



HAL
open science

Relations entre mobilité du sodium, libération du sel et des composés d'arôme en bouche et perception de la saveur : application à des modèles fromagers

Lauriane Boisard

► To cite this version:

Lauriane Boisard. Relations entre mobilité du sodium, libération du sel et des composés d'arôme en bouche et perception de la saveur : application à des modèles fromagers. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS083 . tel-00877715

HAL Id: tel-00877715

<https://theses.hal.science/tel-00877715>

Submitted on 29 Oct 2013

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

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



UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole doctorale Environnements Santé STIC
UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de l'Alimentation

Par

Lauriane BOISARD
Le 14 décembre 2012

Relations entre mobilité du sodium, libération du sel et des composés
d'arôme en bouche et perception de la flaveur :
Application à des modèles fromagers

Directeurs de thèse :

Elisabeth Guichard et Christian Salles

Composition du Jury :

Dr Loïc Foucat	INRA, Nantes	Rapporteur
Pr Eric Spinnler	AgroParisTech, Thiverval-Grignon	Rapporteur
Dr Guillaume Houzé	Fromageries BEL, Vendôme	Examineur
Pr Philippe Cayot	Université de Bourgogne, Dijon	Examineur
Dr Elisabeth Guichard	INRA, Dijon	Directeur de thèse
Dr Christian Salles	INRA, Dijon	Directeur de thèse



UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole doctorale Environnements Santé STIC
UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de l'Alimentation

Par

Lauriane BOISARD
Le 14 décembre 2012

Relations entre mobilité du sodium, libération du sel et des composés
d'arôme en bouche et perception de la flaveur :
Application à des modèles fromagers

Directeurs de thèse :

Elisabeth Guichard et Christian Salles

Composition du Jury :

Dr Loïc Foucat	INRA, Nantes	Rapporteur
Pr Eric Spinnler	AgroParisTech, Thiverval-Grignon	Rapporteur
Dr Guillaume Houzé	Fromageries BEL, Vendôme	Examineur
Pr Philippe Cayot	Université de Bourgogne, Dijon	Examineur
Dr Elisabeth Guichard	INRA, Dijon	Directeur de thèse
Dr Christian Salles	INRA, Dijon	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement Elisabeth Guichard et Christian Salles pour avoir assuré l'encadrement de cette thèse et pour m'avoir fait confiance. Je les remercie pour leur disponibilité, leurs conseils scientifiques et les échanges que nous avons pu avoir.

Je témoigne ma gratitude à Monsieur Loïc Foucat, Ingénieur de Recherches à l'INRA de Nantes, et à Monsieur Eric Spinnler, Professeur à AgroParisTech Thiverval-Grignon, pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail de thèse et pour m'avoir fait l'honneur d'en être les rapporteurs. Je remercie également Monsieur Philippe Cayot, Professeur de l'Université de Bourgogne, et Monsieur Guillaume Houzé, Chargé de Recherches, BEL (France), pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les examinateurs.

Je témoigne ma reconnaissance à Jean-Marie Bonny et Frédéric Gaucheron, membres de mon comité de suivi de thèse, pour les remarques et conseils qui ont enrichi mon travail. Merci également à Sylvie Clerjon pour sa présence aux comités et pour m'avoir éclairée, tout comme Jean-Marie Bonny, sur certains aspects de la RMN. Je remercie également Guillaume Houzé pour sa présence aux comités, et pour m'avoir guidée dans la formulation des modèles fromagers et dans la compréhension des mécanismes moléculaires.

Je remercie tout particulièrement Isabelle Andriot pour son aide et ses conseils tout au long de la thèse. Merci de m'avoir expliqué la RMN et merci d'avoir été aussi investie dans cette thèse, depuis le niveau moléculaire jusqu'au niveau macroscopique ! J'en profite pour remercier également Marie-José Penouilh, Michel Picquet et Alain-Tabard de la plateforme RMN de l'Université de Bourgogne, pour nous avoir guidées, en cas de problème, lors des expériences de RMN.

Je remercie chaleureusement Carole Tournier, ma collègue de bureau depuis 2 ans, pour ses bonnes idées et ses conseils avisés. Je la remercie également pour son aide dans les expériences de suivi de la mastication par électromyographie. J'en profite pour remercier également Claude Yven qui m'avait accueillie auparavant dans ce même bureau lors de mon arrivée en thèse.

Je remercie tout aussi chaleureusement Chantal Septier pour son aide indispensable et sa bonne humeur dans la réalisation et la logistique du profil sensoriel. Un grand merci

également à Vanessa Boissard pour avoir mené ce profil à mes côtés. Son stage de Master 2 a été excellent.

Je remercie Christophe Martin pour ses conseils scientifiques précieux en analyse sensorielle, ainsi que Françoise Durey pour sa bonne humeur et ses conseils concernant la logistique du profil sensoriel. Je remercie également Fabienne Bouillot pour le recrutement très efficace des panélistes qu'elle a effectué. J'en profite pour remercier les 16 panélistes du profil sensoriel pour leur assiduité et leur motivation, ainsi que les 10 sujets des expériences avec APCI-MS.

Je remercie Sylvie Millot pour son aide dans l'établissement des contrats de travail pour les panélistes, ainsi que ses collègues, Laurence Petit et Véronique Ponchelet, pour les nombreuses fois où je les ai sollicitées, aussi bien pour les ordres de mission que pour l'établissement des factures et bons de commande.

Je tiens également à remercier Christine Arnould, de la plateforme de microscopie de l'INRA Dijon, pour son investissement dans la thèse. Merci pour sa persévérance et sa motivation concernant la microscopie confocale. Le transfert de méthode n'a pas été évident, mais nous y sommes parvenues ! Merci également à Christelle Lopez et Marie-Noëlle Madec (INRA Rennes, UMR STLO) pour leur aide dans la mise au point du protocole d'observation des fromages en microscopie confocale. J'en profite pour remercier également Elodie Noirod, de la plateforme de microscopie de l'INRA Dijon, pour son aide et son expérience précieuse en analyse d'images des clichés de microscopie.

Je remercie Christine Achilléos, de l'INRA de Poligny, pour avoir réalisé les mesures rhéologiques des modèles fromagers, ainsi que Céline Lafarge, d'AgroSup Dijon, pour les prétests que nous avons effectués ensemble.

Je remercie Nicolas Deprêtre pour m'avoir aidée dans la mise au point des expériences en chromatographie gazeuse, ainsi qu'Etienne Sémon pour m'avoir aidée à réaliser les expériences en APCI-MS.

Je remercie Laurent Brondel et Caroline Laval pour leur implication lors de la réalisation du protocole des expériences sur l'humain et lors de la préparation du dossier de validation par le Comité de Protection des Personnes. Un travail de titan finalisé en un mois, un record !

Un grand merci à Denis Robert, réparateur et bricoleur hors pair qui m'a sauvé de nombreuses fois sur les dispositifs que j'ai utilisés. Merci également à Jacques Maratray, informaticien (et un peu magicien) qui m'a lui aussi sauvé plusieurs fois, toujours avec sympathie.

Un grand merci à Gayatri Zope, Barbara Bulle, Méghane Baulard, Valérie Febvret et Vanessa Boissard pour leur importante participation dans l'avancée de ce travail au cours de leurs stages respectifs. Merci également à tous les membres de l'équipe 1 du CSGA pour leur accueil chaleureux et leur sympathie.

Cette thèse fait partie d'un dispositif mis en place par la région de Bourgogne et intitulé « Jeune Chercheur Entrepreneur ». Elle a été financée par le conseil régional de Bourgogne que je remercie.

Je ne veux surtout pas oublier de remercier tous mes amis du CSGA ! J'ai partagé avec eux de très bons moments lors de ces trois années de thèse. Expériences scientifiques insolites, délires, soirées en tout genre, notre créativité et notre imagination étaient toujours sollicitées ! Un merci spécial à Laurianne, Chloé, Pierre, Eric, Julie et Rana pour leur bonne humeur et leur amitié à tout moment. Merci également à Maiken, Sandy, Micheline, Francis, Charfedinne, Eloïse et bien d'autres pour leur sympathie. Et je n'oublie pas les filles du CSGA, à l'autre bout... de la rue : Coralie, Carole, Syrina, Aude, Sophie, Amélie, Christine et les autres, merci pour toutes les soirées sympas que nous avons pu faire.

Un immense merci à mes amies d'école d'ingénieur, les « Uis », qui ont toujours été là pour moi. Et un merci spécial à Coralie (et oui, encore elle !) qui a vécu le même parcours que moi : après trois années d'école d'ingénieur ensemble, c'est en thèse à Dijon que nous avons poursuivi notre amitié. Merci pour tout.

Bien sûr, je remercie affectueusement ma famille, et notamment mes parents. Ils m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes projets. Enfin, je remercie Sébastien, qui a été très présent à mes côtés. Merci pour son amour, sa compréhension et son soutien.

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail est de comprendre les effets d'un changement de composition des modèles fromagers sur la mobilité, la libération et la perception de molécules de la saveur (sel, composés d'arôme). Six modèles fromagers aromatisés ont été formulés (3 ratios lipides/protéines (L/P) et 2 teneurs en sel). La microstructure et les propriétés rhéologiques des modèles fromagers ont été caractérisées respectivement par microscopie confocale et par compression uniaxiale. La mobilité des ions sodium a été analysée par RMN ^{23}Na . La cinétique de libération des ions sodium a été suivie dans l'eau, puis dans la salive, en situation de consommation. La libération rétronasale des composés d'arôme a été suivie par nose-space APCI-MS, simultanément au suivi des déglutitions, et de la mastication par électromyographie. Enfin, les propriétés sensorielles des modèles fromagers (intensité salée, arôme, texture) ont été étudiées.

Une diminution du ratio L/P et une diminution de la teneur en sel diminuent la taille des gouttelettes lipidiques et augmentent la fermeté. Cela conduit à une diminution de la mobilité des ions sodium, qui se traduit par une diminution de la quantité de sodium libéré dans la salive et une diminution de la perception salée. De plus, le maximum de libération d'arôme est atteint plus tard et la perception aromatique est diminuée. Ces effets peuvent être expliqués par la répartition lipides/protéines observée en microscopie, par une déglutition plus tardive et une plus grande activité masticatoire.

Mots-clés : modèle fromager, ratio lipides/protéines, sel (NaCl), sodium lié, libération d'arôme, RMN ^{23}Na , APCI-MS, perception.

ABSTRACT

The aim of this work is to understand the effects of changes in the composition of model cheeses on mobility, release and perception of flavor molecules (salt, aroma compounds). Six flavoured model cheeses were formulated (3 lipid/protein (L/P) ratios and 2 salt contents). The microstructure and the rheological properties of the model cheeses were characterized respectively by confocal microscopy and by uniaxial compression test. The mobility of sodium ions was analyzed by ^{23}Na NMR. The kinetics of sodium release was followed in water and then in saliva during consumption of the model cheeses. The retronasal release of aroma compounds was followed by nose-space APCI-MS, simultaneously with the study of swallowing and chewing by electromyography. Then, the sensory properties of the model cheeses (saltiness, aroma, texture) were studied.

A decrease in the L/P ratio and a decrease in salt content reduce the fat droplet size and increase the hardness. This leads to a decrease in sodium ion mobility, which results in a decrease in sodium release in saliva and a decrease in salty perception. Moreover, the maximum intensity of aroma release is reached later and the aroma perception is decreased. These effects can be explained by the observed lipid/protein distribution in microscopy, by the later swallowing and by the higher chewing activity.

Keywords : model cheese, lipid/protein ratio, salt (NaCl), bound sodium, aroma release, ^{23}Na NMR, APCI-MS, perception.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Communications (posters) :

1. **Boisard L.**, Andriot I., Sémon E., Salles C. et Guichard E. (2010). Libération du sodium et des composés d'arôme dans des modèles fromagers aromatisés : influence de la structure et de la composition. *16^e Forum des Jeunes Chercheurs*. 07-08 juin 2010, Besançon, France.
2. **Andriot I.**, Boisard L., Vergoignan C., Salles C. et Guichard E. (2010). Sodium ions in model cheeses at molecular and macroscopic levels. *10th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science*. 13-15 septembre 2010, Clermont-Ferrand, France.
3. **Boisard L.**, Salles C., et Guichard E. (2011). Influence of formulation of model cheeses on salty perception and liking. *9th Pangborn Sensory Science Symposium*. 04-08 septembre 2011, Toronto, Canada.
4. **Boisard L.**, Sémon E., Brondel L., Salles C., Guichard E. (2011). Dynamics of aroma release during cheese consumption: influence of the physiological state. *XIII Weurman Flavour Research Symposium*. 27-30 septembre 2011, Zaragoza, Espagne.
5. **Andriot I.**, Boisard L., Salles C. et Guichard E. (2012). Sodium mobility measured by ^{23}Na NMR explains sodium release in model cheeses. *11th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science*. 26-29 juin 2012, Wageningen, Pays-Bas.
6. Boisard L., Salles C. et **Guichard E.** Salt and fat contents in model cheeses influence the release of sodium ions and aroma compounds. *2012 EFFoST Annual Meeting. A Lunch Box for Tomorrow: An interactive combination of integrated analysis and specialized knowledge of food*. 20-23 Novembre 2012, Le Corum, Montpellier, France.

Communications (présentations orales) :

1. **Boisard L.**, Andriot I., Sémon E., Arnould C., Lopez C., Salles C. et Guichard E. (2010). Structure and composition of flavoured model cheeses impact on sodium and aroma release. *Biopolymères 2010*. 01-03 décembre 2010, Le Croisic, France
2. **Boisard L.**, Andriot I., Arnould C., Salles C. et Guichard E. (2011). Mobilité du sel dans des modèles fromagers. *17^e Forum des Jeunes Chercheurs*. 16-17 juin 2011, Dijon, France.

3. Boisard L., Andriot I., Sémon E., Arnould C., Lopez C., Salles C. et Guichard E. (2011). How does composition of model cheeses affect sodium and aroma release? *7th NIZO Dairy Conference. Flavour and Texture : Innovations in Dairy*. 21-23 septembre 2011, Papendal, Pays-Bas.

4. Boisard L., Tournier C., Sémon E., Noirot E., Guichard E. et Salles C. Changes in salt or fat contents of model cheeses modify *in vivo* aroma release and eating. (flash presentation). *2nd International Conference on Food Oral Processing - Physics, Physiology, and Psychology of Eating*. 1-5 juillet 2012, Beaune, France.

5. Guichard E., Boisard L., Andriot I., Septier C., Sémon E., Tournier C., Salles C. Aroma and salt release and perception in model cheeses are explained by salt/fat contents, microstructure, salt mobility and human physiology. *10th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology*. 16-19 avril 2013, Eisenach, Allemagne (abstract soumis).

Publications :

Andriot I., **Boisard L.**, Vergoignan C., Salles C. and Guichard, E. (2011) Sodium ions in model cheeses at molecular and macroscopic levels. *In Magnetic Resonance in Food Science. An Exciting Future (Special publication No. 332)*. Eds Renou, J.-P., Belton, P. S. and Webb, G. A., pp. 67-70. *The Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK)*.

Boisard, L., Sémon E., Brondel L., Yven C., Salles C. and Guichard E. Dynamics of aroma release during cheese consumption: influence of the physiological state. *In Proceedings of the 13th Weurman Flavour Research Symposium, Zaragoza (Spain) 27-30 septembre 2011. (en cours de parution)*

Boisard, L., Andriot, I., Arnould, C., Achilleos, C., Salles, C., & Guichard, E. (2013). Structure and composition of model cheeses influence sodium NMR mobility, kinetics of sodium release and sodium partition coefficients. *Food Chemistry*, 136, 1070-1077.

Boisard, L., Tournier, C., Sémon, E., Noirot, E., C., Guichard, E., & Salles, C. Effects of salt and fat contents of model cheeses on microstructure, eating events and *in vivo* aroma release. *Flavour and Fragrance Journal (submitted)*.

Boisard, L., Andriot, I., Boissard, V., Septier, C., Salles, C., & Guichard, E. Saltiness in model cheeses is explained by sodium NMR mobility and *in vivo* sodium release. *Food Chemistry (in preparation)*.

ABRÉVIATIONS

ACP	Analyse en composantes principales
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANOVA	Analyse de variances
APCI-MS (atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry)	Ionisation chimique à pression atmosphérique couplée à la spectrométrie de masse
CMR	Carré moyen résiduel
CSGA	Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation
AVC	Analyse en variables canoniques
D ₂ O	Eau deutérée
DQF (signal RMN)	Double quanta filtré (signal RMN)
DTS	Dominance temporelle des sensations
EMG	Electromyographie
HPLC (high performance liquid chromatography)	Chromatographie liquide haute performance
L/P (ratio L/P)	Lipides/Protéines (ratio Lipides/Protéines)
LSD (Least significant differences)	Plus petite différence significative
MCBL	Microscopie confocale à balayage laser
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
MGLA	Matière grasse laitière anhydre
PNNS	Programme national Nutrition - Santé
PTR-MS (proton transfer reaction – mass spectrometry)	Réaction de transfert de protons couplée à la spectrométrie de masse
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SQ (signal RMN)	Simple quanta (signal RMN)
WHO	World Health Organization

TABLE DES MATIERES

Avant-propos.....	29
Introduction.....	31
CONTEXTE SCIENTIFIQUE	
I. La consommation de sel (NaCl) et sa réduction dans les fromages.....	39
1. Approche nutritionnelle	39
2. Stratégies de réduction du sel dans les fromages et les produits fromagers	40
3. Difficultés de la réduction du sel dans les fromages.....	41
a. Teneurs en sodium des fromages	41
b. Rôle du sel dans les fromages	42
II. Intérêt des modèles fromagers pour les études	43
1. Avantages des modèles fromagers par rapport aux fromages réels	43
2. Facilité de formulation des modèles fromagers.....	44
3. Rôle des différents ingrédients des modèles fromagers.....	46
a. Les caséines	46
b. La matière grasse laitière	48
c. Les sels de fonte	50
d. L'eau	53
e. Le pH.....	54
f. Le sel (NaCl)	54
4. Caractérisation de la structure et des propriétés rhéologiques des modèles fromagers.....	56
a. Observation de la microstructure par microscopie.....	56
b. Utilisation de la microscopie confocale.....	56
c. Propriétés rhéologiques des modèles fromagers	59
III. Mobilité et disponibilité du NaCl dans des matrices alimentaires.....	60
1. Mobilité du sodium à l'échelle moléculaire : la résonance magnétique nucléaire (RMN) du sodium.....	60

2.	Mobilité et mouvement du NaCl aux échelles microscopique et macroscopique.....	62
a.	Coefficients de partage eau/matrice du sel	62
b.	Etude <i>in vitro</i> de la diffusion et de la libération du sel.....	63
3.	Libération du NaCl en bouche en situation de consommation.....	65
a.	Rôle de la salive sur la libération du NaCl en bouche	65
b.	Rôle de la mastication sur la libération du sel/du sodium en bouche.....	66
IV.	Mobilité et disponibilité des composés d'arôme dans des matrices alimentaires	68
1.	Les composés d'arôme	68
a.	Rappel de quelques caractéristiques des composés d'arôme	68
b.	Propriétés de partage des composés d'arôme	69
c.	Propriétés de diffusion et de transfert de masse des composés d'arôme	69
2.	Paramètres influençant le partage et la diffusion des composés d'arôme	70
a.	Effet des protéines sur les propriétés des composés d'arôme	70
b.	Effet des lipides sur les propriétés des composés d'arôme	72
c.	Effet de l'eau sur les propriétés des composés d'arôme	73
d.	Effet du NaCl sur les propriétés des composés d'arôme	73
e.	Effet du pH et de la température sur les propriétés des composés d'arôme.....	74
f.	Effet de la texture et de la structure sur les propriétés des composés d'arôme.....	75
3.	Paramètres influençant la libération <i>in vivo</i> des composés d'arôme	76
a.	Le transfert des composés d'arôme jusqu'aux récepteurs olfactifs	76
b.	Effet des protéines sur la libération <i>in vivo</i> des composés d'arôme.....	78
c.	Effet des lipides sur la libération <i>in vivo</i> des composés d'arôme.....	78
d.	Effet du NaCl sur la libération <i>in vivo</i> des composés d'arôme	79
e.	Effet de la texture et de la structure sur la libération <i>in vivo</i> des composés d'arôme	79
f.	Effet de la physiologie orale sur la libération <i>in vivo</i> des composés d'arôme	80
V.	Perception de la saveur des aliments	86
1.	Perception du sel en situation de consommation.....	86

a.	La perception de la saveur salée	86
b.	Effet de la composition et de la texture des matrices alimentaires sur la perception salée	86
2.	Perception des composés d'arôme en situation de consommation.....	88
a.	Effet de la composition des matrices alimentaires sur la perception des arômes	88
b.	Effet de la texture des matrices alimentaires sur la perception des arômes.....	88
3.	Interactions entre la perception des composés d'arôme et la perception salée	89
4.	Quelques informations sur la perception de la texture	91
VI.	Conclusion sur la synthèse bibliographique et démarche adoptée	92

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I.	Mise au point et formulation des modèles fromagers.....	97
1.	Mise au point des modèles fromagers	97
a.	Essais préliminaires	97
b.	Optimisation de la formulation des modèles fromagers	98
2.	Ingrédients.....	99
3.	Formulation finale des modèles fromagers et codification	102
4.	Composition des modèles fromagers.....	103
5.	Fabrication des modèles fromagers.....	104
II.	Caractéristiques des modèles fromagers	106
1.	pH	106
2.	Matière sèche.....	106
3.	Teneur en sodium des modèles fromagers.....	107
4.	Caractérisation de la texture des modèles fromagers	107
5.	Caractérisation de la microstructure des modèles fromagers.....	109
a.	Principe de la microscopie confocale à balayage laser	109
b.	Le choix des fluorochromes : l'identification multiple	111
c.	Méthode de microscopie confocale.....	111
d.	Analyse d'images sur les clichés structuraux de microscopie confocale	112

III.	Etude de la mobilité/libération du sodium	114
1.	Echelle moléculaire : Etude de la mobilité par résonance magnétique nucléaire du sodium (RMN ²³ Na)	114
a.	Brève description de la technique de RMN ²³ Na.....	114
b.	Spécificité et théorie de la RMN du sodium (²³ Na)	114
c.	Application de la RMN du sodium à l'étude des modèles fromagers	115
2.	Echelle macroscopique : Etude des coefficients de partage du sodium eau/modèle fromager 121	
3.	Etude de la cinétique de libération du sodium des modèles fromagers dans une solution aqueuse (libération dynamique produit/eau).....	125
4.	Etudes de la libération du sodium dans la salive	127
a.	Les sujets	127
b.	La procédure.....	127
c.	Analyse des échantillons	128
IV.	Etude de la mobilité et de la disponibilité des composés d'arôme	129
1.	Quantification des composés d'arôme contenus dans les modèles fromagers	129
2.	Etude de l'espace de tête des modèles fromagers	133
3.	Etude <i>in vivo</i> de la libération des composés d'arôme en conditions de mastication	134
a.	Les sujets	134
b.	Procédure	134
c.	Traitement des données obtenues par APCI-MS	136
d.	Suivi de la mastication.....	138
e.	Suivi des déglutitions.....	139
V.	Etude de la perception sensorielle des modèles fromagers	140
1.	Les produits	140
2.	Les juges / Le panel	140
3.	La séance de sélection.....	141
4.	Les séances	141

a.	Familiarisation et élaboration du vocabulaire	142
b.	Création d'un aide-mémoire	145
c.	Entraînement et séances de mesures	147
VI.	Analyses statistiques	148
1.	Analyses statistiques pour les données <i>in vitro</i> de mobilité/libération (sodium et composés d'arôme)	148
2.	Analyses statistiques pour les données <i>in vivo</i> de libération du sel en bouche, de libération des composés d'arôme et de mastication	148
3.	Analyses statistiques pour les données d'étude sensorielle	149
a.	Les sujets	149
b.	Les produits	150

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I.	Caractérisation des modèles fromagers par mesures instrumentales	154
1.	pH des modèles fromagers.....	154
2.	Teneur en matière sèche des modèles fromagers	154
3.	Teneur en sodium des modèles fromagers.....	155
4.	Caractérisation de la rhéologie des modèles fromagers.....	156
a.	Travail à la déformation maximale (<i>W</i>).....	156
b.	Module de déformabilité (<i>MD</i>)	158
5.	Caractérisation de la microstructure des modèles fromagers par microscopie confocale à balayage laser.....	159
a.	Effet du ratio L/P sur la microstructure.....	160
b.	Effet de la teneur en NaCl sur la microstructure.....	160
c.	Cas particulier du modèle fromager L28P20s	161
6.	Analyse d'images des clichés de microscopie confocale.....	161
a.	Pourcentage de surface occupée par les lipides dans les micrographes	161
b.	Taille moyenne des gouttelettes lipidiques	163
c.	Indice de circularité des gouttelettes lipidiques	164

II.	Etude de la mobilité et de la libération du sodium	167
1.	Niveau moléculaire : Etude du sodium par RMN	167
a.	Quantification du sodium.....	167
b.	Etude de la mobilité du sodium	172
2.	Niveau macroscopique : libération et partage du sodium.....	179
a.	Etude de la cinétique de libération des ions sodium (du modèle fromager vers la phase aqueuse).....	179
b.	Etude des coefficients de partage eau/modèle fromager pour le sodium	184
3.	Etude de la libération du sodium dans la salive en situation de consommation.....	186
a.	Effet de la teneur en NaCl sur la libération du sodium en bouche	187
b.	Effet du ratio L/P sur la libération du sodium en bouche	187
c.	Calcul des pentes des courbes de libération du sodium dans la salive.....	188
III.	Etude de la mobilité et de la libération des composés d'arôme.....	191
1.	Quantification des composés d'arôme par extraction Likens-Nickerson.....	191
2.	Suivi de l'activité masticatoire lors de la consommation des modèles fromagers	192
a.	Effet du ratio L/P sur les paramètres masticatoires.....	193
b.	Effet de la teneur en NaCl sur les paramètres masticatoires.....	194
c.	Différences interindividuelles d'activité masticatoire.....	195
3.	Suivi des déglutitions lors de la consommation	195
a.	Etude de la durée avant la première déglutition	195
b.	Etude du nombre de déglutitions pendant la consommation	196
c.	Comparaison de l'activité masticatoire, des déglutitions et des paramètres rhéologiques.....	197
4.	Etude de la libération des composés d'arôme par APCI-MS.....	200
a.	Taux de libération des composés d'arôme avant déglutition (TL_1).....	200
b.	Intensité maximale de libération des composés d'arôme (I_{max}).....	203
c.	Temps pour atteindre l'intensité maximale de libération des composés d'arôme (T_{max})	207
d.	Comparaison des rapports des aires sous la courbe (après/avant la première déglutition) : ratio AUC_2/AUC_1	210

e.	Libération d'arômes <i>in vivo</i> et nombre de déglutitions	213
5.	Etude de la quantité de composés d'arôme en phase vapeur à l'équilibre.....	215
a.	Effet du ratio L/P sur la quantité des composés d'arôme en phase vapeur	216
b.	Effet de la teneur en NaCl sur la quantité des composés d'arôme en phase vapeur	217
IV.	Etudes de la perception sensorielle des modèles fromagers.....	219
1.	Performances du panel	219
a.	Le pouvoir discriminant.....	219
b.	L'accord	220
c.	La répétabilité.....	221
2.	Caractérisation sensorielle globale des modèles fromagers par analyse en variables canoniques (AVC)	222
a.	Effet du ratio L/P sur les caractéristiques sensorielles des modèles fromagers (AVC).....	223
b.	Effet de la teneur en NaCl sur les caractéristiques sensorielles des modèles fromagers (AVC) 224	
3.	Caractérisation sensorielle des modèles fromagers par analyse de la variance (ANOVA) et test LSD de Fisher sur chaque descripteur	224
a.	Descripteurs sensoriels de texture en bouche	224
b.	Description de la saveur salée.....	229
c.	Descripteurs sensoriels de l'arôme	230
	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	233
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	243

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Teneur en sodium de fromages sélectionnés (Holland <i>et al.</i> , 1989).....	42
Tableau 2 : Ingrédients utilisés dans la fabrication des analogues fromagers. Tableau modifié de Guinée <i>et al.</i> (2004).....	45
Tableau 3 : Sels de fonte sodiques utilisés pour la fabrication des fromages fondus (Fox <i>et al.</i> , 1996 ; Mulsow <i>et al.</i> , 2007).....	53
Tableau 4 : Caractéristiques et concentrations des composés d’arôme utilisés dans les modèles fromagers.....	101
Tableau 5 : Correspondance entre ratio Lipides/Protéines (L/P), teneur en sel et codification des modèles fromagers	103
Tableau 6 : Composition des six modèles fromagers formulés.....	104
Tableau 7 : Teneur en matière sèche (MS) et teneur en sodium (Na) des ingrédients des modèles fromagers.....	106
Tableau 8 : Variables rhéologiques obtenues par compression uniaxiale à vitesse constante	109
Tableau 9 : Première liste de descripteurs sensoriels générés par le panel	143
Tableau 10 : Liste affinée des descripteurs sensoriels générés par le panel.....	144
Tableau 11 : Descripteurs sensoriels en bouche figurant dans l’aide-mémoire des panélistes	146
Tableau 12 : Concentrations en NaCl des différentes solutions de référence utilisées pour les échelles Spectrum de l’intensité salée	147
Tableau 13 : Valeurs de pH des six modèles fromagers.....	154
Tableau 14 : Valeurs de matière sèche des six modèles fromagers.....	155
Tableau 15 : Teneurs en sodium des six modèles fromagers (dosage).....	155
Tableau 16 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur les paramètres de rhéologie et de microstructure	166
Tableau 17 : Quantification par RMN du sodium total des modèles fromagers	167
Tableau 18: Quantification par RMN du sodium total des modèles fromagers avec NaCl ajouté (durée d’impulsion : $P_1/4$).....	169
Tableau 19 : Quantification relative du sodium lié par étude du ratio des aires DQ et SQ des signaux RMN : A_{DQ}/A_{SQ} (sodium lié/sodium total).....	170

Tableau 20 : Temps de relaxation longitudinale (T_1), temps de relaxation transversale interne (T_{2s}^{SQ}) et externe (T_{2f}^{SQ}) du signal RMN SQ et pourcentages correspondants de populations (temps de répétition = 150 ms).....	172
Tableau 21 : Matrice des corrélations entre T_1 , T_{2s}^{SQ} , les paramètres de microstructure et les paramètres de rhéologie.....	174
Tableau 22 : Temps de relaxation transversale interne (T_{2s}^{DQ}) et externe (T_{2f}^{DQ}) du signal DQF obtenus par RMN du sodium sur les six modèles fromagers.....	175
Tableau 23 : Temps de création du signal DQF (τ^{opt}) obtenu par RMN du sodium sur les six modèles fromagers.....	176
Tableau 24 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur les paramètres RMN..	178
Tableau 25 : Concentrations finales de libération du sodium dans l'eau	180
Tableau 26 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur les paramètres de libération du sodium dans l'eau (<i>in vitro</i>) et dans la salive (<i>in vivo</i>).....	190
Tableau 27 : Concentrations en composés d'arôme quantifiées dans les modèles fromagers	191
Tableau 28 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur les paramètres de mastication et de déglutition des modèles fromagers.....	199
Tableau 29 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur le paramètre TL_1	202
Tableau 30 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur le paramètre $Imax_2$	206
Tableau 31 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur le paramètre $Tmax_2$	210
Tableau 32 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur la quantité d'arômes dans la phase vapeur à l'équilibre, libérée depuis les modèles fromagers.....	218
Tableau 33 : Accord individuel de chaque juge avec le panel (mai).....	220
Tableau 34 : Accord individuel de chaque juge avec le panel (juin).....	220
Tableau 35 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur la perception sensorielle des modèles fromagers	232

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Action des sels de fonte, avec l'exemple de Na_2HPO_4	51
Figure 2 : Trajet de libération orthonasale et rétronasale des composés d'arôme	77
Figure 3 : Trois profils typiques de courbes de libération de l'hexanal de produits laitiers	84
Figure 4 : Observation par microscopie confocale d'un premier type de modèle fromager (ratio lipides/protéines de 1 et sans NaCl ajouté).....	98
Figure 5: Schéma d'une courbe de compression uniaxiale à vitesse constante : identification des paramètres caractéristiques.....	108
Figure 6 : Schéma expliquant le fonctionnement de la microscopie confocale à balayage laser, d'après Lemiere & Vial (2008).....	110
Figure 7 : Exemple de cliché de microscopie confocale avant analyse d'image (a) et après analyse d'image (b) (modèle fromager L28P20s).....	113
Figure 8 : Echantillon et solution référence utilisés pour les expériences RMN.....	116
Figure 9 : Exemple de spectre de RMN ^{23}Na SQ d'un modèle fromager L20P28s avec une solution de référence $[\text{Na}^+] = 0,40 \text{ M}$ dans du D_2O (1024 scans).....	117
Figure 10 : Dispositif d'étude des coefficients de partage du sodium eau/modèle fromager.....	122
Figure 11 : Exemple de courbe d'étalonnage servant à la détermination de la concentration en sodium avec l'électrode de verre sélective des ions sodium.....	123
Figure 12 : Exemple de courbe d'étalonnage servant à la détermination de la concentration en sodium par HPLC.....	124
Figure 13 : Dispositif de suivi de la cinétique de libération des ions sodium dans l'eau.....	125
Figure 14 : Montage de Likens Nickerson pour l'extraction des composés d'arôme des modèles fromagers.....	131
Figure 15 : Schéma d'un flacon pour l'analyse de la phase vapeur au-dessus d'un échantillon de modèle fromager.....	133
Figure 16 : Schéma illustratif du dispositif d'APCI-MS pour suivre la libération <i>in vivo</i> des composés d'arôme.....	135
Figure 17 : Profil de libération d'arôme en APCI-MS et paramètres étudiés	136
Figure 18 : Profil de libération d'arôme en APCI-MS et paramètres étudiés, avant et après la première déglutition.....	137
Figure 19 : Dispositifs APCI-MS et EMG pour l'analyse simultanée de la libération d'arôme et des contractions musculaires	138

Figure 20 : Emplacement des muscles masséter et temporal (côté droit du visage)	138
Figure 21 : Dimensions d'un morceau de fromage de 4g (\pm 0,2 g) servi lors des séances de notation	140
Figure 22 : Pouvoir discriminant (ANOVA) pour les descripteurs d'odeurs sur quatre répétitions ...	144
Figure 23 : Travail à la déformation maximale (W) et module de déformabilité (MD) des six modèles fromagers.....	156
Figure 24 : Observations de la microstructure des six modèles fromagers (microscopie confocale à balayage laser).....	159
Figure 25 : Surface occupée par les lipides, obtenue par analyse d'images des clichés des six modèles fromagers.....	161
Figure 26 : Taille moyenne des gouttelettes lipidiques, obtenue par analyse d'images des clichés des modèles fromagers	163
Figure 27 : Indice de circularité des gouttelettes lipidiques, obtenu par analyse d'images des clichés des modèles fromagers	164
Figure 28 : Correspondances entre les concentrations en NaCl quantifiées par RMN et les concentrations en NaCl théoriques de cinq solutions de NaCl.....	168
Figure 29 : Ratio sodium lié / sodium total obtenu par quantification absolue du sodium lié	171
Figure 30 : Suivi de la cinétique de libération des ions sodium dans l'eau à l'aide de la sonde sodium membranaire.....	179
Figure 31 : Suivi de la cinétique de libération des ions sodium dans l'eau par prélèvements successifs et dosage des prélèvements	181
Figure 32 : Pentas des courbes de libération <i>in vitro</i> des ions sodium dans l'eau.....	182
Figure 33 : Valeurs moyennes de $T_1/10$ (temps de relaxation longitudinale), T_{opt} (temps de création), R2-5 (pente de libération du sodium entre 2 et 5 min) et W (résistance mécanique) pour les six modèles fromagers	183
Figure 34 : Coefficients de partage du sodium (eau/produit) pour les six modèles fromagers	184
Figure 35 : Libération du sodium en bouche lors de la consommation des modèles fromagers, à T_0 (avant mise en bouche), T_5 (après 5 coups de dents), T_{15} (après 15 coups de dents), T_{30} (après 30 coups de dents) et T_D (avant de déglutir).....	186
Figure 36 : Pentas initiales des courbes de libération <i>in vivo</i> des ions sodium dans la salive.....	188
Figure 37 : Valeurs des paramètres masticatoires mesurés par électromyographie	193
Figure 38 : Durée avant la première déglutition lors de la consommation des six modèles fromagers	195

Figure 39 : Nombre de déglutitions par sujet lors de la consommation, en fonction des modèles fromagers avec ou sans NaCl ajouté	197
Figure 40 : Représentation ACP des valeurs moyennes des données rhéologiques (en vert), des données de mastication (en noir) et des données de déglutitions (en violet) obtenues pour chaque modèle fromager (variant par la teneur en NaCl et le ratio L/P).....	198
Figure 41 : Profil type de libération d'arôme en APCI-MS et paramètres étudiés, avant et après la première déglutition	200
Figure 42 : Variations des valeurs de TL_1 ($=Imax_1/Tmax_1$) en fonction des composés d'arôme et des modèles fromagers	201
Figure 43 : Variations des valeurs de $Imax_2$ en fonction des composés d'arôme et des modèles fromagers.....	204
Figure 44 : Variations des valeurs de $Tmax_2$ en fonction des composés d'arôme et des modèles fromagers.....	208
Figure 45 : Evolution du ratio AUC_2/AUC_1 en fonction des modèles fromagers pour chacun des composés d'arôme	211
Figure 46 : Quantité d'arôme libéré (exemple de la heptan-2-one) et nombre de déglutitions pour les 10 sujets de l'étude.....	213
Figure 47 : Quantité de composés d'arôme dans la phase vapeur : surfaces des pics des chromatogrammes	215
Figure 48 : Quantité d'arômes libérés dans la phase vapeur : surface des pics chromatographiques pondérée par les concentrations en arôme.....	216
Figure 49 : Pouvoir discriminant (ANOVA) du panel au mois de mai	219
Figure 50 : Pouvoir discriminant (ANOVA) du panel au mois de juin.....	219
Figure 51 : Pouvoir discriminant (ANOVA) du panel lors des séances de mesures	221
Figure 52 : Analyse en variables canoniques (AVC) de la perception des six modèles fromagers	223
Figure 53 : Notation des descripteurs morcellement, dureté, compact et élastique pour les six modèles fromagers.....	225
Figure 54 : Comparaison de l'élasticité sensorielle et du module de déformabilité (élasticité rhéologique) pour les six modèles fromagers.....	226
Figure 55 : Notation des descripteurs lisse, gras et collant pour les six modèles fromagers.....	227
Figure 56 : Représentation ACP des descripteurs de texture et des mesures rhéologiques effectuées sur les modèles fromagers.....	228
Figure 57 : Notation de l'intensité salée pour les six modèles fromagers	229

Figure 58 : Notation de l'intensité aromatique globale, de la note fruitée, de la note lactée et de la note beurre pour les six modèles fromagers.....	230
Figure 59 : Schématisation des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur la libération <i>in vivo</i> des composés d'arôme.....	238

AVANT PROPOS

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du premier dispositif Jeune Chercheur Entrepreneur (JCE) mis en place par le Conseil Régional de Bourgogne. Ce dispositif vise à inciter les jeunes chercheurs au développement de projets innovants et à la création d'entreprises. Il permet également de valoriser auprès des entreprises l'innovation issue de la recherche publique.

Ce dispositif offre ainsi un financement pour la réalisation d'une thèse sur 3 ans et l'obtention parallèle d'un master en Administration des Entreprises (AE) de l'Université de Bourgogne. Les bénéficiaires de l'allocation de recherche suivent donc, sur 3 ans, le cursus du master AE de l'Institut d'Administration des Entreprises (IAE) de Dijon, spécialement aménagé pour les doctorants.

De plus, une formation complémentaire à l'entrepreneuriat et au management de l'innovation est proposée aux doctorants. Cette formation de 10 jours est effectuée par différents intervenants du monde industriel. Elle est proposée conjointement par la plateforme PREMICE (Centre Européen d'Entreprise et d'Innovation, Incubateur Régional d'Entreprises Technologiques Innovantes de Bourgogne) et par l'école supérieure de commerce ESC Dijon.

Enfin, chaque jeune chercheur (doctorant) est parrainé par une entreprise. Dans le cas de la présente thèse, le pôle de compétitivité VITAGORA et l'entreprise BEL parrainent le projet.

INTRODUCTION

On appelle communément « sel » le chlorure de sodium noté NaCl. La proportion massique s'approche de 40 % pour les ions sodium Na⁺ et de 60 % pour les ions chlorure Cl⁻. Le sel n'est pas l'unique source d'ions sodium dans l'alimentation, mais il en est la principale avec 90 % de la consommation normale. Les 10 % restants proviennent d'aliments non transformés qui en contiennent naturellement (viandes, œufs, légumes ou laitages). Les ions sodium jouent un rôle important de régulateur de la neutralité du sang, de transmetteur des influx nerveux et de maintien du rythme cardiaque (Hardy, 2004). Le sel est donc un nutriment essentiel.

Toutefois, dans les pays industrialisés, la plupart des habitants en consomment plus que la quantité nécessaire à leurs besoins. La consommation excessive de sodium, sous forme de NaCl est reconnue comme source de pathologies cardiovasculaires, d'hypertension et de rétention d'eau en particulier (Beard *et al.*, 1997 ; Beilin *et al.*, 1999 ; Kaplan, 2000 ; Mickleborough & Fogarty, 2006). C'est pourquoi, l'objectif de réduction de la consommation de sel est au cœur des priorités de santé publique (WHO, 2007), avec deux principaux volets d'action possibles :

- un changement de comportement alimentaire et culinaire des consommateurs, pour lutter, par exemple, contre le choix systématique d'aliments traditionnellement riches en sel, la présence de la salière sur la table, le salage massif des eaux de cuisson, ou le fait de saler automatiquement ses mets sans les avoir goûtés au préalable,
- une réduction de la teneur en sel des aliments, avec optimisation de la libération du sodium en bouche.

C'est ce deuxième volet qui nous intéresse particulièrement. Toutefois, la présence de sel dans les produits alimentaires est souvent indispensable pour assurer leurs qualités organoleptique, hygiénique et/ou technologique. En effet, une réduction de la teneur en sel va non seulement réduire ces indicateurs de qualité mais aussi limiter la durée de conservation des produits (Breslin & Beauchamp, 1997 ; Keast *et al.*, 2004).

Pendant longtemps, les efforts des industries agroalimentaires s'étaient concentrés sur la réduction des coûts de production mais elles doivent, depuis plusieurs années, composer avec les recommandations nutritionnelles, en vue de proposer des produits plus sains. Ainsi, les teneurs en sel, en sucre et en matière grasse sont particulièrement visées. Le challenge est de maintenir les propriétés organoleptiques des produits tout en réduisant les teneurs de ces ingrédients.

Dans les produits tels que les fromages (forte teneur en sel (NaCl) et en matière grasse), le challenge est de taille. En effet, une réduction en sel et/ou en matière grasse impacte inévitablement l'organisation moléculaire de l'aliment et donc toutes les propriétés organoleptiques qui en découlent. Ces changements ont également des conséquences en bouche, lors de la consommation du fromage, puisque ce dernier est déstructuré par la mastication et libère dans la salive le sel et les composés d'arôme qu'il contient.

Malgré une littérature abondante concernant l'étude de modèles fromagers, très peu de projets étudient tous les aspects liés à la mobilité du NaCl et des composés d'arôme à partir du niveau moléculaire, jusqu'au niveau macroscopique, tout en faisant le lien avec la perception sensorielle.

La thèse propose donc une **approche pluridisciplinaire** qui a pour objectif d'étudier la mobilité, la libération et la perception du NaCl et des composés d'arôme à différentes échelles, dans des modèles fromagers.

Une première partie (contexte scientifique) présente un bilan des connaissances concernant les modèles fromagers, le NaCl et les composés d'arôme. En particulier, sont présentés : quelques informations sur la réduction du sel (NaCl) dans les produits alimentaires, les caractéristiques et les avantages des modèles fromagers, un bilan des connaissances concernant les facteurs pouvant affecter la mobilité et la libération du NaCl, en conditions *in vitro* et *in vivo*, les facteurs pouvant affecter la mobilité et la libération des composés d'arôme et enfin, les paramètres influençant la perception salée et la perception aromatique.

Dans la seconde partie (matériels et méthodes), les modèles d'étude sont décrits, ainsi que les techniques et matériels utilisés dans le cadre du travail expérimental. Les protocoles sont expliqués, depuis la fabrication et la caractérisation des modèles fromagers, les mesures de mobilité du sodium, les mesures de libération du sodium et des composés d'arôme (*in vitro* et *in vivo*), jusqu'au protocole du profil sensoriel effectué pour la caractérisation sensorielle des modèles fromagers.

Dans une troisième partie (résultats et discussion), les résultats de caractérisation des modèles fromagers sont tout d'abord présentés (pH, matière sèche, microstructure et rhéologie). Ensuite, les résultats de mobilité et de libération du sodium sont détaillés, depuis le niveau moléculaire (mobilité étudiée par résonance magnétique nucléaire (RMN)), jusqu'au niveau macroscopique *in vitro* et *in vivo*. Les résultats concernant les composés d'arôme sont

également détaillés, à la fois en conditions *in vitro* et *in vivo*. Enfin, les résultats du profil sensoriel effectué sur les modèles fromagers sont décrits et discutés.

Pour terminer, la discussion générale permet de mettre en relation l'ensemble de ces résultats dans le but de comprendre comment la perception du sel et des arômes peut être modulée par le produit (composition, structure, texture) et par le processus en bouche (mastication, déglutition, libération du sel et des composés d'arôme).

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Dans cette partie de contexte scientifique, quelques informations sont tout d'abord données sur la consommation de sel (NaCl) et sur sa réduction dans les fromages. Puisque l'application de la thèse a été réalisée sur des modèles fromagers, nous présentons les caractéristiques et les avantages des modèles fromagers. Un bilan des connaissances est ensuite exposé sur les facteurs qui peuvent influencer la libération du sel et des composés d'arôme, à la fois en conditions *in vitro*, et en conditions de consommation (*in vivo*). Finalement, nous terminons ce contexte scientifique par les paramètres qui peuvent influencer la perception du sel et des composés d'arôme en situation de consommation.

I. La consommation de sel (NaCl) et sa réduction dans les fromages

Tout d'abord, nous resituerons le sel (NaCl) dans un contexte de santé publique. Nous détaillerons ensuite certaines stratégies de réduction du sel, plus particulièrement dans les fromages, puis nous mentionnerons les difficultés rencontrées par les industriels concernant la réduction du sel.

1. Approche nutritionnelle

Les besoins physiologiques quotidiens du corps humain sont de 5 à 6 g de NaCl (soit 2 à 2,4 g de sodium). Mais, les régimes alimentaires des pays occidentaux contiennent, en moyenne, deux à trois fois plus de NaCl que ce qui est nécessaire aux besoins physiologiques. En France, la consommation moyenne de sel atteignait, en 2008, 7,4 g/jour pour les femmes et 9,7 g/jour pour les hommes (Mimran & du Cailar, 2008) ; ces chiffres peuvent même atteindre 12 g/jour pour 10 % des femmes et 23 % des hommes. Mais des apports excessifs de sodium ont des effets indésirables sur la santé. Les effets les plus significatifs sont l'hypertension, les maladies cardiovasculaires, ainsi que l'augmentation d'excrétions calciques, conduisant à l'ostéoporose (Beard *et al.*, 1997 ; Beilin *et al.*, 1999 ; Kaplan, 2000 ; Mickleborough & Fogarty, 2006). Une consommation excessive de sodium conduit à une rétention d'eau et à une augmentation du volume sanguin, pouvant occasionner une élévation de la pression sanguine (Strazzullo *et al.*, 2009). Il a été estimé que 62 % des attaques cardiaques et 49 % des maladies cardiaques étaient dues à des pressions sanguines trop élevées (He & MacGregor, 2010). Néanmoins, l'effet direct de la surconsommation de sel sur les problèmes de santé reste contesté (Hardy, 2004).

Les autorités publiques ont mené de nombreuses actions afin d'atteindre un objectif de 5 g de sel (NaCl) par personne et par jour (AFSSA, 2002 ; WHO, 2007). Ces actions prennent différentes formes, telles que :

- des recommandations visant à réduire la consommation journalière de sodium,
- la déclaration des teneurs en sodium sur les étiquettes des produits alimentaires,
- la tentative de mise en place d'un code couleur nutritionnel d'alerte (vert/orange/rouge). Celui-ci vise à informer les consommateurs, de façon simple et lisible, sur le contenu en sel, sucre et graisses des aliments industriels dont la part va croissant dans notre alimentation. Cette tentative a été rejetée par les députés européens en 2010,
- une augmentation de la demande des produits réduits en sodium, incluant aussi les fromages.

En France, le Programme National Nutrition Santé (PNNS) préconise également une diminution de la consommation de sel. Dans le même temps, la teneur en sel du pain a été réduite de 25 à 20 g/kg de pain. A l'horizon 2013, un objectif de 18 g/kg est envisagé. Par ailleurs, dix-neuf industriels se sont engagés en 2010, en signant une charte d'engagement nutritionnel avec le ministère de la Santé. Cette charte porte sur une réduction des teneurs en sel, en matière grasse ou en sucre de leurs produits.

Afin de procéder à une réduction de la teneur en sodium des aliments, plusieurs possibilités s'offrent aux industriels (Kilcast & Angus, 2007 ; Liem *et al.*, 2011). Certaines d'entre elles sont présentées ci-après, pour les fromages et produits fromagers.

2. Stratégies de réduction du sel dans les fromages et les produits fromagers

Les approches de réduction de la teneur en sel des fromages incluent :

- réduire directement le niveau de sel ajouté (Adams *et al.*, 1995).
- diminuer progressivement le taux de sel des aliments, comme cela a pu être fait sur du pain (Girgis *et al.*, 2003).

- associer des composés exhausteurs de goût à un taux de sel plus faible. En effet, la perception salée diminue lorsqu'on diminue la teneur en sel. Dans des analogues fromagers, ceci implique de compenser avec l'ajout d'ingrédients tels que du monoglutamate de sodium (Kilcast & Angus, 2007), des extraits autolysés de levures (Demott *et al.*, 1986), des poudres de fromages, des pâtes de fromage et/ou des acidifiants (Guinee & Fox, 2004a).
- diminuer ou remplacer les sels de fonte (majoritairement des phosphates de sodium) dans les fromages fondus ou les analogues fromagers, par l'usage sélectif de phosphates dérivés du calcium et du potassium (Henson, 1999).
- substituer complètement ou partiellement le NaCl par d'autres sels tels que KCl, MgCl₂ ou CaCl₂, qui possèdent également une saveur salée (Abou-El-Nour, 1998 ; Fitzgerald & Buckley, 1985 ; Vanderklaauw & Smith, 1995).

Dans le cas de la substitution, la production de Gruyère à teneur réduite en sodium a été testée en remplaçant le NaCl par du MgCl₂ (Lefier *et al.*, 1987). Le fromage contenant le MgCl₂ possédait un goût plus amer et une texture plus souple que le fromage avec NaCl, même s'il était acceptable organoleptiquement. Bien que les substituts du NaCl contribuent à une certaine saveur salée, ils provoquent souvent des arrière-goûts désagréables (amer, métallique, astringent), ce qui a limité leur utilisation dans les produits alimentaires (Lawless *et al.*, 2003 ; Reddy *et al.*, 1995).

Malgré ces pistes de reformulation, la réduction de la teneur en sel dans les fromages reste un challenge pour les industriels. En effet, les fromages contiennent une proportion importante de sel et ce dernier a un rôle prépondérant dans l'élaboration des propriétés du fromage.

3. Difficultés de la réduction du sel dans les fromages

a. Teneurs en sodium des fromages

Les fromages comportent des teneurs en sodium variables, comme le montrent les taux de sodium (Na) de différents fromages (Tableau 1).

Tableau 1 : Teneur en sodium de fromages sélectionnés (Holland *et al.*, 1989)

Type de fromage	Na (mg/100g)
Camembert	650
Cheddar	670
Edam	1020
Emmental	450
Feta	1440
Gouda	910
Mozzarella	610
Parmesan	1090
Roquefort	1670

Malgré des différences de teneur en sodium, la plupart des fromages sont concernés par la réduction du taux de sel (NaCl). Cependant, ces réductions sont freinées par le rôle du sel dans les fromages.

b. Rôle du sel dans les fromages

Le rôle du sel dans le cas des fromages intervient à plusieurs niveaux (Guinee, 2004 ; Hardy, 2004):

- sa contribution à la saveur,
- son action sur l'activité de l'eau (a_w),
- le contrôle de la croissance et de l'activité microbienne,
- le contrôle de différentes activités enzymatiques,
- la synérèse du lait caillé et la diminution d'humidité en résultant (ce qui influence également les paramètres ci-dessus),

- l'induction de changements physiques des protéines fromagères, influençant la texture du fromage, la solubilité des protéines et la conformation des protéines. Du fait de son effet sur l'hydratation des protéines, le sel a aussi une influence majeure sur la microstructure des fromages,
- la qualité du fromage, désignant non seulement la sécurité sanitaire, la qualité nutritionnelle, mais aussi la qualité de la flaveur (saveurs, arômes), de la texture, de l'apparence et de la fonctionnalité (Fox & Cogan, 2004).

Après avoir décrit la consommation de sel et la réduction du sel dans les fromages, le chapitre suivant va permettre de mieux appréhender les modèles d'études que nous avons choisis, à savoir les modèles fromagers, ainsi que leurs ingrédients constitutifs et les modalités d'étude de leur structure et de leur texture.

II. Intérêt des modèles fromagers pour les études

Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord les avantages des modèles fromagers puis les caractéristiques et les fonctionnalités de leurs ingrédients constitutifs.

1. Avantages des modèles fromagers par rapport aux fromages réels

Dans les fromages réels, la salaison par immersion dans une saumure ou par application de sel sec en surface, conduit à un important gradient décroissant de sel depuis la surface vers le centre. En sens inverse, un gradient décroissant d'humidité se produit (Guinee, 1985). Même si ces gradients tendent à disparaître (depuis la croûte vers l'intérieur) du fait de la lente diffusion du sel, le processus est long et imparfait (Hardy, 2004). Dans les fromages de type Cheddar (où le sel est mélangé au lait caillé) ou dans les modèles fromagers, on s'affranchit de ces gradients, tout comme l'on s'affranchit, dans notre cas, de la synérèse. La synérèse correspond à la contraction d'un gel laitier sans force externe qui s'effectue concomitamment avec l'expulsion de lactosérum. Ce phénomène est lié à l'instabilité du réseau gélifié (due à des réarrangements à grande échelle) (Walstra, 1993). L'ajout de sel accentue la synérèse dans les fromages réels (Guinee & Fox, 2004a), alors qu'il ne provoque pas de synérèse dans le type de modèles fromagers étudiés dans ce manuscrit.

L'avantage des modèles fromagers réside aussi dans le fait que la matière grasse et les protéines sont distribuées de manière plus homogène que dans les fromages réels : il y a significativement moins de coalescence des globules gras et ceux-ci sont plus petits (Mulsow *et al.*, 2007). L'autre avantage de ces produits est qu'ils permettent l'incorporation d'ingrédients peu coûteux, en utilisant une technologie simple de fabrication, leur permettant ainsi d'être financièrement intéressants (Bachmann, 2001 ; Eymery & Pangborn, 1988). Il existe un marché pour les analogues fromagers aux Etats-Unis, avec une production annuelle de ~ 300 000 tonnes (Guinee, 2002b), alors que ce marché en Europe est quasi inexistant (Hoogenkamp, 1996).

2. Facilité de formulation des modèles fromagers

Dans la littérature récente, le terme « modèle fromager » peut désigner des formules ayant subi une fermentation bactérienne (Gierczynski *et al.*, 2007), une étape de coagulation par ajout de chymosine (Floury *et al.*, 2009a ; Lauverjat *et al.*, 2009b ; Lawrence *et al.*, 2012) ou désigner un mélange de caséines présure et de matière grasse, additionné de sels de fonte (Phan *et al.*, 2008 ; Tarrega *et al.*, 2008). En réalité, les modèles fromagers qui résultent de ces formulations sont différents, mais appartiennent tous à la catégorie des analogues fromagers. Par définition, la fabrication d'analogues fromagers repose sur l'utilisation de matière grasse, de protéines, d'eau et d'autres ingrédients qui, en mélange, conduisent à la formation d'une pâte homogène (Guinee *et al.*, 2004). Les ingrédients utilisés dans les analogues fromagers, ainsi que leurs fonctions, sont listés dans le Tableau 2. Bien que similaires aux fromages fondus en termes de procédés et de caractéristiques des produits, les analogues fromagers ne sont pas des fromages fondus en tant que tels puisqu'ils n'incluent habituellement pas de fromage naturel comme ingrédient (Guinee *et al.*, 2004).

Tableau 2 : Ingrédients utilisés dans la fabrication des analogues fromagers. Tableau modifié de Guinee *et al.* (2004)

Ingrédients	Effets/fonctions principales	Exemples
Matière grasse	Donner les caractéristiques de texture et de fondant. Participer également aux arômes.	Beurre, matière grasse laitière anhydre, huile de tournesol, huile de palme.
Protéines de lait	Donner les caractéristiques de texture (fermeté) et les propriétés de découpe et d'élasticité lors du chauffage.	Caséines, caséinates, protéines du lactosérum.
Protéines végétales	Présenter un faible coût et une alternative plus durable que les caséines.	Protéines de soja, protéines de cacahuète, gluten de blé.
Amidons	Substituer les caséines et réduire des coûts.	Amidon (natifs ou modifiés) de maïs, de riz ou de pomme de terre.
Sels de fonte	Participer à la formation d'un produit physico-chimiquement stable et modifier les propriétés texturales et fonctionnelles.	Citrates et phosphates de sodium.
Hydrocolloïdes	Améliorer la stabilité du produit et modifier les propriétés texturales et fonctionnelles.	Gomme guar, gomme xanthane, carraghénanes.
Agents acidifiants	Contrôler le pH.	Acide lactique, acétique, citrique, phosphorique.
Arômes	Apporter des arômes dans des bases qui en manquent.	Extraits de bois fumé, épices, fromage modifié enzymatiquement.
Exhausteurs de goût	Accentuer les arômes présents.	NaCl, extrait de levure.
Agents sucrants	Augmenter la perception sucrée, notamment pour les produits à destination des enfants.	Saccharose, dextrose, lactose hydrolysé.
Colorants	Permettre l'obtention de la couleur désirée.	Rocou.
Conservateurs	Prolonger la durée de vie des produits et ralentir la croissance microbienne.	Sorbate de potassium, nisine, propionate de calcium ou de sodium.
Préparations de vitamines et minéraux	Améliorer la valeur nutritive.	Oxyde de magnésium, oxyde de zinc, fer, vitamine A, acide folique.

Les analogues fromagers ont de nombreuses applications, telles que : garniture de pizzas surgelées, tranches de fromages dans les hamburgers, ingrédients dans des salades, sandwiches, sauces et plats préparés.

Du fait de leur manque de saveur, ils ne sont que très peu proposés tels quels à la consommation (Guinee *et al.*, 2004). Il existe trois sortes d'analogues fromagers, en fonction de l'origine des ingrédients utilisés (Mulsow *et al.*, 2007) :

- Les analogues fromagers d'origine laitière (matière grasse laitière et protéines laitières (caséines, caséinates) étant les ingrédients les plus utilisés).
- Les analogues fromagers avec remplacement partiel des ingrédients d'origine laitière (remplacement principalement de la matière grasse laitière par des huiles végétales).
- Les analogues fromagers d'origine non laitière (matière grasse et protéines sont d'origine végétale).

Ces trois types d'analogues peuvent être utilisés dans les applications mentionnées ci-dessus, les coûts de fabrication étant le principal critère de choix du type d'analogue utilisé.

3. Rôle des différents ingrédients des modèles fromagers

Nous avons ciblé dans ce paragraphe le rôle des ingrédients présents dans les modèles fromagers que nous avons utilisés, à savoir des analogues fromagers d'origine laitière, constitués d'un mélange de caséines présure, de caséines acides, de matière grasse laitière, d'eau, d'acide citrique, de sel et de sels de fonte. Ainsi, seuls les rôles de ces ingrédients seront décrits.

a. Les caséines

i. Petit rappel sur les caséines

Parmi les protéines du lait, 80 % sont des caséines, protéines au caractère amphiphile. Les principales caséines sont les caséines α_{s2} , α_{s1} , β et κ , présentes respectivement dans un ratio de 1:4:4:1. Les 20 % de protéines restantes sont les protéines du lactosérum, dont la β -lactoglobuline (50 %) et la α -lactalbumine (20 %) constituent la majeure partie (Smith & Campbell, 2007). Les interactions entre protéines sont gouvernées par une combinaison de forces électrostatiques, de Van der Waals et de répulsions stériques. La fraction de caséines consiste en un ensemble de protéines co-assemblées en super-agrégats et appelées micelles de caséines (Smith & Campbell, 2007).

ii. La caséine présure

- Action de la présure

La présure peut être considérée comme une préparation fonctionnelle d'enzyme qui est adaptée effectivement et naturellement aux buts de la fabrication de fromages (Ye *et al.*, 2000). La chymosine est la principale protéinase constituant les présures traditionnellement utilisées pour la fabrication de fromages. Il s'agit d'une protéinase aspartyl d'origine gastrique, sécrétée par les jeunes mammifères. Le principal rôle de la chymosine dans le processus fromager est un rôle de protéolyse limitée, en présence de Ca^{2+} , et à des températures supérieures à 20°C (fréquemment 30-35 °C). En effet, la chymosine hydrolyse les liaisons Phe105-Met106 des caséines κ , protéines stabilisant les micelles. Les caséines α et β ne sont, quant à elles, presque pas hydrolysées lors de cette étape. L'hydrolyse de la caséine κ provoque la destruction de la stabilité colloïdale des micelles, du fait de la libération du peptide hydrophile C-terminal (appelé glyco- ou caséino-macropéptide). Ceci conduit à une baisse d'hydrophilie et une modification de charges de la micelle de caséine. Un gel présure est ainsi obtenu.

- Obtention de la caséine présure

La caséine présure est obtenue suite à la coagulation du lait par l'action de la chymosine. Le gel présure est broyé et la température est augmentée jusqu'à ~ 55 °C. La synérèse se produit et les particules du lait caillé sont séparées par centrifugation ou tamisage sous vibration. Les particules sont ensuite lavées à l'eau puis pressées pour retirer toute humidité. Finalement, elles sont séchées au moyen d'un tambour ou d'un séchoir (Tamime *et al.*, 2007a), puis broyées à différentes granulométries.

- Utilisation de la caséine présure

Parmi les différents types de caséines et caséinates, la caséine présure est très souvent utilisée pour l'élaboration d'imitations fromagères ou d'analogues fromagers (Guinee *et al.*, 2004). La caséine présure ne cause pas d'effet indésirable sur la saveur du produit fini. Cela est particulièrement important dans le cas des imitations fromagères dans lesquelles la caséine présure est utilisée comme unique source de protéines (Ennis *et al.*, 1998). Néanmoins, la caséine présure s'hydrate plus lentement que d'autres caséines pendant la fabrication des analogues fromagers. Dans le cas d'une hydratation faible, très rapide, des agglomérats de particules de caséine humide se forment, et ils sont difficiles à dissoudre. Ces amas vitreux de protéines sont couramment nommés « fish eyes » (Aimutis, 1995 ; Ennis *et al.*, 1998).

iii. La caséine acide

- Obtention de la caséine acide

Un autre type de caséines est parfois utilisé : la caséine acide. Cette caséine est obtenue par acidification chimique du lait écrémé. Les acides utilisés peuvent être des acides organiques (ex : acide chlorhydrique), de l'acide lactique ou de l'acide sulfurique. Le lait écrémé est chauffé sous agitation, à 30 ou 45 °C avant que l'acide ne soit ajouté, jusqu'à atteindre le point isoélectrique des caséines ($\text{pH}_i \approx 4,6$). Comme pour la caséine présure, la synérèse se produit et les particules du lait caillé sont séparées par centrifugation ou tamisage sous vibration, lavées à l'eau, pressées pour retirer toute humidité puis séchées au moyen d'un tambour ou d'un séchoir (Tamime *et al.*, 2007a). Elles sont ensuite broyées à différentes granulométries.

- Utilisation de la caséine acide

Les caséines acides contiennent très peu de calcium et sont à peine capables de former un réseau ; elles ne contribuent pas à l'acquisition de la structure ferme des fromages mais elles sont souvent ajoutées en quantité entre 3 et 6 %, en tant qu'« additif fonctionnel » dans les imitations fromagères. Cependant, ajoutées en excès (plus de 3,5 %), les caséines acides peuvent avoir un effet négatif sur la flaveur du produit (Ennis & Mulvihill, 1997). Ce problème peut également être rencontré avec des caséinates sodium à dissolution rapide (Ennis & Mulvihill, 1997). Contrairement à l'action de la présure, l'acidification induit une déminéralisation importante des caséines acides (Soupe, 2004), ce qui permet ensuite une meilleure hydratation ultérieure de la caséine acide, comparativement à la caséine présure (Guinee & Fox, 2004b). A partir de la caséine acide, des caséinates de sodium peuvent être obtenus par dissolution de caséine acide en milieu alcalin (NaOH). Ces produits sont solubles dans l'eau.

b. La matière grasse laitière

Dans le lait naturel (de vache), la matière grasse représente en moyenne 3,9 % de la composition chimique (Walstra & Jenness, 1984). Elle existe sous la forme de petits globules gras de taille variant de 0,2 à 15 μm , avec une moyenne de 4 μm (Michalski *et al.*, 2004). Ces globules sont entourés de protéines membranaires et la taille des globules dépend de la lactation et de l'alimentation de la vache. Les triacylglycérols constituent 98 % des lipides de ces globules. Ces derniers sont dispersés dans une phase aqueuse, le plasma, qui est un mélange colloïdal de micelles de caséines, de protéines du sérum, de sucres et de minéraux (Walstra & Jenness, 1984).

Dans la plupart des fromages, la présence de matière grasse est nécessaire au développement du profil aromatique caractéristique (Spinnler, 2011) et de la sensation en bouche. En émulsion huile-dans-eau, les globules gras sont soit stables, soit déstabilisés, entraînant dans ce deuxième cas des phénomènes tels que l'écémage, la floculation, ou la coalescence. Dans un fromage, les globules gras sont piégés physiquement dans le réseau protéique créé lors de la formation du gel. Selon Horne & Banks (2004), la matière grasse ne posséderait pas de rôle actif dans la formation du gel mais elle participerait aux propriétés rhéologiques du produit obtenu à partir du lait caillé. Cette version est contestée, et un débat a lieu pour savoir si les globules gras agissent comme un matériel inerte de remplissage en créant des discontinuités au sein de la matrice de caséines, ou s'ils participent directement à la microstructure des fromages en se liant aux matrices de caséines. Sans aucun doute, les deux mécanismes ont lieu, les plus gros globules gras étant plutôt désignés comme « perturbateurs » de la matrice, sous forme de matière grasse libre piégée, alors que les plus petits globules seraient plutôt bloqués dans les espaces vides des protéines (Everett, 2007 ; Michalski *et al.*, 2004). En réalité, la force exercée par le réseau protéique sur les globules gras influence la taille et la forme des globules (Everett, 2007) et des caséines peuvent s'adsorber autour des gouttelettes lipidiques pour les stabiliser (Horne & Banks, 2004).

La considération de la matière grasse dans les modèles fromagers implique également de connaître la forme sous laquelle elle se présente. Ainsi, la répartition des globules gras dans des fromages a été étudiée à de nombreuses reprises. Une diminution d'agrégation des globules gras et une plus grande fraction volumique de la phase protéique ont été observées suite à la réduction de la teneur en matière grasse de Cheddar. Cette diminution a aussi conduit à une diminution de la taille et du nombre de cavités disponibles pour la matière grasse, résultant en un réseau protéique plus épais (Bryant *et al.*, 1995). De plus, la taille des globules gras est plus uniforme dans les Cheddars réduits en matière grasse, et les globules sont plus dispersés, comparativement aux Cheddars non réduits (Mistry & Anderson, 1993). A l'inverse, des spécialités fromagères ou des Cheddars plus riches en matière grasse possèdent de plus grosses gouttelettes lipidiques (Auty *et al.*, 1999 ; Wendin *et al.*, 2000). L'agrégation des globules gras pour des teneurs en matière grasse plus élevées peut être due au cisaillement pendant la fabrication.

La répartition des globules gras influence également les propriétés rhéologiques des produits fromagers. Dans des fromages fondus, une réduction de la taille des gouttelettes lipidiques est associée à une augmentation de fermeté (Kalab *et al.*, 1987 ; Lee *et al.*, 1981), alors que des gouttelettes lipidiques de taille plus importante conduisent à des fromages plus mous (Guinee *et al.*, 2004). Les globules gras ont donc un impact sur la rhéologie, en créant des discontinuités partielles dans la matrice fibreuse de caséines, rendant ainsi les produits fromagers plus mous (Everett, 2007 ; McMahon *et al.*, 1999).

Lors du refroidissement des analogues fromagers, la matière grasse passe de l'état liquide à l'état cristallin, produisant ainsi une forte augmentation de viscosité (à 4 °C, la matière grasse laitière est sous forme cristallisée). Ainsi, à faible température, les analogues fromagers peuvent être considérés comme un matériau composite comprenant des globules gras dispersés (Guinee *et al.*, 2004).

c. Les sels de fonte

Le terme de sels émulsifiants, longtemps employé pour désigner les sels de fonte, n'est pas correct car ces sels ne possèdent pas de réelles propriétés émulsifiantes (Fox *et al.*, 1996). Les sels de fonte n'agissent pas de façon active sur les surfaces mais ils ont le pouvoir de déclencher de nombreux processus physico-chimiques qui vont finalement augmenter les propriétés émulsifiantes des protéines (caséines). En effet, les protéines ont certes des capacités émulsifiantes mais, notamment du fait du traitement thermique, ces capacités sont très insuffisantes pour conserver les globules gras sous forme dispersée dans la matrice protéique. C'est pour cette raison que les sels de fonte sont utilisés.

Les sels de fonte sont utilisés pour la fabrication des fromages fondus et des analogues fromagers. Selon la nature des sels utilisés, ils sont ajoutés dans des proportions allant de 1 à 3 g.100g⁻¹. Les sels de fonte évitent la fuite de matière grasse (« oiling-off ») et l'exsudation d'humidité pendant la fabrication et le refroidissement. En effet, en liant le calcium, ils augmentent l'hydratation des protéines et l'émulsification de la matière grasse libre. Associés à la chaleur et au cisaillement pendant le process, ces sels convertissent la para-caséine insoluble en para-caséinate de sodium hydraté, montrant ainsi une plus grande capacité de liaison à l'eau (Caric *et al.*, 1985). L'augmentation de la capacité de liaison à l'eau du para-caséinate conduit à une immobilisation d'eau et, par conséquent, à une augmentation suffisante de la viscosité apparente (Guinee *et al.*, 2004).

Le para-caséinate permet, pendant le process, l'émulsification des gouttelettes lipidiques dispersées et contribue à la formation d'une émulsion huile-dans-eau stable, en réduisant l'énergie libre interfaciale de la phase lipidique (Guinee, 2002b). Une fois les ponts calcium-phosphate cassés, les protéines se réassocient ensuite pour former une structure en réseau, responsable de l'augmentation de viscosité apparente. Ainsi, lorsque des sels de fonte sont introduits à une formulation, la réémulsification de la matière grasse libre, ainsi que la réhydratation des protéines deviennent possibles, et un produit stable, lisse et homogène peut être obtenu (Fox *et al.*, 1996 ; Guinee *et al.*, 2004 ; Shimp, 1985).

Les effets causés par l'addition de sels de fonte ont été largement étudiés (Caric *et al.*, 1985 ; Cavalier-Salou & Cheftel, 1991 ; Fox *et al.*, 1996 ; Guinee *et al.*, 2004 ; Marchesseau *et al.*, 1997 ; Shimp, 1985) et sont les suivants :

- séquestration du calcium (échange d'ions),
- augmentation du pH et effet tampon (stabilisation du pH),
- hydratation et gonflement des para-caséines,
- émulsification de la matière grasse,
- stabilisation de l'émulsion huile-dans-eau,
- formation de la structure (notamment lors du refroidissement),
- obtention d'un mélange homogène et lisse.

Il est admis que la principale fonction des sels de fonte est de séquestrer le calcium. La Figure 1 ci-dessous illustre le phénomène de séquestration du calcium.

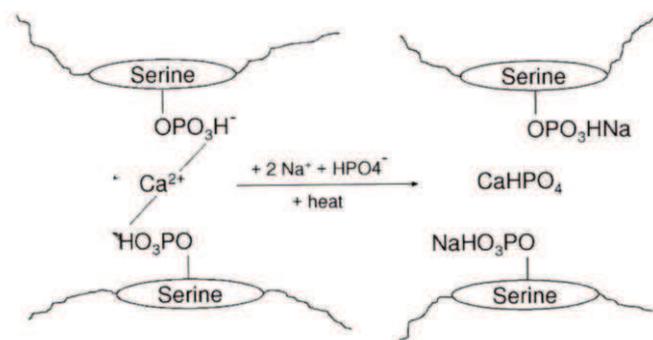


Figure 1 : Action des sels de fonte, avec l'exemple de Na₂HPO₄

La séquestration est basée sur l'échange des ions divalents Ca^{2+} , attachés aux caséines, par l'ion monovalent Na^+ des sels de fonte. Cet échange réduit l'étendue d'action de pontage du calcium (qui liait transversalement et agrégeait les molécules de para-caséines) et rompt l'intégrité structurale de la caséine. La séquestration du calcium provoque une hydratation partielle de la para-caséine insoluble, conduisant ainsi à une conversion en para-caséinate de sodium phosphaté (Caric *et al.*, 1985 ; Marchesseau *et al.*, 1997). En conséquence, le caséinate solubilisé est capable d'interagir avec l'eau et les interfaces lipidiques dans la masse fromagère. Pendant le processus de fabrication, les para-caséinates hydratés de la phase aqueuse revêtent la surface des gouttelettes lipidiques libres et dispersées, conduisant à leur émulsification par la formation d'interface. Il est clair que la concentration en sels de fonte, ainsi que l'intensité de cisaillement déterminent la distribution de la matière grasse et la taille des gouttelettes lipidiques et, par conséquent, la microstructure et la texture des analogues fromagers (Caric *et al.*, 1985). En effet, plus l'émulsification avance, plus la taille des globules gras des analogues fromagers est petite (Caric *et al.*, 1985). Cette taille des globules gras diminue également quand les conditions de fabrication sont plus vigoureuses (Kalab *et al.*, 1987), ce qui augmente la surface spécifique d'interface (Ollivon, 2006). Par ailleurs, le type de sel de fonte influence la taille des globules gras (Mulsow *et al.*, 2007), et la quantité de sels de fonte affecte également la structure et la fermeté d'imitations fromagères (El-Bakry *et al.*, 2010) : une réduction de la teneur en sel de fonte provoque une diminution de la taille des globules gras et une augmentation de la fermeté, à cause d'une moindre hydratation des caséines.

Parmi les sels de fonte utilisés, les principaux sont des sels sodiques d'acide phosphorique et d'acide citrique, incluant les citrates de sodium, les ortho-, pyro- et polyphosphates de sodium, et d'autres mélanges de phosphates. Les sels de fonte sont souvent utilisés en mélange car ils ont des propriétés complémentaires, comme le montre le Tableau 3.

Tableau 3 : Sels de fonte sodiques utilisés pour la fabrication des fromages fondus (Fox *et al.*, 1996 ; Mulsow *et al.*, 2007)

Groupe	Sels de fonte	Exemples	Capacité tampon	Emulsification	Echange d'ions
Citrates	Citrate de mono-, di-, ou trisodium	Citrate de trisodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	forte	faible	faible
Orthophosphates	Phosphate de mono-, di-, ou trisodium	Phosphate de trisodium (Na_3PO_4)	forte	faible	faible
Pyrophosphates	Diphosphate de di-, tri-, ou tétrasodium	Diphosphate de trisodium ($\text{Na}_3\text{HP}_2\text{O}_7$)	modérée	très forte	modérée
Polyphosphates	Tripoly-hexaphosphate de pentasodium ; tétrapoly-hexamétaphosphate de sodium	Polyphosphate de sodium (sel de Graham : $\text{Na}_{k+2}\text{P}_k\text{O}_{3k+1}$)	faible à très faible	très forte (k = 3-10) à faible	forte à très forte

Les polyphosphates ont une forte capacité à complexer le calcium, conduisant à la rupture de la structure des caséines micellaires et à une plus grande disponibilité des molécules de caséine à former un réseau. Les phosphates de sodium ($\text{Na}_{k+2}\text{P}_k\text{O}_{3k+1}$) sont habituellement utilisés pour la production de fromages fermes, non destinés à être fondus. Cette fermeté est liée à l'augmentation des interactions dans la matrice protéique, puisque les polyphosphates présentent des liaisons intenses, et sont donc responsables du développement de la structure interne de la matrice protéique (Guinee *et al.*, 2004). Cependant, l'usage excessif de phosphates peut conduire à la dégradation des caséines et au développement d'un arrière-goût amer (Mayer, 2001).

d. L'eau

Lors de la fabrication des analogues fromagers, l'eau a pour rôle de dissoudre les sels de fonte, d'hydrater les protéines et de permettre la dispersion des ingrédients. Elle conduit également à une diminution de la fermeté, associée à une augmentation du caractère fondant des fromages (Hennelly *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2004).

Dans des analogues fromagers, la fermeté, exprimée par le module de conservation (G' , en Pa), a été trouvée deux fois plus élevée dans les fromages avec une teneur en humidité de $53 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ que dans ceux avec $58 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ d'humidité (Pereira *et al.*, 2001). La diminution de fermeté peut être attribuée à une amélioration de l'hydratation, à un réseau de caséines plus lâche dû à cette hydratation (Marshall, 1990), et à la réduction du ratio protéine/eau (Ennis *et al.*, 1998 ; Fox *et al.*, 1996). Par ailleurs, la taille des gouttelettes lipidiques diminue et leur nombre augmente lorsque la teneur en humidité diminue (Hennelly *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2004 ; Pereira *et al.*, 2001). De plus, les analogues fromagers sont plus fermes et contiennent plus de protéines insolubles lorsque la teneur en matière sèche augmente (diminution de la teneur en eau) (Floury *et al.*, 2009a).

e. Le pH

Le pH influence la rhéologie et la microstructure des fromages fondus et des analogues fromagers. Il agit sur les interactions protéine-protéine et sur l'hydratation des caséines, mais aussi sur la séquestration du calcium causé par les sels de fonte. A pH 6-7, les caséines sont chargées négativement et ont donc un attrait important pour les ions Na^+ (Gaucheron, 2004). Le sodium peut donc se lier aux caséines (Gál & Bányai, 1971 ; Hardy & Steinberg, 1984) et favoriser leur hydratation. Par ailleurs, l'augmentation de pH est connue pour accroître le caractère hydrophile des protéines de lait, du fait de leur charge négative plus importante (Gaucheron, 2004). Le réseau protéique est plus lâche et moins compact, du fait d'interactions plus faibles entre les protéines (Awad *et al.*, 2002). De plus, une augmentation de pH diminue le diamètre moyen des globules gras dans des modèles fromagers (Floury *et al.*, 2009a), ce qui influence également les propriétés rhéologiques de ces produits. Pour plus d'informations sur les effets du pH, mais aussi de la température dans des analogues fromagers, le lecteur peut se référer à Mulsow *et al.* (2007).

f. Le sel (NaCl)

L'effet du sel sur l'hydratation des caséines a été étudié dans du lait écrémé emprésuré (Creamer, 1985). L'addition de 5% de NaCl a provoqué une augmentation des niveaux de calcium dans le sérum et une augmentation de l'hydratation des caséines. L'augmentation de l'hydratation des caséines en présence de NaCl peut être attribuée à la liaison des ions Na^+ avec les caséines (Gál & Bányai, 1971 ; Hardy & Steinberg, 1984) et au déplacement du calcium ou du phosphate de calcium provenant des para-caséines par le Na^+ .

Les interactions entre les ions Na^+ et les caséines ont lieu entre les résidus phosphosérine des caséines et les ions Na^+ , via des liaisons électrostatiques. Ces interactions dépendent des protéines (type de caséine, charge) et de leur environnement (pH, force ionique, température) (Gaucheron, 2004). L'addition de NaCl crée un échange d'ions sodium-calcium avec les paracaséines, en quelque sorte similaire à l'échange d'ions produit entre les sels de fonte (phosphates et citrates de sodium) et la matrice de caséines lors de la fabrication des fromagers fondus. En effet, une relation inverse entre l'hydratation des caséines et le calcium lié aux caséines a été décrite par de nombreux auteurs dans des systèmes modèles. Par exemple, l'addition de 0 à 1,4 % de calcium (w/w) dans de la Mozzarella (par injection à haute pression d'une solution de CaCl_2 à 40%) augmente les interactions caséines-caséines et diminue ainsi l'hydratation des caséines (Pastorino *et al.*, 2003b). Une concentration en sel plus importante provoque un gonflement et une absorption d'eau de la phase protéique dans de la Mozzarella (Guo *et al.*, 1997) et dans du Munster (Pastorino *et al.*, 2003a), du fait des interactions protéines-eau (Gaucheron, 2004). Par conséquent, la Mozzarella sans sel présente, par exemple, une matrice protéique plus ouverte et plus lâche que son homologue salé. Dans des modèles fromagers emprésurés, le sel agit également sur le processus de gélification de la présure, en le ralentissant (Famelart *et al.*, 1999). Par ailleurs, à faible concentration de sel, la solubilité des protéines a tendance à augmenter légèrement (« salting in ») alors qu'elle a tendance à diminuer lorsque la concentration en sel est haute (« salting out »), provoquant la précipitation des protéines (Craescu, 2004).

Ces données concernant les caractéristiques des modèles fromagers ont mis en évidence l'effet des ingrédients sur la structuration des modèles fromagers et ont montré que la microstructure pouvait finement varier lorsque la composition était modifiée. La caractérisation de cette microstructure est importante non seulement pour la compréhension des propriétés rhéologiques des modèles fromagers, mais aussi pour comprendre l'environnement dans lequel évoluent les molécules responsables de la flaveur, et notamment celles qui nous intéressent particulièrement : le sel (NaCl) et les composés d'arôme. Le paragraphe suivant s'intéresse donc à la microstructure et aux propriétés rhéologiques des modèles fromagers.

4. Caractérisation de la structure et des propriétés rhéologiques des modèles fromagers

Tout d'abord, les possibilités d'étude de la microstructure des modèles fromagers sont présentées, en s'intéressant plus spécifiquement à la technique de microscopie confocale, puisque c'est la technique que nous avons décidé d'utiliser pour l'observation de la microstructure des modèles fromagers de nos études. Ensuite, l'étude des propriétés rhéologiques des modèles fromagers est présentée.

a. Observation de la microstructure par microscopie

La structure des analogues fromagers est fréquemment décrite comme étant une émulsion concentrée de gouttelettes lipidiques sphériques incrustées dans une matrice protéique hydratée et dont la taille varie entre 1 et 10 μm (Auty *et al.*, 2001). Plus précisément, la structure des matrices protéiques résulte des interactions entre protéines, mais aussi des interactions entre les para-caséinates recouvrant les globules gras et les para-caséinates dispersés (Fox *et al.*, 1996).

Plusieurs types de microscopie permettent l'observation de la microstructure des produits laitiers (Tamime, 2007), comme la microscopie optique, la microscopie électronique à transmission (MET), la microscopie électronique à balayage (MEB) ou la microscopie confocale. Toutes ces techniques permettent de visualiser la structure des globules gras et des protéines dans différents produits laitiers (Tamime (2007) et références associées), mais nous axerons ici nos descriptions sur la microscopie confocale, car c'est la technique la plus pertinente pour bien différencier les protéines de la matière grasse (Ong *et al.*, 2011).

b. Utilisation de la microscopie confocale

i. Avantages de la microscopie confocale

Contrairement à la microscopie de fluorescence conventionnelle, et à sa perte de résolution axiale due à la superposition d'informations issues des plans adjacents, la microscopie confocale permet de pallier cet inconvénient. En effet, son principe est de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans le plan (Filipe, 2007).

En microscopie optique traditionnelle, mais aussi en MET, les échantillons épais ne sont pas appropriés pour des observations microstructurales. Seules les très fines sections d'échantillons, obtenues principalement par des coupes au microtome, sont observables. L'inconvénient de telles coupes réside dans le fait qu'elles peuvent parfois provoquer des destructions d'éléments structuraux si l'échantillon est fragile. Des artefacts peuvent avoir lieu durant les étapes de sectionnement, ce qui peut, par la suite, rendre l'interprétation d'images difficile. En MEB, les échantillons doivent être secs et conducteurs (Tamime *et al.*, 1990) et, avec cette technique, si des bulles d'air sont présentes, elles peuvent être assimilées à des globules gras, ce qui n'est pas le cas en microscopie confocale (Sutheerawattananonda *et al.*, 1997).

Un avantage de la microscopie confocale est donc que cette technique permet l'observation d'échantillons avec une procédure minimale de préparation (sans fixation ni déshydratation), due à ses possibilités uniques de sections optiques et à sa haute résolution spatiale. De ce fait, elle se révèle très intéressante pour l'étude d'échantillons non modifiés (Auty *et al.*, 1999). Cela est notamment dû à la capacité du laser à pénétrer en profondeur, mais de façon non invasive dans l'échantillon (Wright *et al.*, 1993). Un grand nombre de sections optiques séquentielles peut également être généré pour permettre ensuite la visualisation numérique d'images en 3 dimensions (Heertje *et al.*, 1987). Des phénomènes de transports et de process dynamiques peuvent ainsi être étudiés sur des cellules (Auty *et al.*, 1999 ; Heertje *et al.*, 1990 ; Wright *et al.*, 1993) mais ils n'ont pas été utilisés pour notre étude.

La technique de microscopie optique confocale permet aussi l'identification et la localisation de plus d'un composé chimique à la fois (en fonction du nombre de faisceaux lasers disponibles) par une technique de labellisation spécifique (Herbert *et al.*, 1999a). Des sondes fluorescentes peuvent être utilisées pour identifier des composants spécifiques des aliments (Heertje *et al.*, 1987). La colocalisation est permise par l'utilisation de plusieurs sondes fluorescentes (ou mélange de sondes), dans des solvants adaptés, à des concentrations appropriées et à des longueurs d'ondes spécifiques (Auty *et al.*, 2001). Par exemple, la colocalisation de protéines et de matière grasse est possible dans des émulsions et des aliments réels, avec des marqueurs séparés (Auty *et al.*, 2001 ; Herbert *et al.*, 1999b), mais seulement si les filtres et les émissions de fluorescence des colorants sont bien séparés (Herbert *et al.*, 1999a).

ii. Quelques applications de la microscopie confocale

A la fin des années 1980, la microscopie confocale a commencé à être utilisée pour l'étude de la microstructure des fromages (Heertje *et al.*, 1987), en complément de la MEB et de la MET. La microscopie confocale s'est aussi révélée être très adaptée pour caractériser la microstructure de gels laitiers tels que des yaourts ou des gels acidifiés (Hassan *et al.*, 1995 ; Lucey *et al.*, 1998) et pour mettre en évidence les réseaux de particules de caséines dans ces produits. Plus tard, elle a été utilisée sur des crèmes glacées afin d'évaluer l'effet d'un remplacement de saccharose par du tréhalose sur la microstructure (Bannatyne, 2001). Elle a aussi été utilisée pour observer les exopolysaccharides bactériens dans des yaourts brassés (Hassan *et al.*, 2002).

Les études de microscopie confocale permettent de mieux comprendre la distribution de la matière grasse dans des matrices alimentaires complexes. Parmi les premiers, Marshall (1990) a observé des analogues de fromages fondus et a mis en évidence un réseau protéique de granulométrie plus fine lorsque la teneur en matière grasse augmentait. D'autres observations ont ensuite été réalisées sur différents types de fromages, permettant de caractériser la microstructure des produits, et notamment la répartition des protéines et de la matière grasse. Dans des fromages à pâte pressée cuite, comme l'Emmental, la matière grasse se trouve sous forme de larges zones de forme indéfinie (Lopez *et al.*, 2008), alors que les globules sont quasiment intacts dans des fromages à pâte molle tels que le Camembert (Everett, 2007). La taille des globules peut être diminuée efficacement dans des fromages à pâte molle en utilisant, par exemple, la technologie d'ultrafiltration (Michalski *et al.*, 2004). Des fromages tels que le Cheddar possèdent une matrice protéique continue contenant des globules gras de formes irrégulières, alors que la Mozzarella contient des protéines et de la matière grasse alignées presque linéairement. Les fromages fondus sont des systèmes de type émulsion, avec une phase protéique homogène contenant des gouttelettes lipidiques sphériques de 2 à 25 μm (Auty *et al.*, 2001).

Les images obtenues en microscopie confocale sont particulièrement propices à l'analyse d'image puisque les images se présentent déjà sous forme digitale. Sur des fromages, la taille, la surface mais aussi la répartition des globules gras peuvent ainsi être étudiées (Fenoul *et al.*, 2008 ; Pereira, 2000).

L'ensemble des travaux décrits montre que la microstructure des modèles fromagers dépend de leur composition et des conditions de fabrication. La composition et la microstructure associée influencent ensuite, à leur tour, les propriétés rhéologiques des produits, mais aussi la texture et la flaveur des fromages (Everett & Auty, 2008).

c. Propriétés rhéologiques des modèles fromagers

Les propriétés rhéologiques du fromage sont l'expression macroscopique de la structure de la matrice du fromage, c'est-à-dire de sa composition et de son organisation (Beuvier & Buchin, 2004). Les relations entre structure et propriétés rhéologiques des fromages ont été décrites dans de nombreuses publications (Awad *et al.*, 2002 ; Cunha *et al.*, 2010 ; El-Bakry *et al.*, 2010 ; Flourey *et al.*, 2009a ; Hennelly *et al.*, 2005 ; Lobato-Calleros *et al.*, 1998 ; Marshall, 1990 ; Panouillé *et al.*, 2011 ; Wilkinson *et al.*, 2000). En règle générale, des microstructures avec un réseau protéique plus rigide, plus compact et avec de petits globules gras conduisent à des modèles fromagers dont les propriétés rhéologiques traduisent des produits plus fermes. L'augmentation de fermeté peut être expliquée par une augmentation des interactions protéines-protéines (El-Bakry *et al.*, 2010). A l'inverse, des microstructures avec un réseau protéique plus lâche et de gros globules gras conduisent à des produits plus mous. Mais ce n'est pas seulement la microstructure qui affecte les propriétés rhéologiques. L'augmentation de la durée et de la température de fabrication de fromages fondus peut aussi induire une augmentation de fermeté (Kalab *et al.*, 1987 ; Lee *et al.*, 2003), tout comme la durée de saumurage dans de la Mozzarella (Cervantes *et al.*, 1983). Enfin, la nature de la matière grasse peut affecter les propriétés rhéologiques d'analogues fromagers : les analogues comportant les matières grasses les plus molles ont des valeurs plus faibles du module d'élasticité (Jaros *et al.*, 2001).

Nous venons d'expliquer que la composition des modèles fromagers influençait la structure et les propriétés rhéologiques, mais ces changements d'environnements sont aussi susceptibles de modifier le comportement des autres ingrédients. Dans le cas de cette thèse, les composés d'intérêt des modèles fromagers sont le sel (NaCl) et les composés d'arôme. Ainsi, l'effet de la composition sur le comportement de ces composés est présenté dans les chapitres suivants, en débutant par l'étude du comportement du NaCl (mobilité et disponibilité).

III. Mobilité et disponibilité du NaCl dans des matrices alimentaires

Dans ce chapitre, nous précisons les paramètres qui peuvent influencer la mobilité et la libération du sodium dans différentes conditions d'étude. Ces conditions débutent au niveau moléculaire, à l'échelle des interactions des ions Na^+ avec les autres molécules, et se poursuivent jusqu'à l'étude macroscopique de la libération du sodium dans une phase aqueuse, que ce soit dans de l'eau, ou dans la salive en bouche, en conditions de consommation.

1. Mobilité du sodium à l'échelle moléculaire : la résonance magnétique nucléaire (RMN) du sodium

Dans sa forme la plus simple, la technique de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) consiste à placer un échantillon dans un champ magnétique, exciter les noyaux de l'échantillon à un état d'énergie plus élevée, puis enregistrer le signal émis quand les noyaux retournent à leur état plus stable. Elle constitue une technique de choix pour étudier les interactions entre molécules (Moreau & Guichard, 2006). Les noyaux les plus communément étudiés dans les produits laitiers sont les noyaux ^1H , ^{13}C (principalement pour la matière grasse laitière), et ^{31}P (pour les composés phosphorylés, tels que les phospholipides) (Belloque & Ramos, 1999). La mobilité des ions phosphates a, par exemple, été étudiée par RMN ^{31}P dans des fromages (Gobet *et al.*, 2010). Des exemples récents d'utilisation de la RMN sur des aliments peuvent être trouvés dans les présentations de la conférence internationale « Applications of Magnetic Resonance in Food Science » (Renou *et al.*, 2011). Mais, dans ce paragraphe, nous allons spécifiquement nous intéresser à l'utilisation de la RMN du sodium (^{23}Na).

Du fait des recommandations nutritionnelles visant à réduire la consommation de sel, il existe un réel besoin de caractériser et de quantifier l'état des ions sodium et leur teneur dans les produits alimentaires. A cette fin, la RMN du sodium est une technique unique permettant de déterminer de manière non invasive la teneur en ions Na^+ , ainsi que leur état de liaison (Kemp-Harper *et al.*, 1997 ; Woessner, 2001). Cette technique est utilisée dans les domaines alimentaires et non alimentaires.

Elle est, par exemple, utilisée pour l'étude de la dynamique du sodium dans des matériaux poreux (Porion *et al.*, 2001 ; Rijniers *et al.*, 2004), des biopolymères (Woessner, 2001) et des tissus biologiques (Eliav & Navon, 1994 ; Reddy *et al.*, 1995), ou pour l'étude de la distribution des ions Na⁺ dans des systèmes tels que des gels de pectine (Brosio *et al.*, 1993), des résines échangeuses d'ions (Mouaddab *et al.*, 2007), des systèmes de *iota*-carraghénanes (Gobet *et al.*, 2009b), mais aussi des aliments tels que de la viande de porc salée (Foucat *et al.*, 2003), du saumon fumé (Foucat *et al.*, 2004a), du fromage (Gobet *et al.*, 2010) et du pain (Gudjonsdottir *et al.*, 2012). Dans ces études, la détection de tous les ions Na⁺ a été validée par des expériences de RMN du sodium en simple quanta (SQ). Une fraction de sodium lié a pu être mise en évidence par des expériences RMN du sodium en double quanta (DQ). Les ions Na⁺ liés sont des ions ayant en réalité un mouvement restreint. La technique de RMN a permis de révéler que ces ions étaient dans un environnement spécifiquement ordonné.

Cette technique permet également d'étudier l'influence de l'aliment sur la mobilité des ions Na⁺. Dans les systèmes de *iota*-carraghénanes et dans les gels de pectine, les mesures par RMN ²³Na ont ainsi montré que la formation d'un gel, associée à une augmentation de fermeté, était directement corrélée à une diminution de la mobilité des ions Na⁺ (Brosio *et al.*, 1993 ; Gobet *et al.*, 2009b). Dans la viande de porc salée, ces mesures ont montré que plus la viande était salée, moins le sel lié était mobile (Foucat *et al.*, 2003). La RMN ²³Na a permis de mettre en évidence que le sodium n'était pas réparti de manière homogène dans des filets de saumon fumé et que sa distribution dépendait de la distribution du gras (Foucat *et al.*, 2004b). La quantité d'ions Na⁺ liés est indépendante du procédé de salage des saumons (sel sec et/ou injection) et de la concentration en NaCl, et n'est pas corrélée à la perception salée des saumons (Foucat *et al.*, 2004a). D'un point de vue perceptif, ce résultat diffère d'autres résultats ayant montré que la liaison des ions Na⁺, déterminée par spectroscopie RMN ²³Na, influençait la perception salée de solutions de gomme (Rosett *et al.*, 1994) et de soupes de tomates (Rosett *et al.*, 1997). Dans le cas des solutions de gomme, une gomme ionique chargée négativement (*kappa*-carraghénanes, xanthane) conduit à une moindre mobilité des ions Na⁺ qu'une gomme non ionique (guar, caroube), mais aussi à une suppression de la perception salée, du fait de la liaison des ions Na⁺ à la gomme ionique. Dans le cas des soupes de tomates, les liaisons entre les caséines et les ions Na⁺ diminuent la mobilité des ions Na⁺ et la perception salée est supprimée par l'ajout de protéines (caséinates de calcium).

Des compétitions de liaisons entre KCl et NaCl ont été mises en évidence dans des systèmes de gommés, modifiant ainsi la perception salée (Rosett *et al.*, 1995) : les ions K^+ et Ca^{2+} endogènes, ou le KCl ajouté, se lieraient préférentiellement aux gommés ioniques, laissant ainsi plus d'ions Na^+ disponibles pour éliciter la perception salée. Ce phénomène a pu être révélé par une plus grande mobilité des ions Na^+ suite à l'ajout des espèces mentionnées. Les auteurs ont attribué une diminution de la perception salée au fait que les ions Na^+ puissent se lier aux caséines, ne participant ainsi pas à la perception salée.

La technique de RMN et les résultats obtenus jusqu'à présent ouvrent la voie de la quantification des ions Na^+ libres et liés, ce qui constitue un facteur déterminant dans la caractérisation des produits alimentaires salés. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à la quantification absolue par spectroscopie RMN ^{23}Na de la fraction liée du sodium. A ce jour, on dénombre seulement des études de quantification absolue sur des résine échangeuses d'ions (Mouaddab *et al.*, 2007), sur des gels de iota-carraghénanes et sur des fromages (Gobet, 2008) et, plus récemment, sur du pain (Gudjonsdottir *et al.*, 2012).

La RMN permet d'étudier les interactions entre le sodium et les constituants qui l'environnent à l'échelle moléculaire, mais ce type d'étude peut être complété par des études à l'échelle microscopique et macroscopique, afin de mieux comprendre le comportement de libération du sodium hors d'une matrice, comme l'explique le paragraphe suivant.

2. Mobilité et mouvement du NaCl aux échelles microscopique et macroscopique

Le mouvement de libération du sel d'une matrice vers une phase aqueuse peut être suivi par l'étude de la diffusion du sel, ou par le résultat de ce mouvement, à l'équilibre, via l'étude des coefficients de partage eau/matrice du sel.

a. Coefficients de partage eau/matrice du sel

Contrairement aux composés d'arôme, les composés sapides, tels que le sel (NaCl) ne sont pas solubles dans les lipides. En bouche, le transport de ces composés vers les récepteurs gustatifs se fait à travers la phase aqueuse continue. Ce transport est plus ou moins rapide selon le composé considéré et la composition de la phase aqueuse (Dumont, 2006), ce qui justifie d'étudier les propriétés de libération du NaCl dans des milieux aqueux.

Les propriétés de partage du NaCl ne sont que très peu étudiées dans le domaine alimentaire. A notre connaissance, il n'existe que deux méthodes décrites dans la littérature :

- une cellule de diffusion mise au point pour déterminer le coefficient de partage du NaCl entre l'eau et un gel d'agar (Djelveh *et al.*, 1989). Cette méthode a ensuite été appliquée sur du fromage (Zorrilla & Rubiolo, 1994).
- la méthode Solid/Liquid – Phase Ratio Variation (SL-PRV) mise au point sur des modèles fromagers (Lauverjat, 2009c ; Lauverjat *et al.*, 2009a) et qui est une adaptation de la méthode PRV utilisée pour les composés volatils (Ettre *et al.*, 1993).

Dans cette deuxième méthode, l'inconvénient de la technique d'analyse associée (par détection conductimétrique globale) est qu'elle n'est pas sélective du NaCl et qu'elle nécessite l'utilisation de produits salés et non salés. L'absence d'effet de la teneur en matière grasse ou de la teneur en protéines des modèles fromager sur les coefficients de partage du NaCl pourrait provenir de l'absence de sélectivité de la technique employée.

Pour étudier le partage eau/produit du sodium dans des modèles fromagers, la concentration en sodium soluble dans la phase aqueuse, après centrifugation, peut également être considérée par rapport à la concentration en sodium total (Floury *et al.*, 2009a). Dans ce cas, le partage des ions Na⁺ est plus élevé lorsque le ratio gras/sec, la teneur en NaCl et le pH augmentent. Ces effets ont été expliqués par des effets sur la microstructure des modèles fromagers.

b. Etude *in vitro* de la diffusion et de la libération du sel

Dans le cas des fromages réels, la diffusion du sel depuis la saumure fait l'objet de nombreuses études pour en expliquer le mécanisme. Dans ce cas, l'utilisation de la seconde loi de Fick est très largement utilisée dans les études portant sur la diffusion du NaCl lors de l'étape de salage ou d'affinage (Geurts *et al.*, 1974 ; Zorrilla & Rubiolo, 1994).

Cette loi représente la variation de concentration à un point donné, en fonction du temps et elle s'exprime selon l'équation suivante :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_i \cdot \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2}$$

Où $\frac{\partial c}{\partial t}$ décrit la variation de la concentration au cours du temps, D_i est le coefficient de diffusion et $\frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2}$ décrit la variation de la concentration selon l'axe x de diffusion.

Les principaux facteurs qui influencent la diffusion du sel vers le fromage ont été postulés (Geurts *et al.*, 1974) et sont :

- La taille des pores de la matrice fromagère, qui gouverne à la fois la diffusion du NaCl et la diffusion inverse d'eau (deux fois plus importante en moyenne que la diffusion du NaCl).
- La viscosité apparente de la phase aqueuse des fromages, qui comporte de nombreux matériaux dissous (acides, sels, composés azotés), limitant la diffusion du NaCl.
- Les tortuosités de la matrice fromagère, dues aux obstructions des globules gras et des particules de protéines.
- L'eau liée aux protéines qui augmente le diamètre effectif des protéines et qui provoque des effets de friction.

Ces facteurs peuvent donc être pris en compte dans la détermination d'un coefficient de diffusion du NaCl ajusté (Geurts *et al.*, 1974). Avec ce type de coefficient ajusté, il peut être déduit que la diffusion du NaCl (de la phase aqueuse dans le fromage) augmente lorsque l'extrait sec diminue et lorsque le pourcentage de matière grasse augmente (Guinee, 2004).

La diffusion du sel d'un fromage vers une phase aqueuse est moins étudiée, bien qu'il s'agisse aussi d'un gradient de concentration en NaCl à l'origine de la diffusion du NaCl. Quelques études ont cependant permis d'étudier l'effet de la composition de modèles fromagers sur la diffusion du NaCl. Tout d'abord, l'un des principaux facteurs affectant la diffusion du NaCl est la teneur en matière sèche des modèles fromagers. En effet, une diminution de seulement 32 % de la matière sèche peut conduire à une augmentation de 80 % du coefficient de diffusion du NaCl (Lauverjat *et al.*, 2009b). Le même type d'effet a également pu être mis en évidence sur la diffusion du NaCl dans de la salive artificielle (Floury *et al.*, 2009b). L'effet de la matière sèche s'explique par une augmentation de la fermeté, une diminution de l'eau disponible pour le transport du NaCl et une augmentation de l'effet de tamisage du réseau protéique. Mais les ingrédients constitutifs des modèles fromagers peuvent également influencer le coefficient de diffusion du NaCl : ce dernier augmente lorsque la teneur en sel et la teneur en matière grasse des modèles fromagers augmentent (Lauverjat *et al.*, 2009b). Pour la matière grasse, cet effet semble associé à la diminution simultanée de la teneur en protéines, facilitant ainsi la diffusion du NaCl. Cette constatation montre qu'il est difficile de différencier l'effet de chaque constituant sur la diffusion du NaCl puisque la variation de la teneur d'un constituant modifie souvent la teneur d'un autre.

Enfin, il a été démontré que les ions Na^+ et Cl^- du NaCl contenu dans des modèles fromagers diffusaient de la même façon dans l'eau, puisque leurs profils de libération étaient superposables (Floury *et al.*, 2009b). Ceci confirme la validité d'étudier les ions Na^+ ou les ions Cl^- pour étudier la libération du NaCl.

Nous venons de voir qu'il est possible d'étudier les interactions entre le sodium et les constituants de l'aliment dans lequel il est contenu. Cependant, lors de la consommation en bouche de l'aliment, de nombreux mécanismes physiologiques entrent en jeu (mastication, salivation, etc...). Afin de mieux comprendre ces mécanismes qui vont influencer la libération du sodium en bouche, nous allons plus spécifiquement les présenter dans les paragraphes suivants.

3. Libération du NaCl en bouche en situation de consommation

Comme nous l'avons mentionné, la libération du sodium en bouche est affectée par le processus de mastication et de salivation. Ce paragraphe traite donc de ces deux aspects.

a. Rôle de la salive sur la libération du NaCl en bouche

Tous les effets de salive sur la mastication, la déglutition, la digestion sont décrits par Humphrey & Williamson (2001) et Pedersen *et al.* (2002) mais nous nous intéresserons plus particulièrement ici au rôle de la salive sur la libération de stimuli en bouche. La salive sert de solvant aux molécules gustatives et permet leurs accès aux récepteurs gustatifs (Mese & Matsuo, 2007), mais cet accès dépend du flux salivaire et de la composition salivaire (Gaviao *et al.*, 2004 ; Neyraud *et al.*, 2003 ; Salles *et al.*, 2011a). Concernant la composition salivaire, on sait par exemple que les ions HCO_3^- de la salive participent au pouvoir tampon de la salive et peuvent donc affecter la perception acide (Christensen *et al.*, 1987). D'autres composants salivaires tels que les enzymes amylases et lipases peuvent également interférer avec les composés alimentaires (amidon, lipides) et provoquer un début d'hydrolyse (Ferry *et al.*, 2006 ; Mese & Matsuo, 2007). L'action du flux salivaire peut, entre autres, se manifester sur la libération du NaCl en bouche lors de la consommation de modèles fromagers, par exemple. A des flux salivaires bas, l'extraction du sel d'un modèle fromager pendant la mastication est plus lente (Pionnier *et al.*, 2004b) et moins élevée (Phan *et al.*, 2008). Enfin, la salive contient majoritairement des ions Na^+ et Cl^- et leur concentration dans la salive au repos est suffisante pour stimuler les récepteurs de la saveur salée (la concentration en ions Na^+ est de

2,7 mmol.L⁻¹ environ). Cependant, nous ne percevons que les concentrations supérieures à celles auxquelles les récepteurs gustatifs se sont adaptés (Bartoshuk, 1978).

En bouche, la salive n'est pas le seul paramètre qui peut influencer la libération de stimuli. En effet, le processus en bouche (mastication) peut également intervenir, comme l'explique le paragraphe suivant.

b. Rôle de la mastication sur la libération du sel/du sodium en bouche

Le processus de perception de la saveur en bouche est un processus dynamique (Piggott, 2000) et c'est pour cette raison qu'il est intéressant de considérer la libération du sel en bouche à différents moments de consommation. En général, la quantité de composés non volatils libérés dans la salive augmente au début de la mastication, atteint un maximum, puis diminue plus ou moins rapidement à la fin de la mastication (Davidson *et al.*, 2000), le maximum étant souvent atteint dans la première minute de mastication (Haahr *et al.*, 2004).

Alors que les études traitant de la libération des composés de la flaveur (arômes et saveurs) se sont principalement concentrées sur la fraction volatile, un nombre beaucoup plus restreint d'études s'est intéressé à la libération des composés non volatils en bouche. Dans les premières études, des mesures de conductivité ont été utilisées pour étudier la libération du sel lors de la mastication, en fonction de la texture du Cheddar (Jack *et al.*, 1995). La fabrication d'un palais artificiel avec des électrodes intégrées a permis de suivre la conductivité en bouche. Le profil de libération du sel en bouche pendant la mastication est directement lié à la déstructuration du fromage en bouche et donc à sa texture. A chaque coup de dent, une quantité plus importante de sel est libérée par les fromages fermes et secs, caractérisés par une faible teneur en eau et un ratio sel/humidité plus élevé. De plus, la durée de mastication nécessaire pour atteindre le maximum de libération du sel est directement reliée au caractère mou et crémeux des Cheddars. Les fromages caoutchouteux présentent, quant à eux, des taux de libération du sel plus lents (Jack *et al.*, 1995).

Une approche similaire, mais avec suivi simultané du pH en bouche, a été menée sur des aliments de nature et de texture différentes (cacahuètes, chips, fromage et purée) à l'aide d'un appareil dentaire contenant deux capteurs (conductivité et pH) (Davidson *et al.*, 1998). Ces travaux ont mis en évidence la difficulté de mesure de la conductivité pour des aliments secs. Le capteur de conductivité n'était pas spécifique à l'ion Na⁺ et, pour le fromage, la forte teneur en ions contribuait au signal et rendait la courbe de libération inexploitable. Pour le pH, la capacité tampon de la salive perturbait les valeurs des répétitions successives.

Dans ces deux études présentées, nous pouvons nous demander dans quelle mesure les appareils dentaires n'ont pas modifié la mastication des produits (encombrement en bouche, stimulation salivaire, ...). Des systèmes plus petits ont été mis en place ultérieurement, avec des électrodes placées dans l'espace interdentaire des incisives de la mâchoire inférieure et permettant de suivre le renouvellement cyclique de la salive et les variations de concentrations en sel associées, lors de la consommation de gommes salées (Neyraud *et al.*, 2003). Des électrodes du même type ont été mises au point et utilisées simultanément à un suivi de la température en bouche, sans perturbation de la mastication, sur des produits tels que des cacahuètes salées, du jambon ou des saucisses (Emorine *et al.*, 2012 ; Emorine *et al.*, 2011). Là encore, l'inconvénient de ces capteurs est qu'ils ne sont pas spécifiques des ions Na⁺. Une technique spécifique de suivi de la libération du sodium en bouche consiste à prélever des échantillons de salive sur la langue et à doser le sodium qu'ils contiennent. Cette méthode, décrite par Davidson *et al.* (2000), a été appliquée lors de la consommation de modèles fromagers en collectant des échantillons de salive sur des cotons, à différents temps de la mastication (Phan *et al.*, 2008 ; Pionnier *et al.*, 2004b). La quantité de composés non volatils libérés et leur vitesse de libération sont plus importantes lorsque les paramètres masticatoires (taux de mastication, durée et efficacité masticatoire) augmentent et lorsque la teneur en lipides des modèles fromagers diminue.

Les échantillons de salive peuvent également être prélevés par un filtre déposé sur la langue (de Loubens, 2010 ; Panouillé *et al.*, 2012), ou récupérés en demandant aux sujets de cracher de la salive à des temps successifs. Dans ce dernier cas, des études de libération du sel en bouche ont été menées récemment sur des pains de différentes textures (Tournier *et al.*, 2012), montrant que la quantité de sel libéré est corrélée au pourcentage de salive incorporée dans le bol, que la pente de la courbe de libération du sel est corrélée au flux salivaire, alors que la durée de libération est corrélée au nombre de cycles masticatoires (Tournier *et al.*, 2012). Ce type de récupération (salive crachée) a également été utilisé lors de la consommation de modèles fromagers (Lawrence *et al.*, 2012). La vitesse et l'intensité maximale de libération du sodium en bouche sont plus rapides lorsque la teneur en extrait sec et le ratio gras/sec sont plus faibles. L'effet du ratio gras/sec n'est cependant observable que pour la concentration en sel la plus importante (1,5 %). L'ensemble des études présentées dans ce paragraphe montre que la mastication, mais aussi la texture des aliments et leur composition peuvent modifier la libération du sel dans la salive.

Dans tout le chapitre traitant de la mobilité, de la diffusion et de la libération du sel et du sodium, nous avons présenté les différents facteurs pouvant affecter ces paramètres, à savoir des facteurs de composition, de structure, ou des processus en bouche lors de la consommation de produits salés. Dans le prochain chapitre, nous allons désormais nous intéresser aux paramètres pouvant affecter la mobilité et la libération des composés d'arôme.

IV. Mobilité et disponibilité des composés d'arôme dans des matrices alimentaires

Dans ce chapitre, nous décrirons tout d'abord les caractéristiques des composés d'arôme et leurs propriétés, puis nous nous intéresserons aux interactions qui peuvent avoir lieu entre ces composés et leur environnement, à savoir les ingrédients des aliments dans lesquels ils sont contenus. Nous verrons que ces interactions modifient le comportement des composés d'arôme, que ce soit en phase vapeur à l'équilibre, ou en conditions de consommation de produits aromatisés. Ces deux aspects seront traités successivement.

1. Les composés d'arôme

a. Rappel de quelques caractéristiques des composés d'arôme

Les composés d'arôme sont de petites molécules susceptibles d'être à l'origine de sensations olfactives. Elles sont présentes en faible quantité dans les aliments (0,05 à 1 %) et se trouvent pour une très grande partie emprisonnées dans la matrice alimentaire. Contrairement au sel (NaCl) qui n'est soluble que dans la phase aqueuse et non dans les lipides, les composés d'arôme peuvent se répartir entre les phases lipidiques et aqueuses des aliments (Dumont, 2006). De plus, les composés d'arôme sont volatils, mais cette volatilité dépend de leur nature chimique et de leur masse molaire. Les arômes sont caractérisés par leur hydrophobicité, communément désignée par le $\log P$ des composés d'arôme. Les composés d'arôme contenus dans des aliments peuvent être analysés par GC-MS, après avoir été extraits. Il n'existe pas de méthode universelle d'extraction (liquide, distillation, headspace) car aucune ne représente véritablement le profil aromatique quantitatif ou qualitatif d'un aliment (Reineccius, 2002).

Selon leurs caractéristiques (volatilité, hydrophobicité, ...), les composés d'arôme vont présenter des propriétés différentes, notamment concernant leur partage et leur diffusion entre deux phases.

b. Propriétés de partage des composés d'arôme

Les propriétés de partage sont déterminées à l'équilibre, lorsqu'il n'y a plus de transport de masse entre les deux phases considérées (matrice/air). Le composé d'arôme considéré est distribué de façon homogène dans chacune des phases. Théoriquement, l'analyse de l'espace de tête (« headspace ») au-dessus d'un liquide permet alors la détermination d'un coefficient de partage. Ce coefficient est défini comme étant le ratio de la concentration en soluté dans la phase vapeur sur la concentration dans la phase initiale (le plus souvent liquide). Le coefficient de partage du soluté considéré s'exprime sous la forme :

$$K = C_2/C_1$$

où C_1 est la concentration du composé dans la phase initiale et C_2 la concentration du composé dans la 2^e phase en contact (Voilley, 2006).

Le coefficient de partage est une mesure globale qui tient compte des interactions réversibles et irréversibles entre la matrice et les solutés. Différents paramètres influencent la volatilité des composés d'arôme, et donc les coefficients de partage : la liaison des arômes avec les molécules environnantes (lipides, protéines...), l'équilibre acido-basique, les propriétés des solvants, l'état physique de la matière grasse de la matrice (liquide, cristallin) et la température (De Roos, 2006).

c. Propriétés de diffusion et de transfert de masse des composés d'arôme

Deux facteurs principaux contrôlent le taux de libération et la diffusion des composés d'arôme depuis un aliment (Voilley, 2006):

- La volatilité des composés d'arôme (associée à la mesure des coefficients de partage).
- La résistance au transfert de masse entre phases, et particulièrement depuis le produit vers l'air.

Le taux de transfert de masse (diffusion et convection) est nécessairement influencé par une force motrice, à l'origine du mouvement des matériaux, et par la résistance au flux. Il reflète donc la cinétique de libération des composés d'arôme. Lorsqu'on considère des substances dissoutes dans un liquide, la force motrice est une différence de concentration, alors que dans le cas d'un gaz ou d'une phase vapeur, il s'agit d'une différence de pression partielle ou d'une différence de pression de vapeur.

Dans les deux cas, il s'agit d'une différence de potentiel chimique. La résistance provient, quant à elle, du milieu (liquide ou gazeux) et des interactions entre les matériaux et le milieu (Voilley, 2006). En effet, les aliments sont des systèmes multiphasiques, ce qui complique l'étude de la diffusion et du transfert de masse. La diffusion des composés d'arôme dans une matrice peut être influencée par les effets d'obstruction et de piégeage des macromolécules et de leur organisation structurale, ainsi que par la force et la nature des interactions spécifiques entre les composés d'arôme et leur environnement (autres composés d'arôme, eau, macromolécules, ...).

2. Paramètres influençant le partage et la diffusion des composés d'arôme

Dans ce paragraphe seront détaillés les effets des principaux constituants des modèles fromagers sur les propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme. Ainsi, les effets des protéines, des lipides, de l'eau et du NaCl seront décrits. L'effet du pH et de la température seront également abordés, avant de présenter l'effet de la texture et de la microstructure sur les propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme.

a. Effet des protéines sur les propriétés des composés d'arôme

Les interactions entre composés d'arôme et protéines sont dans la plupart des cas des interactions réversibles qui impliquent des liaisons hydrophobes et hydrogène (Guichard, 2002 ; Lubbers *et al.*, 1998). Ces liaisons dépendent de la nature du composé d'arôme et de la structure de la protéine considérée (Lubbers *et al.*, 1998), cette structure dépendant, elle-même, de l'environnement dans lequel la protéine évolue (Guichard, 2006). Entre autres, la température et les conditions ioniques peuvent modifier cet environnement et la conformation de la protéine (Boelrijk *et al.*, 2006).

Les interactions entre la β -lactoglobuline et les composés d'arôme sont les plus étudiées (Andriot *et al.*, 2000 ; Andriot *et al.*, 1999 ; Benjamin *et al.*, 2011 ; Jouenne & Crouzet, 2000 ; Jung *et al.*, 2002 ; Reiners *et al.*, 2000 ; Seuvre *et al.*, 2001 ; van Ruth & Villeneuve, 2002 ; Yang *et al.*, 2003), même si les interactions avec d'autres protéines ont également été décrites par d'autres auteurs (Dumont, 1987 ; Guichard, 2002 ; Langourieux & Crouzet, 1995 ; Lubbers *et al.*, 1998).

Par les liaisons qu'elles créent avec les composés d'arôme, les protéines participent donc à la rétention des composés d'arôme. L'effet de rétention par les protéines dépend des propriétés des composés d'arôme, et notamment de leur hydrophobicité (valeurs de $\log P$). C'est cette hydrophobicité qui détermine la constante d'affinité du composé pour la protéine considérée, et qui module donc la rétention des composés d'arôme par les protéines. Pour des espèces chimiques d'une même classe, l'affinité pour la β -lactoglobuline augmente avec la longueur de la chaîne hydrophobe des composés d'arôme (ou les valeurs de $\log P$) (Andriot *et al.*, 2000 ; Reiners *et al.*, 2000). Cette rétention par les protéines se traduit par une diminution des coefficients de diffusion (Jung *et al.*, 2002), des coefficients de transfert de masse et des coefficients de partage air/produit (Le Guen & Vreeker, 2003). Cet effet de rétention est d'autant plus important que la concentration en protéines est élevée. Cela a pu être mis en évidence sur des solutions odorantes dans lesquelles l'ajout de β -lactoglobuline a conduit à une diminution d'odeur (Andriot *et al.*, 2000).

Outre la β -lactoglobuline qui est un très bon cas d'étude, les autres protéines du lait (α -lactalbumine, albumine de sérum bovin, caséines) présentent aussi des capacités de liaison avec les composés d'arôme (Tromelin *et al.*, 2006). Le cas des caséines nous intéresse plus particulièrement du fait de leur présence dans les modèles fromagers de notre étude, mais la littérature est moins abondante à ce sujet. Néanmoins, on sait que les aldéhydes interagissent fortement avec les caséines (Lubbers *et al.*, 1998), mais que ces liaisons peuvent également être réversibles (Fares *et al.*, 1998). Par ailleurs, plus la concentration en caséines est élevée, plus les composés d'arôme sont retenus (Fischer & Widder, 1997), et l'hydratation des caséines influence également les interactions avec les composés d'arôme, car la fixation peut parfois être inhibée par la présence de molécules d'eau (Fares *et al.*, 1998). De plus, les composés d'arôme auraient une plus grande affinité pour les caséines que pour les protéines sériques par exemple (Saint-Eve *et al.*, 2006a). Enfin, en émulsion huile-dans-eau, la présence de caséinate de sodium peut modifier l'interface entre l'huile et l'eau, conduisant à une plus grande résistance au transfert de masse des composés d'arôme (butanoate d'éthyle et hexanoate d'éthyle) (Landy *et al.*, 1998).

b. Effet des lipides sur les propriétés des composés d'arôme

Les lipides sont des vecteurs et des modulateurs de mobilité des arômes. Ils participent à leur rétention dans l'aliment mais aussi à leur libération. Dans certains cas, ils sont même précurseurs de flaveur (oxydation des lipides, lipolyse) et peuvent participer aux propriétés sensorielles des produits (Spinnler, 2011). Avec leurs propriétés hydrophobes, les lipides ont une grande influence sur la libération des composés d'arôme, comparativement à des ingrédients plus hydrophiles tels que les protéines et les polysaccharides (de Roos, 1997). Par exemple, l'ajout de seulement 0,5 % de miglyol (triglycérides) à de l'eau conduit à une plus grande diminution de la volatilité de la nonan-2-one que l'ajout de 3 % de la protéine β -lactoglobuline (Seuvre *et al.*, 2000). La matière grasse agit donc comme un réservoir pour les composés d'arôme hydrophobes, qui sont ainsi plus retenus. A titre d'exemple, les composés d'arôme sont plus retenus dans des yaourts avec 5% de matière grasse que dans ceux avec 0% de matière grasse (malgré un effet de rétention quand même présent, dû aux interactions hydrophobes entre composés d'arôme et protéines) (Nongonierma *et al.*, 2006).

Tout comme pour les interactions entre protéines et composés d'arôme, les interactions entre lipides et les composés d'arôme sont dictées par les caractéristiques des composés d'arôme. Ainsi, les composés avec une plus grande chaîne hydrophobe, ou une plus grande chaîne carbonée, sont plus retenus par les lipides dans une émulsion, que les autres composés (Doyen *et al.*, 2001). Cet effet de rétention se traduit ensuite par une diminution des coefficients de partage et des coefficients de diffusion de ces composés (Doyen *et al.*, 2001 ; van Ruth *et al.*, 2001). L'effet de rétention des lipides peut également être observé dans des matrices complexes telles que des modèles fromagers, avec une diminution des coefficients de partage et des coefficients de diffusion de la heptan-2-one et de l'hexanoate d'éthyle lorsque la teneur en matière grasse augmente (Lauverjat *et al.*, 2009b). A l'inverse, des composés très hydrophiles, qui possèdent des valeurs de $\log P$ proches ou inférieures à zéro, ne sont pas retenus par les lipides, ce qui explique des valeurs de coefficient de partage élevées (Guichard, 2002 ; Guyot *et al.*, 1996).

Enfin, la rétention des composés d'arôme par la matière grasse dépend également de la nature de la matière grasse (Nongonierma *et al.*, 2006), avec une libération plus importante d'esters dans des émulsions contenant de la matière grasse végétale que dans des émulsions contenant de la matière grasse animale (Relkin *et al.*, 2004).

c. Effet de l'eau sur les propriétés des composés d'arôme

Tout d'abord, l'effet de l'eau sur les propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme dépend majoritairement de l'hydrophobicité des composés d'arôme (valeurs de $\log P$), avec un effet inverse de celui de la matière grasse. Les composés d'arôme hydrophiles sont retenus par l'eau, alors que les composés hydrophobes sont plus libérés. Par ailleurs, l'eau agit également sur les interactions entre les protéines et les composés d'arôme. Par exemple, la présence d'eau autour de la β -lactoglobuline augmente considérablement la capacité de rétention de la protéine, comparativement à la protéine sèche (Seuvre *et al.*, 2001). Enfin, dans des aliments complexes (multiphasiques), la teneur en eau est inversement reliée à la teneur en matière sèche, et ce ratio eau/matière sèche agit sur la structuration de la matrice et influence par conséquent les propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme. Ainsi, une augmentation de la teneur en matière sèche de modèles fromagers provoque une diminution importante des coefficients de partage et de diffusion de composés d'arôme de classes différentes (esters, cétones) (Lauverjat *et al.*, 2009b). Cette diminution peut être expliquée par les interactions hydrophobes entre protéines et composés d'arôme et par un réseau protéique plus dense, qui empêche la diffusion des composés d'arôme.

d. Effet du NaCl sur les propriétés des composés d'arôme

Tout d'abord, le NaCl a un effet direct sur les composés d'arôme : l'effet de « salting-out », souvent mentionné dans la littérature (Deak *et al.*, 2006 ; Endo *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2011). Le principe repose sur le fait que les ions Na^+ et Cl^- mobilisent les molécules d'eau pour leur hydratation. Une augmentation de la teneur en NaCl entraîne ainsi une diminution de la quantité d'eau disponible pour la solubilisation des molécules d'arôme, ce qui se traduit par une augmentation du partage air/produit (Rabe *et al.*, 2003). Les composés les moins solubles sont les plus affectés par ce phénomène (Lauverjat, 2009c). Cet effet n'a pas seulement lieu en solution, mais peut également être observé dans des matrices complexes, comme des modèles fromagers (Lauverjat *et al.*, 2009b), ou des produits carnés (Flores *et al.*, 2007).

Par ailleurs, le NaCl peut modifier indirectement les propriétés de partage et de diffusion des composés en agissant sur les protéines, modifiant ensuite la rétention des composés d'arôme et par conséquent les propriétés de partage et de diffusion. L'ajout de NaCl stabilise, par exemple, la forme dimérisée de la β -lactoglobuline, en modulant l'équilibre entre les liaisons

hydrophobes et les forces électrostatiques (Sakurai *et al.*, 2001). La quantité de nonan-2-one liée à l'albumine de sérum bovin augmente avec la concentration de NaCl, du fait de la capacité des anions à stabiliser ou déstabiliser la structure protéique (Damodaran & Kinsella, 1980). Dans le même sens, la rétention de l'octan-2-one par la β -lactoglobuline augmente lorsque la concentration en NaCl augmente (de 0 à 1 M NaCl) (Jouenne & Crouzet, 1997). Ces résultats montrent que l'effet de salting out du NaCl peut être contré par des interactions moléculaires entre le NaCl, les protéines et les composés d'arôme.

Enfin, le NaCl peut avoir un effet combiné sur la structure d'une matrice et sur la libération des composés d'arôme. En effet, dans un gel de iota-carraghénanes, l'ajout de NaCl (et plus précisément l'action des ions Na^+) induit un renforcement des interactions entre les chaînes doubles hélices des carraghénanes qui s'agrègent. Lorsque la concentration en NaCl augmente, ce réarrangement est amplifié, conduisant à une agrégation plus forte, et donc à de plus grands espaces vides entre les chaînes des carraghénanes. Cet effet résulte en une moindre obstruction pour la diffusion libre des solutés tels que le NaCl, et donc à une augmentation de diffusion du butanoate d'éthyle (Gostan *et al.*, 2004).

e. **Effet du pH et de la température sur les propriétés des composés d'arôme**

Le pH agit de manière indirecte sur les propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme. En effet, il agit sur la conformation des protéines, ce qui influence ensuite la rétention des composés d'arôme, et donc leurs propriétés de partage et de diffusion. Le pH peut, en effet, conduire à un changement de conformation de la β -lactoglobuline, d'une position fermée de la cavité hydrophobe ($\text{pH} < 6,2$) à une position ouverte ($\text{pH} \sim 6,2 - 7,2$) (Uhrinova *et al.*, 2000). Ceci entraîne une meilleure accessibilité des ligands à des valeurs de pH élevées, et à l'inverse, une plus grande spécificité à des valeurs de pH plus basses. Par conséquent, à des valeurs de pH élevées, les composés d'arôme se lient plus facilement aux protéines, du fait de la meilleure accessibilité du site de fixation. Cela peut ensuite expliquer la diminution de coefficients de partage air/solution protéique observée suite à l'augmentation de pH (van Ruth & Villeneuve, 2002).

La température agit de manière directe et de manière indirecte sur la libération des composés d'arôme. Tout d'abord, son augmentation induit une augmentation de libération des composés d'arôme, du fait de l'augmentation de leur volatilité (Guichard *et al.*, 2008 ; Savary *et al.*, 2006).

Ensuite, tout comme le pH, la température peut également affecter la structure des protéines, ce qui influence ensuite les propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme. En effet, elle peut provoquer l'agrégation des protéines (Hong & Creamer, 2002) ou conduire à leur dénaturation, modifiant ainsi la rétention des composés d'arôme.

f. Effet de la texture et de la structure sur les propriétés des composés d'arôme

Nous venons de présenter l'effet de plusieurs constituants sur les propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme. La structure formée par les constituants et la texture à laquelle ils conduisent peuvent également modifier les propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme.

L'effet de la texture sur les propriétés des composés d'arôme a souvent été étudié dans des gels. Tout d'abord, une structure gélifiée (avec amidon ou carraghénanes) conduit à de plus faibles valeurs des coefficients de transfert de masse et des coefficients de partage gaz/gel de l'hexanoate d'éthyle et de l'acétate d'isoamyle qu'une solution aqueuse (Juteau *et al.*, 2004). Plus la concentration en texturant augmente, plus les coefficients de transfert de masse et de partage diminuent, du fait de l'augmentation de la viscosité (Roberts *et al.*, 1996) et des liaisons entre composés d'arôme et molécules texturantes (Bakker *et al.*, 1998). L'effet de la rigidité des gels peut également influencer le partage et la diffusion des composés d'arôme. Dans des bases de fruits-sur-sucre aromatisées, une augmentation de la rigidité du gel diminue le taux de libération des composés d'arôme et la quantité libérée (Savary, 2006). L'effet de la rigidité et de la viscosité peut s'expliquer par le fait que les composés d'arôme doivent dévier leurs trajectoires lorsqu'ils rencontrent une plus grande résistance, ce qui diminue leur diffusion. Par ailleurs, à viscosités égales, deux solutions épaissies avec des épaississants différents (gomme guar et carboxyméthylcellulose) ne présentent pas les mêmes comportements de libération des arômes (Roberts *et al.*, 1996).

La texture est donc un paramètre important qui influence les propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme, mais la structure des matrices influence également ces propriétés (de Roos, 2003). Dans des aliments multiphasiques (protéines, eau, matière grasse), la structure dépend de l'agencement des constituants, et peut donc modifier la rétention des composés d'arôme.

Par exemple, la nature des protéines employées dans des yaourts conduit à des microstructures différentes (observations en microscopie électronique à balayage) et à des libérations d'arômes différentes (Saint-Eve *et al.*, 2006a). Dans des émulsions de type vinaigrette, de plus grosses gouttelettes lipidiques favorisent la quantité d'alcools et d'acides libérés en phase vapeur, alors qu'elle freine la quantité de limonène et de benzaldéhyde libérés. Cela peut s'expliquer par les différences de nature et d'hydrophobicité des composés (Charles *et al.*, 2000).

Nous venons de voir que la composition, la texture et la microstructure influencent fortement les propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme. Cependant, en bouche, les paramètres de libération des arômes ne sont plus les mêmes, car la texture et la microstructure des produits sont complètement modifiées (De Roos, 2006). La matrice alimentaire est déstructurée progressivement pendant la mastication et imprégnée de salive. Le microenvironnement autour des composés d'arôme est donc perturbé, ce qui modifie la libération des composés d'arôme en bouche. Dans le cadre du projet de thèse, les modèles fromagers vont être dégustés et la libération des composés d'arôme sera suivie lors de cette consommation. Ainsi, nous présentons dans le paragraphe suivant les paramètres qui peuvent influencer cette libération des composés d'arôme en situation de consommation.

3. Paramètres influençant la libération in vivo des composés d'arôme

Dans ce paragraphe, nous présenterons tout d'abord le mode de transfert des composés d'arôme vers la cavité nasale. Ensuite, nous expliquerons comment les caractéristiques des produits peuvent influencer la libération des composés d'arôme lors de la consommation de produits aromatisés. Enfin, nous présenterons les paramètres physiologiques qui peuvent modifier cette libération lors de la consommation.

a. Le transfert des composés d'arôme jusqu'aux récepteurs olfactifs

Les composés d'arôme présents dans les aliments sont perçus par les récepteurs olfactifs de la cavité nasale. Deux trajets peuvent les y conduire : le trajet orthonasal par lequel les arômes atteignent directement la cavité nasale avant même que l'aliment ne soit mis en bouche, et le trajet rétronasal par lequel les composés d'arôme sont d'abord libérés dans la salive avant d'être transférés dans la phase gazeuse de la bouche puis dans le nasopharynx lorsque l'aliment est mastiqué (Holley, 2006). Les deux types de libération sont présentés sur la Figure 2.

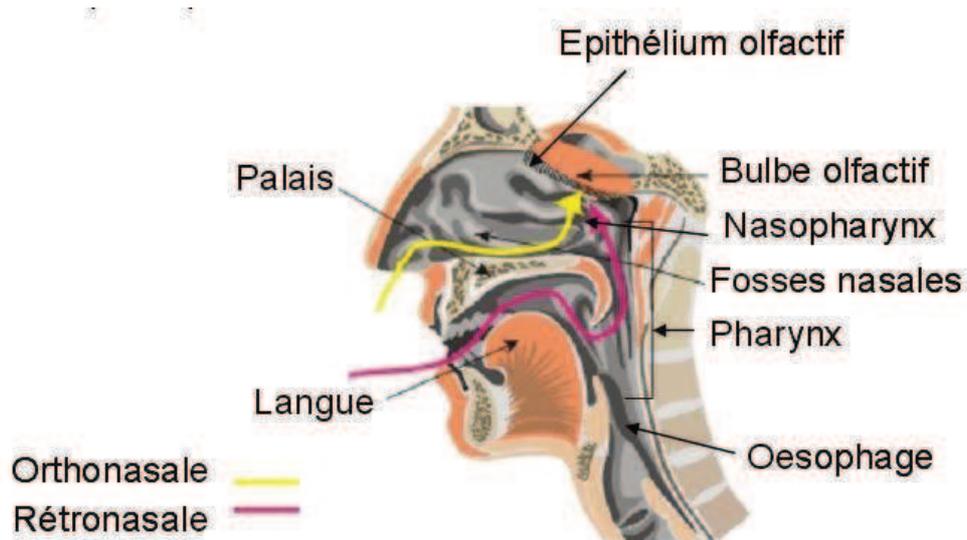


Figure 2 : Trajet de libération orthonasale et rétronasale des composés d'arôme

Le trajet des composés d'arôme depuis la cavité buccale vers la cavité nasale implique une dilution, avec des concentrations 10 à 100 fois inférieures dans la cavité nasale (Linthorpe *et al.*, 2002). Quel que soit leur trajet (orthonasal ou rétronasal), les composés d'arôme interagissent avec l'épithélium olfactif et peuvent se lier, de façon réversible, aux récepteurs des cellules sensorielles. Ces cellules sont des neurones dont le récepteur neuronal possède un pôle dendritique comportant des cils fins immergés dans le mucus nasal. Les cellules possèdent également un axone qui se projette jusqu'au bulbe olfactif et qui transporte le signal électrique dû à l'activation du récepteur neuronal. Les récepteurs odorants appartiennent à la super famille des récepteurs couplés aux protéines G (Buck & Axel, 1991). La transduction olfactive, qui est la conversion de l'énergie de liaison odorant-récepteur en un signal électrique, implique une cascade de réactions enzymatiques commençant par l'activation de la protéine G.

Puisque les arômes sont perçus au niveau de la cavité nasale, la plupart des études ont analysé la libération des composés d'arôme dans la cavité nasale lors de la consommation des aliments. La libération d'arômes peut être suivie en temps réel, lors de la consommation d'un produit, soit par ionisation chimique à pression atmosphérique (atmospheric pressure chemical ionisation – mass spectrometry, ou APCI-MS) (Taylor *et al.*, 2000), soit par spectrométrie de masse couplée à une réaction de transfert de protons (proton transfert reaction – mass spectrometry ou PTR-MS) (Lindinger *et al.*, 1998a). Ces deux techniques permettent de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt, qui sont séparées selon leur rapport masse/charge (m/z).

La libération des composés d'arôme lors de la consommation de produits peut donc être suivie en temps réel dans la cavité nasale. Mais, cette libération est modulée à la fois par la composition et les caractéristiques du produit, et par les mécanismes en bouche. Les paragraphes suivants détaillent, d'abord, l'effet des constituants de la matrice alimentaire sur la libération des composés d'arôme (en ne considérant que des ingrédients pouvant se trouver dans les modèles fromagers) puis l'effet de la texture et de la microstructure des produits, et enfin l'effet des paramètres physiologiques.

b. Effet des protéines sur la libération *in vivo* des composés d'arôme

Les mesures de libération/rétention d'arômes *in vivo* peuvent parfois servir de complément à des études de partage et de diffusion, dans le but d'étudier par exemple les interactions entre composés d'arôme et protéines (Gierczynski *et al.*, 2007 ; van Ruth *et al.*, 2004). Dans certains cas, la rétention des composés d'arôme par les protéines, observées en conditions *in vitro* se retrouve également dans les résultats de libération *in vivo* des composés d'arôme, en situation de consommation. Par exemple, la forte rétention des aldéhydes insaturés par les protéines du lactosérum a été confirmée par l'absence de détection de ces composés d'arôme dans l'air expiré analysé par APCI-MS (Le Guen & Vreeker, 2003). Néanmoins, la forte rétention d'autres composés, tels que des méthyl-cétones, n'a pas été retrouvée en APCI-MS (Le Guen & Vreeker, 2003). Un effet possible de dilution par la salive ou d'interaction entre les composés d'arôme et les muqueuses est proposé par les auteurs.

c. Effet des lipides sur la libération *in vivo* des composés d'arôme

Il est admis que la phase lipidique agit comme un réservoir d'arômes, conduisant à une libération et à une perception retardée des composés d'arôme. Généralement, la libération des composés d'arôme diminue lorsque la teneur en lipides d'une matrice alimentaire augmente, à l'exception des composés hydrophiles (Guichard, 2002 ; Guyot *et al.*, 1996). Cela a pu être montré dans des émulsions, avec une diminution de la concentration des composés d'arôme lipophiles dans la phase aqueuse en bouche provoquée par une augmentation de la fraction lipidique (Carey *et al.*, 2003), du fait de la rétention de ces composés par les lipides. Le même type d'effet (diminution de la libération des composés d'arôme lipophiles suite à l'augmentation de la teneur en lipides) a également été observé sur des aliments solides tels que des modèles fromagers (Lauverjat *et al.*, 2009b).

En bouche, le produit est, en réalité, déstructuré et la libération des composés d'arôme dépend plus de la texture du produit qui les contient que de l'effet séparé de chacun des constituants. Enfin, l'effet des lipides sur la libération *in vivo* ou sur la perception est souvent plus faible que ce qui peut être prédit par l'étude des propriétés de partage et de diffusion des composés d'arôme (Doyen *et al.*, 2001 ; Malone *et al.*, 2003b).

d. Effet du NaCl sur la libération *in vivo* des composés d'arôme

L'effet « salting out » du sel, observé sur le partage des composés d'arôme, peut également avoir lieu en bouche. Sur un même modèle fromager, il a été montré que le temps pour atteindre l'intensité maximale de libération des composés d'arôme était du même ordre de grandeur que celui nécessaire pour atteindre l'intensité maximale de libération du sel (Pionnier *et al.*, 2004a ; Pionnier *et al.*, 2004b). Le sel et les composés d'arôme sont donc libérés simultanément et atteignent un maximum en même temps, probablement après la déglutition. Parfois, aucun effet du sel sur la libération *in vivo* de composés d'arôme ne peut être mis en évidence (Lauverjat *et al.*, 2009b), alors que le NaCl affecte les propriétés de partage des composés d'arôme.

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe sur l'effet des lipides, la libération des composés d'arôme dépend plus de la texture du produit qui les contient que de l'effet individuel de chacun des constituants. Ainsi, le paragraphe suivant décrit l'effet de la texture et de la structure sur la libération *in vivo* des composés d'arôme.

e. Effet de la texture et de la structure sur la libération *in vivo* des composés d'arôme

Sur des gels peu visqueux non mastiqués (de type yaourt par exemple), l'effet de la viscosité et de la fermeté est comparable à ce qui a pu être déterminé par l'étude des coefficients de partage et de diffusion : la viscosité et la fermeté, qui diminuaient le partage et la diffusion, diminuent également la libération *in vivo* des composés d'arôme (Baek *et al.*, 1999 ; Saint-Eve *et al.*, 2006a). La libération maximale est atteinte plus tard quand les gels sont plus structurés (Délérès, I. *et al.*, 2011), et la perception aromatique associée est réduite (Saint-Eve *et al.*, 2006a).

Pour des gels plus visqueux (Boland *et al.*, 2006), ou des produits nécessitant d'être mastiqués, tels que des modèles fromagers (Gierczynski *et al.*, 2007 ; Tarrega *et al.*, 2008), l'effet s'inverse, avec une libération des composés d'arôme plus rapide et plus importante

lorsque la fermeté des produits augmente. Nous verrons dans le paragraphe suivant que la mastication peut expliquer ces différences, révélant parfois des effets de la texture qui n'avaient pas pu être mis en évidence par les études des coefficients de partage et de diffusion (Le Guen & Vreeker, 2003).

Par ailleurs, certains auteurs n'ont observé aucun effet de la texture sur la libération de composés d'arôme dans des crèmes dessert (Lethuaut *et al.*, 2004) ou dans des gels (Hollowood *et al.*, 2002 ; Weel *et al.*, 2002), mais ces études ont utilisé des protocoles de dégustation imposés (durée, mastication), qui peuvent gommer les effets de texture des aliments.

De façon générale, la microstructure modifie la libération des composés d'arôme de manière indirecte, par son action sur la texture (Gierczynski *et al.*, 2011), qui influence à son tour la mastication puis la libération des composés d'arôme.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension de la libération des composés d'arôme, il est important de ne pas considérer seulement l'aliment (composition, texture) mais aussi les processus qui ont lieu en bouche et qui influencent la dynamique de libération des composés d'arôme.

f. Effet de la physiologie orale sur la libération *in vivo* des composés d'arôme

En bouche, le produit subit différentes transformations avant d'être avalé : mastication, dilution par la salive, dégradation préliminaire par les composants de la salive, changement de température (Salles *et al.*, 2011a). La libération des composés d'arôme présente de grandes différences entre individus (Gierczynski *et al.*, 2008 ; Repoux *et al.*, 2011), que ce soit au niveau du profil de libération ou en terme de quantités libérées. Ces différences peuvent être expliquées par les paramètres de physiologie orale, tels que la salivation, la mastication, la déglutition (Pionnier *et al.*, 2004a) ou les variations du volume de la cavité buccale (Mishellany-Dutour *et al.*, 2012). De plus, le protocole de consommation influence également les résultats de libération obtenus (Délérès, I. *et al.*, 2011).

i. Rôle de la mastication sur la libération in vivo des composés d'arôme

Dans le cas de produits qui nécessitent d'être mastiqués avant d'être avalés, la mastication détermine la libération des composés d'arôme : en règle générale, une augmentation des paramètres d'activité masticatoire induit une augmentation de la libération des composés d'arôme (Buettner & Schieberle, 2000a). Cela a déjà été montré sur de nombreux produits alimentaires, tels que des confiseries (Blissett *et al.*, 2006), des chewing-gums (Haahr *et al.*, 2004), des gels de pectine (Hansson *et al.*, 2003), mais aussi des haricots rouges (van Ruth *et al.*, 2004), des bananes (Mayr *et al.*, 2003) et des modèles fromagers (Pionnier *et al.*, 2004a ; Repoux *et al.*, 2012b ; Tarrega *et al.*, 2008). Dans le cas des modèles fromagers, l'augmentation des paramètres d'activité masticatoire est due à une plus grande fermeté des produits, soit par augmentation de la teneur en matière sèche, soit par augmentation de la teneur en protéines.

En réalité, lors de la consommation d'un aliment, la mastication s'adapte aux caractéristiques du produit consommé (Mioche *et al.*, 2003 ; Yven *et al.*, 2012). Chaque individu adopte une stratégie de mastication qui détermine ensuite les caractéristiques du bol alimentaire prêt à être avalé. Très souvent, la durée de mastication est le principal paramètre d'adaptation, devant l'amplitude de contraction des muscles masticatoires (Yven *et al.*, 2012). De manière générale, un produit plus ferme est mastiqué plus longtemps et plus intensément qu'un produit moins ferme. L'activité musculaire des muscles impliqués dans la mastication peut être étudiée, pendant tout le processus de mastication, par la technique d'électromyographie (EMG). Cette technique permet ainsi de montrer que la texture des aliments influence la mastication (Horio & Kawamura, 1989). Les paramètres EMG permettent de mieux prédire les caractéristiques sensorielles texturales des produits que les mesures mécaniques (Gonzalez *et al.*, 2001). On notera que le phénomène de mastication peut aussi être approché en conditions *in vitro*, à l'aide de simulateur de mastication (Salles, 2007).

Lors de la mastication, la salivation augmente également (Anderson & Hector, 1987 ; Neyraud *et al.*, 2003), ce qui fait de la salive un élément important, à considérer dans l'étude de la physiologie orale.

ii. Rôle de la salive sur la libération in vivo des composés d'arôme

La salive peut affecter la libération des composés d'arôme de plusieurs façons : dilution des composés d'arôme par le flux salivaire (Hansson *et al.*, 2003 ; Odake *et al.*, 1998), interactions des constituants salivaires avec les composés d'arôme (Friel & Taylor, 2001 ; Hussein *et al.*, 1983), activité enzymatique, et capacités tampon (Roberts & Acree, 1995). Elle peut aussi affecter la dégradation d'un aliment, par exemple en modifiant la fonte en bouche de pastilles de menthe, et en affectant donc la libération de l'arôme menthone (Repoux *et al.*, 2011). Des pastilles plus dégradées par la salive libèrent plus d'arôme. La concentration en protéines de la salive est une des causes des différences de dégradation en bouche. Les protéines salivaires ont, en effet, leur importance dans la libération des composés d'arôme. Lors de la consommation de vin, la salive diminue la libération des composés d'arôme, du fait des interactions entre les protéines salivaires et les composés d'arôme (Genovese *et al.*, 2009). Plus spécifiquement, les mucines (protéines salivaires) peuvent interagir avec les composés d'arôme par des liaisons hydrophobes (Friel & Taylor, 2001 ; van Ruth & Roozen, 2000) et donc modifier leur libération. D'autres types de protéines salivaires peuvent également intervenir indirectement, comme les amylases et les lipases, par la dégradation partielle de l'amidon et des lipides présents dans les aliments (Boelrijk *et al.*, 2006 ; Pedersen *et al.*, 2002). Ces protéines favorisent ainsi la libération des molécules de la saveur (Ferry *et al.*, 2006) et, très vraisemblablement des molécules d'arôme. L'action des lipases peut également générer de nouveaux composés d'arôme car on sait, par exemple, que l'hydrolyse des lipides des produits laitiers peut conduire à la production de divers composés volatils (Spinnler, 2011). Les produits des réactions entre protéines salivaires et composés d'arôme peuvent à leur tour affecter la libération des composés d'arôme (Salles *et al.*, 2011a).

Les paramètres salivaires (flux et fréquence) influencent également la libération des composés d'arôme, comme cela a pu être mis en évidence en conditions artificielles (Boland *et al.*, 2004 ; van Ruth *et al.*, 2001). Les variations de libération des composés d'arôme, en fonction des paramètres salivaires, sont dépendantes du caractère hydrophobe des composés et des caractéristiques physico-chimiques de l'aliment. En conditions de consommation, les résultats peuvent être différents. Sur du vin, les dégustateurs ayant un faible flux salivaire atteignent le maximum d'intensité aromatique plus tard que ceux ayant un flux salivaire élevé (Noble, 1995). Ceci a également été prouvé sur des émulsions (Mialon & Ebeler, 1997), tout en mentionnant que les corrélations dépendaient des composés étudiés.

Sur des produits solides, il est plus difficile de mettre en évidence un effet des paramètres salivaires et, par exemple, Pionnier *et al.* (2004a) et Tarrega *et al.* (2011) n'ont mis en évidence aucun effet du flux salivaire sur la libération de composés d'arôme lors de la consommation de modèles fromagers. En revanche, la quantité de salive incorporée dans le bol alimentaire dépend de la texture et du ratio lipides/protéines. Les modèles fromagers les plus fermes (ratio lipides/protéines le plus faible) sont ceux qui incorporent le plus de salive lors de la mastication. Cette constatation a été confirmée par les travaux de Repoux *et al.* (2012b) qui ont montré une diminution du pourcentage de salive incorporée quand la teneur en lipides diminuait. Ces constatations sont intéressantes d'un point de vue de la libération des composés d'arôme car il a été montré que le coefficient de transfert de masse du propanoate d'éthyle, dans un bol alimentaire, dépendait à la fois de la dilution par la salive et de la fermeté des produits (Doyennette *et al.*, 2011). De plus, les coefficients de partage (air/bol alimentaire) de composés d'arôme sont plus élevés lorsque le bol alimentaire contient plus de salive (diminution des paramètres de texture des bols par incorporation de salive) (Doyennette *et al.*, 2011).

Pour terminer l'étude des paramètres influençant la libération *in vivo* des composés d'arôme, nous présentons l'effet de la déglutition dans le paragraphe suivant.

iii. Rôle de la déglutition sur la libération *in vivo* des composés d'arôme

Pour la majorité des personnes, aucun gaz n'est transmis de la cavité orale à la cavité nasale, tant que la barrière formée par la langue et le velum n'a pas bougé, soit par déglutition, soit par de vigoureux mouvements de la langue ou de la bouche (Buettner & Schieberle, 2000b). Ainsi, la libération des composés d'arôme est bloquée par cette barrière naturelle. Les variations intra- et inter-individuelles présentes lors des mesures de libération d'arôme proviennent de différences dans les profils de respiration, de flux salivaire, de mastication et de déglutition (Pionnier *et al.*, 2004a). Bien que les arômes soient principalement libérés après déglutition, des pulses de libération peuvent survenir lors de la mastication, avant déglutition, sans être pour autant associés à des déglutitions (Hodgson *et al.*, 2003 ; Tarrega *et al.*, 2011). Les pulses sont associés aux différents coups de dent, au cours desquels l'air, chargé de composés d'arôme, serait pompé hors de la bouche vers la gorge, où il se joindrait à l'air expiré (Hodgson *et al.*, 2003).

Sur la Figure 3 (extraite de Boelrijk *et al.* (2006)), trois profils de libération se distinguent clairement lors de la consommation de produits laitiers liquides (dégglutition imposée à 20 secondes) : un groupe dont le pic de libération survient pendant la phase initiale de mastication, un 2^e groupe dont la libération commence dès la mastication mais qui atteint un pic après déglutition, et un 3^e groupe qui ne libère pas d'arôme avant la déglutition mais seulement après.

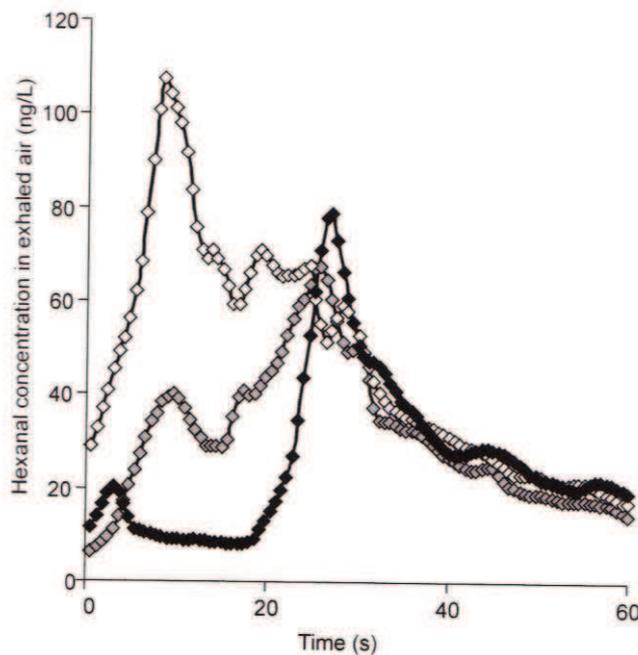


Figure 3 : Trois profils typiques de courbes de libération de l'hexanal de produits laitiers

Dans la plupart des cas, la quantité et l'intensité d'arôme libéré sont plus importantes après déglutition qu'avant déglutition (Lauverjat *et al.*, 2009b ; Repoux *et al.*, 2012b ; Tarrega *et al.*, 2008). Malgré l'existence de plusieurs profils de libération, le cas le plus fréquent consiste en une intensité maximale de libération atteinte après la première déglutition (Boland *et al.*, 2006 ; Gierczynski *et al.*, 2007 ; Hansson *et al.*, 2003).

Lors de la déglutition, l'air expiré associé (« swallow breath ») est expulsé vers la cavité nasale (Buettner *et al.*, 2001). Plusieurs hypothèses concernent le pic de libération d'arôme initial qui suit immédiatement la première déglutition : soit il est associé au transfert d'air depuis la bouche (Linthorpe *et al.*, 2003), soit la déglutition a provoqué une augmentation transitoire du transfert de masse interfacial, du fait d'une plus grande turbulence (Wright *et al.*, 2003).

Le déclenchement de la déglutition dépend de la taille des particules de l'aliment déstructuré en bouche, du degré de lubrification, et de la cohésion du bol, qui permet d'avaler sans danger (Prinz & Lucas, 1997). Après la déglutition, un film de salive (ou plus précisément un mélange de salive et d'aliment) peut rester présent sur la muqueuse pharyngale et participer à la libération des arômes (de Loubens *et al.*, 2010). Pour les liquides, la libération d'arôme qui a lieu pendant la seconde expiration et les suivantes est supposée avoir lieu depuis ce fin film resté sur la surface du pharynx après déglutition (Linthorpe *et al.*, 2003 ; Normand *et al.*, 2004 ; Wright *et al.*, 2003). Pendant l'expiration, les composés d'arôme présents dans ce film sont exposés à d'importants flux d'air, ce qui résulte en une libération fortement contrôlée cinétiquement. Ceci explique pourquoi les concentrations en arôme sont plus faibles à partir de la deuxième expiration et pourquoi cette différence est plus prononcée pour les composés d'arôme les plus volatils. Enfin, dans des boissons, la libération plus tardive de certains composés d'arôme est fortement contrôlée par leurs propriétés de diffusion, et la libération persistante de certains composés est plutôt dépendante du transfert de masse (Linthorpe *et al.*, 2002).

Bien que la mobilité ou la libération des composés de flaveur soient souvent mises en regard avec la perception de la flaveur (Boland *et al.*, 2006 ; Déléris, I. *et al.*, 2011 ; Gierczynski *et al.*, 2008 ; Lauverjat *et al.*, 2009b ; Leclercq & Blancher, 2012 ; Mestres *et al.*, 2005 ; Overington *et al.*, 2010 ; Saint-Eve *et al.*, 2006a ; Weel *et al.*, 2002), les données de libération *in vivo* des composés d'arôme ne sont pas exactement prédictives de la perception aromatique, comme cela a pu être montré sur des bonbons gélifiés (Leclercq & Blancher, 2012). En effet, la perception est un phénomène intégratif, multidimensionnel qui va au-delà de la simple perception quantitative de composés d'arôme. Il est donc pertinent de s'intéresser aux effets des constituants des produits sur la perception. La perception aromatique, mais aussi la perception salée seront abordées dans le chapitre suivant.

V. Perception de la flaveur des aliments

Dans ce chapitre, nous présenterons successivement la perception du sel et la perception des composés d'arôme, en décrivant les facteurs les influençant. Ensuite, les interactions perceptives multimodales entre ces deux perceptions seront détaillées.

1. Perception du sel en situation de consommation

Dans ce paragraphe, nous présenterons, tout d'abord, le mécanisme de perception de la saveur salée, puis nous décrirons l'effet de la composition et de la texture des aliments sur la perception salée.

a. La perception de la saveur salée

Les composés responsables de la saveur sont libérés en bouche lors de la consommation d'aliments et sont détectés par de petites cellules bipolaires, regroupées de façon dense dans des bourgeons gustatifs localisés sur la langue, le palais et le pharynx. Sur la langue, les bourgeons sont portés par les papilles. Les pôles apicaux des cellules gustatives possèdent des microvillosités qui sont en contact avec la cavité orale. Trois classes de papilles se distinguent par leur morphologie et leur localisation : les papilles filiformes, fongiformes, foliées (ou coralliformes), et circumvallées (ou caliciformes). Contrairement aux cellules olfactives, les cellules gustatives ne sont pas des neurones (Holley, 2006). Au contact d'un composé de la saveur, des récepteurs situés sur les microvillosités des cellules gustatives déclenchent des réactions intracellulaires qui activent les synapses et provoquent l'excitation des fibres nerveuses afférentes. Deux sortes de processus ont lieu lors de la réception des saveurs : les saveurs acide et salée sont provoquées par des espèces ioniques détectées par des canaux ioniques, alors que les saveurs sucrée, amère et umami impliquent l'activation de récepteurs couplés à des protéines G, appartenant à la même super famille de récepteurs que ceux comprenant les récepteurs olfactifs (Holley, 2006).

b. Effet de la composition et de la texture des matrices alimentaires sur la perception salée

i. Effet de la composition sur la perception salée

De façon générale, la teneur en matière grasse affecte la perception salée, puisqu'une augmentation de cette teneur conduit à une augmentation de la perception salée, que ce soit dans des émulsions simples (Malone *et al.*, 2003b), dans des produits laitiers gélifiés (Panouillé *et al.*, 2012), dans des spécialités fromagères (Wendin *et al.*, 2000) ou dans des

modèles fromagers (Lawrence *et al.*, 2012 ; Phan *et al.*, 2008). L'effet des protéines est, quant à lui, inverse de celui de la matière grasse. La perception salée des produits diminue lorsque la teneur en protéines augmente, comme c'est le cas, par exemple, dans des produits laitiers gélifiés (Panouillé *et al.*, 2012). Cette diminution de perception salée en présence de protéines peut être attribuée à la liaison des ions Na^+ avec les protéines. En ce sens, Rosett *et al.* (1997) ont observé que la liaison d'ions Na^+ avec des caséines diminue la perception salée dans des soupes de tomate. Cette diminution de perception est attribuée au fait que les ions Na^+ , qui sont liés aux caséines, ne participent pas à la perception salée. Similairement, il a été montré que le gluten pouvait lier le sodium dans du pain, rendant le sodium indisponible pour la réception de la saveur salée (Keast *et al.*, 2004). Par ailleurs, la présence de lactose, dans du lait, peut également masquer la perception salée du sel ajouté, en la compensant par une perception sucrée (Rosett *et al.*, 1997).

La perception salée peut aussi être expliquée, parfois, par la libération du sel en bouche, pour la consommation de produits tels que des chips de pommes de terre ou des gommes salées (Neyraud *et al.*, 2003 ; Tian & Fisk, 2012). Dans d'autres cas, la perception salée n'est pas influencée par les mêmes paramètres que la libération du sel en bouche, laissant suggérer des interactions perceptives dans les produits considérés (Lawrence *et al.*, 2012 ; Phan *et al.*, 2008).

ii. Effet de la texture sur la perception salée

Dans des solutions dans lesquelles la concentration en biopolymères augmente, la perception d'arômes et de saveurs est plus faible, du fait de l'augmentation de viscosité (Baines & Morris, 1987). Ceci a été confirmé sur des produits laitiers, avec une diminution de perception salée pour des produits plus gélifiés, moins liquides (Panouillé *et al.*, 2011). Sur des produits plus fermes, la densité peut également affecter la perception salée. Un pain plus dense est, par exemple, perçu moins salé (Panouillé *et al.*, 2012), alors que la densité n'affecte pas la libération du sel en bouche. En terme de dynamique de perception, des mesures de dominance temporelle des sensations (DTS) ont montré que la sensation salée est plutôt perçue à la fin de la consommation du pain. Enfin, la surface de contact entre l'aliment mastiqué et la salive peut, par son augmentation, stimuler plus de récepteurs gustatifs et induire une augmentation de l'intensité salée perçue (Malone *et al.*, 2003a ; Malone *et al.*, 2003b).

Certains auteurs suggèrent que la matière grasse formerait un film sur les muqueuses (langue et palais) qui limiterait le contact entre les récepteurs gustatifs linguaux et le sel (Lynch *et al.*, 1993 ; Phan *et al.*, 2008), mais les ions sodium seraient capables de pénétrer ce film lipidique sur la langue et d'atteindre les récepteurs gustatifs, du fait de leur petite taille, et malgré les interactions des acides gras avec la muqueuse (Mattes, 2007 ; Valentova & Pokorny, 1998).

Après avoir précisé les facteurs influençant la perception salée, nous allons désormais nous intéresser aux facteurs affectant la perception aromatique.

2. Perception des composés d'arôme en situation de consommation

a. Effet de la composition des matrices alimentaires sur la perception des arômes

Tout d'abord, la matière grasse influence la perception aromatique des produits laitiers. En effet, une augmentation de la teneur en matière grasse conduit à une diminution de la perception de la note aromatique « fromage bleu » dans des modèles fromagers (Saint-Eve *et al.*, 2009) et à une augmentation de la perception de la note « beurre » dans des spécialités fromagères (Saint-Eve *et al.*, 2009). Ces différences peuvent être dues à la nature des composés d'arôme considérés dans les deux cas (heptan-2-one et diacétyle). Dans des modèles fromagers, la teneur en matière sèche ne semble pas modifier la perception aromatique, alors que cet effet était très présent sur la libération *in vivo* des composés d'arôme associés.

b. Effet de la texture des matrices alimentaires sur la perception des arômes

La perception aromatique ne provient pas seulement des interactions physico-chimiques entre la matrice alimentaire et les composés d'arôme puisque, à coefficient de partage air/produit constants, un changement de viscosité ou de niveau de sucre dans des crèmes dessert conduit à des perceptions aromatiques différentes (Lethuaut *et al.*, 2005). L'effet de la texture sur la perception aromatique a été étudié sur des yaourts, montrant que des yaourts peu visqueux étaient perçus plus intenses en arôme fraise que des yaourts plus visqueux (Saint-Eve *et al.*, 2006b). Plusieurs autres études ont montré que l'augmentation de la teneur en différents agents de texture diminuait l'intensité aromatique de matrices gélifiées (Boland *et al.*, 2006 ; Juteau *et al.*, 2004 ; Kälviäinen *et al.*, 2000). La texture influence donc la perception aromatique mais, à l'inverse, la nature de l'arôme peut aussi influencer la perception de la texture : des yaourts présentant des notes beurre et noix de coco sont perçus comme épais et

collants alors que des yaourts présentant des notes pomme verte et amande sont perçus plutôt comme lisses et fluides (Saint-Eve *et al.*, 2004).

La microstructure peut également modifier la perception aromatique, notamment par l'effet de la taille des gouttelettes lipidique dans des émulsions de type vinaigrette (Charles *et al.*, 2000). Sur cette matrice, les auteurs ont montré qu'une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques entraîne une diminution de la perception des notes moutarde, œuf et beurre alors qu'elle entraîne une augmentation de l'odeur de citron. Ces différences ont été attribuées à l'hydrophobicité des composés d'arôme à l'origine de ces perceptions. Enfin, la texture et la microstructure influencent la salivation et la mastication, avec la déstructuration du produit en bouche. Ces deux paramètres sont des facteurs importants dans la perception des composés d'arôme (Burdach & Doty, 1987).

Après avoir décrit la perception salée et la perception aromatique, nous nous intéresserons, dans le paragraphe suivant, aux interactions entre ces deux perceptions.

3. Interactions entre la perception des composés d'arôme et la perception salée

De nombreuses études ont mis en évidence l'existence d'interactions cognitives entre les perceptions d'arômes et de saveurs (Salles, 2006 ; Valentin *et al.*, 2006). Kubickova & Grosch (1998) et Le Quéré & Salles (2001) ont étudié les composés responsables des arômes et ceux responsables de la saveur dans du Camembert et des fromages de Chèvre. Ces deux études concluent que ce sont essentiellement les composés de faibles poids moléculaires qui participent à la saveur, alors que la fraction hydrosoluble est la plus représentative des arômes typiques. L'effet du NaCl en tant qu'exhausteur de goût a souvent été démontré, par exemple dans des modèles fromagers, avec une augmentation de la perception globale d'arôme suite à une augmentation de la teneur en sel (Saint-Eve *et al.*, 2009).

Cependant, les interactions arôme-saveur en bouche sont très dépendantes du couple arôme/saveur étudié (Noble, 1996). Par exemple, l'arôme ail augmente la perception salée de solutions épaissies (Cook *et al.*, 2003), tout comme le font les arômes sardine, bacon, anchois cacahuète, thon et roquefort (Lawrence *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'olfaction rétronasale et la perception des saveurs sont des processus concomitants, ce qui explique que des interactions puissent aussi avoir lieu entre ces deux phénomènes. En effet, la perception salée peut être affectée par la perception olfactive, du fait d'interactions multimodales entre sens (Djordjevic *et al.*, 2004 ; Lawrence *et al.*, 2009 ; Lim & Johnson, 2012 ; Nasri *et al.*, 2011).

Par exemple, la congruence de l'odeur de jambon et de l'odeur de sardine avec la perception salée a été démontrée dans des solutions aqueuses (Lawrence *et al.*, 2009), tout comme celle de l'odeur de la sauce soja avec la perception salée (Djordjevic *et al.*, 2004). Néanmoins, ces effets dépendent de la concentration en sel des solutions. La perception salée de solutions faiblement ou moyennement salées (0,01 ou 0,02 M NaCl), augmente significativement quand les sujets perçoivent simultanément l'odeur de sardine (congruente de la saveur salée), mais cette augmentation de perception salée n'a pas lieu pour les solutions fortement salées (0,04 M NaCl) (Nasri *et al.*, 2011). Ces résultats ont été étendus à des produits fromagers, montrant la validité des interactions multimodales entre odeurs et saveurs congruentes (Lawrence *et al.*, 2011). En effet, des odeurs de Comté et de sardine induisent une augmentation de la perception salée des produits, évoquant ainsi une stratégie intéressante de compensation des pertes sensorielles dans les produits à teneur réduite en sel. On peut également noter que les phénols (composés responsables de la fumée) amplifie la perception salée dans des saumons fumés (Foucat *et al.*, 2004a).

Des interactions peuvent aussi avoir lieu entre la saveur salée (sodium), la saveur sucrée (saccharose) et la saveur amère (urée) (Breslin & Beauchamp, 1997). La perception amère disparaît et la perception sucrée augmente lorsque du sodium est ajouté à un mélange sucre-urée. Les interactions entre perception des saveurs ont lieu au niveau cognitif. Ces résultats sont dans la même lignée que ceux de Gillette (1985) qui suggère que l'addition de NaCl à des soupes diminue l'amertume et augmente la perception sucrée. De plus, la perception salée augmente avec l'ajout d'acide dans du pain (Hellemann, 1992) et la perception acide est influencée par la concentration en sel dans des fromages (Stampanoni & Noble, 1991).

Plus marginalement, des interactions entre sensations trigéminales et saveur ont également été étudiées. De la capsaïcine a été appliquée sur un côté de la langue puis des composés de saveur ont été appliqués de façon bilatérale (Simons *et al.*, 2003). L'intensité sucrée due au saccharose, l'intensité amère due à la quinine et l'intensité umami due au glutamate de sodium étaient notées plus faiblement sur la partie de la langue traitée avec de la capsaïcine, évoquant ainsi une suppression de la transmission centrale des saveurs par la capsaïcine.

Enfin, il existe aussi des interactions entre perception de texture et perception de la saveur. Mais la perception de la texture est complexe, comme l'explique ce dernier paragraphe.

4. Quelques informations sur la perception de la texture

La perception de la texture en bouche est un processus dynamique qui a lieu lors du maniement de l'aliment. Un modèle à 3 dimensions peut être appliqué pour modéliser ce maniement, en incluant le « degré de structure », le « degré de lubrification » et le « temps ». Alors que chaque aliment subit des changements en bouche, il suit sa propre « trajectoire de déstructuration », à travers ces 3 dimensions (Hutchings & Lillford, 1988).

En particulier, les lipides jouent un rôle clé dans la modification de la perception des aliments (Ollivon, 2006): sensation en bouche, apparence (brillance, couleur, opacité), structure, texture (consistance), transfert de chaleur (profil de fonte) et effet non sensoriels (satiété). Les lipides peuvent ensuite influencer la perception des saveurs et des composés d'arôme (Spinnler, 2011). Mais, en réalité, la perception de la texture est complexe ; les propriétés tactiles (géométrie, sensation en bouche, douceur, sensation sableuse, propriétés d'humidité) et kinesthésiques (propriétés mécaniques, fermeté, cohésion, souplesse) sont évaluées en bouche (Meilgaard *et al.*, 1991). Il est donc difficile d'établir une relation causale entre mesures mécaniques de la texture (rhéologie) et perception de la texture (van Vliet, 2002).

Dans certains cas, la perception de la texture peut avoir un effet supprimeur de la perception de la flaveur (Mestres *et al.*, 2005 ; Weel *et al.*, 2002). Cette interaction peut s'expliquer par le fait que les sujets se focalisent plutôt sur la perception de la texture que sur la perception de la flaveur lors de la notation (Gierczynski *et al.*, 2008).

VI. Conclusion sur la synthèse bibliographique et démarche adoptée

Cette synthèse bibliographique montre que la mobilité, la libération et la perception du sel (NaCl) et des composés d'arôme dépendent des caractéristiques du produit (composition, texture, structure) et de l'approche réalisée. Des techniques de mesures *in vitro* permettent d'étudier les interactions entre les constituants des produits et les composés étudiés, mais les mesures *in vivo* sont nécessaires pour mieux comprendre tous les mécanismes intervenant dans la libération des composés lors de la consommation. En effet, les paramètres physiologiques des individus influencent également les mécanismes de libération du NaCl et des composés d'arôme. L'apport de la littérature permet d'enrichir la compréhension des mécanismes de mobilité et de libération du NaCl mais ces données ont été obtenues sur des matrices alimentaires très diversifiées, ce qui peut expliquer des résultats parfois contradictoires.

L'intérêt de ce projet de thèse est de mener une approche intégrative sur un seul type d'aliment : les modèles fromagers. Du niveau moléculaire au niveau macroscopique, la mobilité, la libération et la perception du NaCl et des composés d'arôme vont être étudiées. Concernant le NaCl, les apports de la RMN du sodium vont pouvoir être comparés aux coefficients de partage du sodium, à la libération des ions Na^+ (dans l'eau et dans la salive), et à la perception salée des modèles fromagers. Pour les composés d'arôme, les données de libération *in vitro* et *in vivo* pourront être comparées à la perception des modèles fromagers. Tous ces résultats seront comparés entre eux et également mis en regard de la composition, de la microstructure et de la texture des modèles fromagers.

Ce type d'approche est basé sur l'hypothèse de travail suivante : **La composition des modèles fromagers influence la mobilité du sodium et des composés d'arôme, les stimuli en bouche et la perception de la flaveur.** Pour réaliser ce travail, un modèle fromager (matrice lipoprotéique) a été choisi comme produit d'étude : des variations de composition (ratio lipides/protéines et teneur en NaCl) permettent d'obtenir six produits de structures et de textures différentes.

Dans un premier temps, la **mobilité et la libération du sodium** ont été étudiées en fonction de la composition, de la structure et de la texture des modèles fromagers. Cette étude a été réalisée avec deux approches :

- par RMN du sodium, par l'étude des coefficients de partage (eau/modèle fromager) ou l'étude de la cinétique de libération des ions sodium en phase aqueuse.
- Par l'étude de la libération du sodium en conditions *in vivo*, dans la salive, lors de la consommation de modèles fromagers par des sujets.

Dans un deuxième temps, la **libération des composés d'arôme a été étudiée *in vivo***, dans la cavité nasale, lors de la consommation de modèles fromagers par des sujets.

Enfin, la **perception du NaCl et des composés d'arôme** a été étudiée par l'analyse des caractéristiques sensorielles des modèles fromagers.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Mise au point et formulation des modèles fromagers

1. Mise au point des modèles fromagers

Des modèles fromagers ont été choisis comme aliment support pour cette étude car ce sont des produits facilement réalisables en laboratoire et dont le processus de fabrication est entièrement maîtrisé. En effet, tous les paramètres sont connus et contrôlables.

a. Essais préliminaires

Deux des modèles fromagers mentionnés dans les travaux de Tarrega *et al.* (2008) ont été utilisés pour effectuer des essais préliminaires de faisabilité des techniques (modèles n° 2 et n° 6, correspondant respectivement à des ratios lipides/protéines de 0,5 et 1 pour une vitesse de mélange de 2000 tour.min⁻¹). A partir de ces deux modèles, six modèles fromagers ont ensuite été formulés, avec trois ratios lipides/protéines (0,5 ; 0,75 et 1) et deux niveaux de sel (sans NaCl ajouté, ou avec 1 % de NaCl ajouté).

Sur ces six modèles fromagers, des mesures de coefficient de partage eau/modèle fromager et des expérimentations préliminaires de résonance magnétique nucléaire du sodium (RMN ²³Na) ont été effectuées (Andriot *et al.*, 2010 ; Andriot, I. *et al.*, 2011). Les techniques utilisées sont détaillées plus loin au sein du chapitre « Matériels et méthodes » et les résultats sont présentés dans l'article de Andriot, I. *et al.* (2011) (Annexe 1). Ces expérimentations préliminaires ont montré la fiabilité de la quantification du sodium par RMN, ainsi que la faisabilité de l'étude de la mobilité des ions sodium dans les modèles fromagers. La faisabilité d'application des deux techniques étant démontrée, il a été décidé d'étudier la microstructure des modèles fromagers, afin de mieux comprendre les interactions qui pouvaient avoir lieu entre la matrice et le sodium. Ainsi, des observations en microscopie confocale ont été réalisées (méthode expliquée ultérieurement) à l'UMR STLO (Science et Technologie du Lait et de l'Œuf) du centre INRA de Rennes. Un exemple de cliché obtenu est présenté sur la Figure 4. Les zones protéiques apparaissent en vert, alors que les zones lipidiques (globules gras) apparaissent en rouge (cf. coloration des constituants en microscopie confocale, au paragraphe 5.b.).

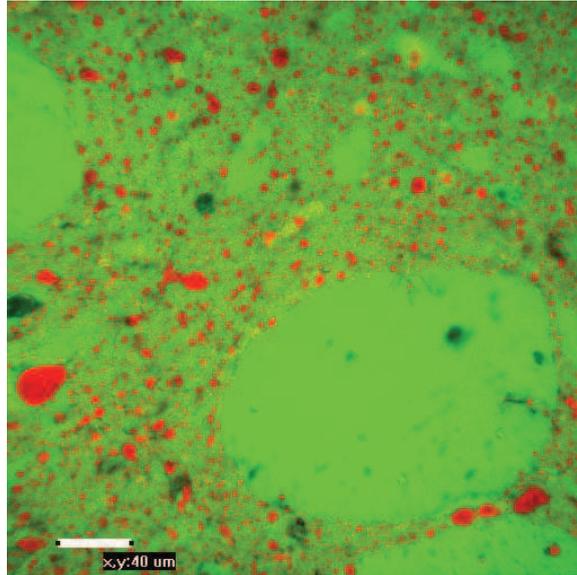


Figure 4 : Observation par microscopie confocale d'un premier type de modèle fromager (ratio lipides/protéines de 1 et sans NaCl ajouté). La phase protéique est représentée en vert sur le cliché, et la phase lipidique en rouge.

La Figure 4 met en évidence l'inhomogénéité de la microstructure. En effet, des agrégats protéiques sont présents (zones vertes de taille plus importante), alors que la matière grasse est plutôt dispersée sous la forme de petits globules gras dans le reste de la matrice. Les agrégats protéiques sont le signe d'une mauvaise homogénéisation du mélange lors de la fabrication. Ce phénomène a déjà été observé par d'autres auteurs sur des modèles fromagers (Floury *et al.*, 2009a).

Suite à ces observations, il a été décidé de procéder à une reformulation des modèles fromagers, afin d'obtenir une formulation dont la microstructure soit homogène (globules gras répartis de façon homogène dans une matrice protéique). L'objectif d'homogénéité est nécessaire pour l'étude de la mobilité de petits solutés (sodium, composés d'arôme) dans une matrice.

b. Optimisation de la formulation des modèles fromagers

Différents paramètres ont donc été modifiés afin d'obtenir une composition optimale permettant à la fois une variation de la teneur en gras et en sel, mais permettant également l'obtention de modèles fromagers structurellement homogènes. Les principales modifications ont concerné :

- La composition, et notamment les caséines utilisées.

Un mélange caséine présure/caséine acide a donc été choisi afin d'être dans des conditions favorables à l'obtention d'une structure homogène. Le ratio caséine acide/caséine présure a été maintenu constant pour toutes les formulations, à savoir :

$$\frac{\text{masse caséine acide}}{\text{masse caséine présure}} = 0,25$$

- Les paramètres de fabrication : température, vitesse d'agitation.

En effet, outre les ingrédients, la température de fabrication et la vitesse de mélange peuvent influencer la structure et donc l'homogénéité de matrices fromagères. Dans notre cas, en partant du protocole de fabrication proposé par Tarrega *et al.* (2008), qui correspondait à une fabrication de modèles fromagers à 65 °C et à une vitesse de mélange de 700 à 2000 tour.min⁻¹ (R3VV, Robot Coupe, Montceau-les-Mines, France), nous avons choisi des paramètres plus élevés afin de favoriser l'homogénéisation, tout en restant dans les limites imposées par le matériel. Les fabrications ont donc été produites à 75 °C et mélangées à la vitesse de 2500 tour.min⁻¹.

2. Ingrédients

Les ingrédients utilisés pour la formulation des modèles fromagers sont les suivants :

- Caséine présure (Eurial Poitouaine, Nantes, France)
- Caséine acide (BBA Lactalis, France)
- Eau déminéralisée : eau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)
- Matière grasse laitière anhydre : MGLA, point de fusion 32 °C (Cormans, Goe-Limbourg, Belgique)
- Acide citrique (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne)
- Sel : NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne)
- Sels de fonte : Kasomel 2185 (Prayon, Europhos, Engis, Belgique)
- Solution aromatique (voir détails plus loin).

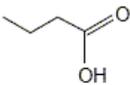
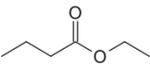
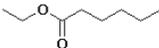
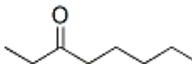
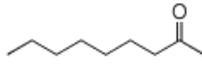
Les sels de fonte utilisés correspondent au produit Kasomel 2185 (Prayon). Ce produit est un mélange de trois sels :

- Citrates trisodiques (E 331)
- Orthophosphates de sodium (E339)
- Polyphosphates de sodium (E 452).

Les proportions en ces trois composés ne nous ont pas été communiquées par le fabricant, mais les teneurs en minéraux ont pu être obtenues, et notamment la teneur en sodium : 24,7 % de sodium dans le Kasomel 2185.

La solution de composés d'arôme (solution aromatique) a été préparée dans du propylèneglycol (Cooper, Melun, France). L'ensemble des composés d'arôme est de qualité alimentaire (« food grade ») et provient du fournisseur Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Un gramme de solution a été ajouté par kilogramme de modèle fromager préparé. Cette solution a été conçue pour donner une note «fromage» aux modèles fromagers (Tarrega *et al.*, 2008). Les caractéristiques des composés, ainsi que les concentrations utilisées sont listées dans le Tableau 4 page suivante.

Tableau 4 : Caractéristiques et concentrations des composés d'arôme utilisés dans les modèles fromagers

	Composés d'arôme						
	Acide butanoïque	Butanoate d'éthyle	Hexanoate d'éthyle	Diacétyl (butane-2,3-dione)	Heptan-2-one	Octan-3-one	Nonan-2-one
Formule brute	C₄H₈O₂	C₆H₁₂O₂	C₈H₁₆O₂	C₄H₆O₂	C₇H₁₄O	C₈H₁₆O	C₉H₁₈O
Structure chimique							
Classe chimique	acide carboxylique	ester	ester	cétone	cétone	cétone	cétone
N° CAS	107-92-6	105-54-4	123-66-0	431-03-8	110-43-0	106-68-3	821-55-6
Masse molaire (g.mol⁻¹)	88,11	116,16	144,21	86,09	114,19	128,21	142,24
logP^a	0,79	1,85	2,83	-1,34	1,73	2,22	2,71
H (Pa.m³.mol⁻¹)^b	3,7.10⁻⁶	8,1.10⁻⁴	1,1.10⁻³	7,9.10⁻⁶	3,4.10⁻⁴	3,3.10⁻⁴	7,1.10⁻⁴
odeur	beurre rance	ananas, fruit mûr, beurre	pomme, vin, ananas, banane	beurre	banane, acétone, roquefort	savon moisi, fruité, fromage	champignon, terreux
Concentration^c (g/kg solution)	9,8	3,5	6,3	2,8	5,1	5,1	5,4

^a. Le logP représente l'hydrophobicité des composés d'arôme.

^b. H représente la constante de Henry, qui correspond à la volatilité des composés d'arôme depuis l'eau.

^{a,b}. Les valeurs de logP et les valeurs de H ont été calculées avec le logiciel EPISuite (Epi Suite[®], v3.20, 2000-2007, U.S. Environmental Protection Agency).

^c. Les concentrations sont exprimées en g/kg de solution aromatique préparée dans du propylène glycol.

3. Formulation finale des modèles fromagers et codification

Six modèles fromagers ont été formulés avec trois ratios Lipides/Protéines (= 3 ratios L/P) et deux teneurs en sel (NaCl). Le ratio L/P est un ratio standard. Il intervient notamment comme facteur de contrôle dans les standards d'identité de nombreuses variétés de fromages (Fox & Cogan, 2004).

Dans notre cas, les ratios L/P (% lipides / % protéines) ont été calculés sur matières sèches (masses déshydratées des protéines et des lipides, comparativement à la masse totale du produit). Le terme lipides désigne la matière grasse laitière anhydre et le terme protéines désigne le mélange de caséine présure et de caséine acide.

Les modèles fromagers ont été codifiés selon leurs ratios L/P. Voici le détail des trois ratios choisis :

- ratio $L/P = 28/20 = 1,4$. Il correspond à une formulation contenant 28 % de lipides (en masse) et 20 % de protéines (en masse) et sera nommé L28P20.
- ratio $L/P = 24/24 = 1$. Il correspond à 24 % de lipides (m/m) et 24 % de protéines (m/m) et sera nommé L24P24.
- ratio $L/P = 20/28 = 0,7$. Il correspond à 20 % de lipides (m/m) et 28 % de protéines (m/m) et sera nommé L20P28.

Les deux teneurs en sel (NaCl) ajoutés sont les suivantes :

- 0 g de NaCl par kg de modèle fromager, ce qui correspond à une version « sans sel ajouté »,
- 10 g de NaCl par kg de modèle fromager (soit 1 % NaCl), ce qui correspond à une version « avec sel ajouté ».

Pour les versions avec sel ajouté, un « s » a été apposé à la fin de la codification des modèles fromagers, donnant ainsi L28P20s, L24P24s, L20P28s. Les versions non salées gardent, quant à elles, la codification initiale (L28P20, L24P24 et L20P28). Les six formulations sont récapitulées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Correspondance entre ratio Lipides/Protéines (L/P), teneur en sel et codification des modèles fromagers

Ratio L/P	Pourcentage lipides/protéines	Désignation	Teneur en sel ajouté (%)
1,4	28 % lipides – 20 % protéines	L28P20	0
		L28P20s	1
1	24 % lipides – 24 % protéines	L24P24	0
		L24P24s	1
0,7	20 % lipides – 28 % protéines	L20P28	0
		L20P28s	1

Les teneurs en matière grasse et en protéines sont comprises dans la gamme de teneurs des fromages couramment consommés, puisque le Camembert comporte 20,9 % de protéines et 23,7 % de lipides, l'Edam contient 26,0 % de protéines et 25,4 % de lipides, l'Emmental possède 28,7 % de protéines et 29,7 % de lipides, et la Mozzarella comporte 25,1 % de protéines et 21,0 % de lipides (Fox & Cogan, 2004). Les modèles fromagers sont donc représentatifs des teneurs en matière grasse et en lipides des fromages du commerce.

4. Composition des modèles fromagers

La mise au point des six modèles fromagers correspond à six formulations différentes. La composition exacte des six modèles fromagers est donnée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Composition des six modèles fromagers formulés

Ingrédients (g/ kg de modèle fromager)	Modèles fromagers					
	L28P20	L28P20s	L24P24	L24P24s	L20P28	L20P28s
Caséine présure ¹	170,2	170,2	204,0	204,0	238,3	238,3
Caséine acide ¹	42,6	42,6	51,0	51,0	59,6	59,6
MGLA ²	280,3	280,3	240,2	240,2	200,2	200,2
Eau déionisée ³	469,4	459,4	467,3	457,3	464,4	454,4
Sels de fonte	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
NaCl	0	10	0	10	0	10
Acide citrique	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Solution aromatique + eau ⁴	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

¹. Le ratio caséine acide/caséine présure est constant pour tous les modèles fromagers et égal à 0,25.

². MGLA : matière grasse laitière anhydre

³. Les quantités d'eau ajoutées correspondent au complément de masse pour atteindre la masse finale (1 kg).

⁴. La composition de la solution aromatique est donnée dans le Tableau 4. Cette solution aromatique (1 g) est mélangée à de l'eau (qsp 10 g) pour faciliter son incorporation.

5. Fabrication des modèles fromagers

Les modèles fromagers ont été préparés par batch de 500 g, dans un robot mixeur à pâles coupantes (R3VV, Robot Coupe, Montceau-les-Mines, France). Ce mixeur possède une double paroi dans laquelle circule un flux d'eau connecté à un bain thermostaté réglé à 75 °C.

Tout d'abord, la matière grasse est mise à fondre. Le sel (pour les versions avec sel ajouté) et l'acide sont mis en solution dans l'eau, sous agitation. Les poudres (caséine acide, caséine présure et Kasomel) sont pesées et mélangées.

La solution d'acide et de sel est, tout d'abord, versée dans le mixeur. Le mixeur est ensuite enclenché (2500 tour.min⁻¹), avant de verser le mélange de poudres puis la matière grasse fondue. Le processus de fabrication opère pendant 7 min 30 s. La solution aromatique (+ eau) est versée dans le mixeur 45 s avant la fin du processus. Cette durée a été choisie pour limiter les pertes de composés d'arôme dues au chauffage, tout en permettant une bonne répartition de la solution aromatique dans la pâte.

Une fois la fabrication terminée, la pâte obtenue est versée à l'aide d'une cuillère dans des gobelets cylindriques en plastique. L'avantage des gobelets est qu'ils permettent, par la suite, une récupération de l'échantillon sans perte et sans déformation, en découpant le gobelet. Pour les expériences de RMN, des gobelets hauts ont été choisis (hauteur = 8 cm, diamètre de base = 4,5 cm), afin de permettre la plus grande hauteur de prélèvement possible (compression inévitable de l'échantillon lors du prélèvement). Pour les autres expériences, des gobelets de plus petites dimensions, lisses, ont été choisis (hauteur = 6 cm, diamètre de base = 4 cm).

Les gobelets remplis ont été ensuite placés au congélateur à -20 °C pendant 25 min. Cette étape de refroidissement rapide permet la formation de la structure du modèle fromager (Guinee *et al.*, 2004). Les échantillons ont ensuite été mis sous vide (vide : 4m³/h, machine sous vide à cloche Bodson, Montigny en Cambrésis, France) dans des sachets adaptés (longueur = 20 cm, largeur = 15 cm). Enfin, ils ont été stockés à 4 °C jusqu'à utilisation.

Pour les expérimentations nécessitant une consommation ultérieure des produits, les niveaux de coliformes totaux, listeria, salmonelles et staphylocoques ont été vérifiés au Laboratoire Départemental de Côte d'Or, pour chaque batch de modèle fromager fabriqué.

II. Caractéristiques des modèles fromagers

1. pH

Les valeurs de pH ont été mesurées à une température de 20 °C avec une électrode pH de pénétration (HI 1083B, micro-bulbe 3 mm, Hanna Instruments, Rhode Island, USA) reliée à un pH-mètre (HI 8417, Hanna Instruments, Rhode Island, USA). Deux répétitions ont été effectuées pour chaque mesure, en insérant le micro-bulbe de l'électrode dans l'échantillon.

2. Matière sèche

La teneur en matière sèche finale a été déterminée pour chaque modèle fromager à l'aide d'un dessiccateur infrarouge (XM 120, Precisa, Poissy, France). Le programme suivant a été retenu : 2 min à 150 °C puis maintien de la température à 180 °C jusqu'à dessiccation totale du produit (arrêt automatique de l'expérimentation ; durée moyenne du séchage : 11 ± 2 min).

Les formulations ont été établies de telle sorte que la matière sèche soit quasiment constante et égale pour tous les modèles fromagers. Pour cela, les teneurs en matière sèche des ingrédients ont été considérées. Le Tableau 7 récapitule les teneurs en extrait sec des matières premières, ainsi que les teneurs en sodium communiquées par les fournisseurs :

Tableau 7 : Teneur en matière sèche (MS) et teneur en sodium (Na) des ingrédients des modèles fromagers

	MS (%)	Na (%)
MGLA	99,9	0
Caséine présure	95,0	0,2
Caséine acide	90,0	0,05
NaCl	99,9	39,66
Sels de fonte (Kasomel)	99,0	24,7

3. Teneur en sodium des modèles fromagers

La teneur totale en sodium des modèles fromagers a été déterminée par spectroscopie d'absorption atomique (spectrophotomètre Varian type 220 FS, SpectraA Technologies, Bangalore, Inde). Les mesures ont été effectuées par le Laboratoire Agrobio (Vézin le Coquet, France). La teneur en cendres des modèles fromagers a été déterminée selon la méthode standardisée de la Fédération Internationale Laitière (FIL-27, 1964). Les résidus des cendres ont été traités avec 6 M d'acide chlorhydrique (HCl). La teneur totale en sodium des cendres en solution a ensuite été déterminée par spectroscopie d'absorption atomique, d'après l'arrêté du 08/09/09/1977 (JO du 3/11/1977). Une adaptation de la norme ISO 8070 :2007 (FIL-119, 2007) a été utilisée. Cette norme spécifie une méthode par spectrométrie d'absorption atomique (dans la flamme) pour la détermination des teneurs en calcium, sodium, potassium et magnésium dans le lait et les produits laitiers. Elle s'applique au lait et lactosérum, au babeurre, au yaourt, à la crème, au lait en poudre, au beurre, au fromage, aux caséines et aux caséinates.

Dans les modèles fromagers sans NaCl ajouté, le sodium quantifié provient des sels de fonte (quantité de sodium négligeable dans les autres ingrédients. cf. Tableau 7). Dans les modèles avec sel ajouté, le sodium provient à la fois des sels de fonte et du NaCl.

4. Caractérisation de la texture des modèles fromagers

Les modèles fromagers ont été fabriqués deux semaines avant l'analyse et stockés à 4 °C dans des sachets sous-vide, avant d'être analysés par compression uniaxiale à vitesse constante.

Des échantillons de forme cylindrique ont été prélevés au cœur des modèles fromagers à l'aide d'un emporte-pièce (diamètre : 13 mm). Le rapport hauteur initiale sur diamètre initial devait être compris entre 1,1 et 1,5. Dans notre cas, les échantillons avaient pour dimensions moyennes : hauteur ~ 18 mm et diamètre ~ 13 mm. Une fois prélevé, chaque échantillon a été placé dans un tube en plastique fermé, stocké à 13 °C pendant au moins ¼ d'heure avant la mesure. Cette étape permettait à l'échantillon de se relaxer des contraintes liées au prélèvement tout en évitant sa dessiccation. La température de 13 °C a été choisie car elle correspond à la température à laquelle ont été servis les modèles fromagers dans les études de consommation (étude de la libération des composés d'arôme et du sodium *in vivo* et étude de la perception sensorielle).

Au cours du test de compression uniaxiale à vitesse constante, l'échantillon a été comprimé suivant son axe principal entre deux plateaux parallèles (35 mm). La force résistante développée par l'échantillon en réponse à la déformation a été mesurée à l'aide d'un capteur de force et enregistrée en fonction de la position du plateau supérieur.

Les mesures ont été réalisées à 13 °C avec un analyseur de texture TA-XT2 (Stable Micro Systems Ltd ; Champlan, France). La vitesse de déplacement de l'outil supérieur était de $0,8 \text{ mm.s}^{-1}$. Les échantillons ont été comprimés jusqu'à un taux de déformation de 90 % de la hauteur initiale de l'échantillon (la fracture n'étant pas visible pour les différents modèles fromagers à l'exception de M1S). Quatre répétitions ont été réalisées.

La contrainte, c'est à dire la résistance mécanique de l'échantillon à la déformation, et la déformation selon Cauchy ont été calculées à partir des données brutes : force et déplacement. La contrainte est définie comme le rapport de la force mesurée sur la surface initiale de l'échantillon. La déformation selon Cauchy est définie comme le rapport de la variation d'épaisseur sur l'épaisseur initiale de l'échantillon.

La courbe "contrainte-déformation" résultante est présentée sur la Figure 5.

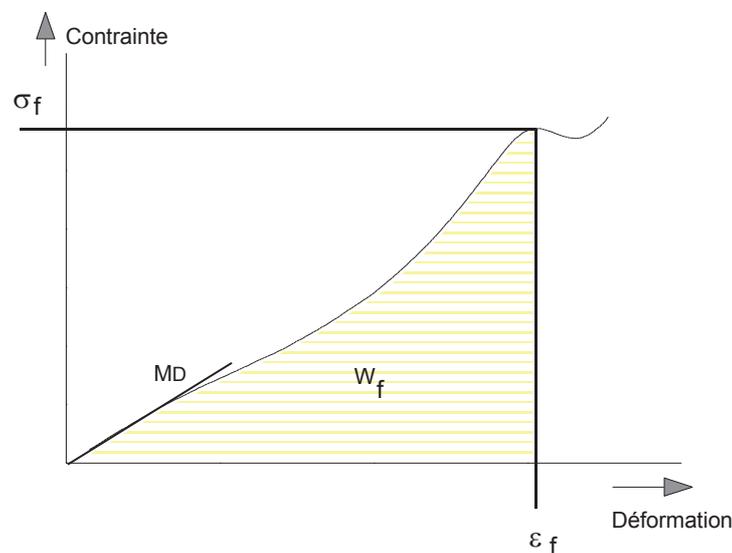


Figure 5: Schéma d'une courbe de compression uniaxiale à vitesse constante : identification des paramètres caractéristiques

Cette courbe est caractérisée par quatre paramètres spécifiques (Tableau 8) :

1. Le **module de déformabilité** MD , qui caractérise le comportement rhéologique des modèles fromagers aux petites déformations et qui correspond à la pente initiale de la courbe. Il traduit l'élasticité du modèle fromager.
2. La **contrainte** σ_f , la **déformation** ϵ_f et l'**énergie** W_f à la fracture qui caractérisent le point de fracture apparente. L'énergie représente le travail nécessaire pour atteindre le point de fracture apparente. La contrainte et l'énergie à la fracture caractérisent la résistance mécanique du modèle fromager. La déformation à la fracture caractérise sa déformabilité.

Tableau 8 : Variables rhéologiques obtenues par compression uniaxiale à vitesse constante

Variables	Unités	Signification			
MD	kPa	module de déformabilité	élasticité	+ élevé	- élastique
σ_f	kPa	contrainte à la fracture	résistance mécanique	+ élevé	+ grande résistance mécanique
W_f	kJ.m^{-3}	travail à la fracture			
ϵ_f	-	déformation à la fracture	déformabilité	+ élevé	+ déformable

Pour les modèles fromagers dont le point à la fracture n'est pas visible, le point caractéristique choisi est le point à la déformation maximale c'est-à-dire à 90 % de déformation. Le paramètre ϵ_f n'est alors pas pris en considération, du fait de sa valeur constante dans ce cas (90 %).

5. Caractérisation de la microstructure des modèles fromagers

a. Principe de la microscopie confocale à balayage laser

En microscopie confocale à balayage laser (MCBL), la source lumineuse est un laser capable de balayer point par point l'échantillon à analyser. Ce balayage permet ainsi d'obtenir des images appartenant à un même plan (Filipe, 2007).

Le principe général de la MCBL est schématisé sur la Figure 6.

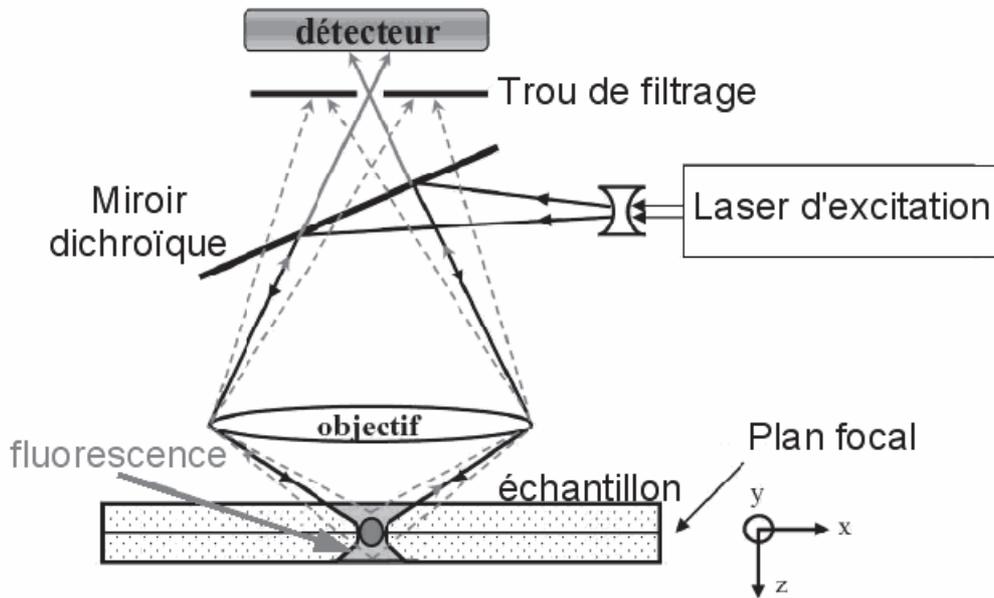


Figure 6 : Schéma expliquant le fonctionnement de la microscopie confocale à balayage laser, d'après Lemiere & Vial (2008)

Un rayon laser excitateur est réfléchi par un miroir dichroïque vers la lentille de l'objectif. Il atteint alors l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes (voir définition paragraphe suivant). Des photons provenant de différents plans de la préparation sont alors émis lors du balayage de l'échantillon par le laser. Un diaphragme à diamètre variable, appelé trou de filtrage (ou pinhole en anglais) est placé dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux). Ce sont donc ces photons émis par l'échantillon marqué et passant par ce trou de filtrage qui participent à la formation de l'image (Wright *et al.*, 1993). On s'affranchit ainsi de la fluorescence émanant des autres plans de l'échantillon. Les rayons réfléchis sont détectés par des photomultiplicateurs (détecteurs) placés près du trou de filtrage. Le signal reçu (intensité lumineuse de chaque point) est enfin converti en signal numérique, contribuant à la création d'une image (section optique) à deux dimensions (8 bits). Chaque section optique est générée en déplaçant le faisceau laser, selon l'axe (x,y), sur une partie du domaine de l'échantillon. La profondeur du plan focal peut être modifiée finement, selon l'axe (z), grâce au déplacement du plateau contenant l'objet (Filipe, 2007). Ainsi, en modifiant la distance échantillon-objectif, il est possible de répéter le balayage pour toute une série de plans espacés d'une hauteur Δz .

En combinant toutes ces images à deux dimensions (x,y), on obtient alors une reconstitution à trois dimensions de l'échantillon. Cependant la profondeur d'exploration est limitée par les effets d'absorption et de diffusion des tissus (Lemiere & Vial, 2008).

b. Le choix des fluorochromes : l'identification multiple

Les fluorochromes sont des molécules naturelles ou synthétiques capable d'émettre de la fluorescence (sondes fluorescentes ou colorants fluorescents spécifiques). Ce sont souvent des molécules polynucléaires hétérocycliques contenant de l'azote, de l'oxygène avec des systèmes d'électrons délocalisés, et des structures réactives qui permettent de les rattacher à des composés biologiques (comme les anticorps par exemple). Les colorants s'intercallent dans des structures biologiques typiques et émettent une longueur d'onde caractéristique, distinguant ainsi les structures spécifiques de l'échantillon. Déposés sur les échantillons sous forme de poudre ou de solution, ils permettent l'identification et la localisation de composants tels que les protéines, les glucides, les lipides... Les microscopes confocaux possèdent plus d'un détecteur, ce qui permet l'observation simultanée (identification multiple) de plusieurs composants. Cependant, les colorants doivent être excités et émettre à des longueurs d'ondes différentes, avec un minimum de superposition (Herbert *et al.*, 1999b). Des images multiples peuvent ainsi être réalisées afin de mettre en évidence les distributions relatives des protéines, des lipides et des glucides.

Dans notre cas, deux colorants fluorescents ont été choisis :

- Le Rouge de Nile (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), spécifique des lipides, et qui a l'avantage de résister au photo-blanchiment (Greenspan *et al.*, 1985).
- L'Acridine Orange (colorant pour microscopie, Aldrich Chemical Company, Inc ; Milwaukee, USA), permettant de visualiser des protéines.

c. Méthode de microscopie confocale

De petits échantillons (8mm x 8mm x 3mm) ont été prélevés dans les modèles fromagers, à l'aide d'un scalpel, puis placés sur des lames de verre. La matière grasse et les protéines ont été colorées selon la méthode décrite par Floury *et al.* (2009a). La solution colorante a été préparée en mélangeant 600 μ L d'une solution de Rouge de Nile (0,04 % de Rouge de Nile (m/v) dans du propane-1,2-diol), et 300 μ L d'une solution d'Acridine Orange (0,1% d'Acridine Orange (m/v) dans de l'eau distillée).

Les échantillons de modèles fromagers ont été colorés en ajoutant 15 μL de la solution colorante. Ils ont ensuite été recouverts d'une lamelle en verre et placés dans l'obscurité à 4 °C pendant 30 min.

La microstructure des modèles fromagers a été observée au moyen d'un microscope confocal Leica droit TCS SP2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). La détection des protéines a été réalisée en utilisant un laser argon/krypton ayant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une longueur d'onde d'émission entre 502 et 563 nm. La détection de la matière grasse a été réalisée à l'aide d'un laser hélium/néon ayant une longueur d'onde d'excitation de 543 nm et une longueur d'onde d'émission comprise entre 594 et 697 nm. Pour les clichés obtenus, les protéines ont été identifiées en vert, alors que la matière grasse a été identifiée en rouge (Figure 7(a)).

Pour chaque modèle fromager, des clichés ont été pris à cinq localisations différentes (du centre vers l'extérieur du modèle fromager), constituant ainsi des pseudo-répétitions. Trois répétitions indépendantes ont été réalisées pour chacun des six modèles fromagers. Les clichés, d'une résolution de 512 pixels x 512 pixels, ont été obtenus à l'aide d'un objectif à immersion dans l'huile (contraste élevé, objectif plan, balayage confocal x40 et ouverture numérique de l'iris de 0,75 à 1,25). Les clichés finaux correspondent à la superposition des clichés obtenus pour la matière grasse et de ceux obtenus pour les protéines.

d. Analyse d'images sur les clichés structuraux de microscopie confocale

L'analyse d'image a été réalisée avec le logiciel ImageJ (version 1.46f2, NIH, USA) sur des portions de clichés de microscopie confocale (256 pixels x 256 pixels). Le canal rouge a été sélectionné pour les analyses. Les images ont été converties au format 8-bit (échelle noire et blanc) et le bruit de fond de l'arrière plan a été diminué en utilisant la fonction « despeckle » du logiciel. Ensuite, la luminosité et le contraste ont été ajustés automatiquement par le logiciel. Le niveau de seuillage automatique (IsoData) a été utilisé pour l'analyse de tous les modèles fromagers, excepté pour le modèle L28P20s pour lequel le seuillage IJ_isodata s'est révélé beaucoup plus pertinent, du fait d'une répartition différente des gouttelettes lipidiques. L'étape de seuillage a permis l'obtention d'une image binaire, dans laquelle les gouttelettes lipidiques ont été nettement séparées de l'arrière plan. La fonction « watershed » du logiciel

ImageJ a ensuite été utilisée dans le but de séparer les gouttelettes qui n'avaient pas été dissociées par les précédents traitements.

La Figure 7 montre un exemple de cliché de microscopie confocale avant analyse d'image (a) ainsi que l'image correspondante, après analyse d'image (b) (modèle fromager L28P20s).

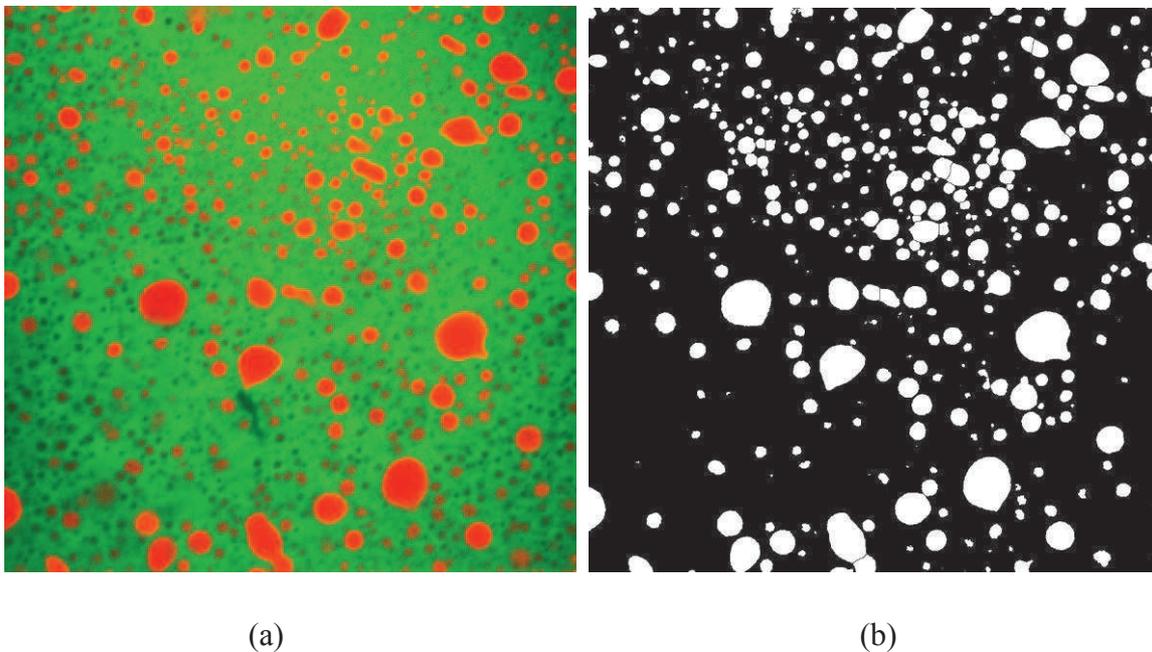


Figure 7 : Exemple de cliché de microscopie confocale avant analyse d'image (a) et après analyse d'image (b) (modèle fromager L28P20s)

La phase protéique est représentée en vert sur le cliché et la phase lipidique est représentée en rouge. Les deux phases sont ensuite représentées respectivement en noir et en blanc sur l'image analysée.

Une fois les images obtenues (Figure 7(b)), la surface (en μm^2) et la circularité des gouttelettes lipidiques ont pu être mesurées. La formule pour le calcul de la circularité est la suivante :

$$4\pi \times [\text{Aire}] / [\text{Périmètre}]^2.$$

Une valeur de circularité de 1,0 indique un cercle parfait, alors qu'une valeur approchant 0,0 indique un polygone infiniment allongé. Le pourcentage de la surface occupée par la matière grasse dans le cliché (en %) a également été calculé. Il correspond au pourcentage de la surface occupée par les gouttelettes lipidiques (en μm^2) comparativement à la surface totale du cliché (en μm^2). Pour chaque modèle fromager, cinq répétitions (portions de clichés) ont été analysées, chaque répétition provenant d'un cliché différent.

III. Etude de la mobilité/libération du sodium

1. Echelle moléculaire : Etude de la mobilité par résonance magnétique nucléaire du sodium (RMN ^{23}Na)

a. Brève description de la technique de RMN ^{23}Na

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est basée sur la propriété de spin des noyaux. Certains noyaux possèdent un spin nul, mais d'autres ont un spin nucléaire différent de zéro (exemple : ^1H). La RMN est une technique de spectroscopie appliquée aux noyaux qui ont un spin nucléaire non nul.

La RMN est un phénomène par lequel les noyaux des molécules placées dans un champ magnétique intense B_0 absorbent les rayonnements électromagnétiques spécifiques. Le signal émis (intensité en fonction du temps) est alors transformé mathématiquement (transformation de Fourier). Ainsi, lors d'une expérience de RMN, l'échantillon est placé dans un spectromètre dans lequel il subit l'action du champ magnétique B_0 . Après excitation des noyaux de l'échantillon (et de leur système de spins), ceux-ci retournent à l'équilibre et la RMN permet d'observer les transitions entre les différents niveaux d'énergie des molécules. La RMN du proton est la plus courante, mais toutes sortes de noyaux peuvent être observés par RMN : ^{13}C , ^{23}Na , ^{31}P , ^{35}Cl , ^{37}Cl , ... La RMN du sodium (^{23}Na) a été choisie afin d'étudier le comportement des noyaux sodium dans les modèles fromagers.

Deux temps de relaxation caractérisent le retour à l'équilibre des noyaux : le temps de relaxation longitudinale (T_1) et le temps de relaxation transversale (T_2). Ces deux temps sont caractéristiques de la mobilité des noyaux étudiés car ils déterminent le temps nécessaire pour que les noyaux reviennent à l'équilibre après excitation.

b. Spécificité et théorie de la RMN du sodium (^{23}Na)

Le comportement moléculaire du sodium dans les modèles fromagers a donc été étudié en utilisant la spectroscopie RMN. Le signal simple quanta (SQ), qui est un signal simple impulsion, a été utilisé pour détecter l'ensemble des ions sodium (sodium total).

Le noyau sodium possède un caractère quadripolaire (spin $I = 3/2$), qui peut interagir avec le champ électrique local (interactions quadripolaires). Ses états de spin initiaux ($+3/2$, $+1/2$, $-1/2$, $-3/2$) en sont modifiés et les transitions entre ces états sont alors caractérisées par des énergies différentes. On distingue la transition centrale ($-1/2$, $+1/2$) et les transitions satellites ($+1/2$, $+3/2$) et ($-1/2$, $-3/2$). La transition centrale contribue pour 40 % à l'aire du signal RMN et les deux transitions satellites pour 60 % (30 % chacune).

Du fait des interactions quadripolaires, les transitions externes relaxent plus vite que la transition interne. Ainsi, T_2^{SQ} par exemple, comprend deux composantes : T_{2f}^{SQ} pour le temps de relaxation rapide, qui caractérise la transition externe du noyau de sodium ($-3/2 \rightarrow -1/2$ et $+1/2 \rightarrow +3/2$) et T_{2s}^{SQ} pour le temps de relaxation lent, qui caractérise la transition interne du noyau de sodium ($-1/2 \rightarrow +1/2$) (Jaccard *et al.*, 1986 ; Kemp-Harper *et al.*, 1997).

c. Application de la RMN du sodium à l'étude des modèles fromagers

i. Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés d'après la méthode décrite sur des fromages par Gobet *et al.* (2009a). Une section cylindrique (longueur ~ 4 cm et largeur ~ 9 -10 mm) a été prélevée au cœur d'un modèle fromager à l'aide d'un emporte-pièce (diamètre 10 mm). Le prélèvement a été effectué à température ambiante, dans le sens de la hauteur du modèle fromager (resté dans son gobelet de stockage et tout juste sorti du réfrigérateur (4 °C)).

La section prélevée (ou « carotte ») a ensuite été insérée dans un tube RMN de 10 mm à l'aide d'un bâtonnet poussoir. Un second tube RMN de 5 mm, rempli d'une solution référence de $\text{Na}_7\text{Dy}(\text{P}_3\text{O}_{10})_2$ (voir détails plus loin), a ensuite été introduit dans le tube de 10 mm contenant l'échantillon de modèle fromager (Figure 8). Le tube de 5 mm était entouré de deux inserts en plastique permettant d'éviter toute déviation lors de son introduction dans le modèle fromager.

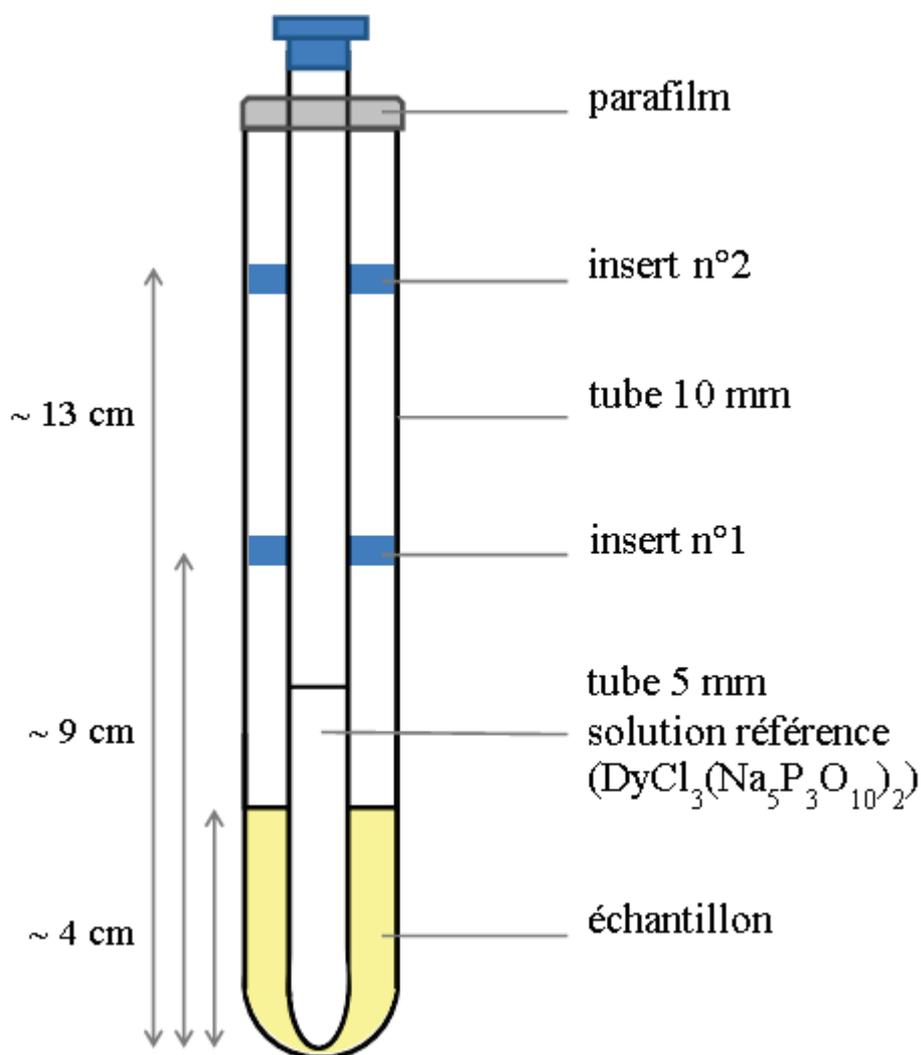


Figure 8 : Echantillon et solution référence utilisés pour les expériences RMN

ii. Quantification du sodium total

Pour quantifier le sodium par RMN dans les modèles fromagers, il a été nécessaire d'introduire une référence externe dans le tube contenant l'échantillon. Cette référence est une solution de $\text{Na}_7\text{Dy}(\text{P}_3\text{O}_{10})_2$ dans du D_2O ($[\text{Na}^+] = 0,40 \text{ M}$).

La solution de référence est préparée de la façon suivante (dans une fiole jaugée de 5 mL, complétée avec du D_2O):

- 76,9 mg de DyCl_3 (chlorure de dysprosium hexahydraté = $\text{DyCl}_3(\text{H}_2\text{O})_6$; Sigma Aldrich, N° CAS : 15059-52-6)

- 176,1 mg de $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (sel anhydre de tripolyphosphate de sodium ; Sigma Aldrich, N° CAS : 7758-29-4).

La réaction associée est la suivante : H_2O



La solution de $\text{Na}_7\text{Dy}(\text{P}_3\text{O}_{10})_2$ constitue ainsi une référence externe permettant de vérifier la teneur en ion sodium des échantillons (Mouaddab *et al.*, 2007). En effet, le chlorure de dysprosium est aussi appelé « agent de shift » en RMN car l'ion $\text{Dy}(\text{PPP})_2^{7-}$ induit un « déplacement » de l'ion Na^+ ($\delta \approx 30$ ppm) par rapport à la position de référence qu'il occupe dans les modèles fromagers. En d'autres termes, l'agent de shift empêche la superposition des pics de la référence et de l'échantillon. La Figure 9 représente le pic correspondant au sodium de l'échantillon (ici L20P28s) et le pic correspondant au sodium de la solution référence.

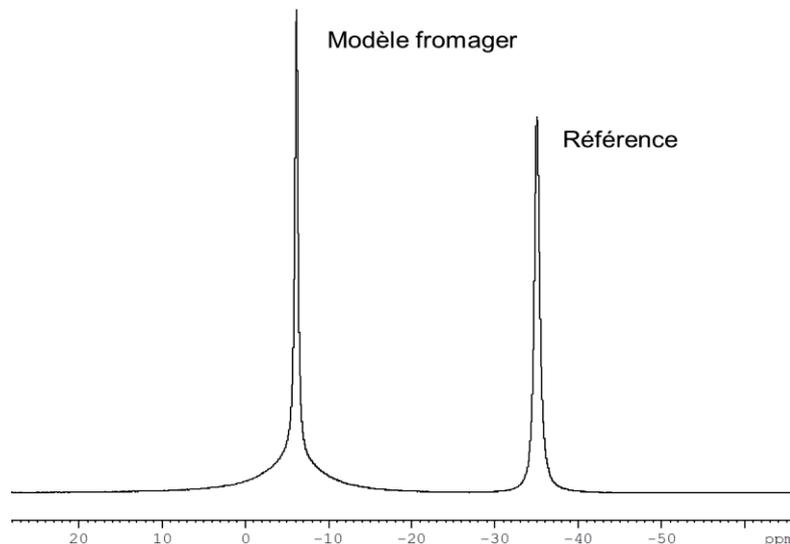


Figure 9 : Exemple de spectre de RMN ^{23}Na SQ d'un modèle fromager L20P28s avec une solution de référence $[\text{Na}^+] = 0,40$ M dans du D_2O (1024 scans)

La concentration totale en sodium de l'échantillon a été déterminée à partir de la concentration de la référence et des aires des pics SQ ^{23}Na de la référence (A_{ref}^{SQ}) et de l'échantillon (A_{ech}^{SQ}), selon l'expression :

$$[\text{Na}^+]_{ech} = \frac{A_{ech}^{SQ}}{A_{ref}^{SQ}} * [\text{Na}^+]_{ref} / \frac{V_{ech}}{V_{ref}}$$

où $\frac{V_{ech}}{V_{ref}} = 3,26$ (Gobet *et al.*, 2009b).

Dans notre cas, $[Na^+]_{ref} = 0,40 \text{ M}$ soit $23,4 \text{ g.L}^{-1}$ dans du D_2O .

L'acquisition des signaux RMN a été effectuée avec le paramètre P_1 optimal, c'est-à-dire la valeur optimale de la durée d'impulsion $\pi/2$ ($P_{1opt} = 15,6 \pm 0,4 \mu\text{s}$). Néanmoins, des calculs ont également été faits avec le paramètre $P_1/4$, aux vues des difficultés à quantifier correctement la teneur en sodium total des échantillons. En effet, il a été montré qu'on obtenait un pulse non sélectif avec un pulse inférieur à $P/4$ (Fenzke *et al.*, 1984).

iii. Quantification du sodium lié

Pour la quantification de la fraction liée du sodium, deux approches ont été menées : une quantification absolue et une quantification relative.

La quantification absolue a été réalisée d'après la méthode décrite par Mouaddab *et al.* (2007), avec l'équation suivante :

$$\frac{[Na]_{calc}^{DQ}}{[Na]^{SQ}} = \frac{10\pi A^{DQ+}}{3 A^{SQ}} \left[\exp\left(-\frac{\tau_{opt}}{T_{2S}}\right) - \exp\left(-\frac{\tau_{opt}}{T_{2F}}\right) \right]^{-1} \times [\tan^{-1}(\omega' \cdot T_{2S}^*) - \tan^{-1}(\omega' \cdot T_{2F}^*)]^{-1}$$

Cette équation s'obtient à partir des temps de relaxation (T_{2F} et T_{2S}) du signal DQ, du temps de création (τ^{opt}) du signal DQ, des aires des signaux SQ et DQ (A^{DQ} et A^{SQ}) et des paramètres influencés par l'hétérogénéité de champ (ω' , T_2^*). Les différents paramètres de temps seront explicités dans les paragraphes suivants. L'hétérogénéité de champ se calcule, quant à elle, à partir du temps de relaxation T_2 de la référence et à partir de la largeur à mi-hauteur du pic correspondant (largeur obtenue avec le logiciel Peakfit version 4.11, Sysstat software Inc.).

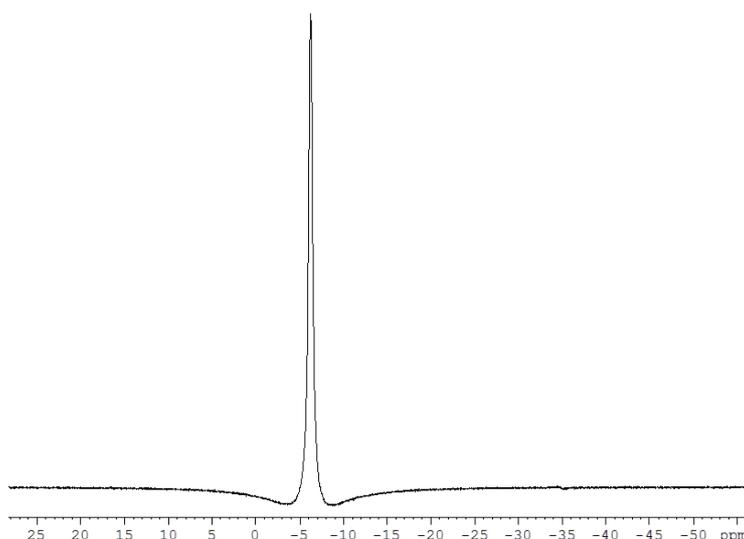


Figure 9bis : Exemple de spectre de RMN ^{23}Na DQ d'échantillon L20P28s (1024 scans)

La quantification relative a été obtenue en calculant le ratio des intégrales (aires) des signaux du sodium lié (signal DQ) et du sodium total (signal SQ). Ce ratio est donc le suivant : A_{DQ}/A_{SQ} . Le calcul de A_{DQ} a été effectué en considérant l'aire absolue des 2 pics A_{DQ}^+ et A_{DQ}^- obtenus lors de la déconvolution avec le logiciel Peak Fit (version 4.11, Syssat software Inc.).

iv. Etude de la mobilité du sodium total

Comme expliqué précédemment, le signal simple quanta (SQ) est un signal simple impulsion, qui a été utilisé pour détecter l'ensemble des ions sodium (sodium total).

Afin de mesurer le temps de relaxation longitudinale (T_1) et le temps de relaxation transversale (T_2) du signal SQ, des séquences « inversion-récupération » et CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) ont été respectivement utilisées pour mesurer T_1 et T_2 (Mouaddab *et al.*, 2007).

- Mesure du temps de relaxation longitudinale T_1

Le temps de relaxation longitudinale T_1 s'obtient par une séquence d'inversion récupération. Une fois mesuré, ce temps T_1 donne des informations sur la mobilité du sodium global.

L'optimisation du T_1 permet de s'assurer que tous les noyaux sont relaxés quand on utilise un délai de 150 ms (délai choisi à cette valeur pour toutes les acquisitions).

- Mesure du temps de relaxation transversale T_2

La courbe d'évolution de l'intensité du signal CPMG en fonction du temps ($I(t)$) est paramétrable par l'équation suivante :

$$I(t) = cte \times \left[A \exp\left(-t/T_{2F}^{SQ}\right) + B \exp\left(-t/T_{2S}^{SQ}\right) \right]$$

où A et B sont les populations des noyaux sodium présentant respectivement une relaxation transversale rapide (T_{2F}^{SQ}) ou lente (T_{2S}^{SQ}), exprimées en pourcentage ($A+B = 1$; population normalisée).

Le graphe correspondant est présenté sur la figure page suivante.

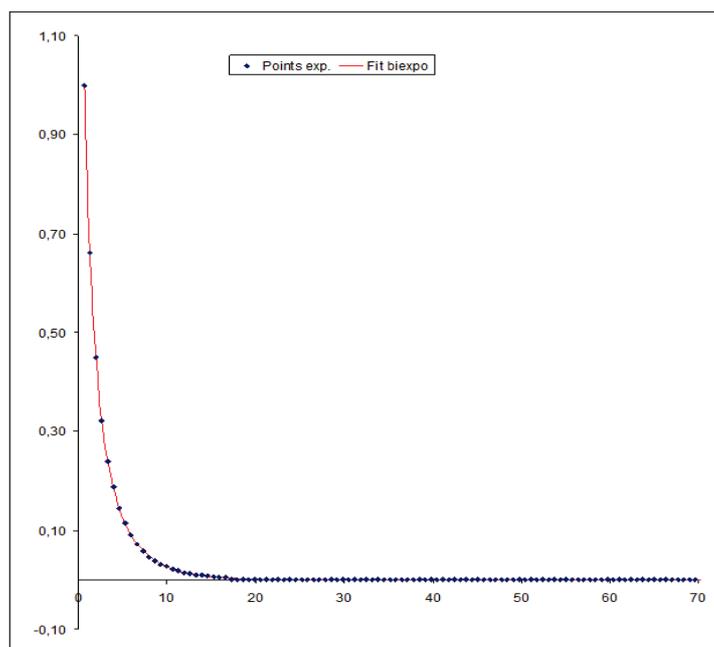


Figure 9ter : Exemple d'évolution de I (normalisée) de la composante transversale du signal ^{23}Na SQ en fonction du temps t (ms). (Séquence CPMG, échantillon L20P28s).

En réalité, on ne mesure pas la valeur réelle de T_2 , mais une valeur apparente plus faible, du fait des légères hétérogénéités de champ magnétique dans l'échantillon (Gobet, 2008). Cette hétérogénéité de champ est calculée à partir du T_2 de la référence et de la largeur du pic à mi-hauteur.

v. Etude de la mobilité du sodium lié

Le signal SQ utilisé précédemment pour l'étude du sodium total est un signal global qui moyenne le comportement de tous les ions. Or, l'échantillon présente en réalité des ions avec des mouvements différents. Un autre signal, le signal DQF (« Double Quantum Filtered ») permet, par exemple, de s'affranchir des ions libres. Ainsi, les signaux provenant des ions Na^+ liés ont pu être sélectivement détectés. Le terme lié désigne des ions qui présentent un mouvement anisotrope plus ou moins restreint en raison soit de leur liaison à des structures ordonnées, soit de leur présence dans des environnements différents (Gobet, 2008 ; Mouaddab *et al.*, 2007).

Des paramètres similaires à ceux du signal SQ ont été pris en compte pour le signal DQF des ions sodium liés. Ils sont appelés T_{2f}^{DQ} et T_{2s}^{DQ} . Ces temps de relaxation permettent la

caractérisation de l'état lié des ions sodium et peuvent être corrélés à la mobilité de ces ions. Plus la valeur du temps de relaxation est grande, plus les ions sodium liés sont mobiles.

De plus, le temps de création (τ^{opt}) représente le temps correspondant à l'intensité maximale du signal DQF. Plus la valeur de ce paramètre est faible, plus l'environnement autour des ions sodium liés est organisé. Il témoigne de l'état de liaison des ions Na^+ liés.

vi. Acquisition des spectres de RMN ^{23}Na SQ et DQF

Les acquisitions ont été réalisées à 25 °C et enregistrées à 132.29 MHz sur un spectromètre Bruker Avance III 500 MHz (11.7 T) équipé d'une sonde large bande BBO de 10 mm. Une durée d'impulsion $\pi/2$ (à la résonance) de 15-17,5 μs a été utilisée pour les expériences de RMN ^{23}Na .

Les paramètres d'acquisition ont été optimisés sur chaque section prélevée de modèle fromager. En effet, la durée d'impulsion n'est pas strictement identique d'une section à l'autre. Les acquisitions des spectres SQ et DQ ont été effectuées avec le même nombre de scans et les mêmes gains. Les acquisitions ont été effectuées avec le logiciel TOPSPIN 3.0 (Bruker Biospin). L'ensemble des spectres acquis a été traité avec le logiciel TOPSPIN 3.0 et le logiciel Peakfit (version 4.11, Syssat software Inc.). Une fonction Gaussienne-Lorentzienne a été utilisée pour l'ajustement des pics.

Dans le cas d'ions sodium possédant une mobilité restreinte, la relaxation de ces ions devient bi-exponentielle et le spectre est une superposition de deux raies Lorentziennes : une raie étroite (transition interne) et une raie plus large (transitions externes) dont le rapport des aires est théoriquement 40 % : 60 %.

2. Echelle macroscopique : Etude des coefficients de partage du sodium eau/modèle fromager

Le coefficient de partage eau/modèle fromager des ions Na^+ est défini par l'équation suivante :

$$K_{\text{Na}} = \frac{[\text{Na}]_{\text{sq}}^{\text{e}}}{[\text{Na}]_{\text{sq}}^{\text{m}}}$$

$[Na]_{\text{eq}}^{\text{e}}$ est la concentration en sodium à l'équilibre dans la phase aqueuse et $[Na]_{\text{eq}}^{\text{m}}$ est la concentration en sodium à l'équilibre dans le modèle fromager. $[Na]_{\text{eq}}^{\text{m}}$ correspond en fait à l'égalité suivante :

$$[Na]_{\text{eq}}^{\text{m}} = [Na]_0^{\text{m}} - [Na]_{\text{eq}}^{\text{e}} \text{ où } [Na]_0^{\text{m}} \text{ est la concentration initiale dans les modèles fromagers.}$$

Pour les expériences, un échantillon de 5 g de modèle fromager (portion d'un disque de diamètre 5 cm et de hauteur 1 cm) a été placé dans un flacon (100 mL, Schott, France) rempli avec 75 mL d'eau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) (Figure 10). Le choix de ce format d'échantillon a été effectué car des échantillons de même dimension ont été servis aux consommateurs lors de l'étude de la libération du sel en bouche *in vivo*.

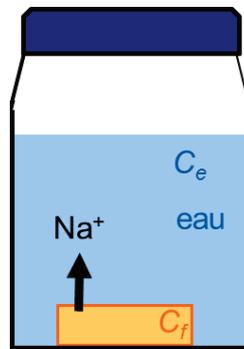


Figure 10 : Dispositif d'étude des coefficients de partage du sodium eau/modèle fromager

C_e est la concentration en sodium dans l'eau et C_f dans le modèle fromager.

Les coefficients de partage des six modèles fromagers ont été déterminés simultanément. Cinq répétitions par modèle ont été effectuées. Trente flacons ont ainsi été préparés et placés dans une étuve maintenue à 25 °C pendant 16 heures (temps suffisant pour atteindre l'équilibre thermodynamique pour tous les échantillons). Après 16 heures, la phase aqueuse a été récupérée et filtrée sur de la laine de verre. La teneur en sodium de cette phase a ensuite été déterminée à l'aide d'une électrode de verre sélective des ions sodium (ROSS®, Orion, Thermo Fisher Scientific, Beverly, USA).

La membrane de verre de cette électrode est formée de SiO₂ (71 %), de Al₂O₃ (18 %) et de Na₂O (11 %). Une fois hydratée, elle devient poreuse et permet l'entrée d'ions Na⁺. C'est le mouvement des ions sodium qui est responsable de la conduction électrique dans la membrane. L'équilibre résultant dépend de la concentration en ions sodium de l'échantillon.

Pour obtenir des résultats reproductibles, un conditionnement de l'électrode dans un électrolyte approprié est nécessaire afin de garantir un état initial stationnaire de la couche de gel. Cette électrode de verre possède une électrode de référence interne. Il s'agit d'une cartouche Ag/AgCl, stockée dans une solution stable (les anions et les cations diffusent à la même vitesse) appelée électrolyte de référence (filling solution). Ici, l'électrolyte est une solution de KCl. L'électrode sélective des ions sodium mesure donc les ions sodium libres en solution.

Les mesures de conductivité ont été réalisées sur des échantillons de 2 mL auxquels ont été ajoutés 200 μ L d'ajusteur de force ionique du sodium (ISA : ionic strength adjuster). Cet « ISA » contient 4 M de NH_4Cl et 4 M de NH_4OH (ISA Cat. No 841111, Thermo Fisher Scientific, Beverly, USA). Il permet d'alcaliniser la solution à doser ($\text{pH} > 9$) et de maintenir une force ionique constante (facilitant la lecture par l'électrode). Les valeurs de concentration de sodium ont ensuite été obtenues à partir d'une courbe d'étalonnage. Un exemple de courbe est présenté sur la Figure 11 ($y = 26,924 \cdot \ln(x) - 233,14$; $R^2 = 0,9872$). Il s'agit d'une correspondance entre les valeurs des mesures conductimétriques (en mV) et les valeurs de concentrations en sodium de la gamme étalon de solutions de NaCl (en ppm). Les valeurs de concentrations en sodium de la gamme sont les suivantes : 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 et 1000 (ppm). Plusieurs courbes ont été effectuées au cours de l'étude, afin de vérifier qu'il n'y ait pas de dérive de la mesure au fil des jours.

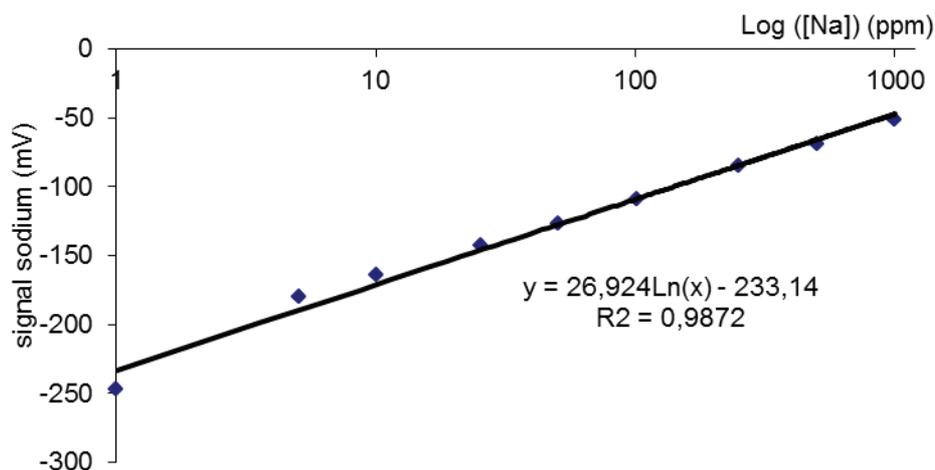


Figure 11 : Exemple de courbe d'étalonnage servant à la détermination de la concentration en sodium avec l'électrode de verre sélective des ions sodium

Les valeurs de concentration en sodium ont été également validées par détection conductimétrique, après séparation ionique effectuée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC, Dionex ICS-3000). La colonne utilisée est une colonne IonPac CS12A 5 μm , maintenue à une température de 25 °C. L'éluant utilisé est de l'acide sulfurique (H_2SO_4 , 11 mM), avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹. La détection du sodium a lieu par conductimétrie avec suppresseur CSRS 300 en 2 mm (courant : 33 mA). Le suppresseur sert à éliminer le signal dû à l'éluant (H_2SO_4). Un volume de 50 μL a été injecté pour la chromatographie. Le contrôle du système et l'acquisition des données ont été faits avec le logiciel UCI-100 Chromeleon.

Dans le cas de la chromatographie HPLC, les concentrations en sodium ont également été obtenues à partir d'une courbe d'étalonnage. Un exemple de courbe est présenté sur la Figure 12 ($R^2 = 0,999$). Il s'agit d'une correspondance entre les aires des pics correspondant au sodium (en $\mu\text{S}\cdot\text{min}$) et les valeurs de concentrations en sodium de la gamme étalon de solutions de NaCl (en mM). Les valeurs correspondantes de concentrations en sodium sont les suivantes : 0,8 ; 1,6 ; 2,4 ; 3,2 ; 6,5 et 9,8 (mM).

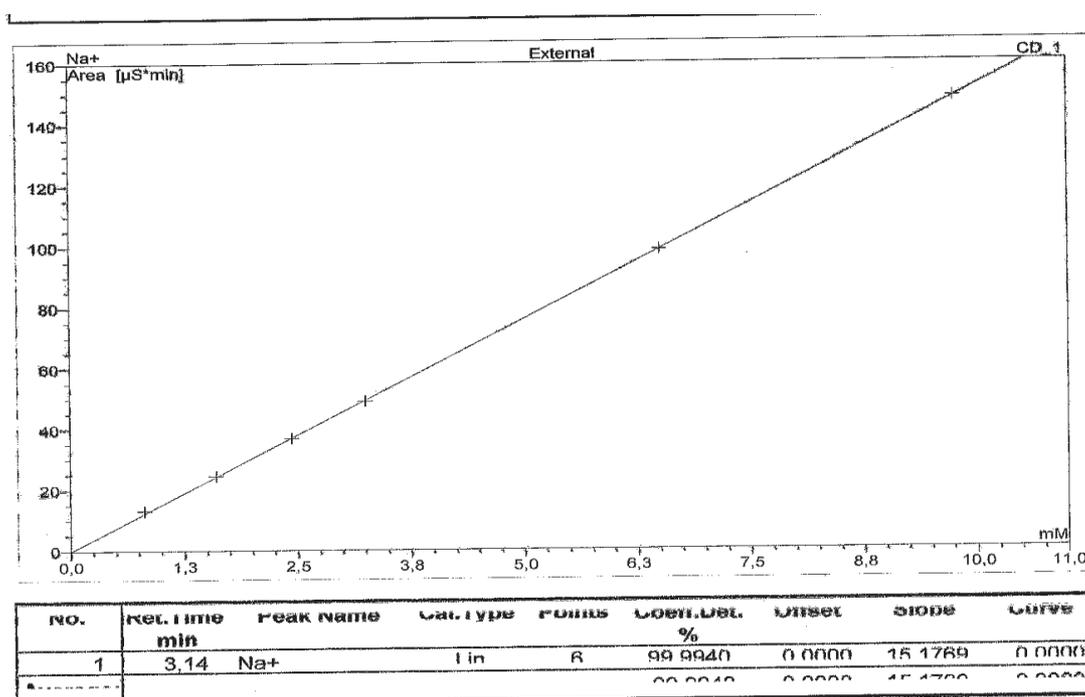


Figure 12 : Exemple de courbe d'étalonnage servant à la détermination de la concentration en sodium par HPLC

Des courbes d'étalonnage ont été effectuées à chaque nouveau passage d'une série d'échantillons (environ 45 échantillons par série).

3. Etude de la cinétique de libération du sodium des modèles fromagers dans une solution aqueuse (libération dynamique produit/eau)

La cinétique de libération des ions sodium (Na^+) a été étudiée pendant sept heures depuis un échantillon cylindrique de modèle fromager (25 g) de diamètre 5 cm. L'échantillon a été immergé au fond d'une enceinte en verre maintenue à 25 °C et contenant 1 L d'eau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). La phase aqueuse a été homogénéisée à vitesse constante (100 $\text{tour}\cdot\text{min}^{-1}$), à l'aide d'une tige à hélice (R 1342, 4 ailettes IKA, Allemagne) reliée à un agitateur (Eurostar-PCV (power control visc), IKA, Allemagne) (Figure 13).

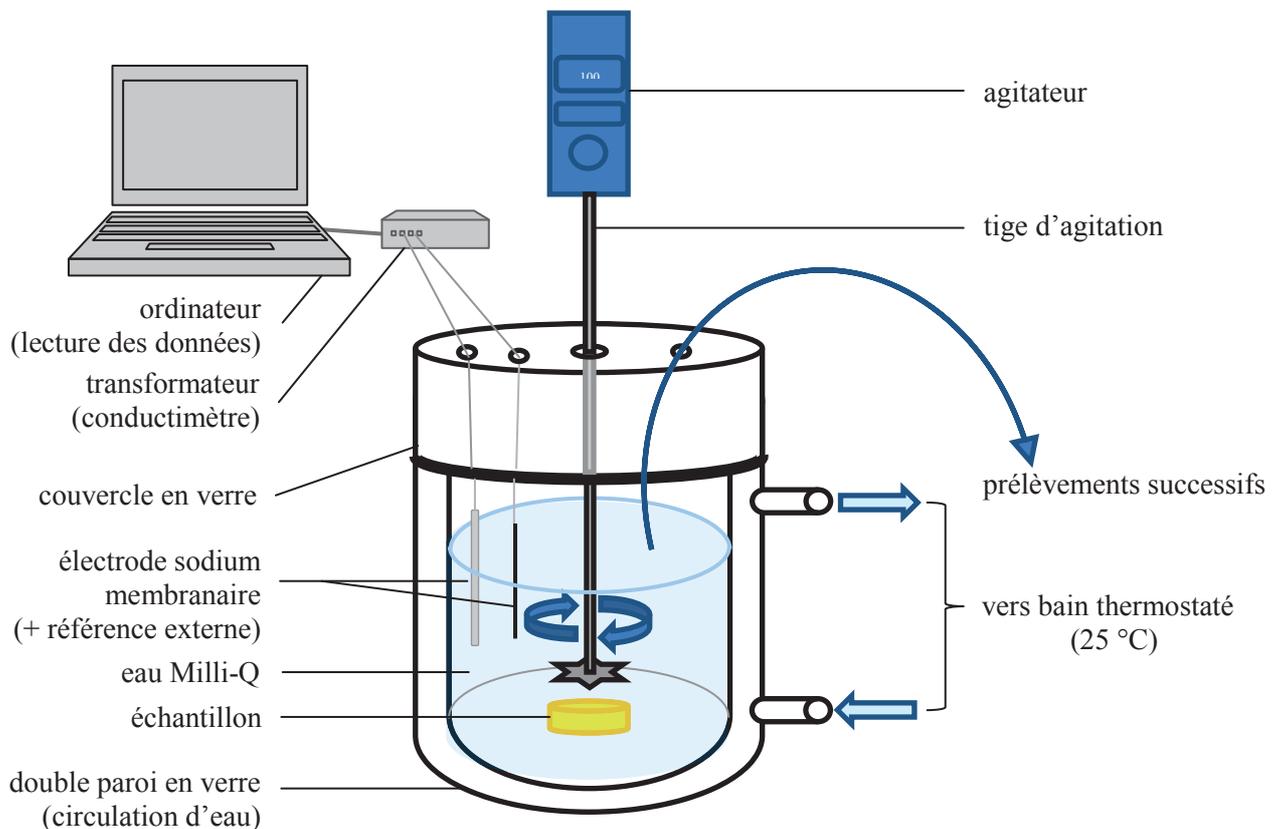


Figure 13 : Dispositif de suivi de la cinétique de libération des ions sodium dans l'eau

L'enceinte en verre a été fabriquée sur mesure par la société Dijonverre Labo (Asnières les Dijon, France). Ses caractéristiques sont les suivantes : hauteur = 29 cm ; diamètre extérieur = 15,5 cm ; diamètre intérieur = 12 cm ; épaisseur = 1,7 cm.

Des prélèvements de 2 mL de la phase aqueuse ont été effectués à différents moments :

- Au début du processus de libération : à 2 min, 5 min, 10 min, 15 min,
- Lors de phase suivante de libération : toutes les 15 min pendant 120 min,
- Lors de la dernière phase de libération : toutes les 60 min jusqu'à la fin de l'expérimentation (équilibre atteint).

La libération des ions sodium a été déterminée en mesurant la concentration en sodium dans les prélèvements à l'aide d'une électrode de verre sélective de l'ion sodium (ROSS®, Orion, Thermo Fisher Scientific, Beverly, USA). Le procédé de mesure est le même que celui mentionné pour la détermination du coefficient de partage (paragraphe 2.). Les valeurs de concentration en sodium ont été également validées par détection conductimétrique, après séparation ionique effectuée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC, Dionex ICS-3000). Le procédé de mesure est également le même que celui mentionné pour la détermination du coefficient de partage (paragraphe 2.).

Les courbes de libération du sodium ont été obtenues à partir des concentrations en sodium des échantillons successivement prélevés. Trois répétitions ont été effectuées pour chacun des six modèles fromagers. Les pentes de libération du sodium ont été calculées entre le prélèvement initial (2 min) et les quatre prélèvements suivants (5 min, 10 min, 15 min et 30 min). Les pentes ont été utilisées pour calculer le taux de libération du sodium, exprimé en $\text{mg.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Une électrode membranaire sélective du sodium (électrode en PVC 6.0508.100, Metrohm, Herisau, Suisse) a également été utilisée afin de suivre en continu, au cours du temps, la cinétique de libération du sodium dans la phase aqueuse. La longueur de l'électrode est de 120 mm et son diamètre est de 12 mm. La gamme de mesure des concentrations en sodium est située entre $5.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ et 1 mol.L^{-1} . L'électrode possède une membrane polymère échangeuse d'ions, sensibilisée avec des ions Ca^{2+} . Ceci permet l'échange avec les ions Na^{+} de l'échantillon testé, puisque ces ions ont une plus grande affinité pour la membrane. Cette fixation entraîne une différence de concentration entre la membrane et la solution, provoquant une différence de potentiel.

Pour mesurer cette différence de potentiel, il faut disposer, outre l'électrode spécifique, d'une électrode de référence. La fonction de l'électrode de référence est de fournir un potentiel constant permettant de mesurer les variations dues à l'électrode indicatrice. Il y a donc une différence de potentiel entre l'électrode spécifique et l'électrode de référence. Cette différence de potentiel est proportionnelle à la concentration de l'ion dans la solution. Dans notre cas, l'électrode de référence externe est une cartouche Ag/AgCl. Elle possède donc un potentiel maintenu constant par un équilibre chimique qui s'établit en son sein.

En raison des propriétés complexes des membranes échangeuses d'ions, ces électrodes sont sujettes à davantage d'interférences que les autres électrodes spécifiques. De ce fait, les mesures peuvent se révéler plus difficiles à obtenir, notamment aux faibles concentrations.

4. Etudes de la libération du sodium dans la salive

La libération du sodium en bouche a été étudiée lors de la consommation des modèles fromagers par recueil d'échantillons de salive.

a. Les sujets

Pour cette étude, 5 sujets sains (2 femmes et 3 hommes), âgés de 29 à 61 ans, ont été recrutés (*quatre de ces sujets ont également participé au profil sensoriel descriptif décrit ultérieurement*). Les sujets ont assisté à 4 séances d'une durée d'une heure environ chacune. Les séances ont été proposées à 11 h et elles ont été réparties sur une semaine. A chaque séance, les 5 sujets ont effectué l'étude simultanément, dans des cabines cloisonnées. Les sujets ont été rémunérés 40 euros pour les 4 séances.

Par ailleurs, il a été demandé aux sujets de ne pas manger, de ne pas boire, de ne pas fumer et de ne pas se parfumer au moins une heure avant la séance. Chaque sujet a reçu une fiche d'information et de consentement à signer au début de l'étude.

b. La procédure

Lors de la consommation des modèles fromagers, la libération du sodium en bouche a été suivie dans la salive. Des échantillons de modèles fromagers (5 g chacun) ont été servis à 13 °C. Afin de connaître la teneur en sodium de la salive lors de la consommation, les sujets ont dû cracher la salive qu'ils avaient en bouche à différents moments de la mastication. La salive devait être crachée dans des tubes Eppendorf[®] : avant la mise en bouche (T₀), après 5 coups de dents (T₅), après 15 coups de dents (T₁₅), après 30 coups de dents (T₃₀), et juste avant de déglutir le produit (T_D).

Les sujets devaient essayer de ne cracher que de la salive, tout en conservant l'échantillon en bouche. Si les juges ont ressenti le besoin de déglutir avant les 30 coups de dents, ils ont dû cracher la salive qu'ils avaient en bouche dans le tube T_D et laisser le tube T₃₀ vide. Dans ce cas, ils ont dû mentionner sur le questionnaire fourni, le nombre de coups de dents effectués avant la déglutition finale.

Lors de la première séance, les sujets ont pu se familiariser avec le protocole, puisque deux produits « blancs » leur ont été servis (deux échantillons de modèles fromagers).

A chaque séance, huit échantillons ont été servis : six échantillons de modèles fromagers et deux échantillons « blancs » à la première séance, puis huit échantillons de modèles fromagers aux trois séances suivantes (dont au moins un échantillon de chaque type de modèle fromager). Ainsi, cinq répétitions ont pu être effectuées pour chacun des six modèles fromagers.

A la fin de chaque échantillon consommé, les sujets ont pu se rincer la bouche avec de l'eau minérale (Evian[®]) et des quartiers de pomme. Les cinq tubes de salive correspondant à l'échantillon consommé (T₀, T₅, T₁₅, T₃₀ et T_D) ont été collectés pour chacun des cinq sujets et placés dans un bac de glace pilée.

Les sujets ont ensuite reçu un nouvel échantillon ainsi que cinq nouveaux tubes Eppendorf[®] labellisés (T₀, T₅, T₁₅, T₃₀ et T_D) prêts à recevoir la salive.

c. Analyse des échantillons

i. Centrifugation et récupération de la salive

Les tubes de salive conservés dans la glace ont ensuite été centrifugés pendant 15 min (15300 g, 4 °C). Un volume de 50 µL a été prélevé dans le surnageant (en évitant de prélever les amas de mucine, ou d'éventuels résidus de fromage et la mucine). Pour les tubes T₀, contenant plus de salive, 100 µL ont été prélevés. Les prélèvements ont été déposés dans des tubes Eppendorf[®].

Remarque : Pour quelques tubes, la centrifugation appliquée n'a pas permis d'obtenir un surnageant limpide. Dans ce cas, les tubes ont été centrifugés 10 min supplémentaires (15300 g, 4 °C). Les tubes ayant subi cette deuxième centrifugation ont été spécifiés. De plus, quelques tubes ont dû être supprimés de l'étude, lorsqu'ils ne permettaient pas d'extraire suffisamment de salive pour être analysés.

ii. Préparation des échantillons de salive pour analyse

Les prélèvements de surnageant ont été dilués avant analyse, dans les tubes Eppendorf[®]. Un volume de 400 µL d'eau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) a été ajouté aux tubes T₀ (dilution 1/5^e), alors qu'un volume de 950 µL a été ajouté aux autres tubes (dilution 1/20^e). Les échantillons ont ensuite été prélevés à l'aide de seringues de 2 mL afin d'être filtrés (filtres en nylon, 13 mm, taille des pores : 0,45 µm, C.I.L., Sainte-Foy-La-Grande, France). Le filtrat obtenu a été placé dans un flacon 2 mL à fond plat ou dans un flacon avec insert de 300 µL, si le volume récupéré était trop faible. Les flacons ont été codés de la façon suivante « SA-TB-CCC » où SA est le sujet A, TB est le temps B (T₀, T₅, T₁₅, T₃₀ ou T_D), et CCC est le code échantillon.

iii. Analyse de la concentration en sodium de la salive par HPLC

Les valeurs de concentration en sodium ont été déterminées par détection conductimétrique, après séparation ionique effectuée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC, Dionex ICS-3000). La colonne utilisée est une colonne IonPac CS12A 5µm, maintenue à une température de 25 °C. L'éluant utilisé est de l'acide sulfurique (H₂SO₄, 11 mM), avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹. La détection du sodium a lieu par conductimétrie avec suppresseur CSRS 300 en 2 mm (courant : 33 mA). Un volume de 25 µL a été injecté pour la chromatographie. Le contrôle du système et l'acquisition des données ont été faits avec le logiciel UCI-100 Chromeleon.

Les concentrations en sodium ont été obtenues à partir d'une courbe d'étalonnage, comme expliqué dans le paragraphe 2.

IV. Etude de la mobilité et de la disponibilité des composés d'arôme

1. Quantification des composés d'arôme contenus dans les modèles fromagers

L'aromatization a été effectuée de manière à ce que les concentrations en composés d'arôme soient identiques dans les produits finis. Néanmoins, lors du processus de chauffage, une partie des composés d'arôme est perdue, et les pertes peuvent varier selon la nature des composés d'arôme (Gierczynski, 2007). La quantification permet de déterminer les quantités de composés d'arôme effectivement présentes dans le modèle fromager après fabrication, afin de pouvoir en tenir compte dans l'interprétation des résultats.

La méthode de distillation/extraction simultanée (SDE), avec le dispositif de Likens-Nickerson (Likens & Nickerson, 1964), a été choisie pour extraire les composés d'arôme des modèles fromagers et pouvoir ensuite les quantifier. Le choix de cette méthode, plutôt que la méthode d'extraction SAFE (Solvent Assisted Flavour Evaporation) repose sur des expériences préalablement effectuées au laboratoire, sur des fromages fondus, et montrant que la technique de Likens-Nickerson était plus rapide et ne générait que très peu de composés d'arôme par chauffage, ne perturbant donc pas les profils chromatiques obtenus (Bellevrat *et al.*, 2008).

Cette méthode est une distillation par extraction simultanée, c'est-à-dire que le solvant entraîne directement les composés de l'échantillon lui aussi vaporisé par chauffage au cours de la distillation. Les composés d'arôme ayant une plus grande affinité avec le solvant, ils passent dans la phase organique quand les vapeurs se mélangent. Les vapeurs se condensent ensuite dans le réfrigérant et deux phases non miscibles sont obtenues :

- La phase aqueuse, la moins dense, ($d = 1$ pour l'eau)
- La phase organique, plus dense, contenant les composés d'arôme ($d = 1,3$ pour le dichlorométhane).

La réalisation de la distillation/extraction simultanée (SDE) nécessite la préparation de deux ballons dont les compositions sont les suivantes :

Ballon test (250 mL):

- 20 g de modèle fromager (congelé, coupé en petites particules)
- 36 g de NaCl
- 100 mL d'eau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)
- 0,5 g d'agent antimoussant (AFE 1030K, Rore Technologies, France)
- billes de verre (favorisent une ébullition constante)
- 50 μ L de solution étalon (pentanoate d'éthyle dans de l'éthanol pur : 0,260 g.L⁻¹).

Ballon solvant (100 mL):

- 25 mL de CH₂Cl₂ (dichlorométhane)
- grains de carborundum (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) ajoutés pour maintenir l'ébullition.

La solution étalon a été ajoutée pour la quantification ultérieure des composés d'arôme. Elle a été choisie telle que l'étalon soit un composé d'arôme de la même famille que les esters étudiés, et telle que le pic de ce composé (obtenu après GC-MS) soit bien distinct des pics des autres composés d'arôme étudiés. Similairement, l'agent antimoussant a été choisi de telle sorte que les pics issus de ce composé ne se superposent pas avec des pics d'intérêt.

Le montage de Likens-Nickerson (Figure 14) a été réalisé sous hotte. Les deux ballons ont été portés à ébullition, à 100 °C pour le ballon test, et à 60 °C pour le ballon de dichlorométhane (voir la composition des ballons dans le paragraphe précédent). Le temps de cette co-distillation a été de 45 min, à partir de la mise en contact des vapeurs des deux solvants.

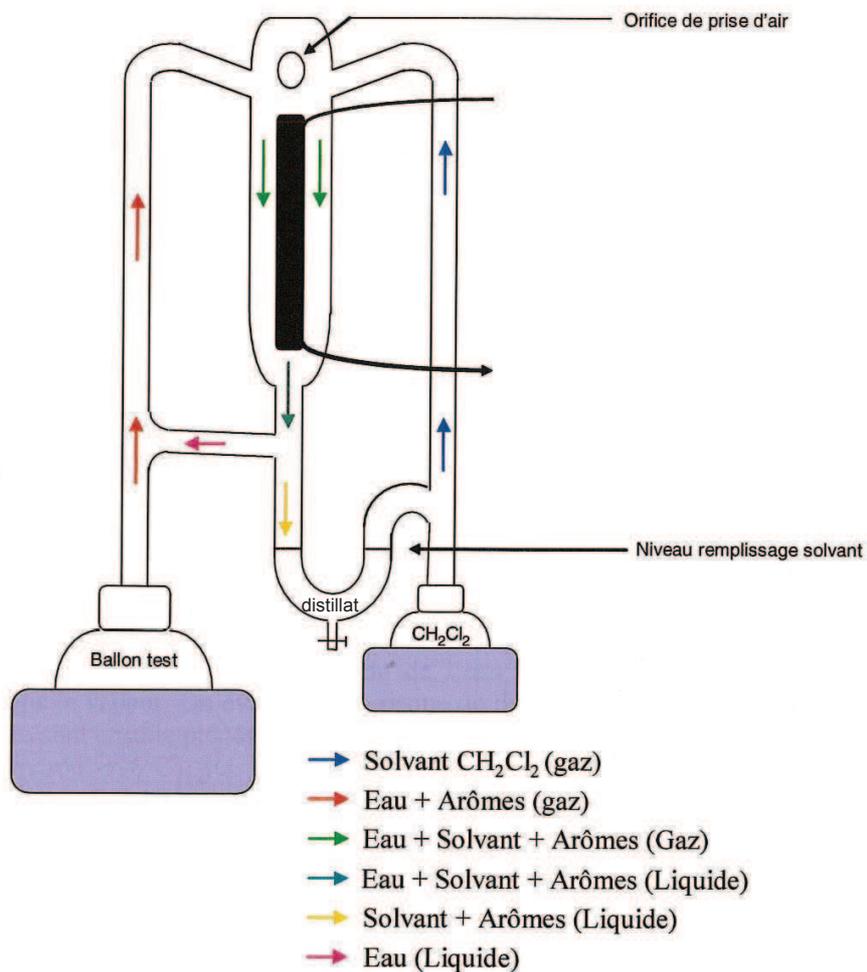


Figure 14 : Montage de Likens Nickerson pour l'extraction des composés d'arôme des modèles fromagers

Une fois refroidi, le contenu des deux ballons a été récupéré : le solvant restant dans le ballon solvant et le distillat comportant deux phases non miscibles. Une phase aqueuse (moins dense) et une phase organique contenant les composés d'arôme (plus dense) ont ensuite été séparées dans une ampoule à décanter pour ne garder que la phase organique.

La phase organique a été complétée jusqu'à 25 mL avec du dichlorométhane distillé, et un second étalon a été ajouté à cette étape de l'expérience. Il s'agit de 50 μL d'une solution d'octanoate d'éthyle dans du dichlorométhane distillé ($0,043 \text{ g.L}^{-1}$). Ce deuxième étalon, appelé étalon de chromatographie, permet de s'affranchir des variations de concentrations pouvant résulter de l'opération ultérieure (la concentration par la méthode de Kuderna-Danish).

La phase organique de l'extraction (+ l'étalon) a été concentrée jusqu'à 500 μL à 70 °C avec un appareil de Kuderna-Danish plongé dans un bain thermostaté. Un aliquot de 1 μL a ensuite été injecté dans un chromatographe en phase gazeuse HP 6890, couplé à un détecteur sélectif de masse MSD 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) opérant en mode ionisation électronique (70 eV). La chromatographie en phase gazeuse permet la séparation des molécules et la spectrométrie de masse permet la détection des ions leur correspondant. Le spectromètre de masse balaye des m/z (masse/charge) correspondant à des masses de 29 à 350 Da. La température de la source ionique a été fixée à 230 °C et la ligne de transfert à 250 °C. Les conditions de l'expérimentation étaient les suivantes : colonne DB-Wax (Agilent J&W, longueur = 30 m, diamètre interne = 0,32 mm et épaisseur de film = 0,5 μm), initialement à 40 °C, puis augmentée de 3 °C.min⁻¹ jusqu'à 240 °C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur, à une vitesse linéaire de 44 cm.min⁻¹. Les données quantitatives ont été obtenues par intégration électronique des surfaces des pics en utilisant le programme ChemStation (Agilent Technologies). Quatre répétitions d'extraction ont été effectuées pour chaque type de modèle fromager et sur chaque batch de fabrication (deux batches ont été fabriqués pour les expérimentations concernant l'étude de la libération des composés d'arôme). Les rendements d'extraction et les coefficients de réponse chromatographiques de chaque composé d'arôme ont été pris en compte dans le calcul des concentrations finales.

2. Etude de l'espace de tête des modèles fromagers

Pour analyser la composition de l'espace de tête (« headspace ») d'un échantillon, il faut procéder à l'échantillonnage de la phase vapeur présente au-dessus du produit, dans des conditions de température et d'agitation définies. Les composés d'arôme libérés dans la phase vapeur sont piégés sur une fibre SPME.

Dans notre cas, l'échantillon à analyser consistait en 5 g de modèle fromager, découpés en très petites particules (~ 1-2 mm) à partir d'un échantillon congelé. Les petites particules ont été tassées au fond d'un flacon en verre dont la partie supérieure était fermée par un bouchon muni d'un septum transperçable (Figure 15). Il était important d'être le plus reproductible possible, afin d'avoir un volume gazeux identique pour toutes les mesures.

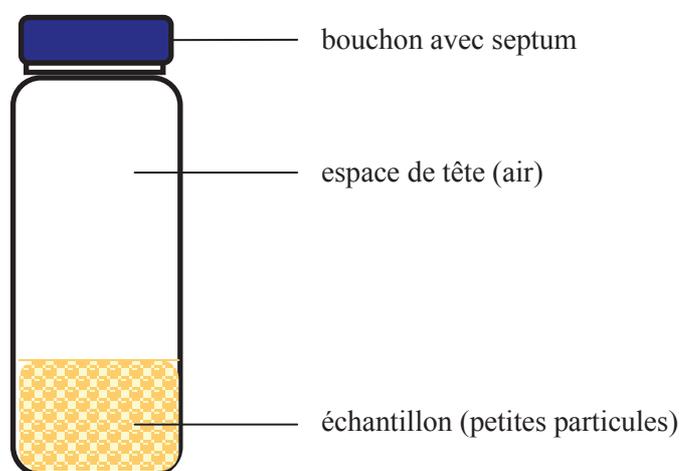


Figure 15 : Schéma d'un flacon pour l'analyse de la phase vapeur au-dessus d'un échantillon de modèle fromager

Les flacons préparés ont été déposés sur le portoir refroidi du passeur automatique Gerstel MPS2 (Gerstek Inc, Mulheim an der Ruhr, Allemagne) maintenu à 10 °C. Avant prélèvement, les flacons ont subi une mise à l'équilibre thermodynamique entre la phase vapeur et l'échantillon (2 h à 32 °C sous agitation).

Initialement, une température de 25 °C devait être choisie, afin d'être dans les mêmes conditions de température que celles employées pour les études de mobilité et libération du sodium. Mais, à 25 °C, très peu de composés sont libérés dans la phase vapeur. Ainsi, nous avons choisi de nous placer à 32 °C, afin de simuler plutôt la température en bouche (Fabre, 2002).

Après mise à l'équilibre (2h, 32 °C), les composés d'arôme libérés dans la phase vapeur ont été piégés sur une fibre SPME (DVB, Carboxen, PDMS, 2 cm, 50/30 µm, Supelco) pendant 45 min, via un passeur automatique MPS2. La fibre est alors désorbée pendant 15 min (5 min en mode splitless et 10 min en split pour reconditionner la fibre SPME) dans l'injecteur à 240 °C d'un chromatographe en phase gazeuse HP 6890, couplé à un détecteur sélectif de masse MSD 5973 (Aligent Technologies) opérant en mode ionisation électronique (70 eV). Les conditions chromatographiques sont les mêmes que celles citées précédemment pour la quantification des composés d'arôme.

Les surfaces des pics des chromatogrammes ont été comparées, mais les coefficients de partage n'ont pas été calculés. Il s'agit donc d'une analyse comparative, non quantitative de la quantité de composés d'arôme libérés dans la phase vapeur.

3. Etude in vivo de la libération des composés d'arôme en conditions de mastication

a. Les sujets

Pour cette étude, 10 sujets sains (6 femmes et 4 hommes), âgés de 20 à 30 ans, ont été recrutés. Chaque sujet est venu lors de 3 séances individuelles d'une durée de 1h30 chacune. Les séances avaient lieu à la même heure pour chaque sujet. Quatre créneaux horaires ont été proposés par journée : 9h30-11h ; 12h-13h30 ; 14h30-16h et 17h-18h30. L'ensemble des séances pour tous les sujets a été réparti sur deux semaines et demie. La totalité des séances a été rémunérée à hauteur de 50 euros. Il était demandé aux participants de ne pas manger, de ne pas boire, de ne pas fumer et de ne pas se parfumer au moins une heure avant la séance. Chaque sujet a reçu une fiche d'information et de consentement à signer au début de l'étude. De plus, le protocole d'étude a été validé éthiquement par le Comité de Protection des Personnes Est-1 (CPP, France, N° 2010/22) le 7 juin 2010 et, également, par l'Agence Française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS, France) le 27 janvier 2011.

b. Procédure

Lors de la consommation des modèles fromagers, la libération rétronasale des composés d'arôme a été suivie dans l'air expiré par spectrométrie de masse avec ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI-MS).

Au début de la première séance, un produit « blanc » (5 g de fromage Babybel[®]) dont les résultats n'ont pas été pris en compte, a été donné au sujet pour qu'il se familiarise avec le protocole. Par la suite, 10 échantillons de modèles fromagers (5 g chacun) ont été servis à 13 °C. Entre deux échantillons, il était demandé au sujet de se rincer la bouche avec de la pomme, du pain et de l'eau. Les produits ont été servis selon un ordre aléatoire, d'après un carré latin de Williams. A chaque séance, au moins un échantillon de chacun des six modèles fromagers a été servi. Sur l'ensemble des trois séances effectuées, 5 répétitions de chaque modèle fromager ont été servies.

Lors du suivi de la libération des composés d'arôme par APCI-MS, le sujet devait positionner l'extrémité de la canule reliée au spectromètre de masse dans une narine et respirer normalement. Ensuite, il lui était demandé de mettre en bouche l'échantillon de fromage et de le consommer tout en gardant la bouche fermée. Un schéma illustratif du dispositif est présenté sur la Figure 16.

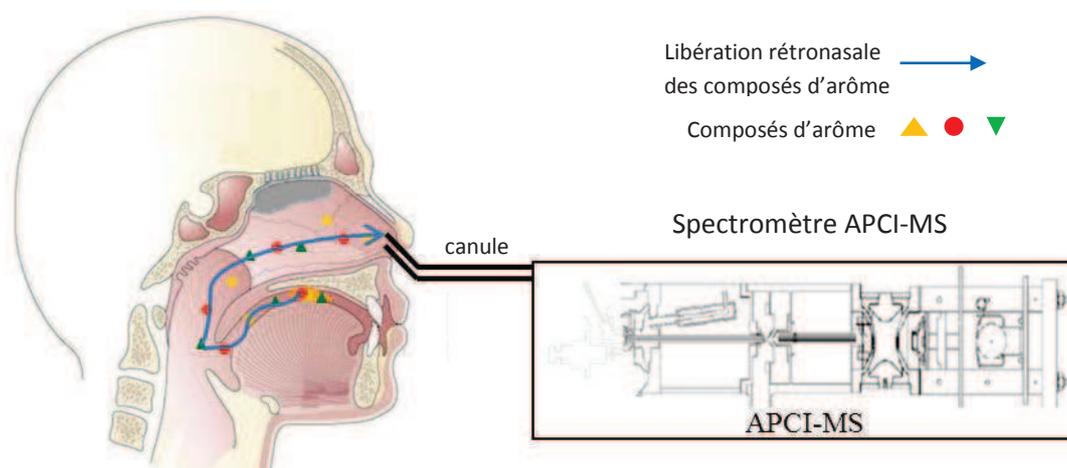


Figure 16 : Schéma illustratif du dispositif d'APCI-MS pour suivre la libération *in vivo* des composés d'arôme

Un protocole de consommation libre a été choisi, c'est-à-dire que les sujets étaient libres de manger comme ils le font normalement (pas de mastication ni de déglutitions imposées). L'enregistrement APCI-MS a été effectué durant trois minutes, couvrant ainsi la durée de consommation du produit.

La méthode APCI-MS a été inspirée de celle décrite par Le Quéré, J-L. *et al.* (2006). L'air expiré a été prélevé à un flux de 49 mL.min⁻¹ et introduit, à travers un capillaire en silice

fondue désactivée (diamètre interne = 0,53 mm) chauffé à 150 °C, dans la source d'ionisation d'un spectromètre de masse à trappe ionique (Esquire-LC, Bruker Daltonique, Wissenbourg, France). Une décharge positive de 6 kV a été appliquée à une aiguille Corona. Les ions moléculaires de type MH^+ correspondant aux composés d'arôme ionisés ont été suivis: diacétylène ($m/z = 87$), acide butanoïque ($m/z = 89$), heptan-2-one ($m/z = 115$), butanoate d'éthyle ($m/z = 117$), octan-3-one ($m/z = 129$), nonan-2-one ($m/z = 143$) et hexanoate d'éthyle ($m/z = 145$).

c. Traitement des données obtenues par APCI-MS

Avant d'être analysées, les courbes de libération des composés d'arôme, obtenues par APCI-MS, ont été lissées en utilisant le logiciel APCI[®] (créé et développé au laboratoire) de manière à éliminer les fluctuations de signal dues aux variations de respiration des sujets. Le niveau de lissage a été fixé pour toutes les acquisitions de telle sorte que le profil obtenu soit représentatif des fluctuations de libération d'arôme, sans perte d'information (ceci correspond au niveau de lissage 5 dans le logiciel utilisé). Trois principaux paramètres ont été extraits de chaque courbe individuelle de libération (Gierczynski *et al.*, 2007) et sont fournis par le logiciel pour chaque composé d'arôme étudié :

- L'aire sous la courbe (*AUC* (u.a.)), qui correspond à la quantité d'arôme libéré,
- L'intensité maximale de libération d'arôme (*I_{max}* (u.a.)) qui correspond au pic de libération d'arôme,
- Le temps correspondant à l'intensité maximale de libération d'arôme (*T_{max}* (min)).

Ces paramètres sont représentés sur la Figure 17 ci-dessous.

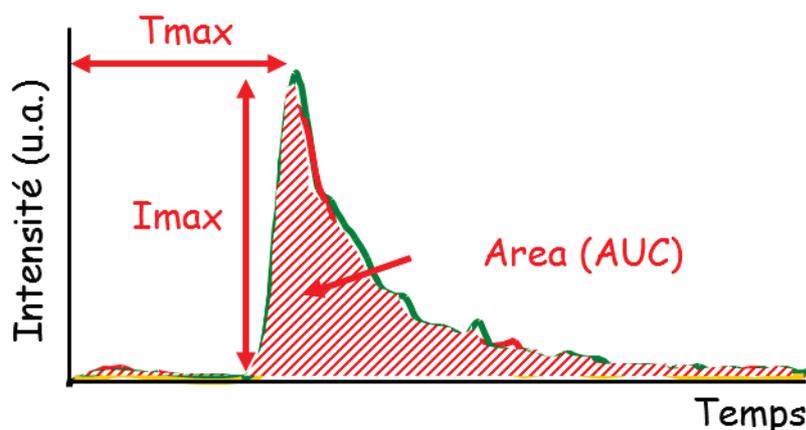


Figure 17 : Profil de libération d'arôme en APCI-MS et paramètres étudiés

Dans le cas de notre étude, ces trois paramètres ont été considérés avant et après la première déglutition. Ainsi, l'aire AUC avant la première déglutition a été notée AUC_1 et l'aire après la première déglutition AUC_2 . De la même façon, I_{max_1} , I_{max_2} , T_{max_1} et T_{max_2} ont été considérés (Figure 18).

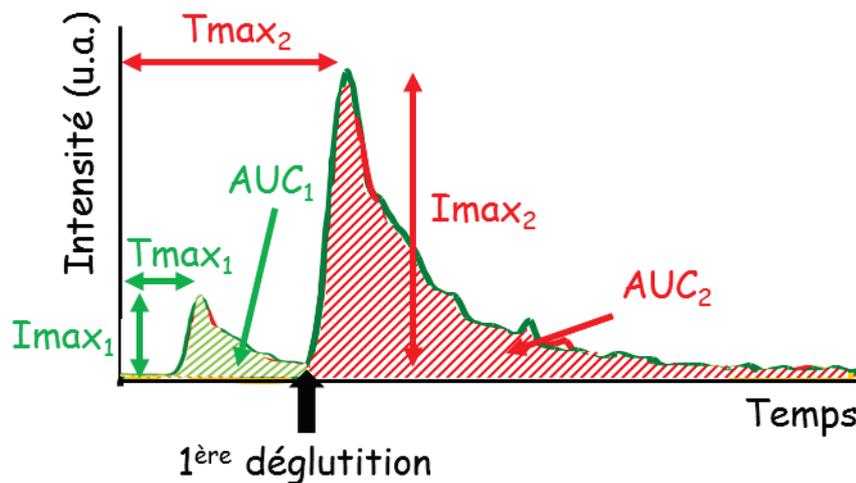


Figure 18 : Profil de libération d'arôme en APCI-MS et paramètres étudiés, avant et après la première déglutition

Le paramètre I_{max_1} / T_{max_1} ($\text{u.a.}\cdot\text{min}^{-1}$) a également été étudié. Il représente le taux de libération d'arôme pendant la phase précédant la première déglutition (Repoux *et al.*, 2012b) et est noté TL_1 .

Le ratio des quantités d'arôme libéré avant et après déglutition a également été calculé et il correspond au ratio AUC_2 / AUC_1 .

Les valeurs des quantités de composés d'arôme libérés (aires AUC , AUC_1 et AUC_2) et les intensités maximales de libération (I_{max} , I_{max_1} et I_{max_2}) qui seront présentées dans la partie Résultats correspondent aux valeurs de ces paramètres (obtenues après lissage) **divisées par les concentrations quantifiées des composés d'arôme**. Les paramètres ont été spécifiquement divisés par les valeurs de concentrations obtenues pour chaque batch de fabrication de modèle fromager. La prise en compte des concentrations quantifiées permet d'éviter de comparer des intensités finales de libération qui ne correspondraient pas aux valeurs réelles.

d. Suivi de la mastication

L'activité musculaire masticatoire a été mesurée lors de la consommation des modèles fromagers par électromyographie (EMG) de surface. Cette mesure a été effectuée simultanément à la mesure de libération rétronasale des composés d'arôme par APCI-MS (Figure 19).

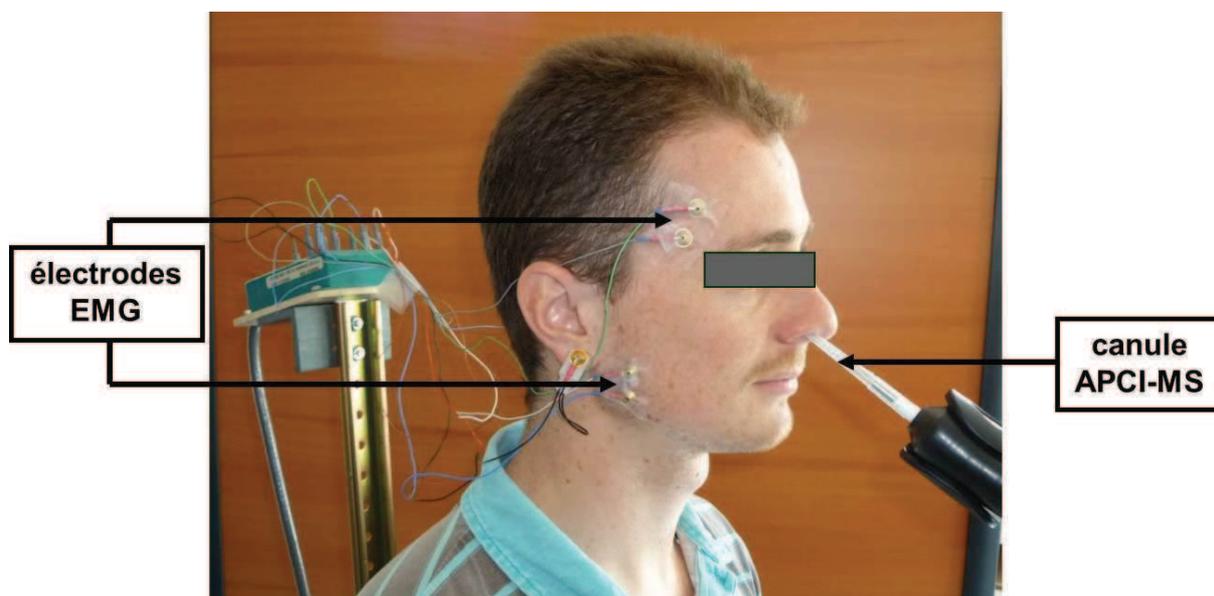


Figure 19 : Dispositifs APCI-MS et EMG pour l'analyse simultanée de la libération d'arôme et des contractions musculaires

Les signaux électromyographiques (en mV) des muscles masséters superficiels (droite et gauche) et des muscles temporaux antérieurs (droite et gauche) ont été enregistrés au moyen d'électrodes de surface en or (Grass Telefactor, West Warwick, RI, USA) recouvertes d'un gel conducteur (Yven *et al.*, 2012). La position de ces muscles est précisée sur la Figure 20.

**Muscle temporal droit (haut)
et muscle masséter droit (bas)**



Figure 20 : Emplacement des muscles masséter et temporal (côté droit du visage)

Les électrodes ont été connectées à un boîtier convertisseur de signal, lui-même relié à un amplificateur de signal. Le signal électrique, résultant des cellules nerveuses et qui provoque la contraction lors de la mastication, a été enregistré par le logiciel Spike 2 (Cambridge Electronic Design, U.K.) et les signaux EMG rectifiés des 4 muscles ont été analysés (Mioche *et al.*, 1999 ; Mioche *et al.*, 2002).

Cinq paramètres masticatoires ont été considérés lors de la consommation du modèle fromager :

- Le nombre de cycles masticatoires (N_c). Un cycle correspond à un coup de dent.
- La durée totale de la mastication (D_t , exprimée en s.).
- La durée d'un cycle masticatoire (D_c , exprimée en s.), où $D_c = D_t / N_c$.
- Le travail total musculaire (W_t , exprimé en mV.s). W_t correspond à l'aire de la surface du signal de l'activité musculaire.
- Le travail musculaire d'un cycle masticatoire (W_c , exprimé en mV.s), où $W_c = W_t / N_c$.

Les données collectées ont été moyennées pour les quatre muscles considérés. Cinq répétitions ont été effectuées pour chaque produit.

e. Suivi des déglutitions

Simultanément aux mesures de libération d'arôme et de mastication, les déglutitions ont été suivies tout au long de la consommation du modèle fromager. Le protocole libre de consommation (c'est-à-dire sans contrainte de mastication, ni de déglutition) a permis le suivi réel des déglutitions. Les sujets de l'étude devaient indiquer chaque déglutition par un tapement sur une surface plane située à côté d'eux. La durée avant la première déglutition, ainsi que le nombre total de déglutitions ont donc été notés manuellement, en fonction des indications des sujets.

V. Etude de la perception sensorielle des modèles fromagers

Afin d'étudier la perception sensorielle des modèles fromagers, un profil sensoriel conventionnel a été réalisé (AFNOR, 1995, 2010).

1. Les produits

Les modèles fromagers sont les mêmes que ceux décrits précédemment. Lors des séances du profil sensoriel, les produits ont été servis à la température de 13 °C, sous la forme d'une portion de type « camembert » pesant 4 g ($\pm 0,2$ g) (Figure 21).

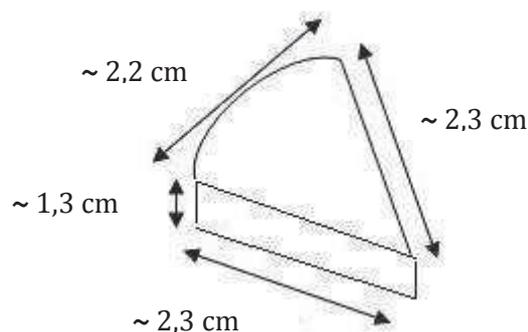


Figure 21 : Dimensions d'un morceau de fromage de 4g ($\pm 0,2$ g) servi lors des séances de notation

2. Les juges / Le panel

Trente-deux sujets ont été présélectionnés dans une base de données (Panelsens, déclaration CNIL 1148039) regroupant des informations concernant près de 7000 personnes candidates ou ayant déjà participé à des séances d'évaluation sensorielle dans le cadre des recherches menées au CSGA. Les principaux critères de présélection étaient la disponibilité et la motivation apparente. Les sujets ont ensuite été convoqués à une séance de sélection portant sur leurs capacités sensorielles.

Sur les 32 sujets présélectionnés, 29 ont répondu présents à la séance de sélection. A l'issue des six tests de la séance de sélection, 16 sujets ont été retenus pour former le panel de l'étude. Ils ont été choisis selon les résultats obtenus et leur disponibilité. Le panel a donc été composé de 10 femmes et 6 hommes âgés de 19 à 60 ans, la moyenne d'âge étant de 41 ans. Parmi eux, 11 possédaient déjà une expérience dans des études d'analyse sensorielle (dont 2 ayant déjà réalisé un profil).

3. La séance de sélection

Au cours de cette séance, chaque candidat a effectué six tests qui ont permis d'évaluer : la sensibilité gustative, la capacité à utiliser une échelle de notation, la sensibilité olfactive, la capacité à se concentrer, la capacité à discriminer qualitativement et quantitativement des stimuli et la capacité à développer du vocabulaire. Les six tests s'inspirent de tests réalisés antérieurement par d'autres auteurs (Gervais & Sauvageot, 1984 ; Issanchou & Lesschaeve, 1993), mais ils ont été orientés en fonction des produits à analyser et de la tâche que les juges ont dû effectuer. Les six tests sont les suivants :

- Test de reconnaissance des saveurs (salée, sucrée, amère, acide et umami).
- Test de notation sur échelle (également appelé test des figures grisées).
- Test de reconnaissance des odeurs (European Test of Olfactory Capabilities, « ETOC ») (Thomas-Danguin *et al.*, 2003).
- Test BOURDON T.I.B (test de concentration mentale) (Vos, 1998).
- Test de classement des saveurs salées (concentrations en NaCl dans de l'eau: 0 g.L⁻¹ - 1,5 g.L⁻¹ - 2,0 g.L⁻¹ - 2,6 g.L⁻¹ - 3,4 g.L⁻¹).
- Test de fluence verbale (fluence sémantique autour du mot « ciel »).

4. Les séances

L'étude a comporté 15 séances d'environ 1 heure, débutant à 16h, à raison de 2 fois par semaine. Elles se sont déroulées dans une salle de dégustation de l'INRA. Le profil a duré 1 mois et demi, du 9 mai au 26 juin 2012. Pour les séances, il était demandé aux participants de ne pas manger, de ne pas boire, de ne pas fumer et de ne pas se parfumer au moins une heure avant la séance. Chaque sujet a reçu une fiche d'information et de consentement à signer au début de l'étude. Les sujets ont été rémunérés 10 euros par séance (par établissement d'un contrat de travail). L'étude s'est intéressée à plusieurs dimensions sensorielles : les arômes, les saveurs, la texture et les odeurs.

Au sein d'un profil sensoriel, les séances comportent des activités diverses qui constituent les différentes étapes du profil (Stone *et al.*, 1974). Deux composantes clés rythment le déroulement et le contenu des séances :

- les différentes étapes théoriques du profil (familiarisation avec les produits, génération des descripteurs, tris successifs des descripteurs, création d'un aide-mémoire, séances d'entraînement à la notation des produits, mesures finales...)
- les performances des juges et leur progression (maîtrise des descripteurs, capacité à noter de la même façon d'une séance à l'autre, accord avec le groupe...)

En fonction de ces paramètres, l'expérimentateur propose au panel des séances adaptées en vue d'obtenir des résultats satisfaisants à l'issue du profil.

a. Familiarisation et élaboration du vocabulaire

La phase de familiarisation a permis tout d'abord aux juges de découvrir les produits de l'étude. Elle leur a également permis de mettre au point une liste de descripteurs qui ont servi à la notation des produits : 5 séances d'une durée variant de 1h à 1h30 ont été consacrées à ces travaux.

Lors de la première séance, les juges ont analysé un ensemble de 8 produits. Cet ensemble était composé des 6 modèles fromagers et de 2 produits du commerce reconnus comme étant les plus proches de l'espace produit de l'étude (Ficello[®] et Emmental Entremont allégé[®]). Pour chacun des produits, les dégustateurs ont dû générer le plus grand nombre de descripteurs sensoriels caractérisant les produits lors de leur consommation. Les 2 produits commerciaux ont été ajoutés dans le but de favoriser une plus grande génération de termes. Au cours de cette première séance, les expérimentateurs ont pu constater la tendance des juges à sentir les produits avant de les mettre en bouche. Ainsi, une dimension « odeur » a été ajoutée à l'étude à ce stade du profil. Les juges ont donc également généré des descripteurs d'odeurs, qui ont été traités de la même manière que les autres.

Lors de la seconde séance, après une mise en commun de chacun des descripteurs générés par le panel, un débriefing a permis d'apporter de la précision aux termes trop vagues et d'éliminer les termes hédoniques ou évoquant des quantités. En cas de désaccord entre les juges, ou bien lorsque certains juges ne comprenaient pas réellement le(s) terme(s) employé(s) par d'autres, l'animateur a proposé des références ou des définitions verbales afin de créer un consensus autour du descripteur. A l'issue du débriefing, une liste de 26 descripteurs a été créée (Tableau 9).

Tableau 9 : Première liste de descripteurs sensoriels générés par le panel

Descripteurs de saveurs, sensations trigéminales, arômes	Descripteurs de texture	Descripteurs d'odeurs
<i>Saveurs, sensations trigéminales</i>		
Salée	Lisse en bouche	Lactée
Sucrée	Collant	Beurre / Crème
Astringence	Texture morcelée	Chimique
Note piquante	Ferme	Fromage fondu
	Compact	Plastique
<i>Arômes</i>	Elastique	Fruitée
Arôme global	Mou	Fraise
Arôme artificiel	Pâteux	
Note lactée	Fondant	
Note fruitée		
Note épicée		
Note beurre et crème		

Lors de la troisième séance, les juges ont été amenés à noter l'intensité de présence de chacun des descripteurs dans les 8 échantillons ayant servi à la génération des termes. Les 2 produits commerciaux ont été conservés pour la notation afin de ne pas perturber les juges. La notation a été faite à l'aide d'échelles structurées à six niveaux. Les notes d'intensité allaient ainsi de 0 (descripteur absent) à 5 (descripteur très présent) au moyen d'une séance créée avec le logiciel FIZZ (version 2.46B, Biosystèmes, Couternon, France). Les notes des 2 produits du commerce ont été retirées du fichier résultat afin de ne garder que les modèles fromagers de l'étude.

Plusieurs analyses statistiques ont été effectuées sur ces données. La moyenne géométrique (Dravnieks *et al.*, 1978) a permis d'indiquer le niveau d'utilisation de chaque descripteur. Le classement des descripteurs selon l'importance de cette moyenne a permis d'éliminer un certain nombre de descripteurs dont les moyennes géométriques étaient relativement faibles (valeur inférieure à 10% en pourcentage cumulé dans notre cas). Une analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs (produit et sujet) a permis de mettre en évidence les descripteurs pour lesquels les sujets faisaient une différence significative entre les modèles fromagers. Enfin, une étude de la matrice des corrélations entre descripteurs a permis de visualiser les descripteurs synonymes ou antonymes et d'effectuer d'éventuels regroupements.

A l'issue de ces analyses statistiques, une réduction du nombre de descripteurs a eu lieu par suppression des termes non discriminants ou par regroupement des synonymes. Cette réduction a été établie après consultation et accord du panel. Elle a également été affinée au cours des séances d'entraînement. Une liste de 18 descripteurs a ainsi été retenue (Tableau 10) : 12 descripteurs en bouche et 6 descripteurs au nez (odeurs).

Tableau 10 : Liste affinée des descripteurs sensoriels générés par le panel

Descripteurs de saveurs, arômes	Descripteurs de texture	Descripteurs d'odeurs
<i>Saveurs</i>	Texture morcelée	Lactée
Salée	Gras en bouche	Crème
	Lisse en bouche	Beurre
<i>Arômes</i>	Elastique	Fromage fondu
Arôme global	Dureté (mou à dur)	Fruitée
Note fruitée	Collant	Fraise
Note lactée	Compact	
Note beurre/gras		

Malgré un entraînement adapté effectué sur les odeurs, aucun des juges n'est parvenu à faire de différences entre les produits pour aucun descripteur d'odeurs ($p > 0,05$), comme le montre la Figure 22 ci-dessous où aucun descripteur d'odeurs n'est discriminant. Ainsi, en raison du temps imparti pour cette étude et par souci d'obtenir des résultats de qualité, nous avons décidé de supprimer la dimension « odeurs » du profil sensoriel.

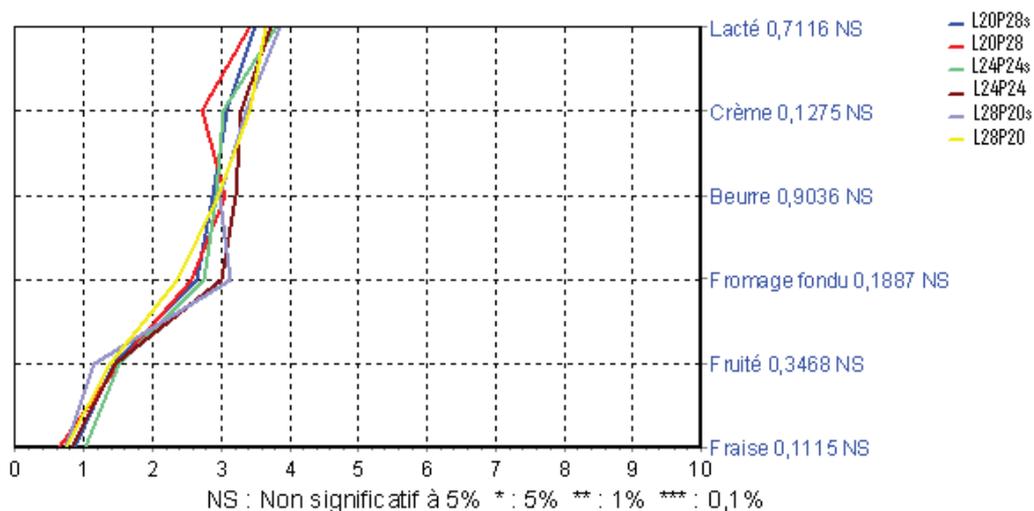


Figure 22 : Pouvoir discriminant (ANOVA) pour les descripteurs d'odeurs sur quatre répétitions

b. Création d'un aide-mémoire

Un aide-mémoire a été créé avec les juges afin d'optimiser leur manière de noter les produits (Annexe 2). Cet aide-mémoire est un document détaillant chacun des descripteurs en bouche, générés précédemment (descripteurs de saveur, d'arômes et de texture). L'aide-mémoire indique la définition, la temporalité (à quel moment le descripteur apparaît dans la dégustation), la localisation (à quel endroit de la bouche apparaît-il) et le mode opératoire de dégustation (la manière dont le juge procède pour évaluer le descripteur). Les trois derniers paramètres (temporalité, localisation, dégustation) concernent principalement les descripteurs de texture. Des produits-références correspondant aux bornes des échelles de notation y figurent également (les produits servant de repères inférieurs et supérieurs des bornes). Cet aide-mémoire permet à tous les juges d'avoir une définition commune des descripteurs, ce qui est primordial pour un profil sensoriel. Les définitions ainsi que les bornes des descripteurs sont données dans le Tableau 11. Les bornes des descripteurs ont été choisies dans l'espace produit des fromages et des produits laitiers.

Tableau 11 : Descripteurs sensoriels en bouche figurant dans l'aide-mémoire des panélistes

Descripteur	Définition	Borne inférieure	Borne supérieure
<u>Saveurs</u>			
Intensité salée	Présence plus ou moins forte de sel	Eau	Solution salée (7g.L ⁻¹)
<u>Arômes</u>			
Intensité aromatique globale	Goût plus ou moins prononcé	<i>absence</i>	Camembert de Normandie au lait cru
Note fruitée	Qui rappelle le goût d'un ou plusieurs fruits	<i>absence</i>	Yaourt multi-fruits
Note lactée	Qui a le goût de lait, de crème	<i>absence</i>	Lait entier stérilisé
Note beurre/gras	Goût plus ou moins prononcé de beurre, de gras	<i>absence</i>	Beurre
<u>Texture</u>			
Texture morcelée	Qui se fractionne, qui fait de petits morceaux en bouche	Fromage fondu La Vache qui rit [®]	Mimolette
Gras en bouche	Qui nappe la bouche, qui laisse un film huileux/lipidique en bouche	Fromage blanc à 0 %	Brillat Savarin [®]
Lisse en bouche	Qui glisse en bouche (contraire de rugueux), notion de fluidité en bouche	Parmesan	Cancoillotte
Elastique	Qui est caoutchouteux, qui résiste à la mastication	Yaourt nature	Fromage Ficello [®]
Dureté (mou à dur)	Qui est difficile à croquer, contraire de mou	Fromage frais Kidiboo [®]	Parmesan
Collant	Qui colle aux dents et au palais	Yaourt nature	Cancoillotte
Compact	Qui reste dense en bouche, qui est épais, difficile à mastiquer	Mousse de fromage frais de type Rondelé [®] ail et fines herbes	Emmental marque Carrefour [®]

c. Entraînement et séances de mesures

Les étapes d'entraînement et de mesures du profil sont des étapes de notation de produit. Chaque juge a dû noter l'intensité de chacun des descripteurs en bouche (Tableau 12) dans les échantillons de modèles fromagers présentés. Lors des séances, les échantillons ont été identifiés par un code aléatoire à 3 chiffres et présentés de façon monadique afin d'éviter toute comparaison. L'ordre de présentation des échantillons a différé pour chaque juge. Il a été établi selon la méthode du carré latin de Williams afin de limiter les effets d'ordre et de report (Schlich, 1993). Sept séances d'entraînement ont constitué un préambule aux 3 séances de mesures. Lors de l'entraînement, les cabines de dégustation ont été éclairées en lumière blanche car il n'y avait pas de différence d'aspect entre les modèles fromagers. Trois morceaux de fromage ont été servis aux juges pour effectuer la notation des 12 descripteurs en bouche. Dans ce cas, les juges ont dû mettre la totalité du morceau de fromage en bouche. Un seul morceau leur a été servi pour noter les 6 descripteurs d'odeur. Les juges devaient alors sentir le morceau et noter l'intensité de chacun des descripteurs perçus (de 0 à 10) sur les échelles linéaires affichées sur l'écran de la séance FIZZ. Plusieurs morceaux de pommes, deux tranches de pain sans sel et un gobelet d'eau ont été servis pour se rincer la bouche entre deux échantillons. La pomme a permis de nettoyer la bouche des éventuels résidus de gras laissés par les modèles fromagers. Le pain a été choisi sans sel car l'étude portait en partie sur la perception salée (cela a permis de ne pas créer de rémanence du sel en bouche). Enfin l'eau a permis d'éliminer les résidus les plus tenaces.

Pour la notation de l'intensité de la saveur salée, une échelle inspirée des échelles utilisées dans la méthode Spectrum™ a été utilisée (Meilgaard *et al.*, 1991). La notation s'est effectuée de 0 à 10, mais quatre solutions salées ont été présentées au sujet pour l'aider dans sa notation (Tableau 12).

Tableau 12 : Concentrations en NaCl des différentes solutions de référence utilisées pour les échelles Spectrum de l'intensité salée

Solution	Pourcentage échelle	Concentration en NaCl
1	16,7 %	2 g.L ⁻¹
2	33,3 %	3,5 g.L ⁻¹
3	56,7 %	5 g.L ⁻¹
4	100 %	7 g.L ⁻¹

Les solutions ont été préparées dans de l'eau minérale Evian.

Au terme de chaque séance d'entraînement, les résultats ont été collectés via le fichier « résultats » généré par le logiciel FIZZ. Une série d'analyses statistiques (détaillées ci-après) a fourni un aperçu des performances globales et individuelles du panel. Les résultats de ces analyses étaient parfois présentés aux sujets en début de séance, afin de leur présenter leurs performances (et améliorations éventuelles). Pour certaines analyses, deux séances au moins étaient nécessaires (par exemple, la répétabilité).

VI. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques des études décrites dans ce manuscrit ont été effectuées avec le logiciel Statistica (version 10, Statsoft, France). En complément, pour les données du profil sensoriel, le logiciel FIZZ (version 2.46B, Biosystèmes, Couternon, France), et la Sensobase[®] (application internet développée par la plateforme Chemosens du CSGA, permettant d'analyser les performances d'un jury d'analyse sensoriel) ont été utilisés.

1. Analyses statistiques pour les données in vitro de mobilité/libération (sodium et composés d'arôme)

Afin de comparer les données obtenues pour les différents modèles fromagers, des analyses de variance (ANOVA) à deux facteurs (sel, ratio L/P) et interactions (sel*ratio L/P) ont été réalisées. Lorsque des différences étaient perçues pour un paramètre, un test LSD (« least significant differences ») a été réalisé pour déterminer les différences significatives. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

Afin de mettre en évidence des corrélations entre paramètres, des coefficients de corrélation de Pearson (r) ont pu être calculés.

2. Analyses statistiques pour les données in vivo de libération du sel en bouche, de libération des composés d'arôme et de mastication

De la même façon que pour les données *in vitro*, les données *in vivo* obtenues pour les différents modèles fromagers ont été comparées par ANOVA. En situation de consommation de modèle fromager, il existe toujours des différences inter-individuelles lors des mesures de libération de composés volatils (Pionnier *et al.*, 2004a) ou non volatils (Pionnier *et al.*, 2004b). Ainsi, trois facteurs ont été considérés pour les mesures *in vivo* (sel, ratio L/P et sujet), ainsi que leurs interactions.

Lorsque des différences étaient perçues pour un paramètre, un test LSD a aussi été réalisé pour déterminer les différences significatives. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$. Comme pour les données *in vitro*, des coefficients de corrélation de Pearson (r) ont pu être calculés afin de mettre en évidence des corrélations entre paramètres. Par ailleurs, des représentations ACP (analyse en composantes principales) ont été utilisées afin de visualiser la variabilité, et les associations potentielles, entre les paramètres *in vivo* étudiés.

3. *Analyses statistiques pour les données d'étude sensorielle*

a. Les sujets

Les performances du panel ont été évaluées à l'échelle globale et à l'échelle individuelle. Elles ont été déterminées avec le logiciel FIZZ (version 2.46B, Biosystèmes, Couternon, France), le logiciel Statistica (version 10, Statsoft, France), ou par l'envoi de jeux de données à la Sensobase[®].

i. Les performances globales

- L'accord global a été calculé à l'aide du coefficient de concordance de Kendall (W) :

$$W = \frac{\text{Variance}}{\text{Variance maximale}}$$

où la variance désigne la variance des notes pour un descripteur.

- Le pouvoir discriminant global

Cette mesure a permis d'évaluer la capacité du groupe à faire une différence entre les produits pour chacun des descripteurs. La mesure a été obtenue grâce au logiciel FIZZ par réalisation d'une ANOVA par descripteur (attribut) à 2 facteurs (produit et sujet) avec interaction produit*sujet. La valeur de la *Pvalue* associée au *F* produit a été analysée : si celle-ci a été indiquée significative ($p < 0,05$), le panel a réussi à discriminer les produits pour le descripteur en question.

- L'homogénéité globale du panel

Elle a été calculée à partir du logiciel FIZZ au moyen d'une ANOVA par descripteur à 2 facteurs (produit et sujet) avec interaction produit*sujet. Tout comme pour le pouvoir discriminant, le principe d'analyse a été basé sur la significativité de l'interaction produit*sujet. Si cette interaction a été indiquée significative, le panel n'a pas été considéré comme homogène pour la notation du descripteur analysé.

ii. Les performances individuelles

- L'accord individuel

L'accord d'un sujet avec le reste du groupe (classement des produits) est évalué à l'aide du coefficient de corrélation de Spearman. Ce coefficient est calculé pour chaque descripteur et pour chaque sujet et rend compte de la corrélation entre le classement du sujet et le classement moyen du groupe.

- Le pouvoir discriminant individuel

Cette mesure a permis d'évaluer la capacité de chaque sujet à faire une différence entre les produits pour chacun des descripteurs. Elle a été calculée par réalisation d'une ANOVA à 1 facteur (produit) par descripteur et par sujet. Le principe est le même que celui décrit précédemment pour le pouvoir discriminant global (significativité).

- La répétabilité individuelle

Cette mesure a permis d'évaluer la capacité du sujet à donner des notes répétables d'une séance à l'autre pour un même produit. Elle a été calculée par réalisation d'une ANOVA à 1 facteur (produit) par descripteur et par sujet. Cette mesure nécessite au moins 2 répétitions. L'évolution de la répétabilité a été obtenue par calcul de la différence entre le carré moyen résiduel (CMR) des répétitions 1 et 2, et le CMR des répétitions 1 et 3. S'il y a eu une augmentation (valeur de différence positive), la répétabilité a augmenté. S'il y a eu une diminution (valeur de différence négative), la répétabilité a diminué.

b. Les produits

Un envoi du jeu de données à la Sensobase[®] a permis d'obtenir plusieurs résultats. L'AVC (analyse en variables canoniques) a permis de visualiser les principales caractéristiques des produits. Enfin, une ANOVA à plusieurs facteurs (ratio Lipides/Protéines, teneur en sel, sujet et interactions) a été réalisée avec le logiciel Statistica (version 10, Statsoft, France). Elle a permis d'évaluer l'existence d'un effet sel et/ou d'un effet du ratio Lipides/Protéines. Le test LSD de Fisher a ensuite permis de déterminer l'existence de différences significatives entre les produits ($p < 0,05$). Une ACP (analyse en composantes principales) de confirmation a également été réalisée avec Statistica.

La partie Matériel et Méthodes a présenté les différents protocoles et les techniques utilisées dans ce projet de thèse. La partie suivante présente les résultats des différentes études menées.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Comme nous l'avons mentionné auparavant, l'objectif de l'ensemble des travaux est d'étudier l'influence de la composition de modèles fromagers (notamment ratio lipides/protéines (L/P) et teneur en sel (NaCl)) sur la mobilité et la libération du sodium et des composés d'arôme, et l'incidence sur la perception.

Nous présenterons, dans un premier chapitre, les caractéristiques des modèles fromagers choisis pour l'étude (composition, structure, propriétés rhéologiques).

Nous décrirons, dans le deuxième chapitre, les résultats de mobilité et de libération du sodium en conditions *in vitro* et en conditions *in vivo* (de consommation des produits). L'impact de la composition des modèles fromagers sur les mécanismes de mobilité et de libération du sodium sera discuté par rapport aux données de microstructure et de rhéologie.

Dans un troisième chapitre, nous présenterons les résultats de libération des composés d'arôme des modèles fromagers, en conditions *in vitro* et en conditions *in vivo*. Ces résultats seront également discutés en fonction des données des deux premiers chapitres.

Dans le dernier chapitre, nous présenterons les résultats de perception sensorielle des produits (saveurs, arômes et texture), en relation avec les données précédemment obtenues.

I. Caractérisation des modèles fromagers par mesures instrumentales

Afin de caractériser les modèles fromagers, les valeurs de pH, de matière sèche et de concentrations en sodium ont été contrôlées. Les propriétés rhéologiques des modèles fromagers ont ensuite été étudiées et la microstructure a été analysée.

1. pH des modèles fromagers

Les valeurs de pH des modèles fromagers sont données dans le Tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13 : Valeurs de pH des six modèles fromagers

	Modèles fromagers					
	L28P20	L28P20s	L24P24	L24P24s	L20P28	L20P28s
pH	6,75±0,01	6,68±0,04	6,85±0,01	6,70±0,04	6,85±0,03	6,73±0,01

Les valeurs sont comprises entre 6,64 et 6,88. Dans certains cas, le pH peut influencer la conformation des protéines (Casal *et al.*, 1988 ; Martinho *et al.*, 2003 ; Swails *et al.*, 2010) et donc leur capacité de liaison avec des petits solutés (sodium, composés d'arôme), mais dans la zone de pH concernée, on peut considérer que les faibles variations ne sont pas impactantes sur les résultats des paramètres ultérieurement présentés (mobilité du sodium et mobilité des composés d'arôme).

2. Teneur en matière sèche des modèles fromagers

Les teneurs en matière sèche des six modèles fromagers ne sont pas significativement différentes (Tableau 14). Ceci correspond également à l'objectif recherché lors de la mise en place des fabrications. Ainsi, on s'affranchit de l'effet d'une variation de la teneur en matière sèche (concernant les conclusions qui porteront sur la mobilité du NaCl et des composés d'arôme). Ceci est un paramètre important car la teneur en matière sèche, et donc en humidité, peut influencer la mobilité du NaCl et des composés d'arôme (Lauverjat *et al.*, 2009b).

Tableau 14 : Valeurs de matière sèche des six modèles fromagers

	Modèles fromagers					
	L28P20	L28P20s	L24P24	L24P24s	L20P28	L20P28s
Matière sèche (%)	53,0±0,6 ^a	52,7±0,3 ^a	52,8±0,4 ^a	53,1±0,4 ^a	52,7±0,3 ^a	53,0±0,5 ^a

^a : les valeurs comportant la même lettre ne sont pas significativement différentes (test LSD de Fisher).

3. Teneur en sodium des modèles fromagers

Les valeurs de teneur en sodium ont été délivrées par le Laboratoire Agrobio (Rennes) ayant effectué les analyses (Tableau 15).

Tableau 15 : Teneurs en sodium des six modèles fromagers (dosage)

	Modèles fromagers					
	L28P20	L28P20s	L24P24	L24P24s	L20P28	L20P28s
Teneur en sodium (%)	0,67±0,02	1,06±0,05	0,66±0,01	1,06±0,04	0,67±0,01	1,06±0,02

Le dosage du sodium confirme le fait que le sodium quantifié des modèles fromagers sans NaCl ajouté provient presque uniquement des sels de fonte. En effet, d'après la teneur en sodium mentionnée par le fournisseur de sels de fonte (dans le Tableau 7), on obtient :

$$[\text{Na}]_{\text{sels de fonte}} = (\text{pourcentage indiqué par le fournisseur}) \cdot (\text{masse incorporée}) / 100$$

$$\text{soit : } [\text{Na}]_{\text{sels de fonte}} = 24,7 \times (25/1000 \cdot 100) / 100$$

$$[\text{Na}]_{\text{sels de fonte}} = 0,62 \%$$

Le faible écart entre le pourcentage calculé (0,62 %) et celui mesuré (0,67 %) peut provenir soit du faible apport de sodium par les autres ingrédients, soit de la légère perte d'eau pendant le processus de fabrication (qui entraîne une augmentation relative de la concentration en sodium).

Dans les modèles avec NaCl ajouté, le sodium provient à la fois des sels de fonte et du NaCl.

On sait que :

$$[\text{Na}]_{\text{NaCl ajouté}} = (39,66) \cdot (\text{masse incorporée}) / 100$$

$$\text{Soit : } [\text{Na}]_{\text{NaCl ajouté}} = 39,66 \times (10/1000 \cdot 100) / 100$$

$$[\text{Na}]_{\text{NaCl ajouté}} = 0,40 \%$$

En sommant les deux concentrations en sodium (des sels de fonte et du NaCl), nous retrouvons la teneur en sodium total dosé par le Laboratoire Agrobio, ce qui confirme les hypothèses de provenance du sodium dans les matrices.

Après la caractérisation physico-chimique des modèles fromagers, les propriétés rhéologiques des produits ont été étudiées et sont présentées ci-après.

4. Caractérisation de la rhéologie des modèles fromagers

a. Travail à la déformation maximale (W)

La Figure 23 représente l'évolution du travail à la déformation maximale W et du module de déformabilité MD .

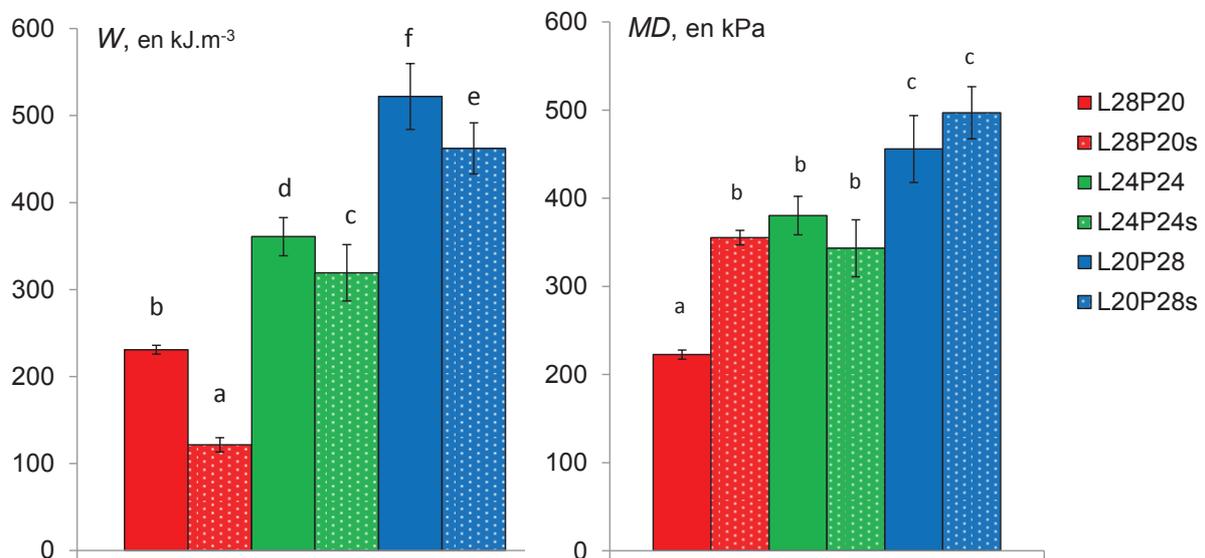


Figure 23 : Travail à la déformation maximale (W) et module de déformabilité (MD) des six modèles fromagers

^{a-e} : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher). Les écarts-types sont représentés.

L'analyse des variances (ANOVA) réalisée sur le travail à la déformation maximale (W) indique que les six modèles fromagers sont significativement différents pour ce paramètre ($p < 0,001$). W reflète la résistance mécanique des produits (à la compression). La contrainte à la déformation maximale (σ) a aussi été mesurée (données non montrées) et elle évolue exactement comme W et reflète également la résistance des produits. Elle ne sera donc pas présentée.

i. Effet du ratio L/P sur le travail à la déformation maximale

Les valeurs du travail à la déformation maximale (W) (et donc la résistance des produits) augmentent significativement quand le ratio L/P (lipides/protéines) diminue ($p < 0,001$) (Figure 23). Ceci est cohérent avec le fait que les protéines de lait contribuent à la fermeté alors que la matière grasse laitière contribue au caractère onctueux/mou du fromage (Lebecque *et al.*, 2001). L'augmentation de résistance pour les ratios L/P plus bas peut également s'expliquer par une moins grande hydratation des protéines. En effet, la teneur en protéines augmente, mais la teneur en eau reste la même. Or, une phase protéique moins hydratée conduit à une matrice plus compacte et plus résistante (Hogan *et al.*, 2012 ; McMahon *et al.*, 2005). Par ailleurs, les interactions entre protéines sont responsables de la formation d'une matrice pendant le processus de refroidissement, conduisant à une augmentation de la viscosité (Dimitreli & Thomareis, 2004 ; Lee *et al.*, 2003), et donc de la résistance.

ii. Effet de la teneur en NaCl sur le travail à la déformation maximale

Les valeurs du travail à la déformation maximale W diminuent significativement dans les modèles fromagers avec NaCl ajouté ($p < 0,001$), comparativement aux versions sans NaCl ajouté (Figure 23). Ceci signifie que les matrices avec NaCl sont moins résistantes. Ces résultats sont en accord avec une étude ayant mis en évidence une réduction de la fermeté de modèles fromagers quand la concentration en NaCl était plus importante (Floury *et al.*, 2009b). Cette diminution de résistance suite à l'ajout de NaCl pourrait s'expliquer par une plus grande proportion d'ions Na^+ pouvant être liés aux caséines. En effet, une plus grande liaison des ions Na^+ par les caséines conduit à une meilleure hydratation de ces protéines (Hardy & Steinberg, 1984). Ainsi, la plus grande capacité d'hydratation des caséines pourrait expliquer la diminution de résistance observée pour les versions avec NaCl ajouté.

iii. Cas particulier du modèle fromager L28P20s

Parmi les six modèles fromagers, celui avec le ratio L/P et la teneur en sodium les plus élevés (modèle L28P20s) présente la plus faible valeur de résistance mécanique. De plus, il a été le seul à se fracturer sous les conditions de compression appliquées. L'absence de fracturation pour les autres modèles fromagers est due à la structuration des modèles fromagers après leur fabrication. En effet, le processus de fabrication (et notamment le refroidissement rapide après fabrication) ne permet pas la formation d'un réel réseau protéique.

Plusieurs heures à haute température (et la présence d'un précurseur) auraient été nécessaires pour la formation d'un véritable réseau protéique. Dans le cas des modèles fromagers, il s'agit plutôt d'un système composé de deux phases en mélange : une phase lipidique et une phase protéique. Les caséines, dont les micelles ont été déstructurées sous l'action des sels de fonte, sont agrégées et non en réseau. Ainsi, lors de la compression, les phases se déforment/"bougent" entre elles. La fracture ne se produit pas. L'observation de la microstructure des modèles fromagers, décrite ultérieurement, apportera des éléments de compréhension quant à la présence de fracture du modèle L28P20s.

b. Module de déformabilité (MD)

i. Effet du ratio L/P sur le module de déformabilité

L'ANOVA réalisée sur les valeurs du module de déformabilité (*MD*) montre un effet significatif du ratio L/P ($p < 0,001$) : les valeurs de *MD* augmentent quand le ratio L/P diminue (Figure 23). Ces résultats sont en accord avec ceux de précédents travaux réalisés sur des matrices lipoprotéiques (Lawrence *et al.*, 2012). L'augmentation de *MD* signifie que l'élasticité rhéologique diminue. Par élasticité rhéologique, il est entendu « la tendance d'un corps à retrouver sa forme et ses dimensions initiales, lorsque toute contrainte est ôtée » (FIL-268, 1991). Ainsi, les modèles fromagers possédant le ratio L/P le plus faible (20/28) apparaissent comme étant les moins élastiques (*MD* plus élevé), alors que le modèle L28P20 apparaît comme étant le plus élastique. Les trois autres modèles présentent une élasticité intermédiaire. Ceci peut s'expliquer par le fait que la matière grasse forme des inclusions élastiques dans la phase protéique, conférant à la matrice ses propriétés rhéologiques (Marshall, 1990).

ii. Effet de la teneur en NaCl sur le module de déformabilité

L'effet du NaCl sur les valeurs de *MD* n'est significatif que pour les modèles fromagers dont le ratio L/P est égal à 28/20 ($p = 0,046$) : les valeurs de *MD* augmentent suite à l'ajout de NaCl (Figure 23). Par ailleurs, on peut remarquer que la plus faible résistance du modèle fromager L28P20s n'est pas associée à la plus faible valeur du module de déformabilité. La fracture de cet échantillon ne s'explique pas par une déformabilité différente.

Les mesures rhéologiques du travail à la déformation maximale et du module de déformabilité nous ont permis de caractériser la résistance et l'élasticité des produits mais, afin de mieux comprendre les causes des différences rhéologiques observées, la microstructure des modèles fromagers a été observée. En effet, la texture du fromage est l'expression macroscopique de la structure de la matrice du fromage, c'est-à-dire de sa composition et de son organisation (Guinee & Fox, 2004a).

5. Caractérisation de la microstructure des modèles fromagers par microscopie confocale à balayage laser

L'observation de la microstructure des modèles fromagers, par microscopie confocale à balayage laser, montre que les gouttelettes lipidiques sont distribuées de manière homogène dans la phase protéique (Figure 24).

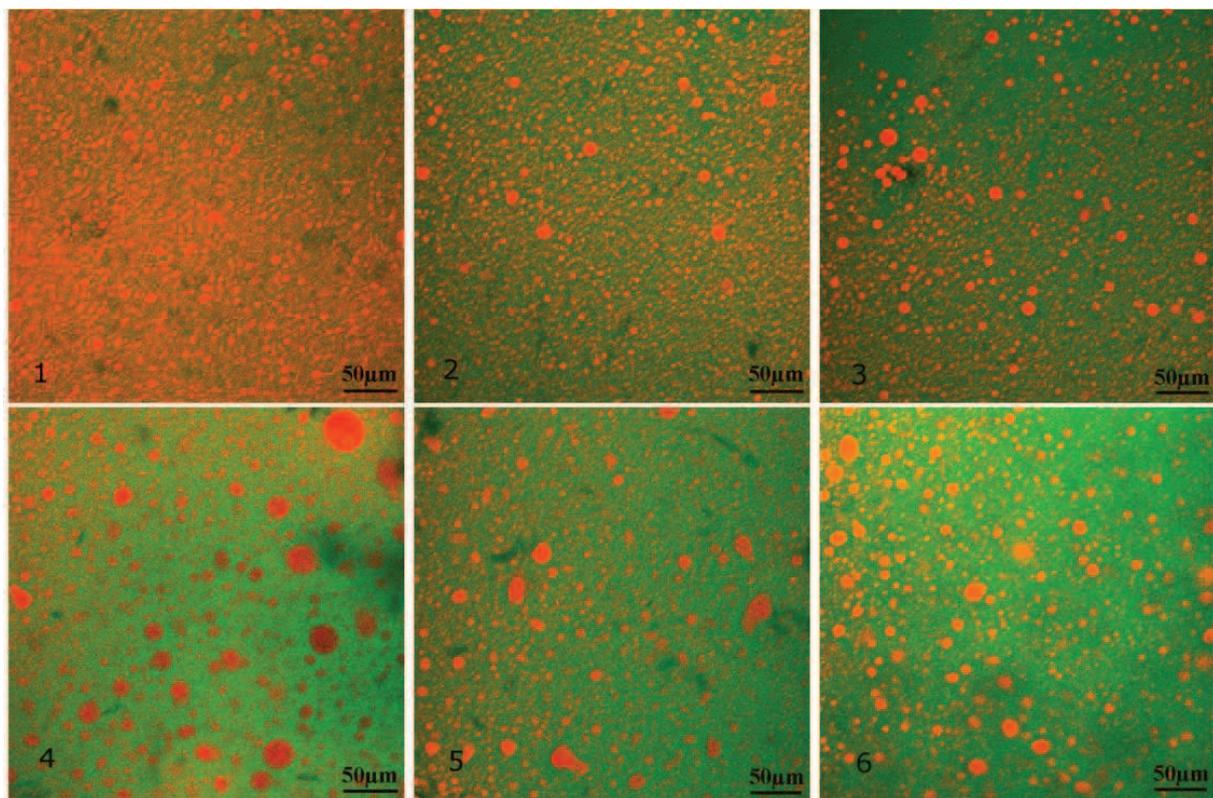


Figure 24 : Observations de la microstructure des six modèles fromagers (microscopie confocale à balayage laser).

Les clichés 1, 2, et 3 correspondent aux modèles L28P20, L24P24 et L20P28 (versions sans NaCl ajouté). Les clichés 4, 5, et 6 correspondent aux modèles L28P20s, L24P24s et L20P28s (versions avec NaCl ajouté).

L'homogénéité des modèles fromagers est un paramètre important car elle rend ensuite possible l'étude de la mobilité du sodium et des composés d'arôme dans un environnement homogène. Cette homogénéité découle des conditions de fabrication qui ont été optimisées, et notamment des conditions de température. A partir de 70-75°C, une pâte lisse et homogène peut, en effet, être obtenue (Mulsow *et al.*, 2007).

a. Effet du ratio L/P sur la microstructure

L'effet du ratio L/P sur la microstructure peut être observé sur les clichés de la Figure 24 : il y a moins de gouttelettes lipidiques lorsque le ratio L/P diminue, ce qui est cohérent avec la diminution de la teneur en matière grasse. De plus amples informations sur l'effet du ratio L/P seront données suite à l'analyse d'images sur les clichés de microscopie (paragraphe 6 ci-après).

b. Effet de la teneur en NaCl sur la microstructure

Quel que soit le ratio L/P, les modèles fromagers sans NaCl ajouté présentent des gouttelettes lipidiques plus petites (taille de 5 µm environ) que les modèles avec du NaCl ajouté (taille de 6-10 µm environ). Ces résultats confirment des travaux précédents ayant montré une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques dans des fromages frais suite à l'augmentation de la teneur en sel (Wendin *et al.*, 2000).

La plus petite taille des gouttelettes observée dans les modèles fromagers sans NaCl ajouté peut expliquer leur plus forte résistance mécanique. En effet, des gouttelettes lipidiques de petite taille, distribuées uniformément dans la phase protéique, procurent une plus grande résistance aux forces appliquées, que l'on peut attribuer à une augmentation des interactions protéine-protéine et protéine-matière grasse (Pereira *et al.*, 2001). A l'inverse, une augmentation de la teneur en matière grasse provoque plus de zones de rupture de la matrice protéique. Ceci réduit les interactions protéines-protéines et confère ainsi au fromage un caractère plus mou (Everett, 2007 ; McMahon *et al.*, 1999).

c. Cas particulier du modèle fromager L28P20s

La fracture au test de compression uniaxiale, qui s'est uniquement produite pour le produit L28P20s serait expliquée par la taille importante des gouttelettes lipidiques. En effet, de plus grosses gouttelettes lipidiques provoquent une plus grande perturbation dans la continuité de la phase protéique (Lopez *et al.*, 2008). Elles constituent des points de faiblesse de la matrice, qui ont pu conduire à la fracture de celle-ci. Lors de la fracture, la matière grasse est libérée hors de la matrice et agit tel un lubrifiant (Marshall, 1990).

6. *Analyse d'images des clichés de microscopie confocale*

L'analyse d'images effectuée sur les clichés de microscopie permet d'affiner les observations des clichés, en apportant des données chiffrées. Elle permet de déterminer le pourcentage de surface occupée par les lipides sur les clichés, la taille moyenne des gouttelettes lipidiques et leur indice de circularité. Les résultats obtenus pour ces trois paramètres sont successivement présentés.

a. Pourcentage de surface occupée par les lipides dans les micrographes

Le pourcentage de surface occupée par les lipides dans le micrographe est donné pour chaque modèle fromager sur la Figure 25. Ce pourcentage représente la surface occupée par les gouttelettes lipidiques, comparativement à la surface totale du cliché.

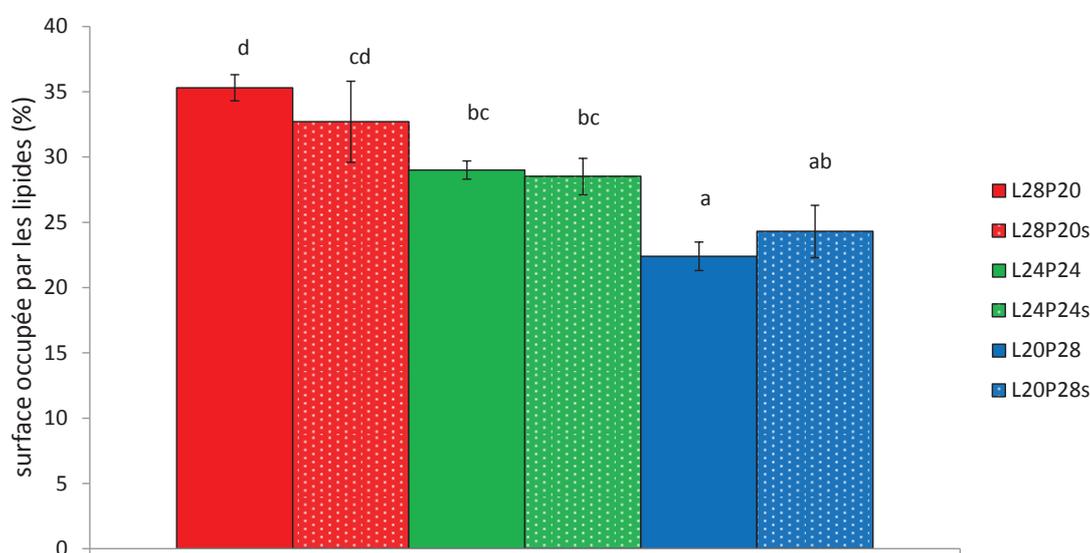


Figure 25 : Surface occupée par les lipides, obtenue par analyse d'images des clichés des six modèles fromagers

^{a-d} : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

i. Effet du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur le pourcentage de surface occupé par les lipides

Un effet significatif du ratio L/P a été observé sur le pourcentage de surface occupée par les lipides ($p < 0,001$) : ce pourcentage diminue logiquement lorsque le ratio L/P diminue (Figure 25). Pour un ratio L/P identique, aucune différence significative n'a été observée entre les versions sans ou avec NaCl ajouté. Cela est cohérent, puisque les quantités de lipides sont les mêmes pour un même ratio L/P, quelle que soit la quantité de NaCl.

Les valeurs de pourcentage de lipides trouvées par analyse d'images sont légèrement supérieures aux pourcentages de lipides incorporés pendant la fabrication. Les valeurs trouvées sont respectivement de 35,3 % et 32,7 % pour L28P20 et L28P20s, au lieu de 28 % ; respectivement de 29 % et 28,5 % pour L24P24 et L24P24s, au lieu de 24 % ; et respectivement de 22,4 % et 24,3 % pour L20P28 et L20P28s, au lieu de 20 %. La légère surestimation du pourcentage de lipides par analyse d'images pourrait avoir plusieurs causes telles que le biais potentiel et les effets de bords lors des traitements d'images successifs, la légère fonte des gouttelettes lipidiques sous la chaleur du laser lors des observations (malgré un soin particulier apporté sur ce point et la réalisation rapide des clichés), ou la diminution de fluorescence de l'acridine orange, qui entraînerait une sous-estimation de la fraction protéique et donc une surestimation de la fraction lipidique. En effet, une exposition prolongée à la lumière du laser peut parfois conduire à un phénomène de disparition/blanchiment du colorant fluorescent, affectant ensuite les mesures quantitatives par exemple (Aguilera & Stanley, 1999).

Cependant, les valeurs de pourcentages de lipides (réelles et calculées) restent dans des gammes très proches. Ainsi, l'analyse d'images fournit une information pertinente et une méthode rapide pour approcher la teneur en matière grasse de produits alimentaires. Ce type de constatation a déjà été effectué sur des muscles de bœuf (Kuchida *et al.*, 2000), ou sur des filets de saumon (Stien *et al.*, 2007).

b. Taille moyenne des gouttelettes lipidiques

La taille moyenne des gouttelettes lipidiques est donnée pour chacun des six modèles fromagers sur la Figure 26.

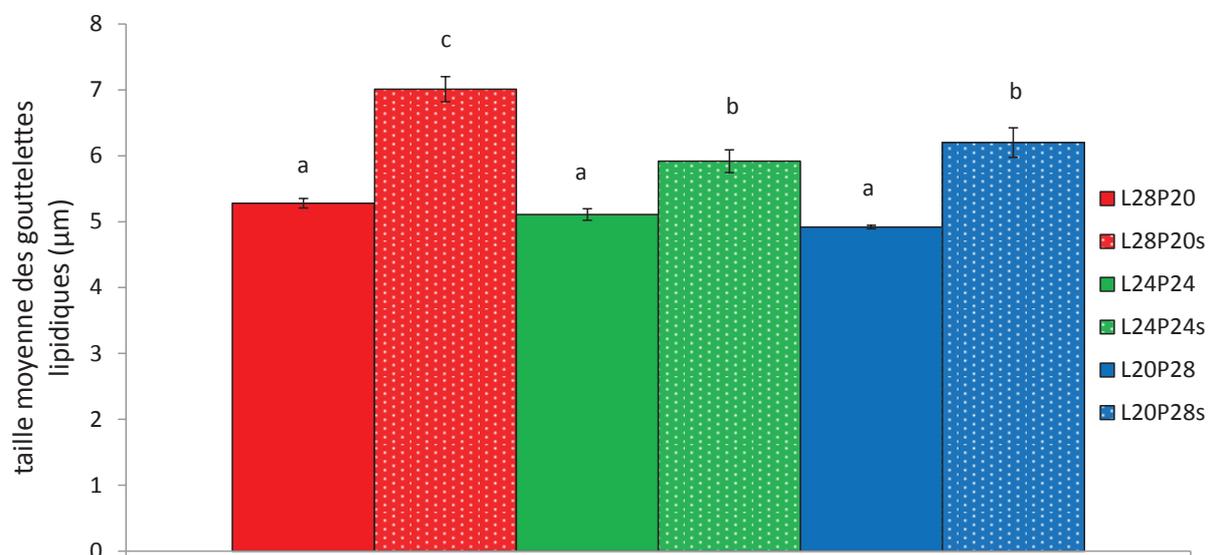


Figure 26 : Taille moyenne des gouttelettes lipidiques, obtenue par analyse d'images des clichés des modèles fromagers

^{a-c} : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

i. Effet du ratio L/P sur la taille moyenne des gouttelettes lipidiques

L'effet du ratio L/P sur la taille moyenne des gouttelettes lipidiques est seulement significatif ($p < 0,001$) pour les trois modèles fromagers avec NaCl ajouté, avec des gouttelettes significativement plus grosses pour le modèle fromager L28P20s que pour les modèles fromagers L24P24s et L20P28s (Figure 26). De plus grosses gouttelettes lipidiques ont également été trouvées dans des spécialités fromagères ou des cheddars plus riches en matière grasse (Auty *et al.*, 1999 ; Wendin *et al.*, 2000). L'agrégation des globules gras pour des teneurs en matière grasse plus élevées pourrait être due au cisaillement pendant la fabrication.

ii. Effet de la teneur en NaCl sur la taille moyenne des gouttelettes lipidiques

Les résultats concernant la taille moyenne des gouttelettes lipidiques montrent un effet significatif de l'ajout de NaCl ($p < 0,001$) (Figure 26). Les modèles fromagers sans NaCl présentent des gouttelettes lipidiques d'une taille significativement plus petite que les modèles fromagers avec NaCl ajouté. L'effet du NaCl sur la taille de gouttelettes lipidiques a

également été observé sur des émulsions à base de gélatine (Rougier, 2006). Cet effet de l'ajout de NaCl sur la taille des gouttelettes peut s'expliquer par la liaison des ions Na^+ aux caséines. En effet, la plus grande présence d'ions Na^+ conduit à une plus grande hydratation des protéines (Hardy & Steinberg, 1984). Ainsi, il se peut que de plus grands espaces soient disponibles au sein de cette matrice hydratée pour l'inclusion de gouttelettes lipidiques. Les gouttelettes lipidiques seraient donc de plus grande taille. Ce résultat pourrait expliquer la baisse de la résistance mécanique pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté. De plus grosses gouttelettes lipidiques conduisent à une structure moins organisée et donc à une matrice moins résistante (Pavia *et al.*, 1999).

L'analyse d'images permet d'estimer précisément la taille des gouttelettes, contrairement à la simple observation des clichés de microscopie confocale. Les modèles fromagers non salés présentent des gouttelettes lipidiques dont la taille moyenne est de $5,1 \mu\text{m}$; les modèles salés L24P24s et L20P28s présentent des gouttelettes de $6,1 \mu\text{m}$; et le modèle L28P20s possède, quant à lui, des gouttelettes dont la taille moyenne est de $7,0 \mu\text{m}$.

c. Indice de circularité des gouttelettes lipidiques

Les indices de circularité des gouttelettes lipidiques des six modèles fromagers sont présentés sur la Figure 27.

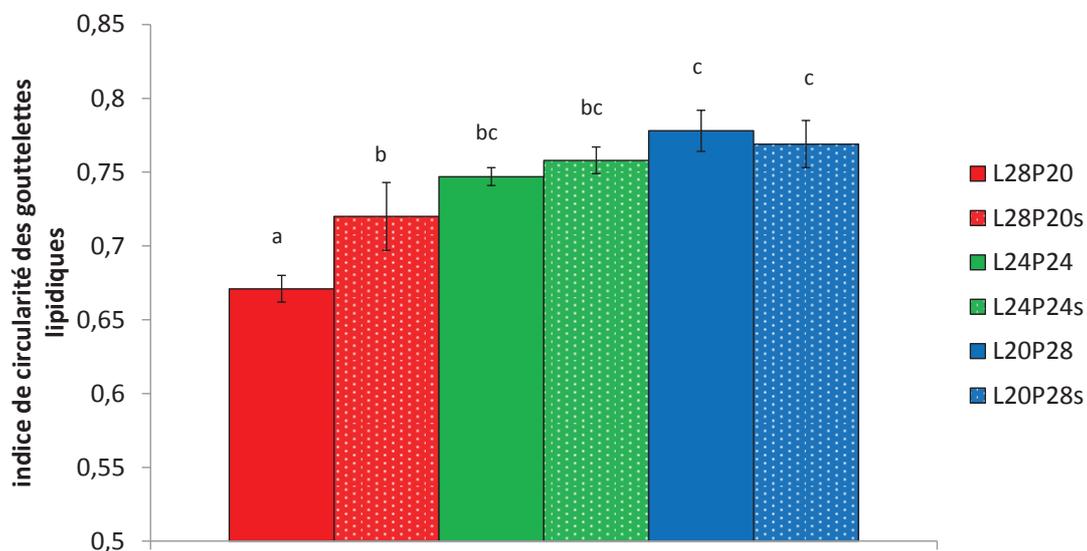


Figure 27 : Indice de circularité des gouttelettes lipidiques, obtenu par analyse d'images des clichés des modèles fromagers

^{a-c} : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

i. Effet du ratio L/P sur l'indice de circularité des gouttelettes lipidiques

Un effet significatif du ratio L/P sur la circularité a été observé ($p < 0,001$) : les valeurs de l'indice de circularité augmentent lorsque le ratio L/P diminue. Dans ce sens, Everett & Olson (2003) ont montré que de petites surfaces de lipides étaient plus circulaires que de grandes surfaces, indiquant que les surfaces plus grandes provenaient soit de groupes de gouttelettes, soit de « pool » de lipides libres. Ainsi, quand le ratio L/P diminue, l'augmentation de circularité des gouttelettes et la petite taille de celles-ci conduisent à une plus grande organisation de la matrice et contribuent ainsi à une plus grande résistance mécanique.

ii. Effet de la teneur en NaCl sur la circularité des gouttelettes lipidiques

L'indice de circularité des gouttelettes lipidiques n'est affecté par l'ajout de NaCl que dans le cas des modèles fromagers ayant le ratio L/P égal à 28/20 (Figure 27). Dans ce cas, l'indice de circularité augmente significativement pour la version avec NaCl ajouté ($p < 0,001$). L'augmentation de circularité pour le ratio L/P égal à 28/20 est également associée à la plus grande différence de taille de gouttelettes entre le modèle fromager sans NaCl (L28P20) et celui avec NaCl ajouté (L28P20s). Pour ce ratio, les gouttelettes plus grosses seraient les plus circulaires, montrant l'impact de la teneur en NaCl sur la taille et sur la forme des gouttelettes lipidiques.

Les effets de la composition (ratio L/P et teneur en NaCl) sur tous les paramètres de rhéologie et de microstructure sont résumés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur les paramètres de rhéologie et de microstructure

Expérience	Paramètres	↘ ratio L/P	↗ teneur en NaCl
Rhéologie	W (résistance)	↗	↘
	σ (contrainte)	↗	↘
	MD (\Leftrightarrow 1/élasticité rhéologique)	↗	↗ (seulement pour 28/20)
Microstructure : analyse d'images	Pourcentage de lipides	↘	NS
	Taille des gouttelettes	↘ (seulement pour versions salées)	↗
	Indice de circularité	↗	↗ (seulement pour 28/20)

En résumé, ce tableau montre que la diminution du ratio L/P conduit à une augmentation des paramètres rhéologiques (résistance, contrainte, déformabilité), associée à des gouttelettes plus circulaires et globalement plus petites. Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en NaCl conduit à une diminution de la résistance et de la contrainte des modèles fromagers, alors que la déformabilité est plus importante. De plus, l'ajout de NaCl dans les formules provoque une augmentation de taille des gouttelettes et une augmentation de circularité.

Après avoir caractérisé la structure et les propriétés rhéologiques des modèles fromagers, nous avons étudié l'impact de ces paramètres et de la composition des modèles fromagers sur la libération du sodium et des composés d'arôme dans différentes conditions.

II. Etude de la mobilité et de la libération du sodium

Dans un premier temps, la mobilité du sodium a été étudiée au niveau moléculaire, afin de mieux comprendre les interactions pouvant avoir lieu entre les ions sodium et leur environnement, à savoir les modèles fromagers. Ensuite, la libération de ces ions dans une phase aqueuse (eau et salive) a été étudiée.

1. Niveau moléculaire : Etude du sodium par RMN

Deux populations d'ions sodium ont été étudiées : une population globale qui correspond au sodium total, et une population d'ions présentant un mouvement restreint qui correspond au sodium lié. Les résultats ont été obtenus d'après les méthodes préalablement décrites dans cette thèse, et expliquées plus en détail dans les thèses de Mouaddab (2008) et Gobet (2008).

a. Quantification du sodium

i. Quantification du sodium total

Le Tableau 17 présente les valeurs de concentrations en sodium obtenues par quantification en RMN, ainsi que les valeurs obtenues par dosage des cendres des modèles fromagers, que nous avons ajoutées pour rappel.

Tableau 17 : Quantification par RMN du sodium total des modèles fromagers

Modèles fromagers	[Na] (g/kg) (RMN)	[Na] (g/kg) (dosage)
L28P20	5,19 ± 0,17	6,57 ± 0,21
L28P20s	8,78 ± 0,42	10,54 ± 0,53
L24P24	5,15 ± 0,24	6,55 ± 0,08
L24P24s	8,88 ± 0,04	10,58 ± 0,39
L20P28	5,01 ± 0,03	6,61 ± 0,17
L20P28s	8,59 ± 0,26	10,62 ± 0,33

L'acquisition des signaux RMN a été effectuée avec le paramètre P_1 optimal, c'est-à-dire la valeur optimale de la durée d'impulsion $\pi/2$. On remarque qu'à cette valeur, les quantifications sont très répétables (Tableau 17). Les modèles fromagers avec NaCl ajouté possèdent des valeurs significativement supérieures ($p < 0,001$) aux modèles fromagers sans NaCl.

Néanmoins, les concentrations en sodium quantifiées par RMN sous-estiment les concentrations dosées dans les modèles fromagers.

Cette sous-estimation pourrait avoir deux causes : une masse volumique des échantillons inférieure à 1 kg.L^{-1} , ou une perte de sel par synérèse (Gobet, 2008). Or, dans notre cas, aucune des deux hypothèses ne convient car la densité des modèles fromagers n'est pas inférieure à 1 kg.L^{-1} et aucune synérèse n'a lieu, puisque c'est un critère que nous avons choisi dans la formulation des modèles fromagers.

Afin de s'assurer que les écarts de concentrations ne proviennent pas d'un biais de la sonde RMN (réponse non linéaire, écart de quantification), une courbe de calibration a été effectuée avec des solutions de NaCl de concentrations différentes (Figure 28).

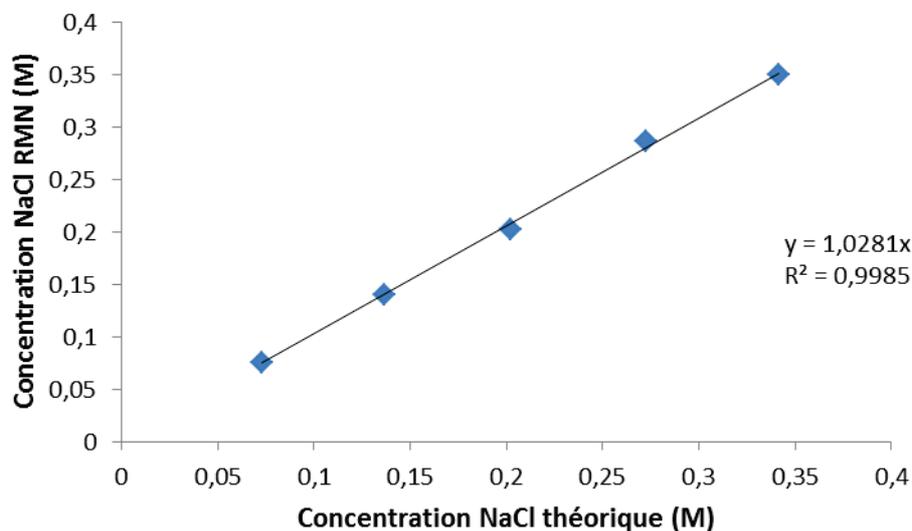


Figure 28 : Correspondances entre les concentrations en NaCl quantifiées par RMN et les concentrations en NaCl théoriques de cinq solutions de NaCl

La courbe de calibration atteste d'une linéarité de réponse de la sonde et d'une très bonne quantification du sodium dans des solutions aqueuses de NaCl.

Par la suite, des tests de quantification ont été effectués en modifiant la valeur de la durée d'impulsion P_1 . Une valeur de $P_1/4$ a été choisie car il a été montré que l'on obtenait un pulse non sélectif à des valeurs de P_1 inférieures ou égales à $P_1/4$ (Fenzke *et al.*, 1984). Les valeurs correspondantes de quantification de la concentration en sodium des trois modèles fromagers avec NaCl ajouté sont présentées dans le Tableau 18.

Tableau 18: Quantification par RMN du sodium total des modèles fromagers avec NaCl ajouté (durée d’impulsion : $P_1/4$)

Modèles fromagers	[Na] (g/kg)		
	répétition 1	répétition 2	moyenne
L28P20s	10,05	10,40	10,23
L24P24s	10,48	10,37	10,43
L20P28s	10,94	10,72	10,83

La diminution du P_1 a considérablement amélioré la quantification des ions sodium des modèles fromagers avec NaCl ajouté. En revanche, la quantification du sodium des modèles fromagers sans NaCl ajouté n’a pas pu être effectuée (données non montrées car inexploitable). En effet, pour une durée d’impulsion divisée par quatre, les spectres des modèles fromagers sans NaCl étaient peu intenses et le bruit de fond était proportionnellement très important.

La meilleure quantification du sodium suite à la diminution du paramètre P_1 pourrait s’expliquer par le fait que des interactions quadripolaires existent entre les protéines et les ions Na^+ , ne permettant pas une quantification absolue pour les expériences effectuées avec le paramètre P_1 . Néanmoins, cette hypothèse reste difficile à valider. Une augmentation du nombre de scans, lors de l’acquisition, améliorerait le rapport signal/bruit, ce qui pourrait améliorer la quantification du sodium.

ii. Quantification relative du sodium lié

Après avoir quantifié le sodium total des modèles fromagers, nous nous sommes intéressés à la quantification du sodium lié. La quantification relative du sodium lié correspond au ratio des intégrales (aires) des signaux du sodium lié (signal DQF) et du sodium total (signal SQ), calculées par divers traitements mathématiques successifs (Gobet, 2008). Ce ratio est donc le suivant : A_{DQ}/A_{SQ} . Il est présenté pour chacun des six modèles fromagers dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Quantification relative du sodium lié par étude du ratio des aires DQ et SQ des signaux RMN : A_{DQ}/A_{SQ} (sodium lié/sodium total)

Modèles fromagers	A_{DQ}/A_{SQ} (%)
L28P20	18,39 ± 0,42 <i>a</i>
L28P20s	18,16 ± 0,08 <i>a</i>
L24P24	18,23 ± 0,96 <i>a</i>
L24P24s	18,45 ± 0,33 <i>a</i>
L20P28	18,41 ± 0,63 <i>a</i>
L20P28s	18,28 ± 0,03 <i>a</i>

a : les valeurs comportant la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

Aucune différence significative n'a été trouvée concernant les ratios A_{DQ}/A_{SQ} des six modèles fromagers. Ce résultat signifie que ni le ratio L/P, ni la teneur en NaCl n'affectent le ratio sodium lié/sodium total. La moyenne du ratio pour tous les modèles fromagers est de 18,32 %. Ce pourcentage se trouve dans la même gamme que de précédents pourcentages trouvés sur des matrices lipoprotéiques, avec des valeurs comprises entre 12,8 % et 21,4 % (Gobet, 2008). Par ailleurs, l'absence de variation du ratio sodium lié/sodium total dans notre cas pourrait s'expliquer par un extrait sec constant entre les modèles fromagers (52,9 %). En effet, Gobet (2008) a trouvé une augmentation du ratio A_{DQ}/A_{SQ} lorsque l'extrait sec de fromages réels augmentait.

iii. Quantification absolue du sodium lié

La quantification relative du sodium lié a été complétée par une quantification absolue, dont les résultats sont présentés sur la Figure 29.

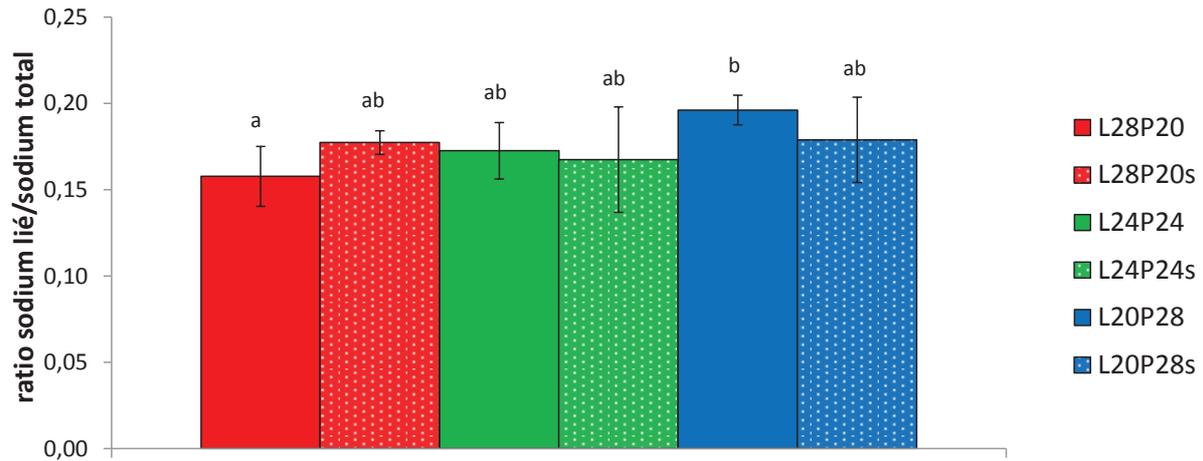


Figure 29 : Ratio sodium lié / sodium total obtenu par quantification absolue du sodium lié

^{a-b} : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

La quantification absolue du sodium lié montre que la surface de pic correspondant aux ions sodium liés représentait entre 16 % et 20 % de la surface de pic correspondant aux ions sodium totaux dans les modèles fromagers. Ces proportions sont proches de celles obtenues par le calcul du ratio A_{DQ}/A_{SQ} . De plus, la quantification absolue du sodium lié apporte un complément d'information car elle permet de distinguer deux des modèles fromagers parmi les six. En effet, les modèles fromagers L28P20 et L20P28 présentent des proportions significativement différentes de sodium lié (respectivement 16 % et 20 %), alors qu'aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant les ratios des autres modèles fromagers. La différence mise ici en évidence entre les deux modèles fromagers L28P20 et L20P28 suggère qu'il y aurait plus de sodium lié lorsque le ratio L/P diminue. De plus, la quantification absolue des ions sodium liés confirme l'ordre de grandeur de 18 % obtenu par quantification relative.

Cependant, la correspondance entre quantification relative et quantification absolue n'a pas toujours lieu (Mouaddab *et al.*, 2007). Sur des résines échangeuses d'ions, un ratio A_{DQ}/A_{SQ} de 0,022 avait été trouvé, ce qui représentait une proportion de 2,2 % de sodium lié. Or, ce ratio ne reflétait pas la réalité puisque sur le support étudié (résine échangeuse d'ions), la fraction de sodium lié devait être de 100 %. Dans le cas de cette étude, l'absence de

correspondance a été expliquée par une grande hétérogénéité de champ (480 s^{-1}). En effet, la forte valeur de l'hétérogénéité de champ conduit à une forte diminution de l'amplitude du signal DQ. Dans notre cas, l'hétérogénéité de champ a été calculée à partir des temps de relaxation transversale de la référence et a été trouvée plus de 10 fois plus faible (35 s^{-1}), ce qui pourrait expliquer la bonne correspondance entre les deux types de quantifications.

b. Etude de la mobilité du sodium

i. Etude de la mobilité du sodium total

La mobilité des ions sodium est déduite de l'étude des temps de relaxation obtenus par RMN. Le Tableau 20 montre que le temps de relaxation longitudinale du signal SQ (T_1), ainsi que la composante 'slow' du temps de relaxation transversale du signal SQ (T_{2s}^{SQ}), sont influencés significativement par la composition des modèles fromagers ($p < 0,001$), alors qu'aucun effet n'a été observé pour la composante 'fast' du temps de relaxation transversale du signal SQ (T_{2f}^{SQ}).

Tableau 20 : Temps de relaxation longitudinale (T_1), temps de relaxation transversale interne (T_{2s}^{SQ}) et externe (T_{2f}^{SQ}) du signal RMN SQ et pourcentages correspondants de populations (temps de répétition = 150 ms)

Signal SQ					
Modèles fromagers	T_1 (ms)	A (%)	T_{2s}^{SQ} (ms)	B (%)	T_{2f}^{SQ} (ms)
L28P20	10,64±0,17 <i>d</i>	32 ± 2	3,81±0,16 <i>c</i>	68 ± 2	1,17±0,10 <i>a</i>
L28P20s	11,93±0,18 <i>e</i>	29 ± 1	4,69±0,25 <i>d</i>	71 ± 1	1,18±0,11 <i>a</i>
L24P24	9,41±0,11 <i>b</i>	38 ± 0	3,01±0,07 <i>a</i>	62 ± 0	1,12±0,04 <i>a</i>
L24P24s	10,73±0,20 <i>d</i>	29 ± 0	4,08±0,19 <i>c</i>	71 ± 0	1,19±0,08 <i>a</i>
L20P28	8,49±0,22 <i>a</i>	40 ± 4	2,77±0,13 <i>a</i>	60 ± 4	1,08±0,08 <i>a</i>
L20P28s	9,71±0,04 <i>c</i>	31 ± 1	3,49±0,13 <i>b</i>	68 ± 1	1,10±0,03 <i>a</i>

a-e : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

- Effet du ratio L/P sur la mobilité du sodium total

Pour une même teneur en NaCl, les temps de relaxation T_1 et T_{2s}^{SQ} diminuent significativement ($p < 0,001$) lorsque le ratio L/P augmente (Tableau 20). Ceci suggère que les ions sodium (population totale) sont moins mobiles quand la teneur en protéines augmente et/ou quand la teneur en lipides diminue. Néanmoins, la présente étude ne permet pas de distinguer si l'effet du ratio L/P sur la mobilité des ions sodium est dû à une diminution de la teneur en lipides, ou à une augmentation de la teneur en protéines. En revanche, nos observations rejoignent celles obtenues sur des fromages réels, montrant que la matière grasse limitait moins la mobilité globale des ions Na^+ que ne le faisaient les protéines (Gobet, 2008). Néanmoins ces observations étaient également associées à des variations de l'extrait sec. Si l'on considère ces derniers résultats pour une teneur en eau fixée, les ions sodium sont plus mobiles dans les fromages avec un taux Gras/Sec plus élevé, ce qui rejoint nos résultats.

- Effet de la teneur en NaCl sur la mobilité du sodium total

Pour un même ratio L/P, T_1 et T_{2s}^{SQ} sont significativement influencés par la teneur en NaCl ($p < 0,001$), avec des valeurs significativement plus élevées pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté (Tableau 20). Ceci signifie que les ions sodium sont plus mobiles dans les modèles fromagers avec NaCl que dans ceux sans NaCl ajouté. Gobet (2008) trouvait un effet inverse de l'ajout de NaCl sur les temps de relaxation dans des fromages réels car, dans leur cas, une augmentation de la teneur en NaCl conduisait à une diminution de la teneur en eau et à une augmentation de la viscosité. Ceci est un mécanisme propre au mode de fabrication des fromages réels, avec une phase de salage dans un bain de saumure. Dans notre cas, la teneur en eau est constante et l'augmentation de la teneur en NaCl conduit à une moindre résistance des modèles fromagers, probablement du fait de son action sur l'hydratation des caséines (Gál & Bányai, 1971 ; Hardy & Steinberg, 1984). Ce ne serait donc pas véritablement la concentration en NaCl qui influencerait sa mobilité, mais plutôt l'effet du NaCl sur la structure de la matrice.

Ici encore, la mobilité des ions peut être liée aux différences de microstructure des modèles fromagers avec NaCl : les gouttelettes lipidiques y sont plus grosses et donc moins nombreuses. La tortuosité de la phase protéique est peut-être moins importante, ce qui expliquerait la plus grande mobilité des ions sodium. Les modèles fromagers avec NaCl

ajouté sont ceux qui présentent une résistance moindre (à ratio L/P égal). De plus grosses gouttelettes lipidiques et une phase protéique plus lâche contribuent à cette plus faible résistance et à une plus grande mobilité des ions sodium. Cet effet est particulièrement visible pour le modèle L28P20s qui fut le seul à se fracturer lors du test de compression et qui possède les temps de relaxation du sodium les plus élevés. Là encore, aucun effet n'a été observé sur les valeurs de T_{2f}^{SQ} .

Par ailleurs, on peut voir que les proportions théoriques de sodium (60 % de transition externe et 40 % de transition interne) ne sont pas exactement retrouvées, mais restent du même ordre de grandeur que la théorie. On peut également observer que les valeurs de T_1 sont toujours supérieures aux valeurs de T_2 . Ceci est cohérent puisque nous sommes dans un milieu solide, donc dans un système où les mouvements sont très lents. A l'inverse, dans un milieu peu visqueux, les mouvements moléculaires sont rapides et T_1 est égal à T_2 (Gobet, 2008).

La mobilité des ions sodium totaux peut être mise en regard de la microstructure et de la texture des modèles fromagers. En ce sens, une matrice des corrélations a été établie entre ces paramètres (Tableau 21).

Tableau 21 : Matrice des corrélations entre T_1 , T_{2s}^{SQ} , les paramètres de microstructure et les paramètres de rhéologie.

Les valeurs en gras correspondent à des corrélations significatives ($p < 0,05$).

	T_1	T_{2s}^{SQ}	pourcentage de lipides	taille des gouttelettes	indice de circularité	W	MD
T1	1	0,97	0,76	0,78	-0,59	-0,91	-0,53
T2s-SQ	0,97	1	0,64	0,83	-0,47	-0,83	-0,45
pourcentage de lipides	0,76	0,64	1	0,26	-0,94	-0,90	-0,80
taille des gouttelettes	0,78	0,83	0,26	1	-0,09	-0,58	0,03
indice de circularité	-0,59	-0,47	-0,94	-0,09	1	0,75	0,78
W	-0,91	-0,83	-0,90	-0,58	0,75	1	0,71
MD	-0,53	-0,45	-0,80	0,03	0,78	0,71	1

La matrice indique de fortes corrélations (négatives et positives) entre les paramètres RMN et les paramètres de microstructure/rhéologie. Toutes les valeurs de coefficients de corrélations entre ces paramètres sont supérieures à 0,64 (ou inférieures à -0,64) lorsque les corrélations sont significatives. La mobilité des ions sodium totaux est donc fortement associée aux modèles fromagers à plus forte teneur en lipides, présentant des gouttelettes lipidiques plus grosses, et une moindre résistance.

ii. Etude de la mobilité du sodium lié

• **Etude des temps de relaxation du sodium lié**

Les signaux DQF des expériences RMN mettent en évidence la présence d'une fraction d'ions sodium liés, tels qu'ont pu l'observer Mouaddab *et al.* (2007) sur des résines échangeuses d'ions, ou Gobet *et al.* (2009b) sur des gels de iota-carraghénanes. Les ions sodium liés sont dénommés ainsi puisqu'ils sont dans un environnement spécifiquement plus ordonné que les autres ions sodium, et ils présentent une moindre mobilité (Gobet, 2008 ; Mouaddab, 2008). Les temps de relaxation transversale (composante 'fast' et composante 'slow'), ainsi que le temps de création du signal DQF sont donnés dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Temps de relaxation transversale interne (T_{2s}^{DQ}) et externe (T_{2f}^{DQ}) du signal DQF obtenus par RMN du sodium sur les six modèles fromagers

modèles fromagers	Signal DQF	
	T_{2s}^{DQ} (ms)	T_{2f}^{DQ} (ms)
L28P20	9,47±0,11 <i>d</i>	0,36±0,01 <i>b</i>
L28P20s	9,90±0,06 <i>e</i>	0,44±0,02 <i>d</i>
L24P24	8,45±0,05 <i>b</i>	0,28±0,01 <i>a</i>
L24P24s	8,98±0,16 <i>c</i>	0,40±0,03 <i>c</i>
L20P28	7,53±0,21 <i>a</i>	0,26±0,02 <i>a</i>
L20P28s	8,30±0,08 <i>b</i>	0,34±0,01 <i>b</i>

a-e : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

Les temps de relaxation transversale interne (T_{2s}^{DQ}) et externe (T_{2f}^{DQ}) du signal DQF suivent la même évolution que le temps de relaxation transversale interne du signal SQ (T_{2s}^{SQ}). Pour une même teneur en sodium, les temps de relaxation diminuent significativement quand le ratio L/P diminue ($p < 0,001$) (Tableau 22). De plus, pour un même ratio L/P, ces temps de relaxation augmentent significativement quand la teneur en sodium augmente. Ceci signifie que les ions Na^+ liés sont plus mobiles lorsque le ratio L/P et la teneur en NaCl augmentent, tout comme l'étaient les ions Na^+ totaux. De plus, le modèle fromager le moins résistant rhéologiquement (L28P20s) présente la plus grande mobilité des ions sodium liés (plus grandes valeurs de T_{2s}^{DQ} et T_{2f}^{DQ}).

- **Etude du temps de création du sodium lié**

Les valeurs du temps de création du signal DQF sont données dans le Tableau 23 pour les six modèles fromagers.

Tableau 23 : Temps de création du signal DQF (τ^{opt}) obtenu par RMN du sodium sur les six modèles fromagers

Signal DQF	
modèles fromagers	τ^{opt} (ms)
L28P20	1,21±0,02 <i>c</i>
L28P20s	1,43±0,05 <i>e</i>
L24P24	0,99±0,02 <i>b</i>
L24P24s	1,31±0,07 <i>d</i>
L20P28	0,90±0,06 <i>a</i>
L20P28s	1,14±0,04 <i>c</i>

a-e : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

Le temps de création du sodium lié suit la même évolution que les temps de relaxation transversale du sodium lié. Les valeurs diminuent significativement avec le ratio L/P ($p < 0,001$) et augmentent significativement quand la teneur en sodium augmente ($p < 0,001$).

Ceci signifie que le système est plus ordonné aux alentours des ions sodium liés lorsque le ratio L/P diminue (augmentation de la teneur en protéines et/ou diminution de la teneur en lipides), ce qui confirme la moindre mobilité des ions sodium liés observée dans les modèles fromagers correspondants.

Les plus grandes valeurs de τ^{opt} pour les matrices avec NaCl ajouté montrent que l'ajout de NaCl conduit à un environnement moins organisé aux alentours des ions sodium liés. Ce phénomène pourrait corroborer la moindre résistance des modèles fromagers avec NaCl. Une bonne corrélation ($r = -0,81$) a été identifiée entre les valeurs de τ^{opt} et celles du travail W (résistance) : les matrices avec les temps de création les plus longs (système moins organisé autour des ions sodium liés) sont les matrices les moins résistantes rhéologiquement. De plus, la plus forte valeur de τ^{opt} correspond à la matrice la moins résistance (L28P20s). Il est donc intéressant de mettre en évidence le fait que le modèle fromager avec l'environnement le moins organisé autour des ions sodium liés est également le modèle fromager qui possède les gouttelettes lipidiques les plus grosses et la plus faible résistance.

Comme pour le sodium total, la mobilité des ions sodium liés peut être mise en regard de la microstructure et de la texture des modèles fromagers. En ce sens, une matrice des corrélations a été établie entre ces paramètres (Tableau 23bis).

Tableau 23bis : Matrice des corrélations entre τ^{opt} , T_{2s}^{DQ} , T_{2f}^{DQ} , les paramètres de microstructure et les paramètres de rhéologie.

Les valeurs en gras correspondent à des corrélations significatives ($p < 0,05$).

	τ^{opt}	T_{2s}^{DQ}	T_{2f}^{DQ}	pourcentage de lipides	taille des gouttelettes	indice de circularité	W	MD
τ^{opt}	1	0,89	0,99	0,63	0,81	-0,45	-0,81	-0,44
T_{2s}^{DQ}	0,89	1	0,85	0,90	0,63	-0,76	-0,96	-0,67
T_{2f}^{DQ}	0,99	0,85	1	0,57	0,83	-0,39	-0,77	-0,39

La matrice indique de fortes corrélations (négatives et positives) entre les paramètres RMN et les paramètres de microstructure/rhéologie. Toutes les valeurs de coefficients de corrélations entre ces paramètres sont supérieures à 0,57 (ou inférieures à -0,57) lorsque les corrélations sont significatives. La mobilité des ions sodium liés est donc fortement associée aux modèles fromagers à plus forte teneur en lipides, présentant des gouttelettes lipidiques plus grosses, et une moindre résistance.

Les évolutions des paramètres RMN sont résumées dans le Tableau 24, en fonction des variations de composition.

Tableau 24 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur les paramètres RMN

Expérience	Paramètres	↘ ratio L/P	↗ teneur en NaCl
RMN	<i>Temps de relaxation du Na total (sauf T_{2f}^{SQ}) (\Leftrightarrow mobilité)</i>	↘	↗
	<i>Temps de relaxation du Na lié (\Leftrightarrow mobilité)</i>	↘	↗
	<i>Temps de création du Na lié (\Leftrightarrow 1/système organisé)</i>	↘	↗
	<i>Ratio A_{DQ}/A_{SQ} (lié/total)</i>	pas d'effet	pas d'effet
	<i>Quantification absolue du sodium lié</i>	↗	pas d'effet

En résumé, ce tableau montre que la mobilité des ions sodium (totaux et liés) diminue lorsque le ratio L/P diminue, mais augmente avec l'ajout de NaCl.

Afin de voir si cette mobilité impact le comportement de libération du sodium, l'étude macroscopique de la libération du sodium dans différentes conditions a été effectuée.

2. Niveau macroscopique : libération et partage du sodium

a. Etude de la cinétique de libération des ions sodium (du modèle fromager vers la phase aqueuse)

Le suivi de la cinétique de libération des ions sodium a été réalisé à l'aide de deux sondes : une sonde sodium membranaire et une électrode spécifique des ions sodium. La sonde membranaire permet de suivre l'évolution de la libération des ions sodium au cours du temps, sans discontinuité. Les courbes de libération obtenues avec cette sonde sont présentées sur la Figure 30 (moyenne des six profils des modèles fromagers).

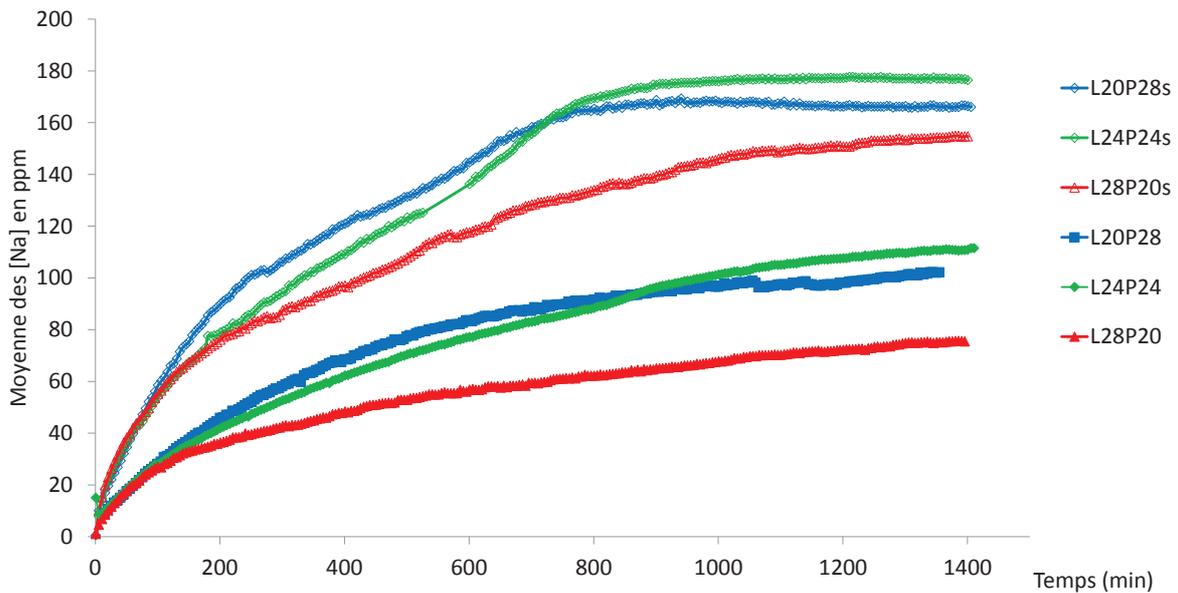


Figure 30 : Suivi de la cinétique de libération des ions sodium dans l'eau à l'aide de la sonde sodium membranaire

Les concentrations de sodium dans l'eau après équilibre sont reportées dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Concentrations finales de libération du sodium dans l'eau

Modèles fromagers	Concentration finales (ppm)
L28P20	75,4 ± 9,0 <i>a</i>
L28P20s	154,7 ± 12,3 <i>c</i>
L24P24	111,6 ± 8,8 <i>b</i>
L24P24s	176,1 ± 10,0 <i>c</i>
L20P28	102,2 ± 3,4 <i>b</i>
L20P28s	166,2 ± 7,2 <i>c</i>

a-c : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

Un effet significatif de la teneur en NaCl sur les concentrations finales en sodium a été trouvé (Tableau 25). L'effet du ratio L/P n'est significatif que pour les matrices sans NaCl ($p < 0,001$) avec une plus faible libération du sodium du modèle fromager L28P20. L'absence de différence entre les autres modèles fromagers s'explique par le fait que cette libération ait été suivie sous agitation de la phase aqueuse. En effet, après 24 heures, les modèles fromagers se sont dissous dans la phase aqueuse et les différences de formulations sont gommées. Pour la matrice L28P20, la moindre libération pourrait peut-être s'expliquer par des gouttelettes lipidiques très peu circulaires. La phase protéique serait donc, en contrepartie, plus tortueuse et moins régulière, entraînant plus d'obstacles pour la libération du sodium.

Bien que la sonde membranaire permette un suivi en continu de la libération du sodium, son inconvénient est qu'elle n'est pas très sensible aux faibles valeurs de concentrations en sodium et qu'elle ne permet donc pas d'avoir un résultat fiable de concentration en sodium au début de la libération. Or, il nous semble important de chercher à relier le début de la cinétique de libération avec la mobilité des ions sodium. Ainsi, une électrode spécifique aux ions sodium a été utilisée pour le suivi de la cinétique de libération durant les 7 premières heures de libération. Les courbes de libération obtenues avec cette électrode sont présentées sur la Figure 31.

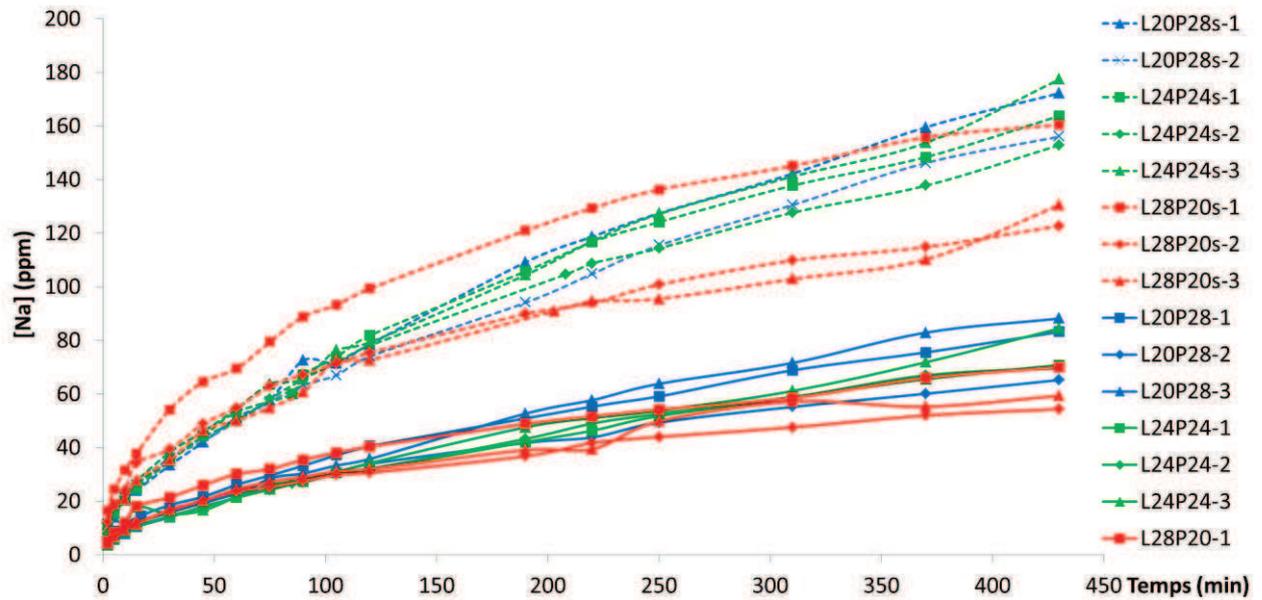


Figure 31 : Suivi de la cinétique de libération des ions sodium dans l'eau par prélèvements successifs et dosage des prélèvements

Les modèles fromagers restent relativement peu de temps en bouche durant la mastication, c'est pourquoi un intérêt particulier a été apporté à l'étude de la première phase des courbes de libération. Pour cette raison, les pentes des courbes de la libération du sodium ont été mesurées pour les trente premières minutes dans le but de déterminer les taux de libération du sodium. Les résultats sont présentés sur la Figure 32.

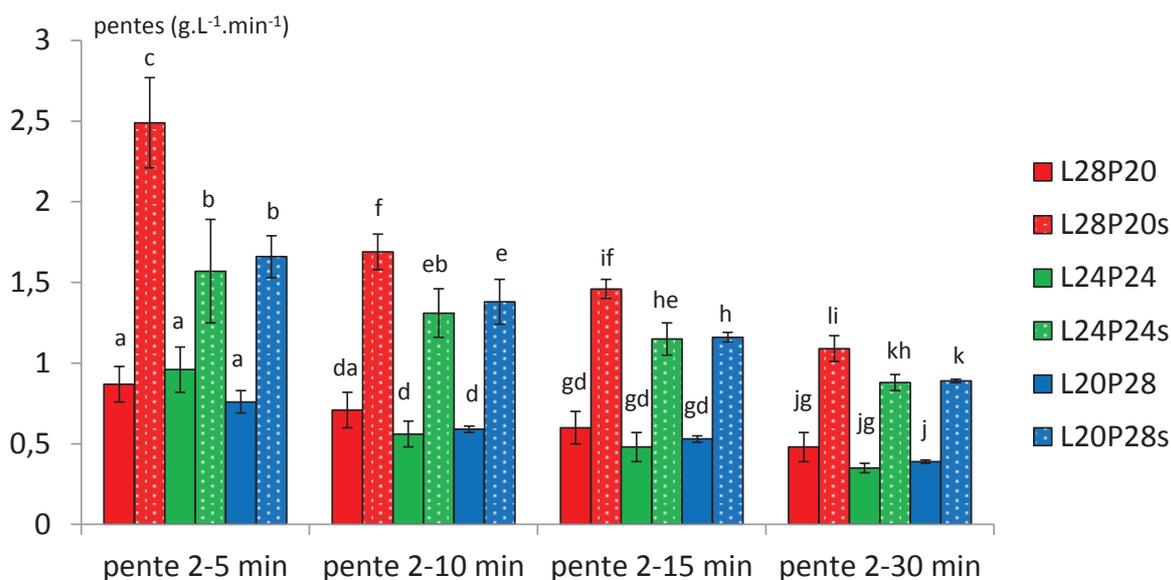


Figure 32 : Pentés des courbes de libération *in vitro* des ions sodium dans l'eau

a-k : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher). De plus, les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même modèle fromager, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

i. Effet de la teneur en NaCl sur la cinétique de libération des ions sodium

Les vitesses de libération du sodium sont significativement plus élevées pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté que pour ceux sans NaCl ajouté ($p < 0,001$), à chacun des temps de prélèvements considérés : 2-5 min, 2-10 min, 2-15 min et 2-30 min (Figure 32). Ceci s'explique par une plus grande concentration en sodium des modèles fromagers avec NaCl ajouté.

ii. Effet du ratio L/P sur la cinétique de libération des ions sodium

Dans notre cas, l'effet du ratio L/P a été observé seulement pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté, avec une augmentation du taux de libération du sodium pour le modèle fromager L28P20s, comparativement aux modèles L24P24s et L20P28s. Le même type d'effet de la teneur en matière grasse avait été observé par Lauverjat *et al.* (2009b) sur des modèles fromagers. La vitesse de libération du sodium pourrait s'expliquer par la structure moins résistante de ce modèle fromager (L28P20s) qui devient plus fragile sous agitation, favorisant ainsi la libération du sodium. De plus, la phase protéique des modèles fromagers ayant le ratio L/P 28/20 est proportionnellement plus concentrée en NaCl que celle des matrices ayant le

ratio L/P 20/28 (où le NaCl est plus « dilué » dans les protéines). Ceci pourrait expliquer une expulsion plus rapide du NaCl.

iii. *Illustration des données RMN et des données rhéologiques*

Un graphique illustratif a été effectué afin de comparer les évolutions de la libération du sodium (pente entre 2 et 5 min), de la résistance mécanique (W) et de l'évolution des temps de relaxation longitudinale et de création (T_1 et τ^{opt}) obtenus par RMN (Figure 33, tirée de Boisard *et al.* (2013)). Le paramètre $T_1/10$, et non T_1 , y est présenté par soucis d'échelle.

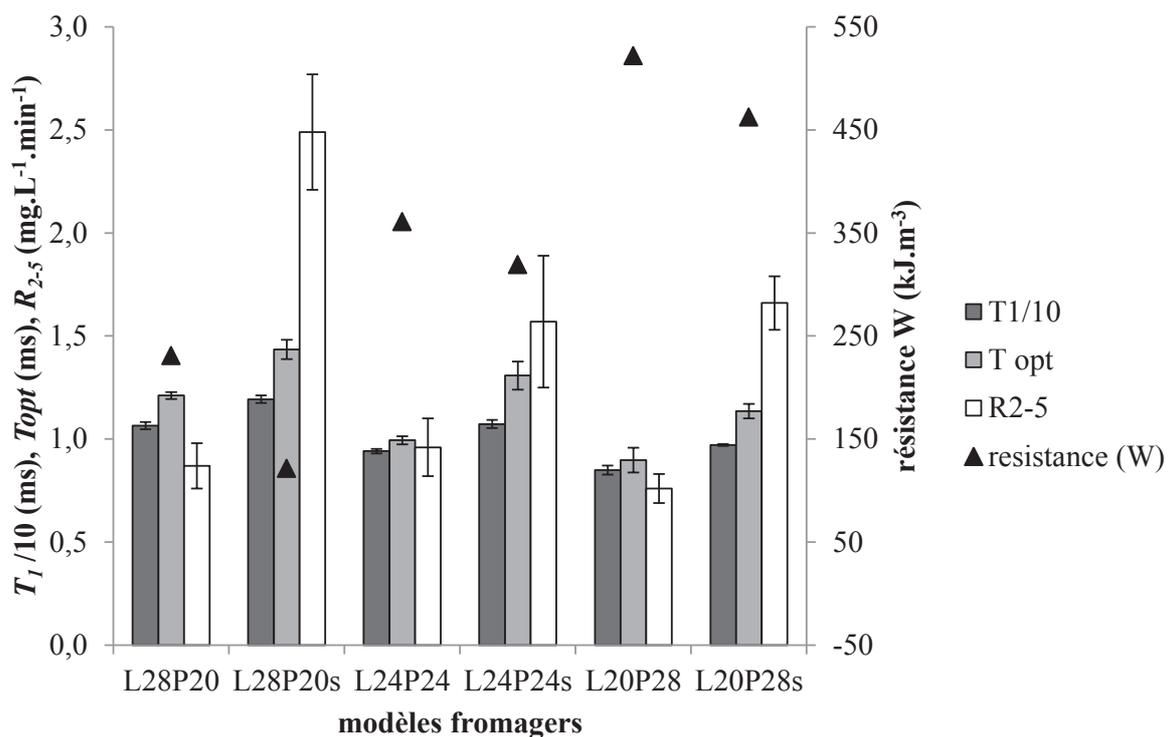


Figure 33 : Valeurs moyennes de $T_1/10$ (temps de relaxation longitudinale), T_{opt} (temps de création), R_{2-5} (pente de libération du sodium entre 2 et 5 min) et W (résistance mécanique) pour les six modèles fromagers

Pour un même ratio L/P, ce graphique illustre les relations entre la diminution de la résistance (due à l'ajout de NaCl), l'augmentation de la libération du sodium et l'augmentation des paramètres RMN montrant une plus grande mobilité des ions sodium. Des corrélations négatives ont été déterminées entre résistance et taux de libération du sodium ($r = -0,55$) et entre résistance et paramètres RMN (coefficients de corrélation donnés dans les paragraphes correspondants). A l'inverse, une corrélation positive a été trouvée entre le taux de libération du sodium et les paramètres RMN ($r = 0,73$ avec T_1 et $r = 0,78$ avec τ^{opt}).

De plus, pour un même contenu en sodium, une diminution du ratio L/P (de 28/20 à 20/28) induit une augmentation de la résistance rhéologique, une diminution de la mobilité des ions sodium (T_1 et τ^{opt}) et une diminution de la vitesse de libération du sodium.

Pour compléter l'étude de la cinétique de libération du sodium, les coefficients de partage eau/modèles fromagers pour le sodium ont été déterminés à l'équilibre et sont présentés dans le paragraphe suivant.

b. Etude des coefficients de partage eau/modèle fromager pour le sodium

La Figure 34 montre que les coefficients de partage du sodium entre le modèle fromager et l'eau sont influencés par la composition des modèles fromagers.

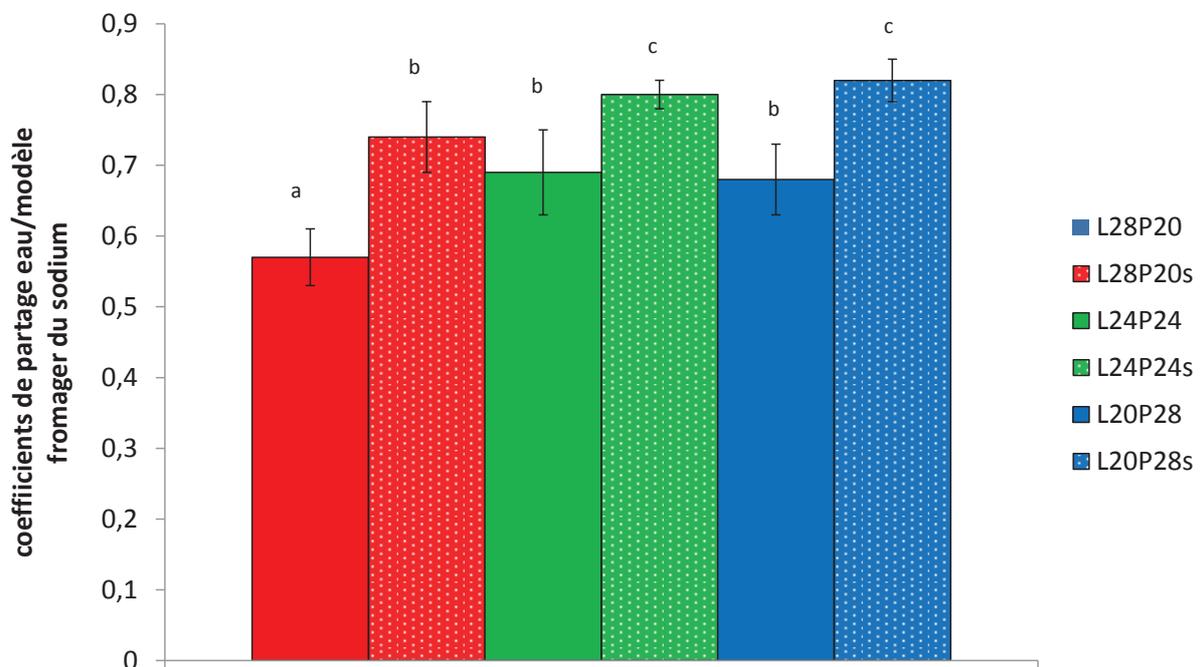


Figure 34 : Coefficients de partage du sodium (eau/produit) pour les six modèles fromagers

a-c : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

i. Effet de la teneur en NaCl sur les coefficients de partage du sodium

Pour un même ratio L/P, les valeurs des coefficients de partage sont significativement plus élevées pour les modèles fromagers avec NaCl que pour ceux sans NaCl ($p < 0,001$) (Figure 34).

Ceci pourrait suggérer que le sodium provenant du NaCl possède une plus grande capacité de libération que le sodium plus « endogène » qui provient des sels de fonte. Une autre explication pourrait être l'effet déjà mentionné du NaCl sur la microstructure des modèles fromagers.

ii. Effet du ratio L/P sur les coefficients de partage du sodium

L'effet du ratio L/P sous ces conditions d'équilibre a été observé à la fois pour les versions avec NaCl ajouté et pour les versions sans NaCl (Figure 34). Pour un contenu identique en sodium, les modèles fromagers avec un ratio L/P égal à 28/20 présentent les plus faibles coefficients de partage du sodium. Les plus faibles valeurs de coefficients de partage pourraient s'expliquer par la matrice des fromages qui est plus riche en matière grasse. En effet, cette matrice est plus hydrophobe et présente donc un caractère moins « spongieux » dans l'eau, limitant la libération du sodium. Par contre, les différences entre coefficients de partage ne permettent pas d'expliquer les différences de pentes de libération. En effet, pour chaque teneur en sel, les pentes sont plus élevées pour les fromages les plus riches en matière grasse. Dans ces fromages, le sodium se trouve en plus grande concentration dans la phase aqueuse, ce qui favorise sa libération. Cet effet n'est pas retrouvé à l'équilibre.

iii. Autres commentaires sur les coefficients de partage du sodium

En outre, les coefficients de partage du sodium ont des valeurs toujours inférieures à 1. Ceci signifie qu'une partie du sodium est retenue par la matrice des modèles fromagers et ne se retrouve pas dans la phase aqueuse. Ces résultats confirment de précédentes études ayant trouvé des coefficients de partage du sodium compris entre 0,50 et 0,95 pour des modèles fromagers (Lauverjat *et al.*, 2009b), ou entre 0,79 et 0,91 pour des gels (Zorrilla & Rubiolo, 1994).

Les valeurs de coefficients de partage du sodium inférieures à 1 confirment également l'hypothèse de la présence d'une fraction liée, non libérée, des ions sodium. De plus, la valeur maximale du coefficient de partage obtenue pour le modèle fromager L20P28s est de 0,82, ce qui est cohérent avec une moyenne de 18 % de sodium lié (quantification RMN). Même si aucune corrélation n'a pu être établie entre les proportions de sodium lié et les coefficients de partage du sodium, la piste d'un résidu de sodium, non libéré, et correspondant au sodium lié, n'est pas à négliger.

Après avoir étudié le comportement de libération du sodium dans l'eau, nous avons étudié ce comportement dans la salive, en situation de consommation des modèles fromagers par cinq sujets.

3. Etude de la libération du sodium dans la salive en situation de consommation

Les courbes de suivi de la libération du sodium dans la salive en bouche, lors de la consommation des modèles fromagers par 5 sujets, sont présentées sur la Figure 35. Toutes les valeurs de concentrations obtenues à T₀ (temps avant la mise en bouche) ont été soustraites des concentrations suivantes.

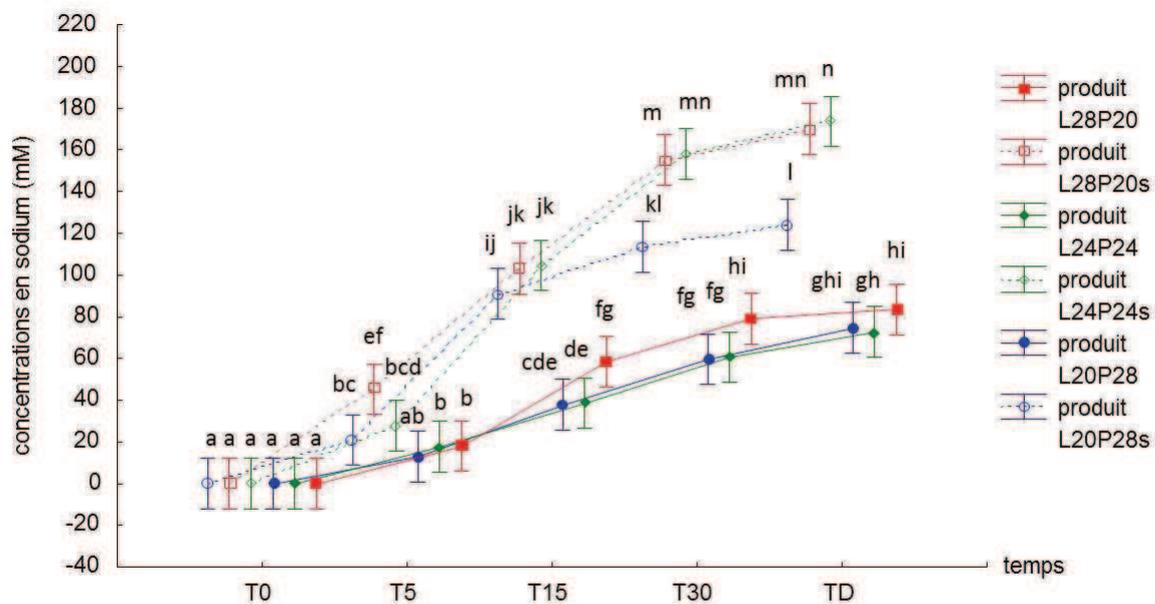


Figure 35 : Libération du sodium en bouche lors de la consommation des modèles fromagers, à T₀ (avant mise en bouche), T₅ (après 5 coups de dents), T₁₅ (après 15 coups de dents), T₃₀ (après 30 coups de dents) et T_D (avant de déglutir)

a-n : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher). De plus, les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même modèle fromager, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

Les courbes de libération du sodium en bouche montrent que les profils diffèrent entre les six modèles fromagers, selon la teneur en NaCl et selon le ratio L/P.

a. Effet de la teneur en NaCl sur la libération du sodium en bouche

Quel que soit le ratio L/P, dès 15 coups de dents, les modèles fromagers avec NaCl ajouté libèrent significativement plus de sodium que les modèles fromagers sans NaCl ($p < 0,001$) (Figure 35). Cependant, à 5 coups de dents (T_5), les modèles avec NaCl et sans NaCl ne sont pas différenciables, excepté L28P20s qui libère significativement plus de sodium que les autres modèles ($p < 0,001$), et qui était également celui qui possédait le taux le plus élevé de libération du sodium dans l'eau. Par ailleurs, pour chaque modèle fromager, les concentrations en sodium obtenues à T_{30} et à T_D ne sont jamais significativement différentes. Ceci s'explique par le fait que la déglutition survient peu après 30 coups de dents dans le cadre de cette étude.

b. Effet du ratio L/P sur la libération du sodium en bouche

Pour les modèles fromagers sans NaCl ajouté, la matrice L28P20 se distingue des deux autres, avec une libération de sodium significativement plus importante à T_{15} et T_{30} ($p < 0,001$). Cependant, les concentrations des trois modèles fromagers sans NaCl ne sont ensuite plus significativement différentes au moment de la déglutition (T_D). Pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté, le modèle L28P20s se distingue d'abord des deux autres modèles (L24P24s et L20P28s) par une libération significativement plus grande à T_5 , puis c'est le modèle L20P28s qui se distingue ensuite des deux autres modèles, avec une libération significativement plus faible à T_{30} et T_D (temps de déglutition). Dans notre cas, l'augmentation du ratio L/P conduit à une augmentation de la libération du sodium en bouche, contrairement à ce qui a pu être montré dans d'autres études sur des modèles fromagers (Lawrence *et al.*, 2012 ; Phan *et al.*, 2008). Ces études avaient montré qu'une forte teneur en matière grasse conduisait à une diminution de la libération du sel en bouche. La diminution de libération du sel en bouche dans leur cas peut être expliquée par une diminution de la teneur en eau (augmentation de la teneur en matière sèche) associée à l'augmentation de la teneur en matière grasse. Dans notre cas, l'augmentation du ratio L/P conduit à une diminution de résistance, et il a été montré que des gels moins résistants libéraient plus de sel sous compression que des gels plus résistants (Koliandris *et al.*, 2008).

La plus faible libération du sodium pour le modèle L20P28s, comparativement aux modèles L24P24s et L28P20s peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Tout d'abord, les études de RMN ont précédemment montré que les ions sodium étaient moins mobiles et dans un environnement plus ordonné dans ce modèle fromager. De plus, l'étude *in vitro* de la libération du sodium dans une phase aqueuse a également montré que le modèle fromager L20P28s présentait un taux de libération (pente) moins important que les modèles L28P20s ou L24P24s. Dans ce cas, les résultats de libération du sodium en bouche corroborent ceux de libération *in vitro* et sont expliqués par la mobilité des ions sodium mesurée par RMN.

En revanche, nous verrons par la suite que les modèles possédant le ratio L/P 20/28 sont plus mastiqués que les autres. Dans notre cas, la mastication n'est donc pas le facteur déterminant dans la libération du sodium en bouche, mais il s'agit plutôt de l'influence de la composition et de la structure. Pour compléter l'étude de cette influence sur la libération du sodium en bouche, les taux de libération initiale du sodium (pentes des courbes de libération) ont été calculés et sont présentés ci-après.

c. Calcul des pentes des courbes de libération du sodium dans la salive

Les pentes des courbes de libération présentées sur la Figure 36 sont présentées ci-dessous. Il s'agit des pentes initiales entre T₀ et T₅ (5 coups de dents).

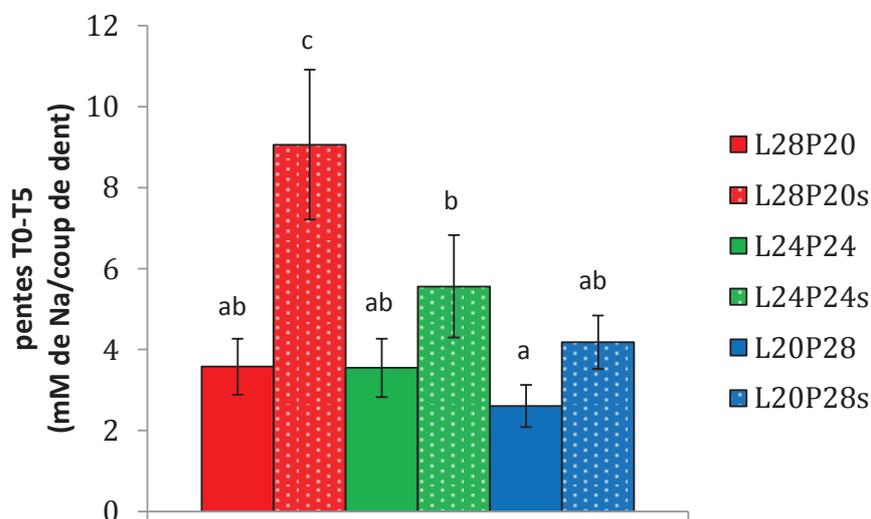


Figure 36 : Pentes initiales des courbes de libération *in vivo* des ions sodium dans la salive

a-c : les valeurs comportant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

L'effet de la teneur en NaCl est présent pour les trois ratios L/P mais il n'est significatif que pour le ratio L/P égal à 28/20 ($p < 0,001$), avec une augmentation de la pente de libération due à l'augmentation de la teneur en NaCl (Figure 36). L'effet du ratio L/P n'est significatif que pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté ($p < 0,001$) avec une nette augmentation de la pente pour le modèle L28P20s, comparativement aux modèles L24P24s et L20P28s. Ces pentes de libération rejoignent les résultats de libération obtenus *in vitro*, et peuvent donc également être mises en relation avec la mobilité des ions Na^+ .

Les effets de la composition sur tous les paramètres de libération du sodium étudiés sont résumés dans le Tableau 26.

Tableau 26 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur les paramètres de libération du sodium dans l'eau (*in vitro*) et dans la salive (*in vivo*)

Expérience	Paramètres	↘ ratio L/P	↗ teneur en NaCl
Suivi <i>in vitro</i> avec la sonde membranaire	<i>Concentration finale</i>	↗ (seulement pour non salés)	↗
Suivi <i>in vitro</i> avec l'électrode	<i>Pentes des courbes de libération in vitro</i>	↘ (seulement pour salés)	↗
Coefficient de partage	<i>Coefficient de partage (sans agitation)</i>	↗	↗
Suivi <i>in vivo</i> dans la salive	<i>Concentration finale</i>	↘ (seulement pour salés)	↗
	<i>Pentes des courbes de libération in vivo</i>	↘ (seulement pour salés)	↗

En résumé, ce tableau montre qu'une diminution du ratio L/P conduit à une diminution des pentes de libération du sodium dans une phase aqueuse (eau et salive). En revanche, la diminution du ratio L/P conduit à une augmentation des coefficients de partage eau/modèle fromager du sodium à l'équilibre. De plus, la concentration finale de sodium en bouche après mastication des modèles fromagers est plus faible lorsque le ratio L/P est plus faible. Ces résultats montrent qu'une diminution du ratio L/P n'affecte pas de la même façon la cinétique de libération dans l'eau, la cinétique de libération dans la salive et les coefficients de partage eau/modèle fromager. Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en NaCl induit une augmentation de tous les paramètres mesurés de libération du sodium.

Après s'être intéressé au comportement du sodium contenu dans les modèles fromagers, nous avons souhaité étudier l'impact de la composition des modèles fromagers sur la libération des composés d'arôme qu'ils contenaient. Pour cela, la libération des composés d'arôme a été étudiée dans différentes conditions, présentées dans le chapitre suivant.

III. Etude de la mobilité et de la libération des composés d'arôme

Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord les concentrations en composés d'arôme dans les modèles fromagers, quantifiées par extraction. Ensuite, nous présenterons les résultats obtenus lors de la consommation des modèles fromagers, à savoir le comportement masticatoire, les caractéristiques de déglutition et la cinétique de libération des composés d'arôme dans la cavité nasale. Enfin, l'analyse de la quantité de composés d'arôme libérés dans la phase vapeur à l'équilibre viendra compléter ces résultats.

1. Quantification des composés d'arôme par extraction Likens-Nickerson

Les concentrations en composés d'arôme dans les produits finis ont été calculées après extraction par Likens-Nickerson (Tableau 27). La quantification a été réalisée pour chaque batch de chaque modèle fromager ayant servi pour les études de libération des composés d'arôme. Néanmoins, seules les valeurs moyennes globales (2 batchs, avec 4 répétitions de quantification par batch) sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 27 : Concentrations en composés d'arôme quantifiées dans les modèles fromagers

Modèles fromagers (concentrations en 10^{-1} mg.kg $^{-1}$ modèle fromager)						
Composés d'arôme	L28P20	L28P20s	L24P24	L24P24s	L20P28	L20P28s
Diacétyl	1,8±0,1 ^a	2,3±0,1 ^b	1,9±0,4 ^a	2,2±0,2 ^b	2,0±0,2 ^a	3,2±0,2 ^c
Butanoate d'éthyle	13,9±1,7 ^a	19,2±2,7 ^b	15,5±3,3 ^a	17,3±4,9 ^{ab}	24,1±6,0 ^c	31,1±4,2 ^d
Hexanoate d'éthyle	13,8±2,5 ^a	16,4±0,7 ^a	13,3±2,5 ^a	15,3±0,9 ^a	21,5±4,7 ^b	36,6±8,2 ^c
Heptan-2-one	42,9±5,5 ^a	49,0±2,2 ^{bc}	44,0±7,7 ^a	46,3±5,1 ^{ab}	51,1±2,0 ^c	51,1±1,3 ^c
Octan-3-one	33,9±4,8 ^a	38,1±1,1 ^b	33,3±6,3 ^a	38,9±1,8 ^b	44,9±5,9 ^c	50,5±2,7 ^d
Nonan-2-one	9,0±2,1 ^a	10,1±0,2 ^{ab}	9,0±1,4 ^a	10,7±1,0 ^{ab}	12,6±1,6 ^b	22,8±7,1 ^c

a-n : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

Pour toutes les analyses traitées par la suite, la concentration de chaque batch de fabrication a été considérée et non les valeurs moyennes, afin de pondérer les données de libération *in vivo*. Parmi les sept composés d'arôme, seul l'acide butanoïque n'a pas pu être quantifié du fait de sa trop faible récupération après extraction. Il ne sera donc pas traité dans les analyses suivantes. Le Tableau 27 montre néanmoins que les valeurs sont significativement différentes et souvent plus grandes dans les matrices L20P28s. Les modèles fromagers avec NaCl ajouté auraient tendance à avoir plus de composés d'arôme. Ces résultats confirment la nécessité de faire ce calcul de quantification.

2. Suivi de l'activité masticatoire lors de la consommation des modèles fromagers

La Figure 37 présente tous les paramètres masticatoires étudiés pendant la consommation des modèles fromagers : le nombre de cycles masticatoires, la durée totale de mastication, la durée moyenne d'un cycle de mastication, le travail total musculaire et le travail moyen d'un cycle masticatoire. Ces paramètres ont été mesurés simultanément à la mesure de la libération des composés d'arôme dans la cavité nasale (par APCI-MS) et aux mesures de déglutitions.

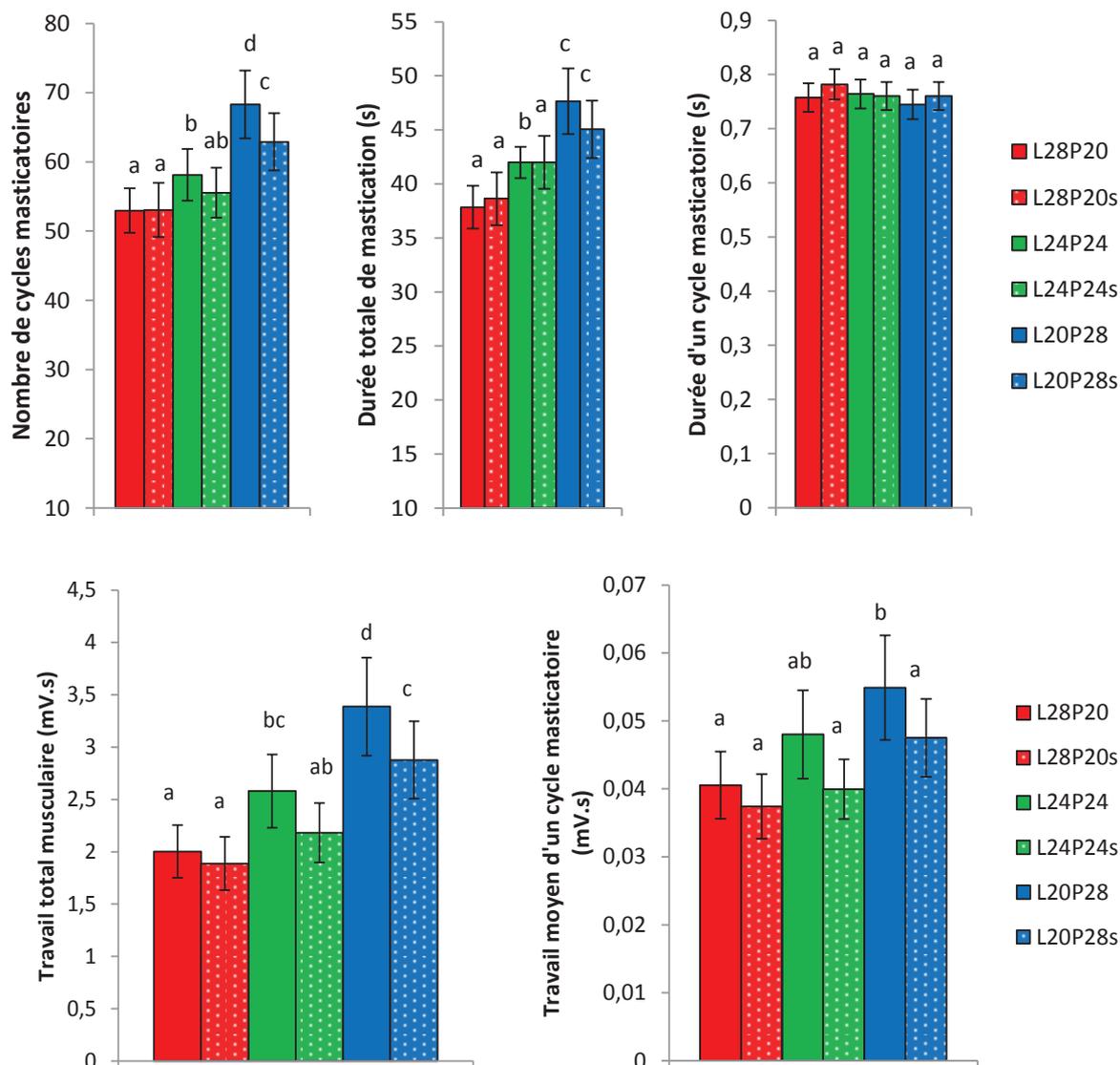


Figure 37 : Valeurs des paramètres masticatoires mesurés par électromyographie

a-d: les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

a. Effet du ratio L/P sur les paramètres masticatoires

Un effet significatif du ratio L/P a été trouvé pour les trois paramètres masticatoires globaux ($p < 0,001$) que sont le nombre de cycles masticatoires, la durée totale de la mastication et le travail total musculaire (sur toute la durée de la mastication), ainsi que pour le travail musculaire moyen pour un cycle de mastication (Figure 37). Ces paramètres masticatoires augmentent lorsque le ratio L/P diminue.

En d'autres termes, les modèles fromagers ayant le ratio L/P le plus faible (20/28) sont ceux qui nécessitent le plus de cycles masticatoires (= coups de dents), la plus grande durée de mastication et le plus important travail musculaire de mastication. Ces résultats masticatoires confirment les résultats obtenus par de précédents travaux sur des modèles fromagers et des fromages, montrant une augmentation des paramètres masticatoires consécutive à une diminution de la teneur en matière grasse (Jack *et al.*, 1995 ; Tarrega *et al.*, 2008). De plus, ces résultats sont cohérents avec les données rhéologiques puisque les modèles fromagers ayant le ratio L/P le plus faible sont les plus fermes et nécessitent donc une mastication plus importante. L'augmentation de l'activité masticatoire pour les matrices les plus fermes est due à un effet adaptatif de la mastication, consécutif aux variations de texture (Ottenhoff *et al.*, 1992 ; Woda *et al.*, 2006).

L'étude de la durée moyenne d'un cycle masticatoire montre que cette durée est inchangée en fonction des modèles fromagers. Ceci signifie qu'une plus grande durée de mastication est due uniquement à un nombre plus important de cycles masticatoires ($r = 0,95$), et non à une durée plus longue des cycles masticatoires. Le nombre important de cycles masticatoires observés pour les modèles fromagers est dû à la teneur élevée en matière sèche des produits. Cette teneur peut paraître élevée pour des produits fromagers, mais elle a été optimisée afin de permettre l'application de toutes les techniques expérimentales. En effet, un taux de matière sèche trop faible n'aurait pas permis l'étude de la libération du sodium dans l'eau car les modèles fromagers se seraient trop délités.

b. Effet de la teneur en NaCl sur les paramètres masticatoires

L'effet du NaCl sur les paramètres masticatoires ne s'est révélé significatif que pour le nombre de cycles masticatoires et le travail total musculaire de mastication ($p < 0,001$) avec une diminution de ces paramètres suite à l'ajout de NaCl dans les modèles fromagers (Figure 37). Aucun effet significatif n'a pu être mis en évidence pour les autres paramètres. Là encore, la diminution des deux paramètres masticatoires cités peut s'expliquer par les mesures rhéologiques effectuées, puisque les modèles fromagers avec NaCl ajouté sont moins résistants rhéologiquement que les versions sans NaCl. Ceci expliquerait que moins de travail musculaire et moins de cycles masticatoires soient nécessaires.

c. Différences interindividuelles d'activité masticatoire

Les sujets présentent différents profils de mastication, avec de grandes variations interindividuelles pour les paramètres étudiés. Par exemple, le nombre de cycles masticatoires peut varier, en moyenne, de 22 cycles à 97 cycles entre deux sujets ; la durée totale de mastication peut varier de 24,6 s à 68,9 s, et la durée d'un cycle masticatoire peut varier de 0,62 à 1,21 s. De plus, le travail musculaire total peut, quant à lui, varier de 0,5 mV.s à 7,9 mV.s, et le travail moyen d'un cycle masticatoire de 0,01 mV.s à 0,10 mV.s. Bien que ces différences interindividuelles soient significatives ($p < 0,001$), elles ne masquent pas les différences d'activité masticatoire observées pour les six modèles fromagers.

3. Suivi des déglutitions lors de la consommation

Les déglutitions ont été mesurées simultanément au suivi de la mastication lors de la consommation des modèles fromagers. Deux paramètres ont été pris en compte et sont présentés : la durée avant la première déglutition et le nombre total de déglutitions.

a. Etude de la durée avant la première déglutition

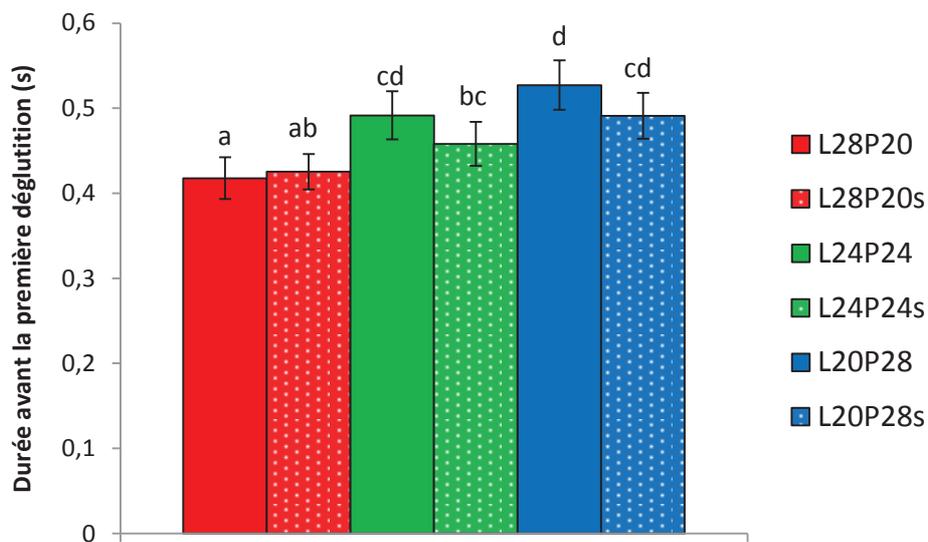


Figure 38 : Durée avant la première déglutition lors de la consommation des six modèles fromagers

a-d : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

i. Effet du ratio L/P sur la durée avant déglutition

La durée avant la première déglutition augmente significativement lorsque le ratio L/P diminue ($p < 0,001$) (Figure 38). Ceci signifie que les modèles fromagers plus riches en protéines et moins riches en lipides sont déglutis plus tardivement, comme cela a déjà pu être montré sur d'autres modèles fromagers (Lauverjat, 2009c). Ceci peut être lié au fait que ces modèles requièrent un nombre de cycles masticatoires plus élevé du fait de leur plus grande résistance (Tarrega *et al.*, 2008). En ce sens, une corrélation a été mise en évidence entre le nombre de cycles masticatoires et la durée avant déglutition ($r = 0,88$). En effet, les modèles fromagers possédant un ratio L/P plus bas nécessitent un nombre plus important de cycles masticatoires et donc un temps plus long avant d'obtenir un bol alimentaire prêt à être avalé, comme cela a déjà pu être prouvé sur d'autres types de fromages (Yven *et al.*, 2012).

ii. Effet de la teneur en NaCl sur la durée avant déglutition

Les modèles fromagers avec NaCl ajouté tendent à être déglutis plus rapidement que les modèles fromagers sans NaCl ajouté ($p = 0,074$), probablement dû à la plus faible résistance des modèles fromagers avec NaCl ajouté. Une autre explication pourrait résider dans le fait que l'augmentation de la teneur en NaCl conduit à une augmentation de la perception salée et à une augmentation de la salivation (Neyraud *et al.*, 2003). C'est cette augmentation de salivation qui pourrait conduire à une déglutition légèrement plus rapide.

b. Etude du nombre de déglutitions pendant la consommation

La considération du nombre de déglutitions a été rendue possible grâce à un protocole de consommation libre, c'est-à-dire que les sujets étaient libres de mastiquer et d'avaler lorsqu'ils le souhaitaient. Ce nombre varie énormément entre les sujets, puisqu'il est compris entre 1 et 12 déglutitions (moyenne par sujet, tous modèles fromagers considérés). En revanche, ni le contenu en NaCl ni le ratio L/P ne modifient significativement le nombre de déglutitions lors de la consommation. Néanmoins, l'effet du NaCl a été étudié plus en détail, en considérant chaque sujet individuellement (Figure 39).

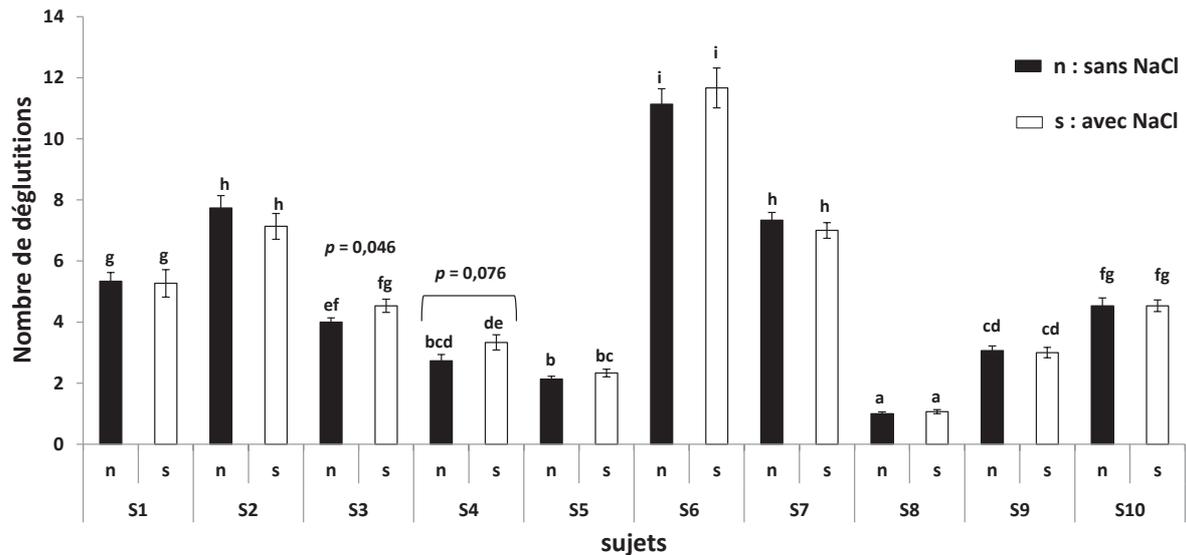


Figure 39 : Nombre de déglutitions par sujet lors de la consommation, en fonction des modèles fromagers avec ou sans NaCl ajouté

a-i : les valeurs comportant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

L'effet du NaCl sur le nombre de déglutitions ne s'est avéré significatif que pour le sujet S3 ($p < 0,05$) et seulement une tendance a pu être notée pour le sujet S4 ($p = 0,076$). Chez ces sujets, l'augmentation du nombre de déglutitions pour les modèles fromagers avec NaCl peut s'expliquer par un effet du NaCl sur la sensation en bouche et sur la salivation. En effet, il a déjà été montré que le nombre de déglutitions était positivement corrélé à la quantité de salive sécrétée en bouche (Nederkoorn *et al.*, 1999).

c. Comparaison de l'activité masticatoire, des déglutitions et des paramètres rhéologiques

Afin de visualiser les paramètres de mastication, de déglutition et de rhéologie sur un même graphique, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée. Les deux premières composantes comptent pour 89,5 % de la variabilité totale entre les modèles fromagers (Figure 40).

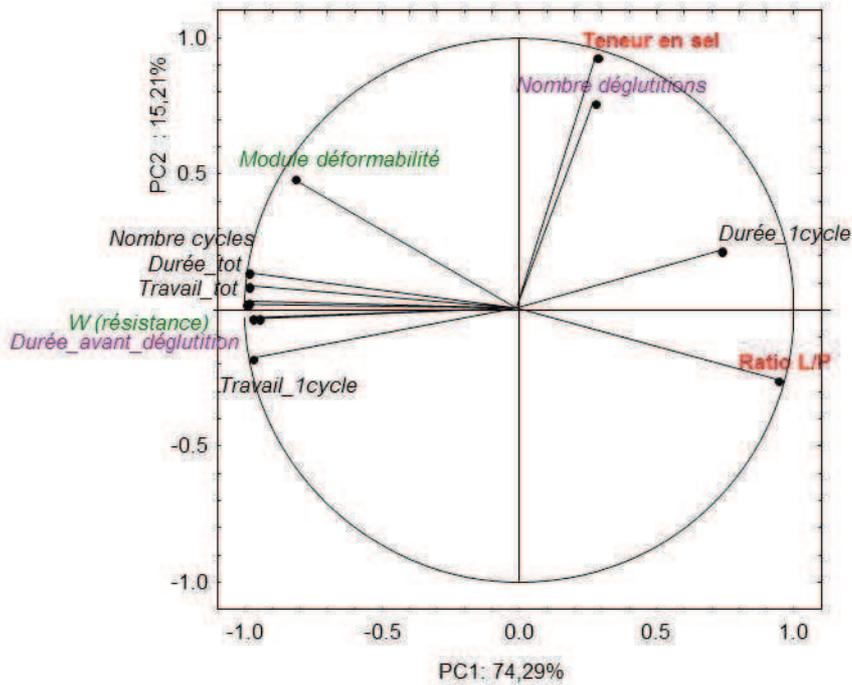


Figure 40 : Représentation ACP des valeurs moyennes des données rhéologiques (en vert), des données de mastication (en noir) et des données de déglutitions (en violet) obtenues pour chaque modèle fromager (variant par la teneur en NaCl et le ratio L/P)

Cette ACP illustre clairement l'association entre quatre des paramètres masticatoires (nombre de cycles, durée de mastication, travail total et travail pour un cycle masticatoire), la durée avant la première déglutition et la résistance rhéologique des modèles fromagers. Ces paramètres sont portés par l'axe 1, qui compte pour 74,29 % de la variabilité entre les produits et qui est tiré, à son opposé, par le ratio L/P. La deuxième composante de l'ACP compte pour 15,21% de la variabilité entre les produits et est tirée par la teneur en NaCl. Bien que le nombre de déglutitions soit associé à cet axe, nous avons vu précédemment que l'effet du NaCl sur le nombre de déglutitions n'était significatif que pour un seul des sujets de l'étude.

Les effets de la composition des modèles fromagers sur les paramètres de mastication et de déglutition sont résumés dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur les paramètres de mastication et de déglutition des modèles fromagers

Expérience	Paramètres	↘ ratio L/P	↗ teneur en NaCl
Activité masticatoire	<i>Nombre de cycles masticatoires</i>	↗	↘
	<i>Durée totale de la mastication</i>	↗	NS
	<i>Durée d'un cycle masticatoire</i>	NS	NS
	<i>Travail total de mastication</i>	↗	↘
	<i>Travail pour un cycle masticatoire</i>	↗	↘
	Déglutitions	<i>Durée avant déglutition</i>	↗
	<i>Nombre de déglutitions</i>	NS	NS

En résumé, ce tableau montre que les paramètres masticatoires augmentent quand le ratio L/P diminue, mais diminuent quand la teneur en NaCl augmente, ce qui montre que les paramètres masticatoires suivent la même évolution que les paramètres rhéologiques. De plus, la durée avant déglutition évolue de la même façon suite aux modifications de composition, alors que le nombre de déglutitions n'est pas affecté par la composition.

Comme mentionné auparavant, la libération des composés d'arôme dans la cavité nasale a été suivie durant la consommation des modèles fromagers par APCI-MS, simultanément à l'activité masticatoire et aux déglutitions. Les résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

4. Etude de la libération des composés d'arôme par APCI-MS

Différents paramètres liés à la libération des composés d'arôme ont été obtenus après analyse, comme le rappelle la Figure 41, préalablement présentée dans la partie Matériel et Méthodes. Nous discuterons plus particulièrement des paramètres suivants, car jugés plus pertinents pour notre étude : TL_1 , taux de libération initiale d'arôme (égal à I_{max_1}/T_{max_1}), I_{max_2} , intensité maximale de libération d'arôme après la première déglutition, T_{max_2} , temps pour atteindre I_{max_2} et AUC_2/AUC_1 , ratio des quantités d'arômes libérés après et avant déglutition.

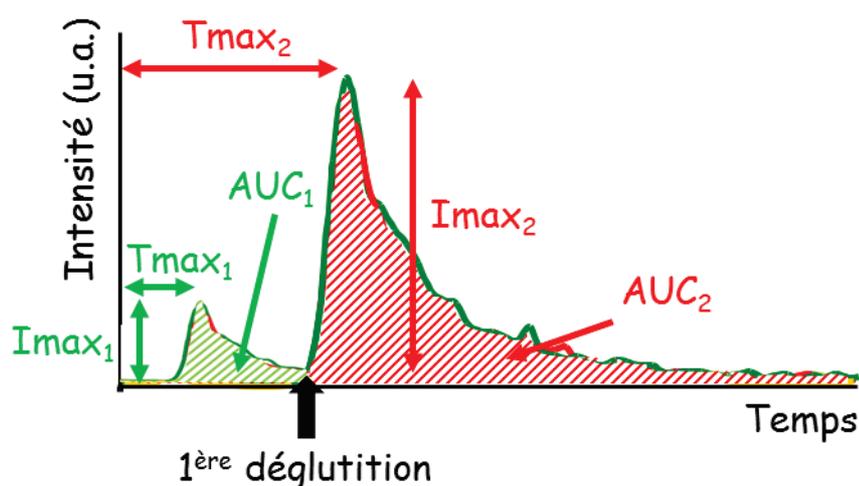


Figure 41 : Profil type de libération d'arôme en APCI-MS et paramètres étudiés, avant et après la première déglutition

a. Taux de libération des composés d'arôme avant déglutition (TL_1).

Le taux de libération des arômes (TL_1) a été calculé pour chaque modèle fromager et pour chaque composé d'arôme, à l'exception de l'acide butanoïque qui n'a pas pu être quantifié (Figure 42). Ce taux correspond au ratio I_{max_1}/T_{max_1} . Comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes, les valeurs d'intensités maximales de libération (I_{max_1}) correspondent aux valeurs brutes d'intensités maximales (après lissage) divisées par les concentrations en composés d'arôme quantifiées dans chacun des modèles fromagers correspondants.

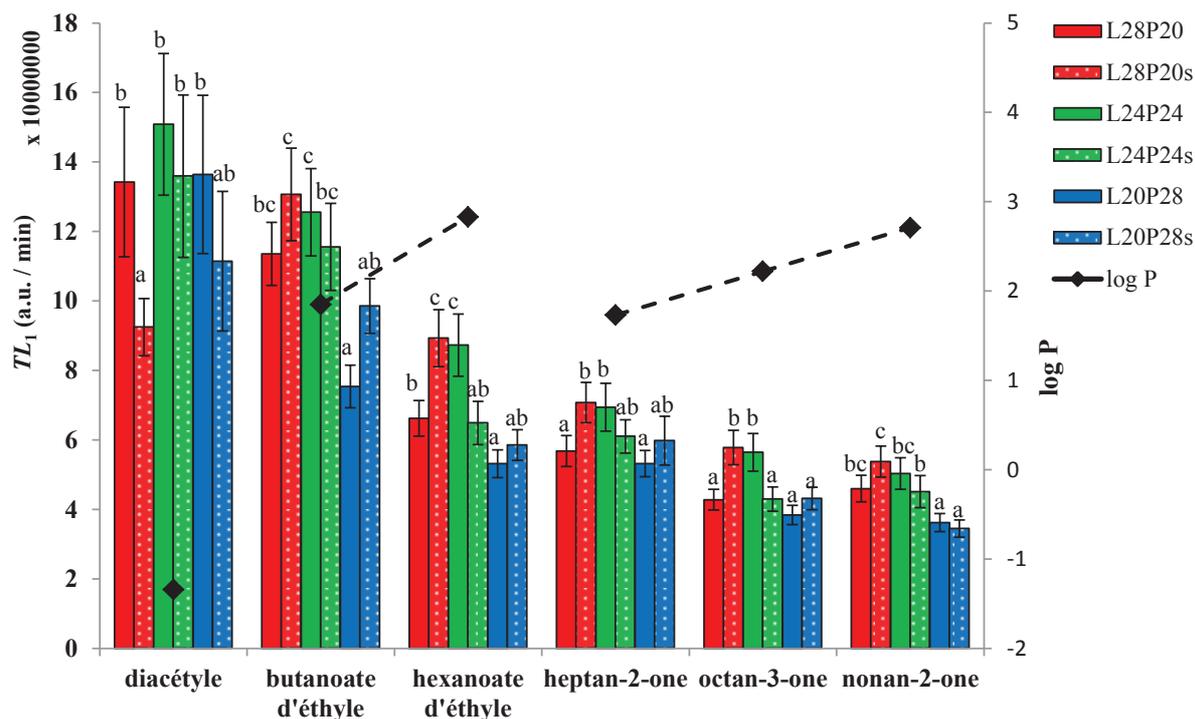


Figure 42 : Variations des valeurs de TL_1 ($=Imax_1/Tmax_1$) en fonction des composés d'arôme et des modèles fromagers

a-c : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

Les modèles fromagers avec le ratio L/P égal à 20/28 conduisent à un taux de libération des composés d'arôme TL_1 globalement inférieur à ceux des modèles plus riches en lipides et moins riches en protéines. Ceci peut s'expliquer par la présence de protéines qui diminuerait le taux d'arômes libérés initialement, du fait d'interactions moléculaires entre composés d'arôme et protéines (Guichard, 2002). Pour les modèles fromagers dont le ratio L/P est égal à 28/20, l'ajout de NaCl conduit à une augmentation significative de TL_1 pour tous les composés d'arôme ($p < 0,001$) sauf pour le diacétyle. Cette augmentation pourrait s'expliquer par un effet de « salting out » conduisant à une libération d'arômes plus importante dans les modèles fromagers avec un ratio L/P élevé, car ce sont les modèles dans lesquels les ions sodiums sont plus mobiles (Andriot, I. *et al.*, 2011 ; Boisard *et al.*, 2013). Néanmoins, cet effet ne se retrouve ni pour le ratio L/P égal à 24/24, ni pour celui égal à 20/28. En outre, TL_1 diminue lorsque l'hydrophobicité des composés augmente. Le paramètre TL_1 du diacétyle est beaucoup plus important que le paramètre TL_1 de la nonan-2-one, pour des valeurs de $\log P$ (hydrophobicité) respectives de -1,34 et 2,71.

Dans chaque catégorie (esters et cétones), l'effet de l'hydrophobicité des composés d'arôme sur TL_1 est présent, avec une diminution de TL_1 quand l'hydrophobicité des composés d'arôme augmente : $TL_1(\text{butanoate d'éthyle}) > TL_1(\text{hexanoate d'éthyle})$, et $TL_1(\text{heptan-2-one}) > TL_1(\text{octan-3-one}) > TL_1(\text{nonan-2-one})$. Ceci peut s'expliquer par une diminution des coefficients de transfert de masse quand l'hydrophobicité des composés d'arôme augmente (Voilley, 2006).

Le Tableau 29 résume les effets de la composition sur le paramètre TL_1 , en considérant chacun des composés d'arôme.

Tableau 29 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur le paramètre TL_1

Expérience	Composés d'arôme	↘ ratio L/P	↗ teneur en NaCl
$TL_1 =$ I_{max_1}/T_{max_1}	<i>Diacétyl</i>	NS	↘
	<i>Butanoate d'éthyle</i>	↘	↗ (tendance)
	<i>Hexanoate d'éthyle</i>	↘ (seulement pour salés)	↗ (pour 28/20) ↘ (pour 24/24)
	<i>Heptan-2-one</i>	↘ (seulement pour salés)	↗ (pour 28/20)
	<i>Octan-3-one</i>	↘ (seulement pour salés)	↗ (pour 28/20) ↘ (pour 24/24)
	<i>Nonan-2-one</i>	↘	NS

En résumé, ce tableau montre qu'une diminution du ratio L/P entraîne le plus souvent une diminution du paramètre TL_1 et que l'augmentation de la teneur en NaCl peut avoir des effets différents selon les composés d'arôme.

b. Intensité maximale de libération des composés d'arôme (I_{max})

Comme dans le paragraphe précédent, les valeurs données d'intensités maximales de libération correspondent aux valeurs brutes d'intensités maximales (après lissage) divisées par les concentrations en composés d'arôme quantifiées dans chacun des modèles fromagers correspondants.

L'intensité maximale de libération lors de la consommation (I_{max}) correspond toujours à l'intensité maximale de libération après déglutition (I_{max_2}), comme le montre, par exemple, la courbe présentée au début du paragraphe 4 (Figure 41). En effet, les valeurs de I_{max} sont toujours plus hautes après déglutition (I_{max_2}) qu'avant déglutition (I_{max_1}), et cela a été observé pour tous les modèles fromagers, tous les composés d'arôme et tous les sujets (données non montrées). La même observation a déjà été mentionnée dans différentes études (Hansson *et al.*, 2003 ; Laverjat *et al.*, 2009b). Ce phénomène est attribué à l'ouverture du velum pendant la déglutition, permettant le transport des composés d'arôme de la cavité orale vers la cavité nasale (Buettner *et al.*, 2001 ; Mestres *et al.*, 2006).

Dans notre étude, nous ne décrivons que l'évolution de I_{max_2} , I_{max_1} et I_{max_2} présentant des profils similaires. I_{max_2} présente de grandes différences interindividuelles, allant parfois d'un facteur 1 à 10 (données non montrées). Cet effet a déjà été souligné dans d'autres études (Gierczynski *et al.*, 2008 ; Repoux *et al.*, 2011), mais ces différences n'empêchent pas de conclure quant à la variabilité entre produits et composés d'arôme. Par ailleurs, les valeurs de I_{max_2} peuvent différer d'un composé aromatique à l'autre, mais ces différences peuvent soit provenir d'une réelle différence de libération *in vivo* des composés d'arôme, soit d'une différence de coefficient de réponse de l'appareil APCI-MS pour ces composés.

Le but de notre étude n'étant pas de comparer les réponses des différents composés d'arôme, nous n'avons pas effectué de calibration du système APCI-MS pour chaque composé. Ainsi, nous ne présenterons donc que l'effet du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur le paramètre I_{max_2} .

i. Effet du ratio L/P sur l'intensité maximale de libération des composés d'arôme

La Figure 43 présente les valeurs de I_{max_2} pour les composés d'arôme considérés dans les six modèles fromagers. L'effet des composés d'arôme sur la libération d'arômes est produit-dépendant, mais de façon générale, une diminution du ratio L/P conduit à une diminution de I_{max_2} .

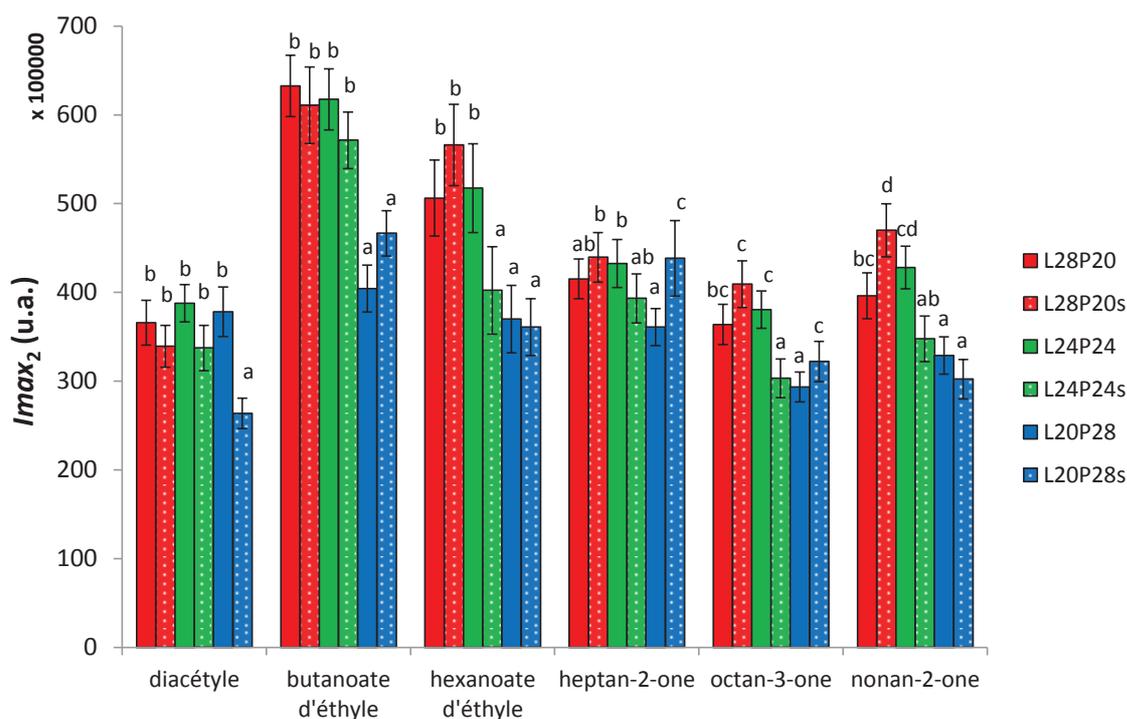


Figure 43 : Variations des valeurs de I_{max_2} en fonction des composés d'arôme et des modèles fromagers

a-d: les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

Cette diminution de I_{max_2} diffère de ce qui a pu être précédemment observé sur d'autres modèles fromagers (Tarrega *et al.*, 2008), où les valeurs les plus élevées de I_{max} correspondaient aux modèles fromagers possédant le plus faible ratio L/P. Plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- les modèles fromagers des deux études ont des formulations différentes. La libération de composés d'arôme peut différer, notamment si la microstructure est différente (elle n'a pas été contrôlée dans les travaux de Tarrega *et al.* (2008)).

- les composés d'arôme des modèles fromagers de l'étude de Tarrega *et al.* (2008) n'ont pas été quantifiés après fabrication. Il est donc possible que les plus grandes valeurs de libération d'arômes, obtenues dans les modèles avec un faible ratio L/P, ne soient pas seulement dues à une mastication plus importante, mais également dues à une concentration initiale en composés d'arôme plus importante dans ces modèles fromagers. En effet, dans le cas de notre étude, les modèles fromagers avec le plus faible ratio L/P (20/28) présentent des concentrations quantifiées plus élevées que les autres modèles fromagers (Tableau 27). C'est pour cette raison qu'il est important de considérer les concentrations réelles dans les modèles fromagers.

Dans la présente étude, bien que les paramètres masticatoires augmentent pour les modèles fromagers avec un ratio L/P plus bas, la diminution de I_{max_2} pour ces modèles pourrait être expliquée par une rétention plus importante de la phase protéique, qui est plus épaisse et plus rigide dans les fromages ayant un ratio L/P plus bas (Bryant *et al.*, 1995). La microstructure associée est également plus rigide et possède des gouttelettes plus circulaires, contribuant ainsi à un système plus stabilisé (Guinee *et al.*, 2004). Dans notre cas, l'effet du ratio L/P semble être plus important que l'effet de la mastication. En effet, la microstructure affecte la libération des arômes, par un effet combiné de rétention par les protéines et les gouttelettes lipidiques. L'effet de rétention des protéines semble prévaloir sur l'effet de réservoir des lipides dans ce cas. A l'inverse, la plus grande libération d'arômes dans les fromages plus riches en lipides et moins riches en protéines peut s'expliquer par une fonte (dissolution) plus importante en bouche. En effet, le point de fusion de la matière grasse est de 32 °C, ce qui correspond à la température en bouche (Fabre, 2002). En effet, dans l'étude préalablement décrite de la libération du sodium en bouche, il a été montré que les matrices plus riches en lipides libéraient plus de sodium en bouche, du fait d'une désintégration plus importante. Cette désintégration plus importante dans la salive provoquerait une plus grande surface d'échange en bouche, un plus grand transfert de masse des composés d'arôme, et une libération plus importante. De plus, la plus grande quantité de sel libéré pourrait expliquer la plus forte libération des composés d'arôme (par « salting out »). Une autre hypothèse pourrait être l'augmentation de salive incorporée dans les bols alimentaires au cours de la mastication des fromages possédant une teneur en lipides plus basse (Repoux *et al.*, 2012b ; Tarrega *et al.*, 2011). Ceci conduirait à la dilution des composés d'arôme par la salive (Odake *et al.*, 1998) et à une plus faible libération de ceux-ci.

ii. Effet de la teneur en NaCl sur l'intensité maximale de libération des composés d'arôme

Aucun effet significatif de l'ajout de NaCl sur $Imax_2$ n'a pu être mis en évidence (Figure 43), ce qui rejoint les conclusions de Lauverjat (2009c), sur des modèles fromagers, qui ne montraient aucun effet significatif du NaCl sur $Imax$. Dans notre cas, l'effet du NaCl semble dépendre du ratio L/P. Pour les cétones, une augmentation de la teneur en NaCl induit une faible augmentation de $Imax_2$ pour les modèles fromagers avec un ratio L/P égal à 28/20, alors qu'elle induit une diminution de $Imax_2$ pour les modèles fromagers avec un ratio L/P égal à 24/24. Aucune tendance n'a pu être définie ni pour le ratio égal à 20/28, ni pour les autres composés d'arôme. Il se peut que l'effet du NaCl sur $Imax_2$ ne soit pas clairement identifiable car le NaCl agit peut-être préférentiellement avant déglutition ($Imax_1$), comme cela a pu être mis en évidence sur les modèles fromagers dont le ratio est égal à 28/20, avec l'étude de TL_1 ($Imax_1/Tmax_1$).

Les effets de la composition des modèles fromagers sur le paramètre $Imax_2$ sont résumés dans le Tableau 30, en considérant chacun des composés d'arôme.

Tableau 30 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur le paramètre $Imax_2$

Expérience	Composés d'arôme	↘ ratio L/P	↗ teneur en NaCl
Intensité maximale de libération des composés d'arôme ($Imax_2$)	<i>Diacétyl</i>	↘ (seulement pour salés)	↘ (pour 20/28)
	<i>Butanoate d'éthyle</i>	↘	NS
	<i>Hexanoate d'éthyle</i>	↘	↘ (pour 24/24)
	<i>Heptan-2-one</i>	↘ (tendance)	↗ (pour 20/28 et 28/20) ↘ (tendance pour 24/24)
	<i>Octan-3-one</i>	↘	↘ (pour 24/24) ↗ (tendance pour 28/20)
	<i>Nonan-2-one</i>	↘	↗ (pour 28/20) ↘ (pour 24/24)

Ce tableau récapitule les effets préalablement cités, à savoir une diminution de $Imax_2$ lorsque le ratio L/P diminue et un effet du NaCl qui dépend des composés d'arôme et du ratio L/P.

c. Temps pour atteindre l'intensité maximale de libération des composés d'arôme (T_{max})

Le temps pour atteindre l'intensité maximale de libération des composés d'arôme (T_{max}) a été ensuite considéré. Comme pour I_{max_2} , seules les valeurs de T_{max_2} sont décrites dans ce paragraphe. En effet, T_{max_2} correspond toujours à T_{max} global, et T_{max_1} et T_{max_2} présentent des profils similaires.

i. Différences interindividuelles de T_{max}

Les valeurs de T_{max_2} sont très variables selon les sujets et varient de 0,54 s à 1,29 s (données non montrées), mais ceci n'empêche pas de conclure quant à la variabilité entre produits et composés d'arôme.

ii. Effet du ratio L/P sur T_{max}

Pour tous les composés d'arôme, une diminution du ratio L/P conduit à une augmentation significative de T_{max_2} ($p < 0,001$) (Figure 44), signifiant que l'intensité maximale de libération correspondante (I_{max_2}) est obtenue plus tardivement. Cela peut s'expliquer par des processus en bouche (activité masticatoire, déglutitions, ...) plus longs quand le ratio L/P diminue.

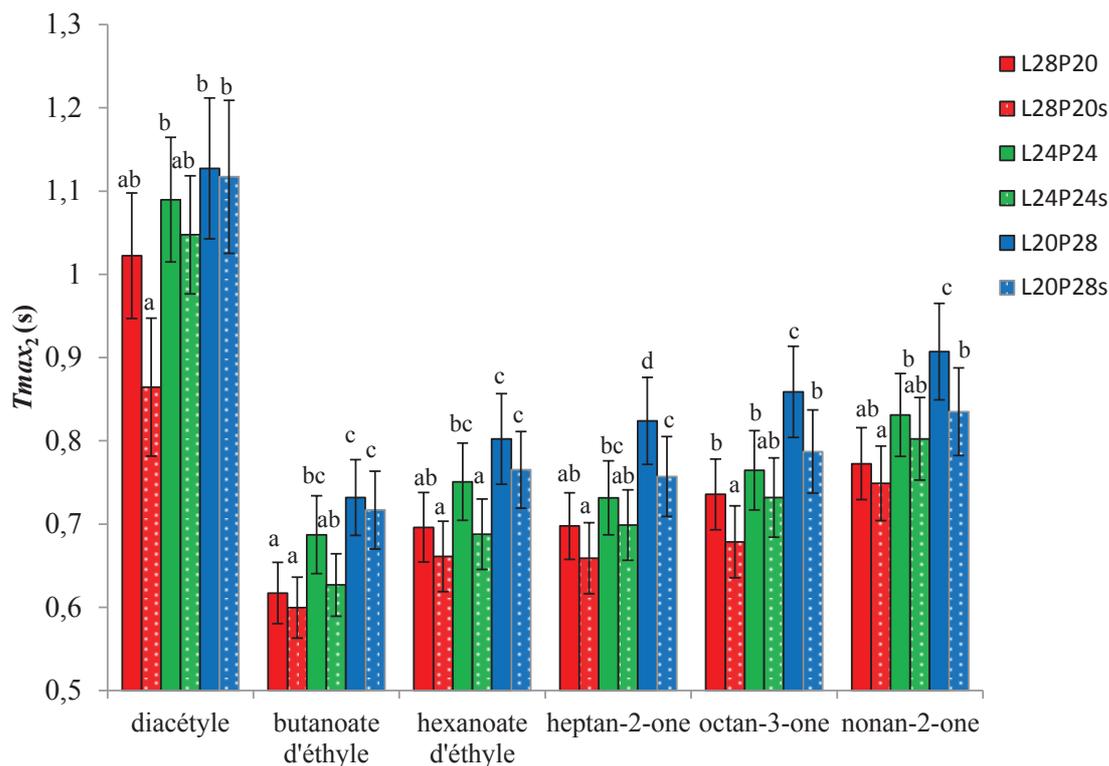


Figure 44 : Variations des valeurs de T_{max_2} en fonction des composés d'arôme et des modèles fromagers

a-d: les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

iii. Effet de la teneur en NaCl sur T_{max}

Quel que soit le ratio L/P, les versions avec NaCl ajouté présentent des valeurs de T_{max_2} significativement plus basses ($p < 0,001$) que les versions sans NaCl ajouté (Figure 44). Cela peut s'expliquer par l'effet « salting out » du NaCl qui permet une libération des composés d'arôme plus rapide avant déglutition. Par conséquent, la libération des composés d'arôme après déglutition est également plus rapide. Une corrélation intéressante a été mise en évidence entre T_{max_2} et la durée avant déglutition ($r = 0,577$). Cela est dû au fait que I_{max_2} est atteint plus vite lorsque le produit est dégluti plus vite.

iv. Variations de T_{max} en fonction de la nature des composés d'arôme

Les valeurs de T_{max_2} sont plus élevées pour les cétones que pour les esters, et elles augmentent avec l'hydrophobicité des composés (c'est-à-dire, lorsque les valeurs de $\log P$ augmentent) (Figure 44).

Ces résultats vont à l'encontre d'une précédente étude sur un modèle fromager qui n'avait montré aucun effet de la nature des composés d'arôme sur les valeurs de T_{max} (Pionnier *et al.*, 2004a), mais ils rejoignent les études de Brauss *et al.* (1999), Aprea *et al.* (2006), et Lauverjat (2009c) qui avaient également trouvé un décalage dans la libération des composés d'arôme selon leur hydrophobicité dans des yaourts, des crèmes desserts ou des modèles fromagers. Dans notre cas, le comportement du diacétyl (composé ayant la plus faible hydrophobicité, $\log P = -1.34$) est opposé à celui des autres composés : la valeur de T_{max_2} est la plus élevée (I_{max_2} arrive le plus tard pour ce composé), alors que la valeur de T_{max_1} est la plus basse de toutes (données non montrées pour T_{max_1}). Cela montre que les composés très hydrophiles sont libérés plus tard après déglutition, alors qu'ils sont libérés plus rapidement avant déglutition. Puisque les composés d'arôme sont plus ou moins hydrophobes selon leur nature, l'organisation des gouttelettes lipidiques dans la phase protéique va influencer leur transfert de la phase lipidique vers la phase aqueuse (Charles *et al.*, 2000). Dans chaque classe chimique (esters et cétones), les composés les plus hydrophobes ont une plus grande affinité pour les lipides et sont donc plus retenus (de Roos, 1997 ; Doyen *et al.*, 2001). Ainsi, leur libération est plus lente et l'intensité maximale de libération est atteinte plus tard.

Les effets de la composition sur le paramètre T_{max_2} sont résumés dans le Tableau 31, en considérant chacun des composés d'arôme.

Tableau 31 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur le paramètre T_{max_2}

Expérience	Composés d'arôme	↘ ratio L/P	↗ teneur en NaCl
Temps pour atteindre I_{max_2} (T_{max_2})	<i>Diacétyle</i>	↗	↘
	<i>Butanoate d'éthyle</i>	↗	↘ (tendance)
	<i>Hexanoate d'éthyle</i>	↗	↘
	<i>Heptan-2-one</i>	↗	↘
	<i>Octan-3-one</i>	↗	↘
	<i>Nonan-2-one</i>	↗	↘

En résumé, ce tableau montre que l'intensité maximale de libération après déglutition est atteinte plus tard (valeurs de T_{max_2} plus grandes) lorsque le ratio L/P diminue. L'effet du NaCl est aussi le même pour tous les composés, avec une diminution de T_{max_2} lorsque la teneur en NaCl augmente.

d. Comparaison des rapports des aires sous la courbe (après/avant la première déglutition) : ratio AUC_2/AUC_1

Comme le rappelle la courbe présentée au début du paragraphe 4 (Figure 41), le profil de libération comprend deux phases : avant et après déglutition. Ainsi, nous avons trouvé intéressant d'examiner le rapport des aires sous la courbe de ces deux phases. Comme pour I_{max} , les valeurs données d'aires sous la courbe de libération correspondent aux valeurs brutes (après lissage) divisées par les concentrations quantifiées des composés d'arôme. De plus, AUC totale et I_{max} présentent exactement les mêmes évolutions. Nous ne présenterons donc pas les résultats des aires totales sous la courbe (AUC), mais plutôt le rapport des valeurs moyennes de AUC_2 (pour chaque ion et chaque modèle fromager) sur les valeurs moyennes de AUC_1 (pour chaque ion et chaque modèle fromager) (Figure 45). Les écart-types ne figurent donc pas sur la figure. Les données de AUC totale seront mises en relation avec le nombre de déglutitions ultérieurement.

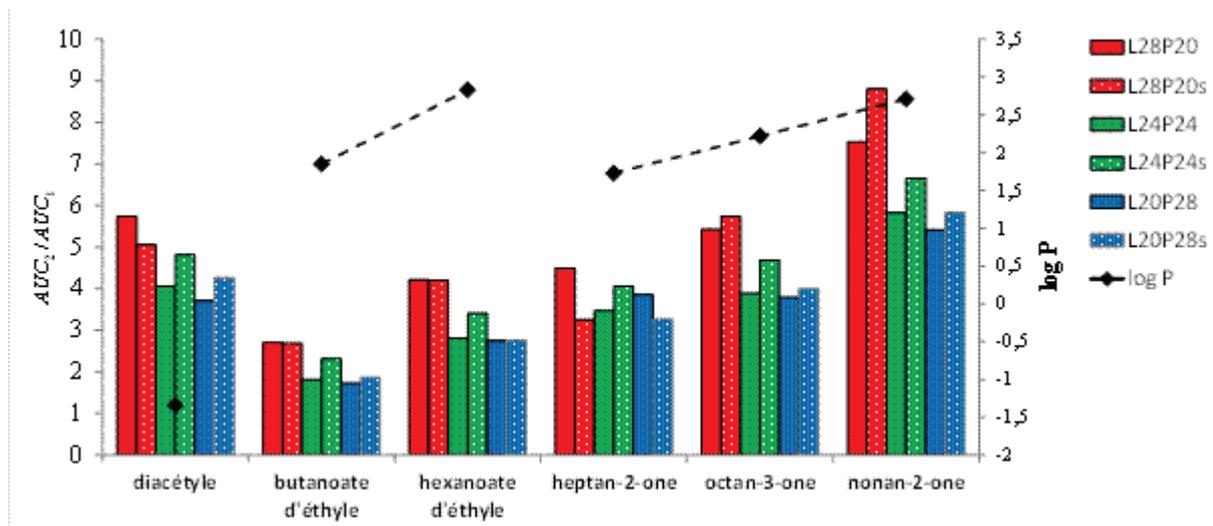


Figure 45 : Evolution du ratio AUC_2/AUC_1 en fonction des modèles fromagers pour chacun des composés d'arôme

Le ratio AUC_2/AUC_1 est toujours plus élevé que 1, signifiant que la quantité d'arômes libérés est toujours plus élevée après déglutition (AUC_2) qu'avant déglutition (AUC_1). La même observation a déjà été mentionnée par d'autres auteurs (Lauverjat *et al.*, 2009b ; Mestres *et al.*, 2006 ; Repoux *et al.*, 2012b). De plus, des corrélations ont été mises en évidence entre AUC_1 et $Imax_1$ ($r = 0,65$) et, moins significativement, entre AUC_2 et $Imax_2$ ($r = 0,49$).

i. Effet du ratio L/P sur AUC_2/AUC_1

Dans l'ensemble, le ratio AUC_2/AUC_1 est plus élevé quand le ratio L/P est plus haut, évoquant un effet du contenu lipides/protéines sur le profil de libération d'arômes (Figure 45). Les lipides agissent comme un réservoir pour les composés d'arôme et retardent leur libération après déglutition. Cela peut aussi être lié au fait que les modèles fromagers avec un ratio L/P plus élevé sont déglutis plus rapidement, laissant plus de temps après déglutition pour que les composés d'arôme soient libérés. Ceci se confirme par des valeurs de AUC_1 plus faibles que celles de AUC_2 . De plus, les produits à plus forte teneur en lipides ont tendance à laisser un film gras plus important après déglutition (Repoux *et al.*, 2012a), qui participe à la libération des composés d'arôme.

Le ratio L/P influence la libération des composés d'arôme en fonction de la nature des composés (Figure 45). Le ratio AUC_2/AUC_1 est significativement plus élevé pour les cétones que pour les esters ($p < 0,001$), mettant en évidence le fait que les cétones sont plus libérées

après déglutition que les esters. Repoux *et al.* (2012b) ont observé le même phénomène dans des fromages fondus, dans lesquels la libération de la nonan-2-one avait lieu principalement durant l'étape post-déglutition. De plus, le ratio AUC_2/AUC_1 augmente lorsque l'hydrophobicité des composés augmente dans chaque classe chimique (cétones et esters). En effet, pour les cétones, le ratio AUC_2/AUC_1 varie entre 5,4 et 8,8 pour la nonan-2-one ($\log P = 2,71$), alors qu'il varie entre 3,7 et 5,8 pour la octan-3-one ($\log P = 2,22$), et entre 3,2 et 4,5 pour la heptan-2-one ($\log P = 1,73$). Dans le même sens, pour les esters, le ratio AUC_2/AUC_1 varie entre 2,7 et 4,2 pour l'hexanoate d'éthyle ($\log P = 2,83$), alors qu'il varie entre 1,7 et 2,7 pour le butanoate d'éthyle ($\log P = 1,85$). Ces résultats peuvent s'expliquer par des modifications du coefficient de transfert de masse. En effet, les coefficients de transfert de masse lipides/eau diminuent quand l'hydrophobicité des composés augmente (Voilley, 2006). Cela expliquerait pourquoi les composés les plus hydrophobes sont libérés dans la salive plus lentement du fait de leur transfert plus lent entre les gouttelettes lipidiques et la phase aqueuse, ce qui entraîne une quantité d'arômes libérés avant déglutition plus faible. De plus, les produits à plus forte teneur en lipides ont tendance à laisser un film gras plus important après déglutition (Repoux *et al.*, 2012a). Ce film lipidique contient les composés les plus hydrophobes qui vont être libérés après déglutition (AUC_2).

ii. Effet de la teneur en NaCl sur AUC_2/AUC_1

Pour le composé le plus hydrophobe (nonan-2-one), l'effet du NaCl peut être clairement établi, avec une augmentation du ratio AUC_2/AUC_1 pour les versions avec NaCl ajouté. Cela pourrait être expliqué par l'augmentation de la taille des gouttelettes suite à l'ajout de NaCl. Les plus grosses gouttelettes retarderaient le transfert des composés d'arôme (Charles *et al.*, 2000) et décaleraient leur libération après déglutition.

Comme nous l'avons mentionné auparavant, l'aire totale sous la courbe de libération (AUC) a été mise en relation avec le nombre de déglutitions et est présentée ci-après.

e. Libération d'arômes *in vivo* et nombre de déglutitions

Bien qu'aucun effet significatif de la composition n'ait pu être identifié sur le nombre de déglutitions pendant la consommation, une relation intéressante entre ce nombre et la quantité de composés d'arôme libérés (*AUC*) a été mise en évidence. La Figure 46 illustre ce lien en présentant l'aire sous la courbe (ici pour la heptan-2-one) et le nombre de déglutitions pendant la consommation.

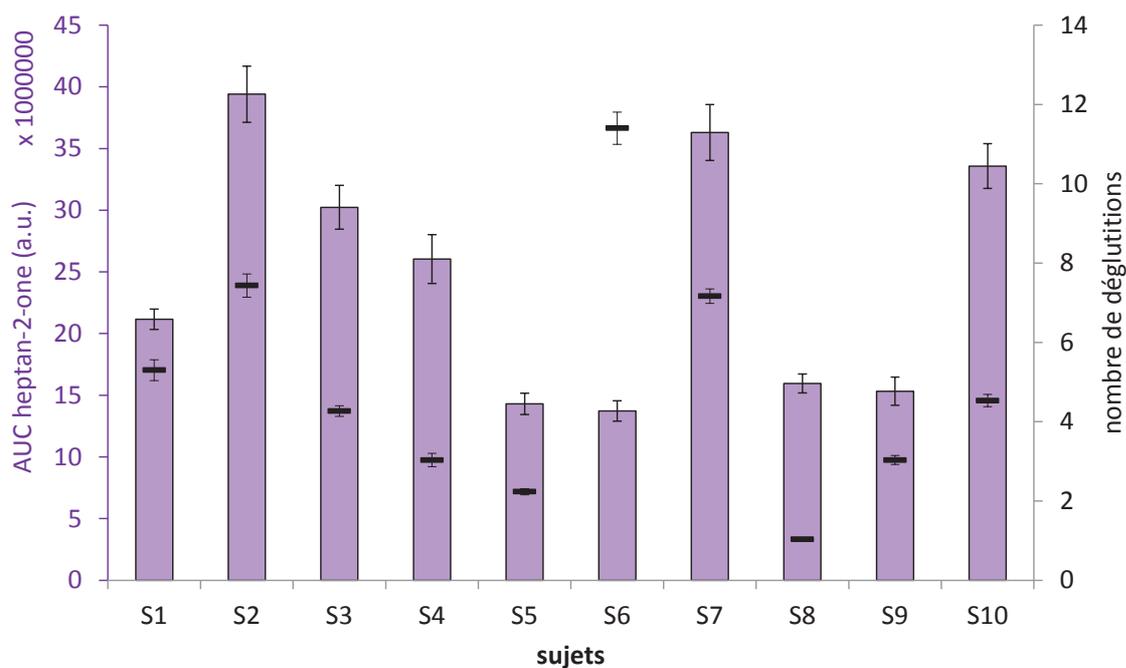


Figure 46 : Quantité d'arôme libéré (exemple de la heptan-2-one) et nombre de déglutitions pour les 10 sujets de l'étude

Les sujets présentant un nombre plus important de déglutitions présentent aussi une plus grande quantité d'arômes libérés (valeur plus élevée de *AUC*) (Figure 46). Ce lien entre *AUC* et le nombre de déglutitions existe pour tous les sujets (excepté pour le sujet S6), quelle que soit la quantité globale d'arômes qu'ils libèrent. Le sujet S6 présente un nombre étonnamment élevé de déglutitions, associé à une faible libération d'arômes. Cela peut être expliqué par un profil de mastication particulier (nombre de cycles de mastication extrêmement bas) qui conduit à une faible libération d'arômes, malgré un nombre élevé de déglutitions. En excluant le sujet S6, une corrélation ($r = 0,57$) a été mise en évidence entre le nombre de déglutitions et la quantité d'arômes libérés (*AUC*).

Cela peut être dû à une augmentation de la libération d'arômes après déglutition (Hodgson *et al.*, 2003) : la succession de déglutitions conduit à une augmentation globale de la libération d'arômes. De plus, la quantité d'arômes libérés est également corrélée au nombre de cycles masticatoires ($r = 0,69$) et à la durée de mastication ($r = 0,72$). Cela peut expliquer pourquoi certains sujets (par exemple les sujets S8 et S9) présentent des quantités similaires de libération d'arômes alors que leurs nombres de déglutitions sont différents. Par ailleurs, l'analyse des valeurs des aires sous les courbes (Figure 46) montre que trois groupes de sujets différents peuvent être considérés :

- le groupe des forts libérateurs (aires supérieures à $2,5 \cdot 10^7$ u.a.) avec les sujets S2, S7 et S10,
- le groupe des libérateurs moyens (aires entre $1,5 \cdot 10^7$ u.a. et $2,5 \cdot 10^7$ u.a.) avec les sujets S1, S3 et S4,
- le groupe des faibles libérateurs (aires inférieures à $1,5 \cdot 10^7$ u.a.) avec les sujets S5, S6, S8 et S9.

Malgré des différences de quantités d'arômes libérés, la relation entre *AUC* et le nombre de déglutitions existe pour les trois groupes de libérateurs (sauf pour le sujet S6), ce qui met en évidence l'important effet de la physiologie sur la libération des composés d'arôme.

L'étude de la libération des composés d'arôme en conditions *in vivo* a mis en évidence que cette libération était affectée à la fois par la mastication et par la déglutition dans un protocole de consommation libre, mais elle a également montré que la composition et la microstructure des produits gouvernaient la libération des composés d'arôme, avec un effet de rétention par la matrice des modèles fromagers.

Afin de savoir si la libération des composés d'arôme *in vivo* pouvait être expliquée par la libération des composés d'arôme *in vitro*, la quantité des composés d'arôme dans la phase vapeur a été étudiée à l'équilibre et est présentée dans le paragraphe suivant.

5. Etude de la quantité de composés d'arôme en phase vapeur à l'équilibre

A 25 °C, la quantité de composés d'arôme libérés dans la phase vapeur à l'équilibre était trop faible pour être bien détectable, du fait de la forte teneur en matière sèche des modèles fromagers (protéines + matière grasse), ces deux constituants étant reconnus pour ralentir la libération des composés d'arôme. Ainsi, nous avons choisi d'étudier la libération à 32 °C, ce qui correspond à la température en bouche (Fabre, 2002).

Sur la Figure 47, les résultats bruts sont représentés, c'est-à-dire les surfaces des pics des chromatogrammes, sans considération des concentrations respectives des composés d'arôme.

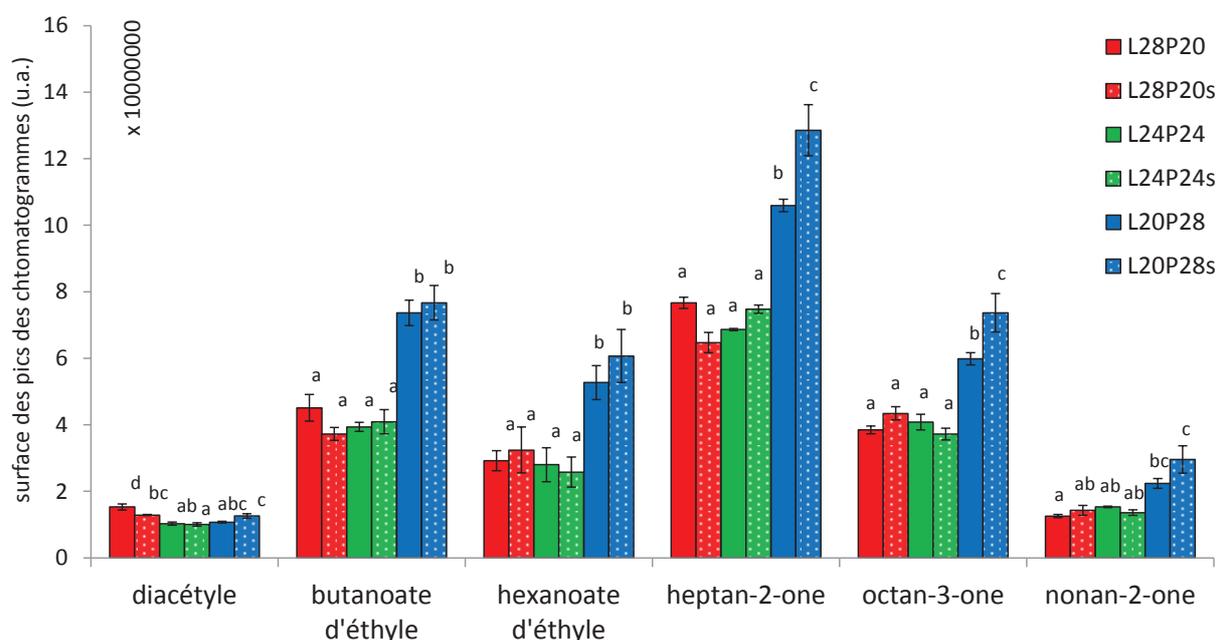


Figure 47 : Quantité de composés d'arôme dans la phase vapeur : surfaces des pics des chromatogrammes

a-d : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un composé d'arôme, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

L'analyse des résultats bruts montre que les quantités d'arômes dans la phase vapeur sont différentes en fonction des modèles fromagers, et notamment qu'une plus grande quantité d'arômes est libérée depuis les modèles fromagers possédant un ratio L/P de 20/28. Cela ne constitue pas une conclusion en tant que telle, mais cela confirme l'intérêt de la quantification des arômes car les différences de libérations peuvent être dues à des quantités d'arômes initiales différentes. En effet, avec la quantification des arômes, nous avons trouvé que les modèles fromagers avec un ratio L/P de 20/28 possédaient une plus grande quantité d'arômes que les autres.

Nous avons ensuite utilisé les mêmes données que précédemment, mais en les pondérant par les concentrations quantifiées après extraction. Les résultats pondérés sont représentés sur la Figure 48 ci-dessous.

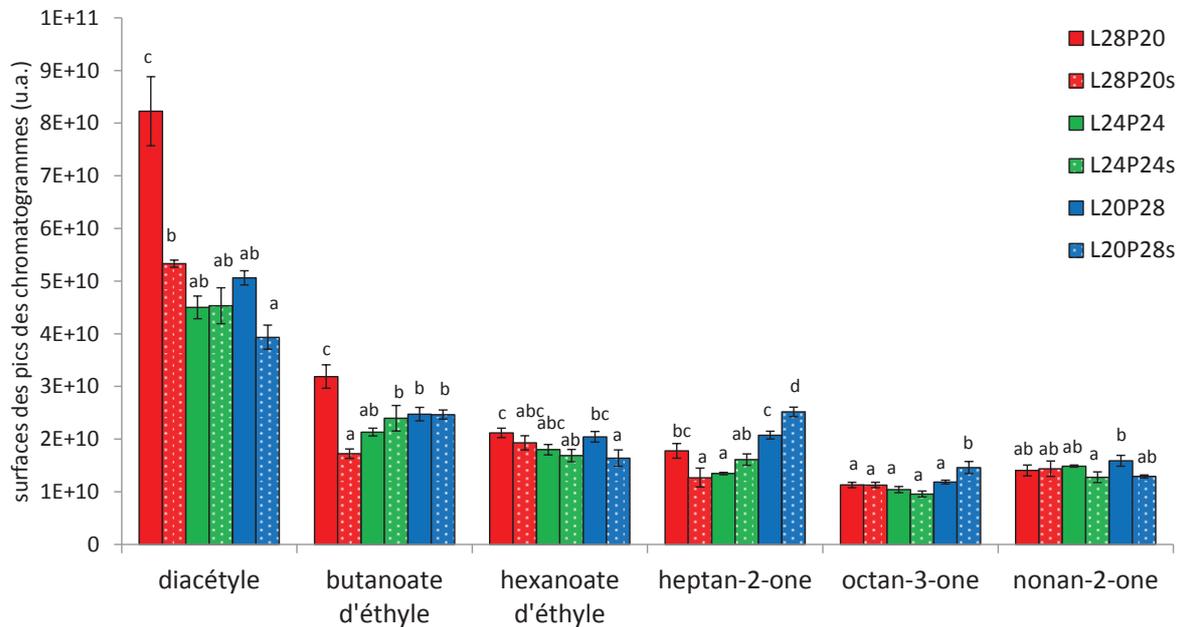


Figure 48 : Quantité d'arômes libérés dans la phase vapeur : surface des pics chromatographiques pondérée par les concentrations en arôme

a-d: les valeurs comportant des lettres différentes, pour un composé d'arôme, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

La Figure 48 montre que l'effet de la composition des modèles fromagers sur la libération des composés d'arôme dépend du composé d'arôme.

a. Effet du ratio L/P sur la quantité des composés d'arôme en phase vapeur

Pour le diacétyle, la quantité d'arômes dans la phase vapeur est significativement plus faible lorsque le ratio L/P diminue, du fait de la plus grande affinité de ce composé d'arôme hydrophile pour la phase protéique aqueuse. La même évolution est observée pour le butanoate d'éthyle dans les modèles fromagers sans NaCl, alors que pour les cétones, la quantité d'arômes dans la phase vapeur est globalement plus faible lorsque le ratio L/P augmente, ce qui est conforme avec une plus grande affinité pour la matière grasse de ces composés les plus hydrophobes.

b. Effet de la teneur en NaCl sur la quantité des composés d'arôme en phase vapeur

Dans tous les cas, l'effet du NaCl sur la quantité libérée des composés d'arôme en phase vapeur dépend du ratio L/P. Pour les esters et le diacétyl, un ajout de sel, lorsqu'il est significatif, tend à diminuer la quantité des composés d'arôme dans la phase vapeur, probablement car la microstructure associée est plus tortueuse. Pour les cétones, l'effet du NaCl est plus difficilement observable et varie selon les composés.

Les effets de la composition des modèles fromagers sur la quantité d'arômes libérés en phase vapeur (*in vitro*) sont résumés dans le Tableau 32, en considérant chacun des composés d'arôme.

Tableau 32 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur la quantité d'arômes dans la phase vapeur à l'équilibre, libérée depuis les modèles fromagers

Expérience	Composés d'arôme	↘ ratio L/P	↗ teneur en NaCl
Quantité d'arômes dans la phase vapeur	<i>Diacétyl</i>	↘	↘ (seulement pour 28/20)
	<i>Butanoate d'éthyle</i>	↘ (pour non salés) ↗ (pour salés)	↘ (seulement pour 28/20)
	<i>Hexanoate d'éthyle</i>	NS	↘ (seulement pour 20/28)
	<i>Heptan-2-one</i>	↗ (seulement pour salés)	↘ (pour 28/20) ↗ (pour 20/28)
	<i>Octan-3-one</i>	↗ (seulement pour salés)	↗ (pour 20/28)
	<i>Nonan-2-one</i>	NS	NS

En résumé, ce tableau montre que le ratio L/P et la teneur en NaCl influencent différemment la quantité de composés d'arôme dans la phase vapeur à l'équilibre selon les composés d'arôme.

Après avoir décrit l'ensemble des résultats de mobilité et de libération du sodium et des composés d'arôme, nous nous sommes demandés comment les différences de libération du sodium et des composés d'arôme pouvaient être perçues lors de la consommation des modèles fromagers. Nous avons donc réalisé un profil sensoriel des produits afin d'étudier la perception du NaCl et la perception des composés d'arôme.

IV. Etudes de la perception sensorielle des modèles fromagers

Le profil sensoriel permet d'obtenir la cartographie des caractéristiques sensorielles des produits. Il a été mené avec les descripteurs sensoriels perçus en bouche, générés par le panel de dégustateurs : descripteurs de texture (morcellement, dureté, compact, élastique, gras en bouche, lisse en bouche et collant), saveur salée et descripteur d'arôme (intensité aromatique globale, note fruitée, note lactée et note beurre) (cf. Tableau 11).

Afin de s'assurer que les notations effectuées par le panel sur les descripteurs en bouche étaient exploitables, nous avons étudié les performances du panel et les résultats sont présentés ci-après.

1. Performances du panel

Les performances globales et individuelles ont été analysées en vue d'orienter le profil mais aussi en vue d'avoir un aperçu des capacités du panel. Voici une sélection des résultats statistiques les plus pertinents ayant permis de rendre compte de la qualité du panel au cours des séances d'entraînement du profil.

a. Le pouvoir discriminant

A l'échelle du panel, une représentation graphique a permis d'évaluer la capacité à discriminer les produits sur chacun des descripteurs. Une comparaison entre les 3 répétitions du premier mois du profil (mai) et les 3 répétitions du mois suivant (juin) a permis de visualiser directement l'évolution de la compréhension des descripteurs (Figures 49 et 50).

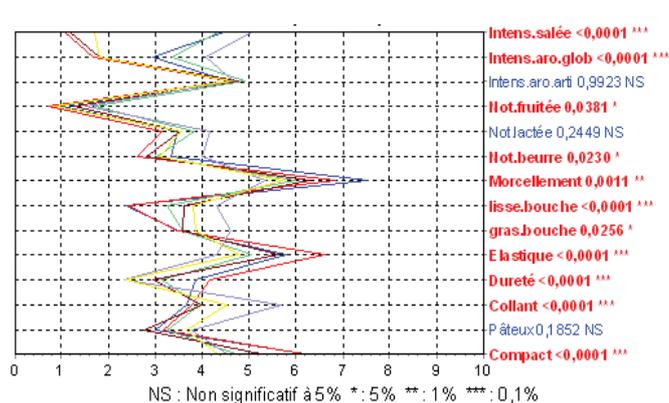


Figure 49 : Pouvoir discriminant (ANOVA) du panel au mois de mai

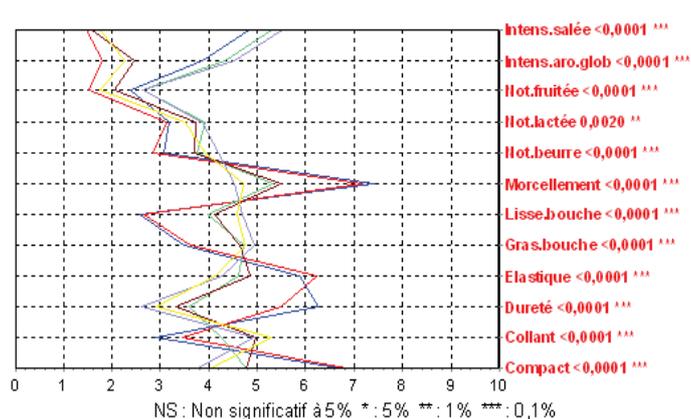


Figure 50 : Pouvoir discriminant (ANOVA) du panel au mois de juin

Entre mai et juin, la discrimination des produits par le panel s'est visiblement améliorée (3 descripteurs non significatifs en mai, à plus aucun descripteur non significatif en juin). Seul le descripteur « note lactée » a été un peu plus difficile à assimiler. Les panélistes différenciaient moins bien les produits pour ce descripteur.

b. L'accord

L'accord individuel de chaque juge avec le panel a été mis en évidence pour le mois de mai et le mois de juin (Tableaux 33 et 34). Le code couleur permet de visualiser l'évolution positive de l'accord entre les deux mois : la plus grande proportion d'éléments verts et la moins grande proportion d'éléments rouges entre les mois de mai et juin montre une amélioration de l'accord entre les panélistes. Les seuils respectifs (pour la validité de l'accord) étaient de 60 % pour le mois de mai et 75% pour le mois de juin. Les juges ont donc développé leurs capacités d'accord individuel pour chacun des descripteurs au cours des séances d'entraînement.

Tableau 33 : Accord individuel de chaque juge avec le panel (mai)

	PS00215	PS02584	PS03699	PS04011	PS04407	PS05230	PS05397	PS07320	PS07681	PS08889	PS09980	PS10046	PS10402	PS10861	PS10864
Intens_sallee															
AromGlob															
Durete															
Compact															
Morcellement															
Collant															
Lisse															
Gras															
Fruite															
Beurre															
Elastique															
Lacte															

Tableau 34 : Accord individuel de chaque juge avec le panel (juin)

	PS00215	PS02584	PS03699	PS04011	PS04407	PS05230	PS05397	PS07320	PS08889	PS09980	PS10046	PS10402	PS10858	PS10861
Intens_sallee														
AromGlob														
Durete														
Compact														
Morcellement														
Collant														
Lisse														
Gras														
Fruite														
Beurre														
Elastique														
Lacte														

Légende :

- Accord avec le reste du groupe
- En voie de progression
- Absence d'accord avec le reste du groupe

c. La répétabilité

L'évolution de la répétabilité n'est pas présentée car il s'agit d'un paramètre plus subtil à évaluer, très variant au fil des séances. En effet, la répétabilité de notation peut augmenter, puis diminuer. Elle ne reflète pas nécessairement la performance des sujets. En effet, certains sujets ont présenté une répétabilité plus prononcée que d'autres. Il est difficile pour un être humain d'être répétable à 100%. Cependant, être répétable ne signifie pas pour autant être performant. Des sujets peuvent avoir une bonne répétabilité, noter de la même manière d'une séance à l'autre mais avoir des difficultés dans la compréhension du descripteur et présenter des performances discriminantes faibles. C'est pourquoi, pour cette étude, nous avons privilégié des sujets avec un pouvoir discriminant élevé. Les sujets ont donc compris les descripteurs, même s'ils ne notent pas exactement de la même façon d'une séance à l'autre. De plus, les sujets possédaient finalement peu de séances pour augmenter leur répétabilité. Des profils se déroulant sur plusieurs mois sont nécessaires pour augmenter réellement la répétabilité.

Une ANOVA complémentaire indiquant le pouvoir discriminant global a été réalisée (Figure 51).

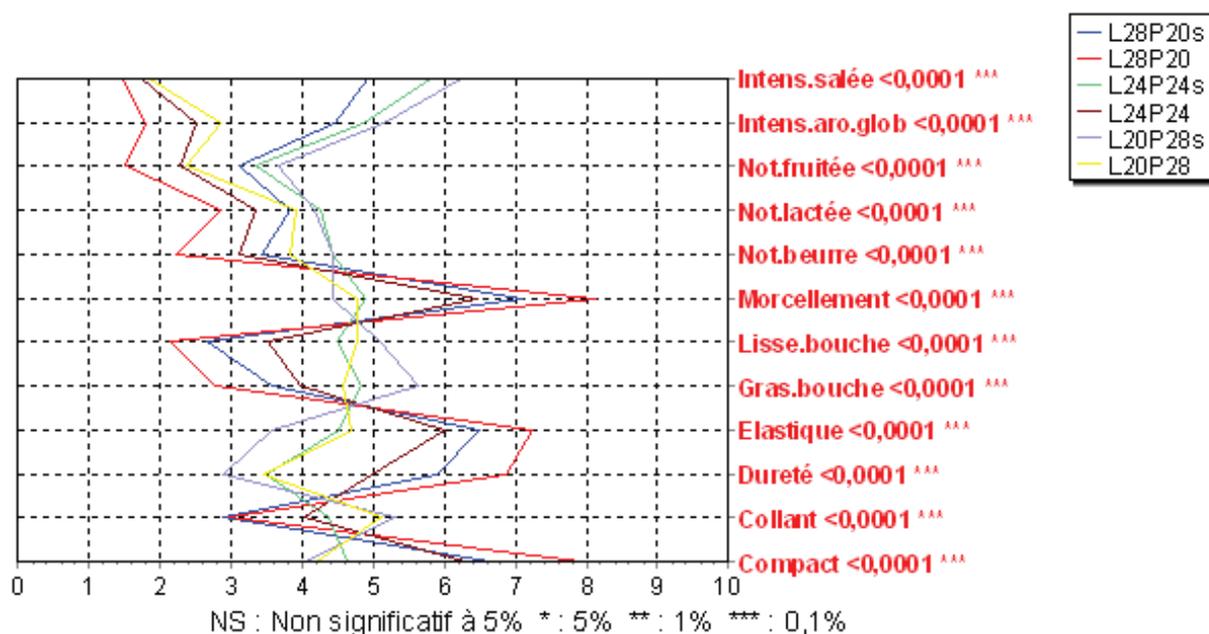


Figure 51 : Pouvoir discriminant (ANOVA) du panel lors des séances de mesures

Cette analyse a permis de vérifier la bonne compréhension des descripteurs par le panel. Les sujets sont parvenus à faire une différence entre les produits pour chacun des descripteurs (*Pvalue* du *Fproduit* très significative, $p < 0,001$).

A l'issue de l'entraînement, les panélistes ont été évalués comme discriminants, en accord, et répétables, par chacun des tests statistiques effectués. Ainsi, les séances de mesures des produits ont été effectuées avec un panel qui a compris les différents descripteurs et qui a été capable de faire des différences entre les produits pour chacun des descripteurs. De plus, le panel est composé de juges capables d'être en accord entre eux sur la majorité des descripteurs.

Par ailleurs, lors de la réalisation des ANOVA, un effet "sujet" a été trouvé pour chaque descripteur, ce qui signifie que les panélistes n'utilisent pas exactement de la même façon l'échelle de notation (Lawless & Heymann, 1999). Un effet "sujet" significatif est fréquent, même dans le cas d'un panel très entraîné (Lawless & Heymann, 1999). Cela n'affecte en rien les conclusions sur les produits étudiés. Les résultats obtenus suite aux séances de mesure des six modèles fromagers sont présentés dans les paragraphes suivants.

2. Caractérisation sensorielle globale des modèles fromagers par analyse en variables canoniques (AVC)

Tout d'abord, une caractérisation sensorielle globale des modèles fromagers a été effectuée par AVC. Cette analyse s'apparente à une ACP des moyennes des produits qui tient compte de la dispersion des notes des sujets autour de chaque moyenne (Figure 52). Les descripteurs de texture (morcellement, dureté, compact, élastique, gras en bouche, lisse en bouche et collant), la saveur salée et les descripteurs d'arôme (intensité aromatique globale, note fruitée, note lactée et note beurre) figurent sur cette représentation. Chaque descripteur perçu en bouche est représenté par un segment de droite : plus le segment est grand, plus le descripteur participe à la discrimination des produits. Les produits sont représentés par des étoiles bleues. La caractérisation des produits se fait par projection perpendiculaire sur le segment du descripteur correspondant. Les cercles correspondent à des ellipses de confiance (indice de confiance de 90%). S'ils ne sont pas superposés, les produits sont jugés significativement différents selon cette représentation.

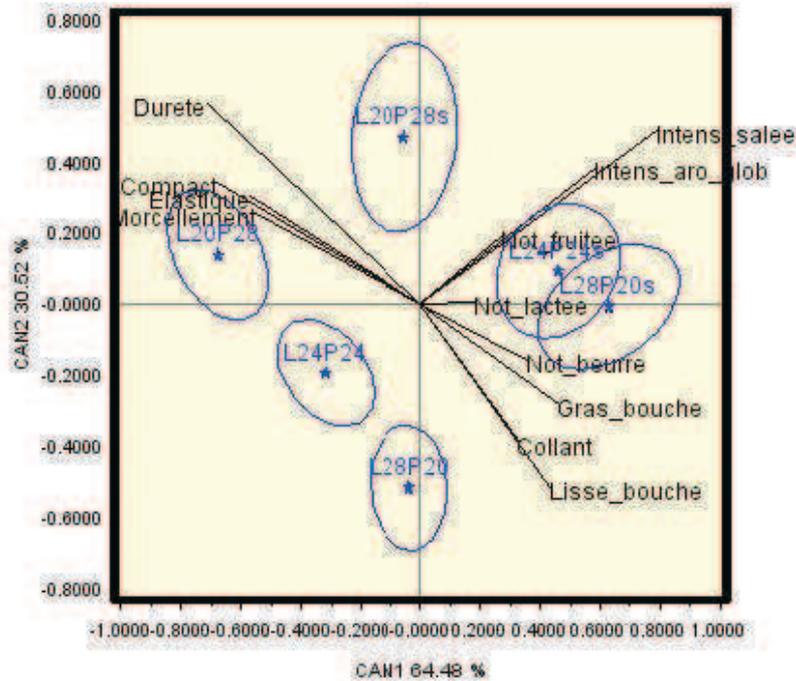


Figure 52 : Analyse en variables canoniques (AVC) de la perception des six modèles fromagers

Cette représentation AVC apporte un premier aperçu des caractéristiques des produits et de leurs descripteurs. Elle est commentée dans les paragraphes ci-dessous.

a. Effet du ratio L/P sur les caractéristiques sensorielles des modèles fromagers (AVC)

Le plan 1-2 sépare les descripteurs de texture en opposant les descripteurs tels que morcellement, élastique, compact et dureté, aux descripteurs tels que lisse en bouche, gras en bouche et collant (Figure 52). Les modèles fromagers sont très bien associés aux descripteurs de texture selon leurs ratios L/P. En effet, les modèles fromagers possédant le ratio L/P égal à 20/28 sont plus proches des descripteurs morcellement, élastique, compact et dureté, que les modèles ayant un ratio 24/24 ou 28/20. A l'inverse, les modèles fromagers possédant le ratio L/P égal à 28/20 sont plus proches des descripteurs lisse en bouche, gras en bouche et collant que les modèles ayant un ratio 24/24 ou 20/28. A l'exception de L24P24s et L28P20s qui présentent des caractéristiques voisines sur cette représentation, les autres produits sont bien différenciés (ellipses indépendantes).

b. Effet de la teneur en NaCl sur les caractéristiques sensorielles des modèles fromagers (AVC)

Dans le plan 1-2 de la représentation AVC, l'intensité salée (et dans une moindre mesure l'intensité de l'arôme global) est projetée perpendiculairement aux descripteurs de texture, ce qui signifie que la saveur salée n'est pas corrélée avec les descripteurs de texture (Figure 52). Les trois modèles fromagers avec NaCl ajouté (L28P20s, L24P24s et L20P28s) se différencient bien des modèles sans NaCl (L28P20, L24P24 et L20P28). En revanche, les notes aromatiques (note lactée, note beurre, note fruitée) semblent, quant à elles, moins bien représentées. Il y a moins de différences entre les produits pour ces descripteurs.

Afin d'avoir une différenciation plus fine des produits entre eux, une ANOVA et un test LSD de Fisher ont été réalisés.

3. Caractérisation sensorielle des modèles fromagers par analyse de la variance (ANOVA) et test LSD de Fisher sur chaque descripteur

Dans ce paragraphe, les résultats pour les descripteurs sensoriels de texture seront, tout d'abord, présentés. Ils seront divisés en deux catégories de descripteurs de texture (en lien avec la mastication et en lien avec la formation du bol alimentaire), d'après les associations de la représentation AVC (Figure 52). Ensuite, la saveur salée et l'arôme (intensité aromatique, note fruitée, note lactée et note beurre) seront analysés.

a. Descripteurs sensoriels de texture en bouche

i. Descripteurs sensoriels de texture en lien avec la mastication

Les intensités de quatre des descripteurs de texture sont présentées sur la Figure 53. Il s'agit des descripteurs évalués en mastiquant le produit (entre les dents).

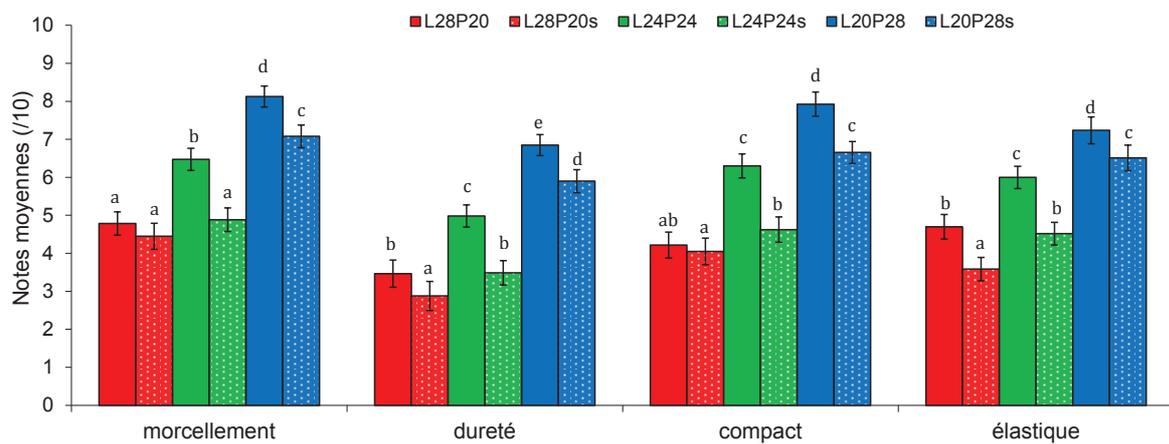


Figure 53 : Notation des descripteurs morcellement, dureté, compact et élastique pour les six modèles fromagers

a-e : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

- **Effet du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur la perception des descripteurs de texture (mastication)**

Un effet significatif du ratio L/P a été mis en évidence sur la notation des descripteurs de texture : morcellement, dureté, compact et élastique ($p < 0,001$). L'intensité de ces descripteurs est plus importante lorsque le ratio L/P est faible. En revanche, l'intensité est significativement plus faible pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté ($p < 0,001$). Pour les descripteurs morcellement et dureté, ces observations sensorielles rejoignent les mesures instrumentales préalablement effectuées (mesures de rhéologie) et qui indiquent à la fois une augmentation de la résistance des modèles fromagers lorsque le ratio L/P diminue, et une diminution de la résistance pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté. Cela confirme le vocabulaire sensoriel généré : lorsque le ratio L/P diminue, les modèles fromagers sont perçus comme étant plus durs, plus compacts et formant de petits morceaux en bouche lors de la mastication (morcellement en bouche). Les mesures sensorielles et instrumentales évoluent dans le même sens, ce qui signifie que les différences de composition et de structure des modèles fromagers ont engendré des modifications significatives des descripteurs sensoriels de texture. De ce fait, les données sensorielles permettent de préciser les différences entre les produits.

- **Cas particulier du descripteur élastique**

La Figure 54 présente les valeurs d'intensité pour le descripteur sensoriel élastique, mises en regard des valeurs du module de déformabilité obtenues rhéologiquement et présentées antérieurement dans ce manuscrit.

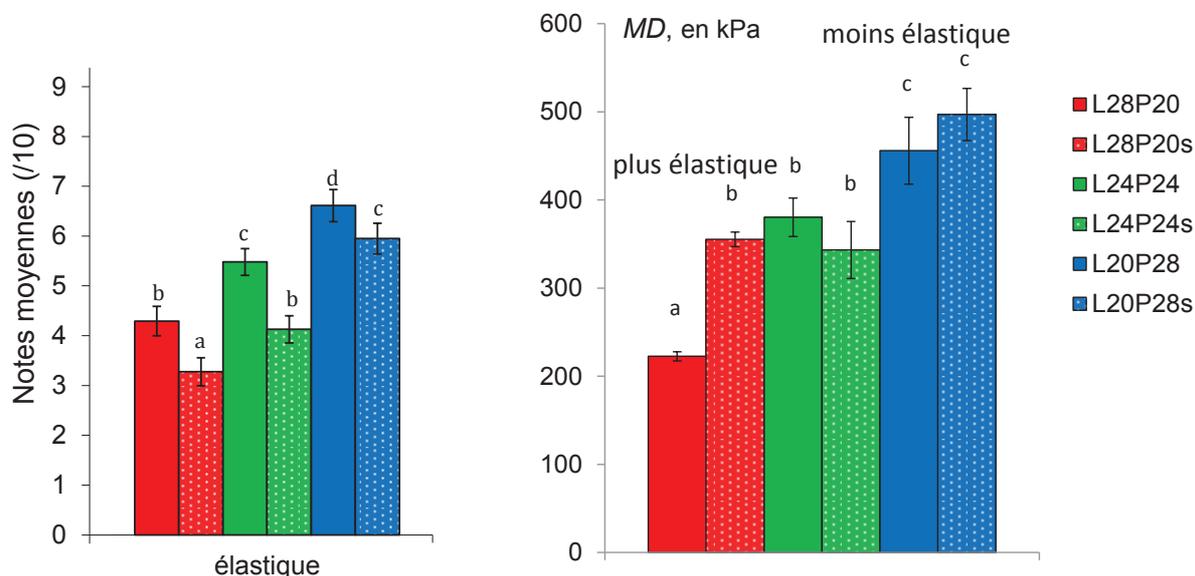


Figure 54 : Comparaison de l'élasticité sensorielle et du module de déformabilité (élasticité rhéologique) pour les six modèles fromagers

Le descripteur sensoriel élastique évolue à l'inverse de l'élasticité rhéologique (le module de déformabilité *MD* reflétant l'inverse de l'élasticité rhéologique) (Figure 54). En effet, les valeurs de *MD* montrent que les modèles fromagers ayant le ratio L/P le plus faible sont les moins élastiques d'un point de vue rhéologique (*MD* plus élevée). D'un point de vue sensoriel, l'élasticité évaluée est supérieure pour les modèles fromagers ayant le plus faible ratio L/P. Une diminution d'élasticité suite à l'ajout de sel est perçue sensoriellement pour les trois ratios L/P alors que l'élasticité rhéologique ne diminue que pour le ratio 28/20 (augmentation de *MD*). Ces résultats confirment de précédents travaux ayant montré les divergences entre élasticité sensorielle et élasticité rhéologique (Noel *et al.*, 1996). En réalité, le terme élastique ne correspond pas aux mêmes concepts dans les deux cas. L'élasticité rhéologique désigne la propriété d'un corps à revenir à sa forme initiale après déformation, alors que l'élasticité sensorielle a été définie par le panel de dégustateurs comme désignant des produits caoutchouteux, qui résistent à la mastication. En ce sens, l'élasticité sensorielle est, peut-être, à comparer davantage à la résistance rhéologique qu'à l'élasticité rhéologique.

ii. Descripteurs sensoriels de texture en lien avec la formation du bol alimentaire

Les trois autres descripteurs de texture analysés par le panel sont présentés sur la Figure 55.

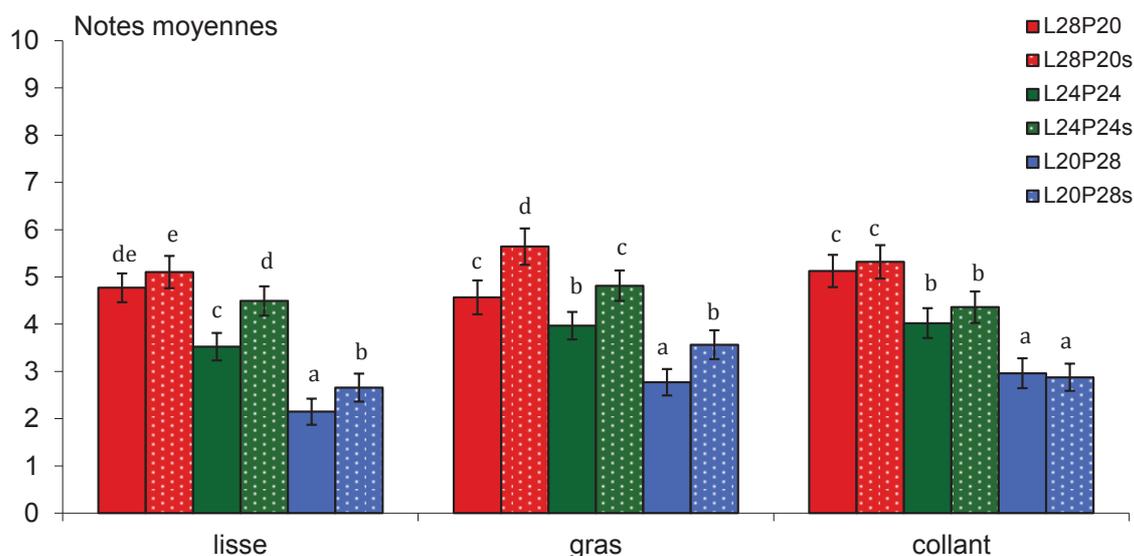


Figure 55 : Notation des descripteurs lisse, gras et collant pour les six modèles fromagers
a-e : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

- **Effet du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur la perception des descripteurs de texture (formation du bol alimentaire)**

Un effet significatif du ratio L/P a été mis en évidence sur la notation des descripteurs de texture : lisse, gras et collant ($p < 0,001$). L'intensité de ces descripteurs est plus importante lorsque le ratio L/P est plus élevé. En effet, le phénomène de tapissage en bouche (« mouth coating ») par la matière grasse est plus élevé pour les fromages les plus riches en matière grasse (Repoux *et al.*, 2012a), ce qui explique qu'ils soient perçus plus gras en bouche. Ce tapissage est également à l'origine de la perception du caractère lisse en bouche.

L'effet du NaCl n'est observable que pour les descripteurs lisse et gras avec une intensité perçue significativement plus élevée de ces deux descripteurs pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté ($p < 0,001$). La taille plus importante des gouttelettes lipidiques, observée microscopiquement dans les modèles fromagers avec NaCl ajouté, pourrait induire un tapissage en bouche plus important et donc une intensité plus élevée des caractères gras et lisse en bouche. Par ailleurs, ce résultat peut également provenir d'une interaction entre perception salée et perception du gras (Lawrence *et al.*, 2012), avec un effet « exhausteur » de l'une pour l'autre. Le descripteur collant n'est, quant à lui, pas affecté par la teneur en NaCl.

iii. Relations entre la texture sensorielle et les mesures rhéologiques

Une ACP prenant simultanément en compte les notes des juges pour les descripteurs de texture et les mesures instrumentales de déformabilité, contrainte et résistance est présentée sur la Figure 56.

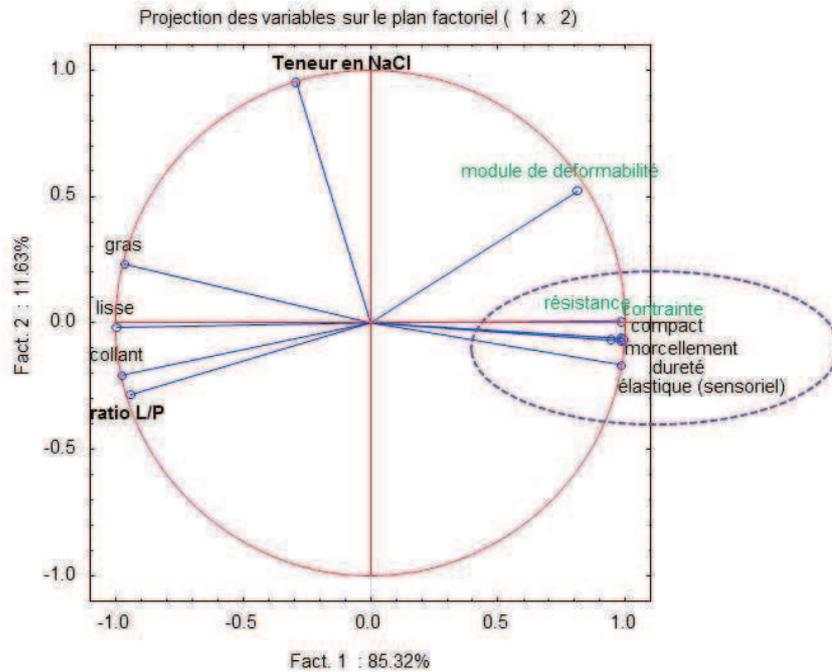


Figure 56 : Représentation ACP des descripteurs de texture et des mesures rhéologiques effectuées sur les modèles fromagers

La représentation ACP permet de confirmer les corrélations et les oppositions mises en évidence précédemment. Ainsi, la résistance et la contrainte (rhéologique) sont corrélées aux descripteurs de texture désignant des produits compacts, morcelés, durs et élastiques. En revanche, l'élasticité sensorielle et le module de déformabilité ne sont pas associés sur l'ACP. Ils ne désignent pas la même notion. Ceci confirme que les données obtenues expérimentalement ne peuvent pas toujours être corrélées aux mesures sensorielles. L'extrapolation n'est pas toujours possible. Ceci est dû au fait que la perception de la texture en bouche est une action multimodale, pas seulement mécanique. En effet, la perception de la texture est un phénomène complexe, qui fait également intervenir des phénomènes tactiles et kinesthésiques (Meilgaard *et al.*, 1991).

Après nous être intéressés aux descripteurs de texture perçus en bouche, nous avons étudié les descripteurs sensoriels de la saveur (saveur et arôme).

b. Description de la saveur salée

Dans le cas de note étude, seule la saveur salée a été étudiée car c'est la seule saveur qui a été identifiée dans les modèles fromagers par le panel de dégustateurs. La Figure 57 ci-dessous présente les notes obtenues par les six modèles fromagers pour l'intensité salée.

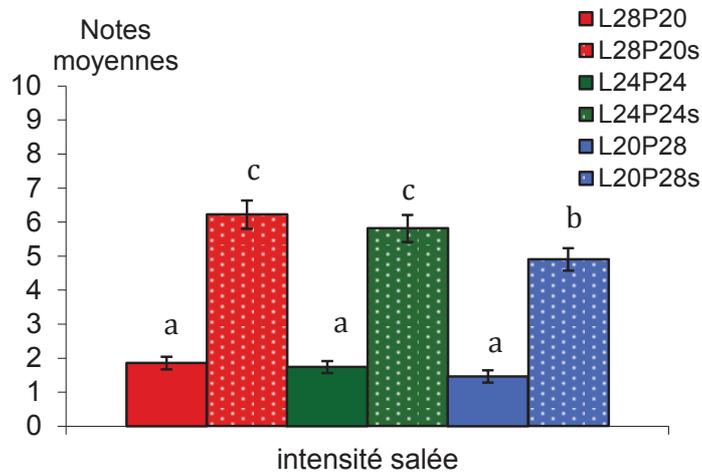


Figure 57 : Notation de l'intensité salée pour les six modèles fromagers

a-c : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

i. Effet de la teneur en NaCl sur l'intensité salée des modèles fromagers

Les différences de teneurs en NaCl des produits ont bien été perçues par les sujets puisque les produits avec et sans NaCl ajouté sont significativement différents. Les 3 modèles fromagers sans NaCl ajouté se trouvent dans le même groupe statistique et possèdent les notes les plus basses d'intensité salée. La notation n'est cependant pas nulle, ce qui indique que les sels de fonte, même seuls, participent à l'intensité salée. Les modèles fromagers avec NaCl ajouté possèdent les notes les plus hautes avec un écart de plus de 4 points sur une échelle de 10 points. Des différences significatives d'intensité existent entre les produits avec NaCl ajouté, qui peuvent s'expliquer par des différences de composition ou de structure des modèles fromagers.

ii. Effet du ratio L/P sur l'intensité salée des modèles fromagers

Le ratio L/P n'affecte pas la notation des trois modèles fromagers sans NaCl ajouté. En revanche, à l'échelle des produits avec NaCl, une subdivision peut être observée : le modèle L20P28s est noté significativement moins salé que les modèles L24P24s et L28P20s.

L'absence de différence significative d'intensité salée entre les modèles L28P20s et L24P24s explique la proximité de ces deux modèles fromagers sur la représentation AVC. La perception salée est plus intense lorsqu'il y a plus de matière grasse dans le produit. Ceci peut s'expliquer par la présence d'interactions perceptives entre la perception salée et la perception

du gras (Lawrence *et al.*, 2012), avec un effet « exhausteur » de l'une pour l'autre. Dans notre cas, les modèles **plus gras** sont **notés plus salés**, et les modèles **plus salés** sont **notés plus gras** en bouche.

La perception salée peut également être reliée à la mobilité des ions sodium observée par RMN. Ce type de relation n'a été que très peu étudié, mais nous pouvons citer les travaux de Rosett *et al.* (1997) sur des soupes, qui ont montré que la moindre mobilité du sodium (et sa liaison aux caséines) provoquait une diminution de la saveur salée. De plus, il a été montré précédemment, dans ce manuscrit, que les ions sodium étaient moins mobiles et qu'ils étaient moins libérés dans la salive pour les modèles fromagers avec un ratio L/P bas. Ainsi, la perception salée s'expliquerait par la mobilité des ions sodium dans le produit et par leur libération en bouche, contrairement à de précédentes études qui montraient une relation inverse entre libération du sodium en bouche et perception salée (Lawrence *et al.*, 2012 ; Phan *et al.*, 2008). En revanche, l'effet du sodium lié ne peut pas être un argument d'explication pour la perception salée car aucune différence entre les quantités de sodium lié n'a pu être mise en évidence entre les modèles fromagers avec NaCl ajouté.

c. Descripteurs sensoriels de l'arôme

La Figure 58 présente les notes obtenues par les six modèles fromagers pour l'intensité aromatique globale perçue en bouche lors de la consommation, et pour l'intensité des notes fruitée, lactée et beurre.

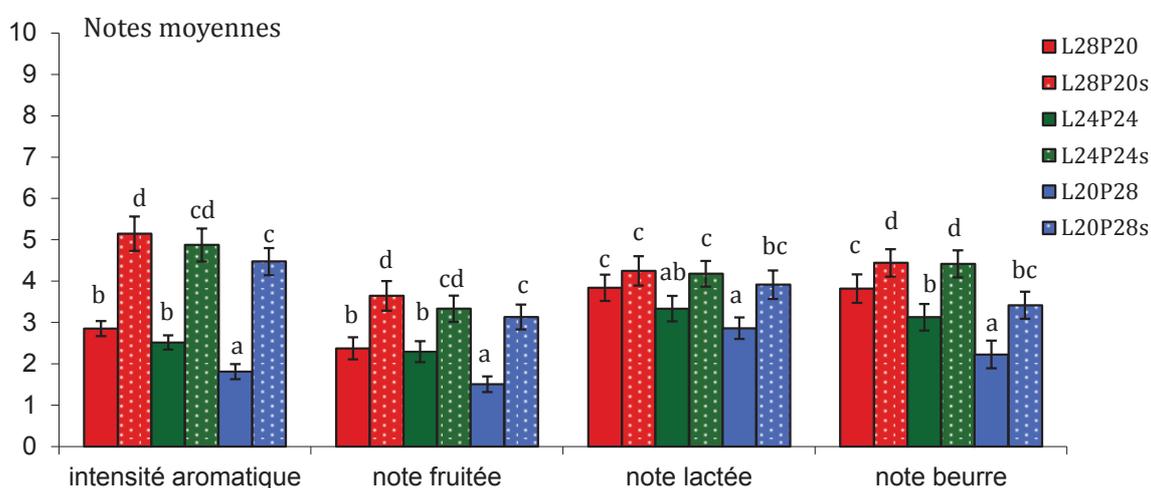


Figure 58 : Notation de l'intensité aromatique globale, de la note fruitée, de la note lactée et de la note beurre pour les six modèles fromagers

a-d : les valeurs comportant des lettres différentes, pour un même paramètre, sont significativement différentes ($p < 0,05$, test LSD de Fisher).

L'intensité aromatique globale se décompose en plusieurs notes (fruitée, lactée, beurre) qui évoluent de manière similaire et selon le même profil que l'intensité aromatique globale.

i. Effet de la teneur en NaCl sur l'intensité des descripteurs sensoriels de l'arôme

Les intensités des descripteurs sensoriels de l'arôme sont significativement plus faibles pour les modèles fromagers sans NaCl que pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté ($p < 0,001$) (Figure 58). L'augmentation de l'intensité aromatique lorsque la teneur en agent sapide augmente a déjà été observée avec du NaCl ou du sucre (Cook *et al.*, 2003 ; Lethuaut *et al.*, 2005). La différence de notation entre les modèles fromagers sans NaCl et avec NaCl est plus importante pour l'intensité aromatique globale que pour les autres notes particulières qui la compose. Ceci peut s'expliquer par un effet cumulatif des notes aromatiques en mélange (Berglund *et al.*, 1976).

ii. Effet du ratio L/P sur l'intensité des descripteurs sensoriels de l'arôme

L'effet du ratio L/P sur l'intensité des descripteurs sensoriels de l'arôme des modèles fromagers est significatif à la fois pour les modèles fromagers sans NaCl et pour ceux avec NaCl ajouté ($p < 0,001$). Plus le ratio L/P est élevé, plus l'intensité des descripteurs sensoriels de l'arôme est élevée. Ceci peut être expliqué par la libération des arômes en bouche lors de la consommation. En effet, le suivi de cette libération jusque dans la cavité nasale a montré que les composés d'arôme étaient plus libérés en présence d'un ratio L/P plus élevé. De plus, la persistance des composés d'arôme en bouche est peut-être plus importante à cause d'un tapissage plus important en bouche par la matière grasse. Par ailleurs, la note beurre est perçue plus intense dans les modèles fromagers pour lesquels le ratio L/P est plus élevé. Ce sont ces mêmes modèles fromagers qui étaient également perçus comme plus gras en bouche. Ainsi, cela peut montrer une interaction entre perception de la texture (gras en bouche) et perception aromatique (note beurre).

Les effets de la composition des modèles fromagers sur les intensités des descripteurs sensoriels perçus lors de la consommation des modèles fromagers sont résumés dans le Tableau 35.

Tableau 35 : Récapitulatif des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur la perception sensorielle des modèles fromagers

Catégorie	Descripteurs	↘ ratio L/P	↗ teneur en NaCl
Descripteurs de texture	<i>Morcellement</i>	↗	↘
	<i>Dureté</i>	↗	↘
	<i>Compact</i>	↗	↘
	<i>Elastique</i>	↗	↘
	<i>Gras en bouche</i>	↘	↗
	<i>Lisse en bouche</i>	↘	↗
	<i>Collant</i>	↘	pas d'effet
Descripteur de saveur	<i>Intensité salée</i>	↘	↗
Descripteurs d'arômes	<i>Intensité aromatique globale</i>	↘	↗
	<i>Notes aromatiques spécifiques</i>	↘	↗

En résumé, ce tableau montre qu'une diminution du ratio L/P a pour conséquence une augmentation d'intensité des descripteurs morcellement, dureté, compact et élastique ; une diminution des descripteurs gras en bouche, lisse en bouche et collant ; et une diminution d'intensité de tous les descripteurs de la saveur (saveur et arôme). Par ailleurs, les notations des descripteurs évoluent de manière inverse suite à une augmentation de la teneur en NaCl.

Les différentes techniques employées dans le cadre de ce projet de thèse ont permis de mieux comprendre les relations entre la mobilité du sodium, la libération du NaCl et des composés d'arôme (dans l'eau et en bouche), et la perception des modèles fromagers. Afin d'approfondir la réflexion concernant les résultats obtenus par ces différentes techniques, la partie suivante propose une discussion générale des résultats, suivie d'une conclusion et des perspectives de travail.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce travail a permis d'étudier les relations entre mobilité du sodium, libération du sel et des composés d'arôme et perception de la flaveur dans des modèles fromagers.

Après avoir caractérisé les propriétés rhéologiques et la microstructure, et après s'être assuré que le pH et la teneur en matière sèche ne variaient pas significativement entre les modèles fromagers, nous avons étudié l'impact de la composition des modèles fromagers sur ces phénomènes de mobilité, de libération et de perception. Dans cette partie, nous proposons de discuter les résultats et d'approfondir leur interprétation, en prenant pour point de départ la perception des modèles fromagers et en l'expliquant par les mécanismes que nous avons étudiés, de l'échelle macroscopique jusqu'à l'échelle moléculaire.

Dans un premier temps, nous allons discuter les résultats relatifs à la perception salée. Nous avons mis en évidence des différences de perception salée entre les modèles fromagers, non seulement en modifiant la teneur en NaCl, mais aussi en modifiant la composition en lipides et protéines. Les résultats de perception salée des modèles fromagers peuvent être expliqués par la libération du sodium en bouche lors de la consommation des modèles fromagers. En effet, à teneur en sodium équivalente ($10,6 \text{ g.kg}^{-1}$), les modèles fromagers plus riches en lipides et moins riches en protéines ont été perçus plus salés et ont conduit à une libération de sodium plus rapide et plus importante en bouche que les autres modèles fromagers. Ce pulse initial de sodium, ainsi que la quantité plus importante de sodium libéré en bouche ont augmenté la quantité d'ions Na^+ parvenant aux récepteurs gustatifs, et ont ainsi augmenté l'intensité salée perçue. Dans un deuxième temps, outre une libération de sodium plus importante en bouche, les modèles fromagers avec le ratio L/P le plus élevé sont également ceux qui présentent la plus grande mobilité des ions Na^+ au sein de la phase protéique. Cette plus grande mobilité a été expliquée par une phase protéique plus hydratée et une microstructure associée plus lâche, laissant plus d'espaces pour de plus grosses gouttelettes lipidiques. Ainsi, dans le cadre de notre étude, la perception salée des modèles fromagers peut être expliquée par la libération du sodium en bouche et par la mobilité des ions sodium.

De plus, les modèles fromagers avec la microstructure la plus contrastée (plus gros globules gras), et donc la répartition de sodium la plus hétérogène, ont été perçus plus salés. Or, une distribution spatiale inhomogène de sel et des contrastes de concentrations en sel dans l'aliment provoquent des pulses salés en bouche, qui augmentent également la perception salée. Ceci a pu être démontré sur la distribution hétérogène du sucre dans des gels (Mosca *et al.*, 2012), mais aussi sur la distribution hétérogène du sel dans du pain (Noort *et al.*, 2010).

L'augmentation de perception de l'intensité salée dans les modèles fromagers possédant un ratio L/P plus élevé peut également être expliquée par le fait que ces modèles fromagers soient déglutis plus vite (valeurs plus faibles de la durée avant la première déglutition). Or, les déglutitions provoquent des pulses de libération du sel en bouche, et ces pulses sont associés à une intensité salée perçue plus intense (Busch *et al.*, 2009). La libération pulsatile du sodium en bouche a, en effet, été décrite comme un facteur augmentant la perception salée (Meiselman & Halpern, 1973).

Alors que l'étude de la mastication avait été réalisée sur les modèles fromagers lors du suivi de la libération des composés d'arôme par APCI-MS, elle peut aussi être mise en regard de la libération du NaCl en bouche, puisque ce sont les mêmes modèles fromagers qui ont été consommés. En comparant les données de mastication à celles de libération du sodium en bouche, on s'aperçoit que les modèles fromagers qui nécessitent l'activité masticatoire la plus importante ne sont pas ceux qui libèrent le plus de sodium, tout comme ce n'étaient pas ceux qui libéraient le plus de composés d'arôme. Ainsi, dans notre cas, l'effet de la composition et de la microstructure associée serait plus important sur la libération des composés de la saveur (NaCl et composés d'arôme) que celui de la mastication.

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de comprendre que le ratio L/P n'était pas le seul paramètre modifiant la microstructure des modèles fromagers. La teneur en NaCl des modèles fromagers impacte également l'organisation de la phase protéique, la structure et les propriétés rhéologiques des modèles fromagers. En effet, la présence de NaCl améliore l'hydratation de la phase protéique (Hardy & Steinberg, 1984), laissant des pores de taille plus importante pour l'inclusion de gouttelettes lipidiques plus grosses, ceci étant associé à une moindre résistance rhéologique. Une phase protéique plus hydratée et moins organisée (du fait des plus grosses gouttelettes lipidiques) contribue à expliquer une plus grande mobilité des ions Na⁺ dans les modèles fromagers avec NaCl ajouté.

Dans les produits réalisés, nous pouvons signaler que le ratio sodium/matière sèche est constant pour chaque teneur en NaCl (respectivement 1,2 % pour les modèles sans NaCl et 2,0 % pour les modèles avec NaCl ajouté), mais le ratio sodium/protéines varie. Ainsi, pour les modèles fromagers sans NaCl ajouté, le ratio sodium/protéines varie de 2,3 %, pour les modèles fromagers avec le ratio L/P égal à 20/28, à 3,2 % pour le ratio 28/20. De même, dans les modèles fromagers avec NaCl ajouté, le ratio sodium/protéines varie de 3,8 %, pour les modèles fromagers avec le ratio L/P égal à 20/28, à 5,3 % pour le ratio 28/20.

Ceci signifie que les modèles fromagers avec un ratio L/P plus faible possèdent proportionnellement moins de sodium dans la phase protéique. Cela montre que ce n'est donc pas la proportion de sodium dans la phase protéique mais bien la proportion d'hydratation de la phase protéique qui influence la mobilité des ions sodium.

Grâce à la RMN ^{23}Na , nous avons pu déterminer l'état de liaison et la dynamique des ions sodium présents dans les modèles fromagers. Cela nous a permis de mettre en évidence une fraction de sodium lié, quantifiable. La quantification de cette fraction de sodium lié a néanmoins montré que la proportion de sodium lié ne variait presque pas entre les six formulations de modèles fromagers. Ainsi, puisque le rapport sodium lié/sodium total a été trouvé presque constant dans les modèles fromagers ($\approx 18\%$ en RMN), la mobilité du sodium total (lié + libre) reflèterait, en fait, le comportement du sodium libre dans les modèles fromagers. Ces résultats de mobilité du sodium total et du sodium lié montrent également que les variations de la perception salée entre les modèles fromagers avec NaCl ajouté ne sont pas dues à des proportions différentes de sodium lié car aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant la quantité de sodium lié dans les modèles fromagers avec NaCl ajouté. Par ailleurs, puisque ni la teneur en NaCl, ni le ratio L/P ne modifient véritablement la proportion de sodium lié dans les modèles fromagers, il est possible que le principal facteur affectant la fraction de sodium lié soit le pourcentage de matière sèche, comme cela avait pu être observé sur des fromages (Gobet, 2008).

En ce qui concerne la perception de l'arôme, la réalisation du profil sensoriel a également permis de montrer que les modèles fromagers plus riches en lipides (moins riches en protéines) et plus riches en NaCl étaient perçus plus aromatiques. Or, ce sont ces modèles fromagers qui présentaient les libérations *in vivo* les plus importantes du sodium et des composés d'arôme. Comme nous l'avons mentionné auparavant, la composition des modèles fromagers influence ces libérations. Dans notre cas, les effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur la libération des composés d'arôme dans la cavité nasale peuvent être schématisés de la façon suivante :

- 1) Effet NaCl :** libération plus rapide des composés d'arôme de la phase protéique (moins hydrophobes)
 → valeurs de pentes (libération) plus grandes
- 2) Effet lipides et taille des globules gras :** libération retardée des composés d'arôme de la phase lipidique (plus hydrophobes)
 → Libération plus importante après déglutition

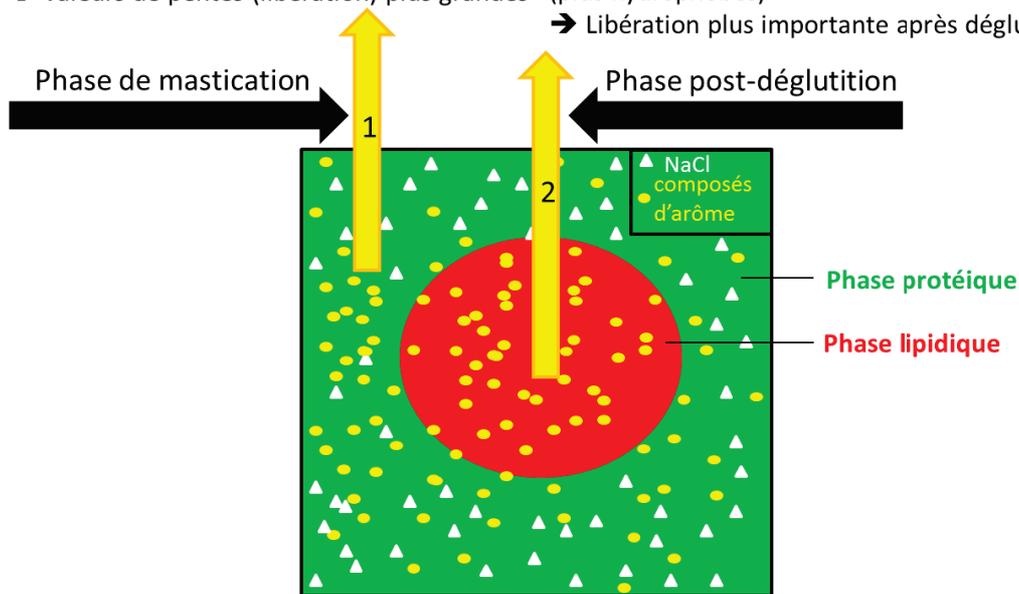


Figure 59 : Schématisation des effets du ratio L/P et de la teneur en NaCl sur la libération *in vivo* des composés d'arôme

En réalité, l'effet du NaCl et du ratio L/P peut s'expliquer en deux temps :

- Dans un premier temps, l'augmentation de la teneur en sel déclenche une libération rapide des composés d'arôme présents dans la phase aqueuse. Ces composés sont libérés dans la salive puis vers la cavité nasale (voie rétronasale de libération des composés d'arôme). Ceci expliquerait les valeurs plus importantes des taux initiaux de libération d'arômes pour les modèles fromagers avec NaCl ajouté.
- Dans un second temps, le transfert des composés d'arôme hydrophobes solubilisés dans les gouttelettes lipidiques s'opère. Il a d'abord lieu de la phase lipidique vers la phase protéique. Mais, les gouttelettes lipidiques de taille importante des modèles avec NaCl ajouté ralentissent le transfert. Cela pourrait expliquer la seconde partie de libération des arômes, avec une libération des arômes plus lente et donc une quantité plus importante d'arômes libérés après déglutition (valeurs plus grandes du ratio AUC_2/AUC_1).

Le ratio L/P et la teneur en NaCl agissent donc de manière différente sur la libération des composés d'arôme. De plus, ils gouvernent également les phénomènes de déglutition, avec une déglutition plus rapide des modèles fromagers comportant une teneur en NaCl plus importante et un ratio L/P plus élevé. Ces déglutitions plus rapides sont associées à une libération plus importante du sodium et des composés d'arôme en bouche.

Les déglutitions plus rapides peuvent être dues à une plus grande salivation (due au NaCl) et à une lubrification plus importante (due aux lipides). De plus, la fragmentation en bouche et l'incorporation de salive peuvent aussi être différentes entre produits (Repoux *et al.*, 2012b ; Yven *et al.*, 2012), mais nous n'avons pas contrôlé ces paramètres. En revanche, nous avons mis en évidence que la mastication n'était pas un paramètre déterminant pour la libération des composés d'arôme. Dans le cas de notre étude, la composition (ratio L/P et teneur en NaCl) et la microstructure sembleraient avoir plus d'influence que la mastication sur la libération des composés d'arôme. Par ailleurs, les effets observés sur la libération *in vivo* des composés d'arôme ne sont pas dus aux propriétés de partage des composés d'arôme dans la phase vapeur.

Les modèles fromagers avec NaCl ajoutés, perçus plus aromatiques, ne présentaient pas de libération des composés d'arôme significativement plus importante. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats :

- Les différences interindividuelles mises en évidence lors de l'étude en conditions *in vivo* masquent les éventuelles différences de libération des composés d'arôme entre les modèles avec NaCl ajouté et ceux sans NaCl. En effet, l'importance de la variabilité interindividuelle peut masquer des effets sur la libération des composés d'arôme dans la cavité nasale (Gierczynski, 2007).
- Les interactions sensorielles texture–arôme et/ou saveur–arôme que nous avons citées précédemment affectent la perception des modèles fromagers, expliquant les différences entre libérations *in vivo* (sel et composés d'arôme) et perception.

Enfin, sur un plan purement perceptif, nos résultats laissent supposer des interactions entre la perception du sel, la perception des composés d'arôme, et la perception du gras en bouche. Tout d'abord, en ce qui concerne la perception salée et la perception aromatique, nous avons expliqué l'intensité aromatique perçue plus élevée dans les modèles fromagers avec NaCl par la présence de sel (exhausteur de goût) qui a induit également une intensité salée perçue plus importante. Inversement, il est possible que la perception aromatique ait également augmenté la perception salée. En effet, les modèles fromagers plus riches en matière grasse et moins riches en protéines ont libéré plus de composés d'arôme en bouche et ont été perçus plus aromatiques, tout en étant également perçus plus salés. Or, il existe des interactions saveur–arôme et les arômes congruents de la saveur salée, tels qu'un arôme fromage, peuvent augmenter la perception salée (Lawrence *et al.*, 2011).

Par ailleurs, comme nous l'avons mentionné dans la partie Résultats, il est très probable que les perceptions du sel et du gras en bouche interagissent. Dans notre cas, les modèles fromagers plus gras (plus riches en lipides et moins riches en protéines) ont été perçus plus salés, et inversement, les modèles fromagers plus salés ont été perçus comme étant plus gras en bouche. Ce type d'interactions a déjà été suggéré par Lawrence *et al.* (2012) mais il est difficile d'étudier la part de l'effet de chaque perception sur l'autre. Des études complémentaires, peut-être sur des émulsions simples salées, pourraient permettre de mieux comprendre les interactions entre perception du sel et perception du gras. Les interactions perceptuelles entre sel et matière grasse pourraient également expliquer le fait que les deux produits avec la plus forte teneur en NaCl et les deux ratios L/P les plus élevés (L24P24s et L28P20s) aient été notés de façon plus proche par les sujets, alors qu'ils étaient bien différenciables sur le plan de la physico-chimie et de la rhéologie. En l'occurrence, il est possible que l'absence de différence significative de notation de l'intensité salée pour ces deux modèles fromagers les ait rapprochés sur la représentation graphique de l'AVC (Figure 52). De plus, un report des descripteurs de texture sur la notation des descripteurs de saveurs et d'arôme est également possible (Gierczynski *et al.*, 2011).

Finalement, les résultats sensoriels peuvent également être mis en relation avec les résultats d'activité masticatoire. Les modèles fromagers perçus comme étant plus durs, plus compacts et formant de petits morceaux en bouche lors de la mastication (morcellement en bouche) sont ceux qui nécessitaient le plus de cycles masticatoires, le plus de travail masticatoire et la plus grande durée de mastication. La rhéologie des modèles fromagers influence donc la perception, mais il se peut que la perception de texture en bouche, qui a lieu dès le premier coup de dent (qui agit en quelque sorte comme un texturomètre en bouche) influence ensuite le comportement masticatoire, ce qui peut impacter ensuite une perception sensorielle modifiée du produit déstructuré. De plus, il se peut également que la perception salée en bouche influence la physiologie de consommation, car nous avons montré que les produits perçus plus salés étaient déglutis plus vite.

Enfin, le cas particulier de l'élasticité mérite une explication approfondie car bien que l'élasticité sensorielle et le module de déformabilité rhéologique soient souvent comparés (Lassoued *et al.*, 2008 ; Vinas *et al.*, 2007), les définitions d'élasticité sous-jacentes ne sont pas les mêmes (Lauverjat, 2009c). En général, les termes sensoriels et rhéologiques qui font référence à la fermeté et à la résistance des fromages sont fortement corrélés (Foegeding *et al.*, 2003), mais les termes sensoriels décrivant les notions de fracture, d'adhésivité,

d'élasticité et de cohésion des fromages ne sont que faiblement, voire pas du tout, corrélés aux propriétés rhéologiques (Foegeding *et al.*, 2003). Tout d'abord, les corrélations entre paramètre rhéologique et paramètre sensoriel dépendent des conditions du test (temps, vitesse de compression, taux de déformation). Le fromage étant un produit viscoélastique, l'équilibre entre ces deux propriétés est modifié selon le test utilisé. Le ratio de l'énergie dissipée (partie visqueuse) sur l'énergie emmagasinée (partie élastique) dépend de l'échelle de temps de la déformation. Par conséquent, la réponse du matériau dépend du temps (FIL-268, 1991). Les tests rhéologiques sont mis au point pour évaluer des propriétés physiques et non pour imiter le processus sensoriel humain (Foegeding *et al.*, 2003). Les tests rhéologiques mesurent seulement un événement 'unique' : les forces et déformations associées à la première bouchée de consommation. Cela ne représente que 2 à 10% du temps total de mastication normale (Bourne, 1975). De plus, les méthodes instrumentales ne peuvent pas mimer le profil de mastication particulier de chaque personne (Wilkinson *et al.*, 2000). En réalité, l'élasticité sensorielle évaluée par les juges est bien plus complexe que l'élasticité mesurée instrumentalement. En effet, la perception de la texture est un phénomène complexe, qui fait également intervenir des phénomènes tactiles et kinesthésiques (Meilgaard *et al.*, 1991).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux décrits dans ce manuscrit a montré que la composition de modèles fromagers (ratio lipides/protéines (L/P) et teneur en sel) modifiait la structure de la phase protéique et de la phase lipidique, modifiant ainsi la mobilité et la libération des molécules de la saveur (sel, composés d'arôme).

L'approche pluridisciplinaire que nous avons menée a permis de comprendre les différentes causes à l'origine des variations de perception des aliments. Dans un contexte de réduction du sel et de la matière grasse dans les aliments, une étude intégrée des effets de ces réductions apporte de nouvelles pistes de réflexion, puisqu'elle a été conduite depuis le niveau moléculaire jusqu'au niveau macroscopique et à la perception. Les différentes techniques complémentaires qui ont été utilisées dans ce travail ont permis d'avancer dans la compréhension de la mobilité du sel et des composés d'arôme.

Même si les résultats trouvés n'apportent pas directement une stratégie de réduction de la matière grasse et du sel, ils offrent une meilleure compréhension des mécanismes impliqués. Les résultats de nos travaux ne sont pas en faveur des produits allégés, puisque les modèles fromagers plus riches en matière grasse sont perçus comme étant plus salés et plus aromatiques, et les modèles fromagers plus riches en sel sont perçus comme étant plus gras en bouche et plus aromatique. La diminution de la teneur en sel et en matière grasse diminue donc les propriétés organoleptiques des modèles fromagers. Néanmoins, une piste intéressante concerne la taille des globules gras des modèles fromagers. En effet, nous avons montré que des produits comportant des globules gras plus gros étaient perçus plus salés, comme cela avait également pu être montré sur des spécialités fromagères (Wendin *et al.*, 2000). Ici réside peut-être une piste de formulation des produits fromagers, et notamment des fromages fondus. On sait que la taille des globules ne dépend pas uniquement de la teneur en matière grasse, mais aussi de la vitesse de cisaillement, de la température de fabrication, des sels de fonte utilisés et du type de matière grasse (Caric *et al.*, 1985 ; Kalab *et al.*, 1987 ; Mulsow *et al.*, 2007). Ainsi, les industriels peuvent modifier la taille des globules gras, sans augmenter la teneur en matière grasse, afin d'optimiser la perception salée.

La taille des cristaux de sel peut également modifier la perception salée (Fisk *et al.*, 2012). Des cristaux de sel de taille plus importante conduisent à une plus faible intensité de la perception salée, associée à une libération moins intense et retardée du sel dans la salive (maximum de concentration atteint après 50 s au lieu de 20 s). La taille des cristaux de sel pourrait donc être une autre piste d'optimisation de la perception salée dans des produits tels

que les fromages. De plus, les expériences RMN ont montré que les ions sodium étaient moins mobiles et dans un environnement plus ordonné lorsque le ratio L/P diminuait. De ce fait, il pourrait également être intéressant de considérer un taux d'hydratation constant des protéines, et de voir si la simple augmentation de la teneur en matière grasse affecterait de la même façon la mobilité des ions Na^+ . Dans notre cas, compte-tenu des contraintes de formulation des modèles fromagers, la gamme de variation des teneurs en NaCl et des ratios L/P n'était pas très étendue. La réalisation de modèles fromagers avec de plus grandes variations de composition pourrait conduire à des résultats complémentaires et à une meilleure compréhension de l'impact de leur composition sur la fraction de sodium lié. En outre, afin de mieux comprendre les interactions moléculaires entre caséines et ions Na^+ , les complexes caséines- Na^+ pourraient être étudiés par des méthodes spectroscopiques, par l'étude de la solubilité des complexes ou par RMN.

Enfin, dans ce manuscrit, la mobilité des composés d'arôme n'a pas été étudiée par RMN. Cependant, la technique de RMN-DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) apporte des informations sur la diffusion intrinsèque des molécules d'arôme dans les modèles fromagers. En effet, Andriot *et al.* (2009) ont montré par cette technique que les protéines modifiaient le comportement moléculaire des composés d'arôme. De plus, Gostan *et al.* (2004) et Gobet *et al.* (2006) ont également montré, par cette technique, que l'ajout de NaCl à des gels de carraghénanes modifiait la structure et diminuait la diffusion des composés d'arôme, différemment selon la nature des composés. L'étude de la mobilité des composés d'arôme par RMN-DOSY serait donc complémentaire de l'étude de la libération *in vivo* des composés d'arôme et de l'étude de la quantité d'arômes libérés dans la phase vapeur. En effet, cette technique d'investigation moléculaire permettrait de confirmer si l'importance de la structure observée sur la libération des composés d'arôme est également présente sur leur diffusion.

Par ailleurs, toute l'étude de cette thèse a porté sur des modèles fromagers. Afin de valider l'ensemble des résultats obtenus, une étude similaire pourrait être menée sur des fromages réels. De plus, il serait intéressant de prendre en compte, dans de futures études, d'autres paramètres physiologiques, tels que le flux salivaire, la composition salivaire, le tapissage en bouche par la matière grasse, ou l'étude du bol alimentaire qui pourraient expliquer les échanges entre le produit et la salive, afin de mieux comprendre la libération des composés d'arôme. En effet, bien que nous nous soyons intéressés principalement aux différences entre produits, nous avons pu voir, lors de chaque expérience faisant intervenir des sujets humains,

qu'il existait des différences interindividuelles physiologiques. L'étude de la physiologie apparaît donc comme une piste complémentaire de compréhension des mécanismes étudiés.

Enfin, d'un point de vue sensoriel, le profil sensoriel permet une très bonne caractérisation des produits, mais le choix des descripteurs dépend du choix des panélistes puisque les descripteurs ont été initialement proposés par leurs soins. Les informations obtenues par le profil sensoriel pourraient être complétées par des analyses sensorielles dynamiques, telles que l'étude de la dominance temporelle des sensations (DTS), qui préciseraient les résultats de libération *in vivo* dynamique des composés d'arôme obtenus par APCI-MS (Labbe *et al.*, 2009). Ce type d'étude pluridisciplinaire, avec un maximum de paramètres suivis simultanément, reste une perspective très intéressante dans la compréhension des mécanismes de mobilité, de libération et de perception des molécules de la flaveur.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou-El-Nour, A. M. (1998). Effect of sodium chloride, a mixture of sodium chloride and potassium chloride on the curd characteristics. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 26(1), 193-202.
- Adams, S. O., Maller, O., & Cardello, A. V. (1995). Consumer acceptance of foods lower in sodium. *Journal of the American Dietetic Association*, 95(4), 447-453.
- AFNOR. (1995). *Recherche et sélection de descripteurs pour l'élaboration d'un profil sensoriel, par approche multidimensionnelle* (Vol. NF ISO 11035). Paris, France: AFNOR.
- AFNOR. (2010). *Analyse sensorielle. Méthodologie. Directives générales pour l'établissement d'un profil sensoriel* (Vol. NF ISO 13299). Paris, France: AFNOR.
- AFSSA. (2002). *Rapport sel : évaluation et recommandations*.
- Aguilera, J. M., & Stanley, D. M. (1999). *Microstructural principles of food processing and engineering*: Aspen Publishers Inc., Gaithersburg.
- Aimutis, W. R. (1995). Dairy protein usage in processed and imitation cheeses. *Food Tech Europe*, 2(2), 34.
- Anderson, D. J., & Hector, M. P. (1987). Periodontal mechanoreceptors and parotid secretion in animals and man. *Journal of Dental Research*, 66(2), 518-523.
- Andriot, I., Marin, I., Feron, G., Relkin, P., & Guichard, E. (1999). Binding of benzaldehyde by β -lactoglobulin, by static headspace and high performance liquid chromatography in different physico-chemical conditions. *Le Lait*, 79(6), 577-586.
- Andriot, I., Harrison, M., Fournier, N., & Guichard, E. (2000). Interactions between methyl ketones and beta-lactoglobulin: Sensory analysis, headspace analysis, and mathematical modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4246-4251.
- Andriot, I., Guichard, E., & Moreau, C. (2009). Diffusion des arômes par RMN-DOSY. In *Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire. Réunion jointe des groupes thématiques Magnétisme Nucléaire et Biologie et Biologie Structurale des Protéines*, (pp. 1 p). Dourdan (FRA).
- Andriot, I., Boisard, L., Vergoignan, C., Salles, C., & Guichard, E. (2010). Sodium ions models cheeses at molecular and macroscopic levels. In *The 10 th International Conference on the Application of Magnetic Resonance in Food Science*. Clermont Ferrand (FRA).
- Andriot, I., Boisard, L., Vergoignan, C., Salles, C., & Guichard, E. (2011). Sodium ions in model cheeses at molecular and macroscopic levels. In J.-P. Renou, P. S. Belton & G. A. Webb (Eds.), *Magnetic Resonance in Food Science. An Exciting Future (Special publication No. 332)*, (pp. 67-70). Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry.
- Aprea, E., Biasioli, F., Gasperi, F., Mark, T. D., & van Ruth, S. (2006). In vivo monitoring of strawberry flavour release from model custards: effect of texture and oral processing. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(1), 53-58.
- Auty, M. A. E., Fenelon, M. A., Guinee, T. P., Mullins, C., & Mulvihill, D. M. (1999). Dynamic confocal scanning laser microscopy methods for studying milk protein gelation and cheese melting. *Scanning*, 21(5), 299-304.
- Auty, M. A. E., Twomey, M., Guinee, T. P., & Mulvihill, D. M. (2001). Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *Journal of Dairy Research*, 68(3), 417-427.
- Awad, R. A., Abdel-Hamid, L. B., El-Shabrawy, S. A., & Singh, R. K. (2002). Texture and microstructure of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 35(1), 54-61.
- Bachmann, H.-P. (2001). Cheese analogues: a review. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 505-515.
- Baek, I., Linforth, R. S. T., Blake, A., & Taylor, A. J. (1999). Sensory perception is related to the rate of change of volatile concentration in-nose during eating of model gels. *Chemical Senses*, 24(2), 155-160.
- Baines, Z. V., & Morris, E. R. (1987). Flavour/taste perception in thickened systems : the effect of guar gum above and below c. *Food Hydrocolloids*, 1(3), 197-205.
- Bakker, J., Boudaud, N., & Harrison, M. (1998). Dynamic release of diacetyl from liquid gelatin in the headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2714-2720.

- Bannatyne, S. P. (2001). *Assessment of full and partial replacement of sucrose with trehalose in ice-cream manufacture*. Final Year Dissertation, University of Glasgow, Glasgow.
- Bartoshuk, L. M. (1978). Psychophysics of taste. *American Journal of Clinical Nutrition*, 31(6), 1068-1077.
- Beard, T. C., Blizzard, L., O'Brien, D. J., & Dwyer, T. (1997). Association between blood pressure and dietary factors in the Dietary and Nutritional Survey of British Adults. *Archives of Internal Medicine*, 157(2), 234-238.
- Beilin, L. J., Puddey, I. B., & Burke, V. (1999). Lifestyle and hypertension. *American Journal of Hypertension*, 12(9), 934-945.
- Bellevrat, A., Andriot, I., Deprêtre, N., & Guichard, E. (2008). *Bilan d'aromatisation de deux fromages industriels de type "fromage fondu" (rapport de stage)*. Dijon (FRA) CSGA UMR1324, INRA, Université de Bourgogne, AgroSup, CNRS.
- Belloque, J., & Ramos, M. (1999). Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products. *Trends in Food Science & Technology*, 10(10), 313-320.
- Benjamin, O., Leus, M., & Everett, D. W. (2011). Static headspace analysis of volatile compounds released from [beta]-lactoglobulin-stabilized emulsions determined by the phase ratio variation method. *Food Research International*, 44(1), 417-424.
- Berglund, B., Berglund, U., & Lindvall, T. (1976). Psychological processing of odor mixtures. *Psychological Review*, 83(6), 432-441.
- Beuvier, E., & Buchin, S. (2004). Raw milk cheeses. In P. F. Fox, P. L. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1 (pp. 319-345). London: Elsevier.
- Blissett, A., Hort, J., & Taylor, A. J. (2006). Influence of chewing and swallowing behavior on volatile release in two confectionary systems. *Journal of Texture Studies*, 37(5), 476-496.
- Boelrijk, A. E. M., Smit, G., Weel, K. G. C., & Burger, J. J. (2006). Flavour release from liquid food products. In A. Voilley & P. Etiévant (Eds.), *Flavour in food* CRC Press ed., vol. Part 3 (pp. 260-284). Cambridge, CB1 6AH, UK: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Boisard, L., Andriot, I., Arnould, C., Achilléos, C., Salles, C., & Guichard, E. (2013). Structure and composition of model cheeses influence sodium NMR mobility, kinetics of sodium release and sodium partition coefficients. *Food Chemistry*, 136, 1070-1077.
- Boland, A. B., Buhr, K., Giannouli, P., & van Ruth, S. M. (2004). Influence of gelatin, starch, pectin and artificial saliva on the release of 11 flavour compounds from model gel systems. *Food Chemistry*, 86(3), 401-411.
- Boland, A. B., Delahunty, C. M., & van Ruth, S. M. (2006). Influence of the texture of gelatin gels and pectin gels on strawberry flavour release and perception. *Food Chemistry*, 96(3), 452-460.
- Bourne, M. C. (1975). Is rheology enough for food texture measurement? *Journal of Texture Studies*, 6(2), 259-262.
- 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 yogurt system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2055-2059.
- Breslin, P. A. S., & Beauchamp, G. K. (1997). Salt enhances flavour by suppressing bitterness. *Nature*, 387(6633), 563-563.
- Brosio, E., Delfini, M., Dinola, A., Dubaldo, A., & Lintas, C. (1993). H-1 and Na-23 NMR relaxation-times study of pectin solutions and gels. *Cellular and Molecular Biology*, 39(6), 583-588.
- Bryant, A., Ustunol, Z., & Steffe, J. (1995). Texture of cheddar cheese as influenced by fat reduction. *Journal of Food Science*, 60(6), 1216-&.
- Buck, L., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors : a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65, 175-187.
- Buettner, A., & Schieberle, P. (2000a). Influence of mastication on the concentrations of aroma volatiles - some aspects of flavour release and flavour perception. *Food Chemistry*, 71(3), 347-354.

- Buettner, A., & Schieberle, P. (2000b). Exhaled odorant measurement (EXOM) - A new approach to quantify the degree of in-mouth release of food aroma compounds. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie Food Science and Technology*, 33(8), 553-559.
- Buettner, A., Beer, A., Hannig, C., & Settles, M. (2001). Observation of the swallowing process by application of videofluoroscopy and real-time magnetic resonance imaging-consequences for retronasal aroma stimulation. *Chemical Senses*, 26(9), 1211-1219.
- Burdach, K. J., & Doty, R. L. (1987). The effects of mouth movements, swallowing, and spitting on retronasal odor perception. *Physiology & Behavior*, 41(4), 353-356.
- Busch, J. L. H. C., Tournier, C., Knoop, J. E., Kooyman, G., & Smit, G. (2009). Temporal Contrast of Salt Delivery in Mouth Increases Salt Perception. *Chemical Senses*, 34(4), 341-348.
- Carey, M., Linforth, R., & Taylor, A. (2003). *Factors affecting dynamic flavour release from emulsions*.
- Caric, M., Gantar, M., & Kalab, M. (1985). Effects of emulsifying agents on the microstructure and other characteristics of process cheese - a review. *Food Microstructure*, 4(2), 297-312.
- Casal, H. L., Köhler, U., & Mantsch, H. H. (1988). Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 957(1), 11-20.
- Cavalier-Salou, C., & Cheftel, J. C. (1991). Emulsifying salts influence on characteristics of cheese analogs from calcium caseinate. *Journal of Food Science*, 56(6), 1542 - 1547.
- Cervantes, M. A., Lund, D. B., & Olson, N. F. (1983). Effects of salt concentration and freezing on mozzarella cheese texture. *Journal of Dairy Science*, 66(2), 204-213.
- Charles, M., Rosselin, V., Beck, L., Sauvageot, F., & Guichard, E. (2000). Flavor release from salad dressings: Sensory and physicochemical approaches in relation with the structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1810-1816.
- Christensen, C. M., Brand, J. G., & Malamud, D. (1987). Salivary changes in solution pH - a source of individual-differences in sour taste perception. *Physiology & Behavior*, 40(2), 221-227.
- Cook, D. J., Hollowood, T. A., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (2003). Oral Shear Stress Predicts Flavour Perception in Viscous Solutions. *Chemical Senses*, 28(1), 11-23.
- Craescu, C. (2004). *Structure et propriétés générales des protéines*. Paris: Lavoisier. Tec&Doc.
- Creamer, L. K. (1985). Water-absorption by renneted casein micelles. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 40(10), 589-591.
- Cunha, C. R., Dias, A. I., & Viotto, W. H. (2010). Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. *Food Research International*, 43(3), 723-729.
- Damodaran, S., & Kinsella, J. E. (1980). Stabilization of proteins by solvents. Effect of pH and anions on the positive cooperativity of 2-nonanone binding to bovine serum albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 8503-8508.
- Davidson, J. M., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (1998). In-mouth measurement of pH and conductivity during eating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5210-5214.
- Davidson, J. M., Linforth, R. S. T., Hollowood, T. A., & Taylor, A. J. (2000). Release of non-volatile flavor compounds *in vivo*. In D. D. Roberts & A. J. Taylor (Eds.), *Flavor release*, (pp. 99-111). Washington, DC.: American Chemical Society
- de Loubens, C. (2010). *Compréhension et modélisation des phénomènes physiques régissant la libération des stimuli orosensoriels*. AgroParistech, (thèse) Thiverval-Grignon.
- de Loubens, C., Magnin, A., Verin, E., Doyennette, M., Tréléa, I. C., & Souchon, I. (2010). A lubrication analysis of pharyngeal peristalsis: Application to flavour release. *Journal of Theoretical Biology*, 267(3), 300-311.
- de Roos, K. B. (1997). How Lipids influence Food Flavor. *Food Technology*, 51(1), 60-63.
- de Roos, K. B. (2003). Effect of texture and microstructure on flavour retention and release. *International Dairy Journal*, 13(8), 593-605.

- De Roos, K. B. (2006). Modelling aroma interactions in food matrices. In A. Voilley & P. Etiévant (Eds.), *Flavour in food* CRC Press ed., vol. Part 3 (pp. 229-259). Cambridge, CB1 6AH, UK: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Deak, N. A., Murphy, P. A., & Johnson, L. A. (2006). Effects of NaCl concentration on salting-in and dilution during salting-out on soy protein Fractionation. *Journal of Food Science*, 71(4), C247-C254.
- Déléris, I., Saint-Eve, A., Dakowski, F., Sémon, E., Le Quéré, J.-L., Guillemin, H., & Souchon, I. (2011). The dynamics of aroma release during consumption of candies of different structures, and relationship with temporal perception. *Food Chemistry*, 127(4), 1615-1624.
- Demott, B. J., Hitchcock, J. P., & Davidson, P. M. (1986). Use of sodium substitutes in cottage cheese and buttermilk. *Journal of Food Protection*, 49(2), 117-120.
- Dimitreli, G., & Thomareis, A. S. (2004). Effect of temperature and chemical composition on processed cheese apparent viscosity. *Journal of Food Engineering*, 64(2), 265-271.
- Djelveh, G., Gros, J. B., & Bories, B. (1989). An improvement of the cell diffusion method for the rapid-determination of diffusion constants in gels or foods. *Journal of Food Science*, 54(1), 166-169.
- Djordjevic, J., Zatorre, R. J., & Jones-Gotman, M. (2004). Odor-induced changes in taste perception. *Experimental Brain Research*, 159(3), 405-408.
- Doyen, K., Carey, M., Linforth, R. S. T., Marin, M., & Taylor, A. J. (2001). Volatile release from an emulsion : headspace and In-Mouth studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 804-810.
- Doyennette, M., Déléris, I., Saint-Eve, A., Gasiglia, A., Souchon, I., & Trelea, I. C. (2011). The dynamics of aroma compound transfer properties in cheeses during simulated eating conditions. *Food Research International*, 44(10), 3174-3181.
- Dravnieks, A., Bock, F. C., Powers, J. J., Tibbetts, M., & Ford, M. (1978). Comparison of odors directly and through profiling. *Chemical Senses and Flavour*, 3(2), 191-225.
- Dumont, J. P. (1987). Flavour-protein interactions : a key to aroma persistence. In M. Martens, G. A. Dalen & H. Russwurm Jr. (Eds.), *Flavour Science and Technology*, (pp. 143-148): John Wiley.
- Dumont, J. P. (2006). Emulsion-flavour interactions. In A. Voilley & P. Etiévant (Eds.), *Flavour in food* CRC Press ed., vol. Part 3 (pp. 156-171). Cambridge, CB1 6AH, UK: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- El-Bakry, M., Duggan, E., O'Riordan, E. D., & O'Sullivan, M. (2010). Effects of emulsifying salts reduction on imitation cheese manufacture and functional properties. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 596-603.
- Eliav, U., & Navon, G. (1994). Analysis of double-quantum-filtered NMR-spectra of ²³Na in biological tissues. *Journal of Magnetic Resonance Series B*, 103(1), 19-29.
- Emorine, M., Mielle, P., Maratray, J., Thomas-Danguin, T., & Salles, C. (2011). In-mouth salt release measurement during food chewing using sensors. In P. Gouma (Ed.), *Olfaction and Electronic Nose: Proceedings of the 14th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose*, vol. 1362 (pp. 102-103).
- Emorine, M., Mielle, P., Maratray, J., Septier, C., Thomas-Danguin, T., & Salles, C. (2012). Use of Sensors to Measure In-Mouth Salt Release During Food Chewing. *IEEE SENSORS JOURNAL*, in press, 530-543.
- Endo, S., Pfennigsdorff, A., & Goss, K.-U. (2012). Salting-Out Effect in Aqueous NaCl Solutions: Trends with Size and Polarity of Solute Molecules. *Environmental Science & Technology*, 46(3), 1496-1503.
- Ennis, M. P., & Mulvihill, D. M. (1997). Cheese analogues. *5th Cheese symposium, 11--13th March 1997.*, 1-14.
- Ennis, M. P., O'Sullivan, M. M., & Mulvihill, D. M. (1998). The hydration behaviour of rennet caseins in calcium chelating salt solution as determined using a rheological approach. *Food Hydrocolloids*, 12(4), 451-457.

- Ettre, L. S., Welter, C., & Kolb, B. (1993). Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography utilizing the phase ratio variation method. *Chromatographia*, 35(1/2), 73-84.
- Everett, D. W., & Olson, N. F. (2003). Free oil and rheology of cheddar cheese containing fat globules stabilized with different proteins. *Journal of Dairy Science*, 86(3), 755-763.
- Everett, D. W. (2007). Microstructure of natural cheeses. In A. Tamime (Ed.), *Structure of dairy products*, (pp. 170-209).
- Everett, D. W., & Auty, M. A. E. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18(7), 759-773.
- Eymery, O., & Pangborn, R. M. (1988). Influence of fat, citric acid and sodium chloride on texture and taste of a cheese analog. *Sciences des Aliments (France)*, 8(1), 15-32.
- Fabre, M. (2002). *Interactions protéines-matières grasses-arômes dans les crèmes glacées*. Université de Bourgogne - Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation, (thèse) Dijon (FRA).
- Famelart, M. H., Le Graet, Y., & Raulot, K. (1999). Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl₂: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 293-297.
- Fares, K., Landy, P., Guillard, R., & Voilley, A. (1998). Physicochemical interactions between aroma compounds and milk proteins: Effect of water and protein modification. *Journal of Dairy Science*, 81(1), 82-91.
- Fenoul, F., Le Denmat, M., Hamdi, F., Cuvelier, G., & Michon, C. (2008). Technical note: Confocal scanning laser microscopy and quantitative image analysis: Application to cream cheese microstructure investigation. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1325-1333.
- Fenzke, D., Freude, D., Frohlich, T., & Haase, J. (1984). NMR intensity measurements of half-integer quadrupole nuclei. *Chemical physics letters*, 111(1,2), 171-175.
- Ferry, A. L. S., Mitchell, J. R., Hort, J., Hill, S. E., Taylor, A. J., Lagarrigue, S., & Valles-Pamies, B. (2006). In-mouth amylase activity can reduce perception of saltiness in starch-thickened foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8869-8873.
- FIL-27. (1964). Détermination de la teneur en cendres des fromages fondus. *FIL-IDF 1965*.
- FIL-119. (2007). Lait et produits laitiers - Détermination des teneurs en calcium, sodium, potassium et magnésium - Méthode spectrométrique par absorption atomique.
- FIL-268. (1991). Rheological and fracture properties of cheeses.
- Filipe, C. (2007). *Etude de l'effet de l'oestradiol sur la reendothelialisation*. Unpublished Thesis/Dissertation, UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER - Ecole doctorale Biologie Santé et Biotechnologies, Toulouse (FRA).
- Fischer, N., & Widder, S. (1997). How proteins influence food flavor. *Food Technology*, 51(1), 68-70.
- Fisk, I., Chiu, N., Rama, R., Xian, T., & Carvalho Da Silva, M. (2012). Sodium release from snack foods. In *2nd International Conference on Food Oral Processing - Physics, Physiology, and Psychology of Eating*. Beaune (FRA).
- Fitzgerald, E., & Buckley, J. (1985). Effect of total and partial substitution of sodium-chloride on the quality of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 68(12), 3127-3134.
- Flores, M., Gianelli, M. P., Perez-Juan, M., & Toldra, F. (2007). Headspace concentration of selected dry-cured aroma compounds in model systems as affected by curing agents. *Food Chemistry*, 102(2), 488-493.
- Floury, J., Camier, B., Rousseau, F., Lopez, C., Tissier, J.-P., & Famelart, M.-H. (2009a). Reducing salt level in food: Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure-texture relationships. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1611-1620.
- Floury, J., Rouaud, O., Le Poullennec, M., & Famelart, M.-H. (2009b). Reducing salt level in food: Part 2. Modelling salt diffusion in model cheese systems with regards to their composition. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1621-1628.
- Foegeding, E. A., Brown, J., Drake, M., & Daubert, C. R. (2003). Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal*, 13(8), 585-591.

- Foucat, L., Donnat, J. P., & Renou, J. P. (2003). ^{23}Na and ^{35}Cl NMR studies of the interactions of sodium and chloride ions with meat products. In P. S. Belton, A. M. Gil, G. A. Webb & D. Rutledge (Eds.), *Magnetic Resonance in Food Science: Latest Developments*, (pp. 180-185).
- Foucat, L., Donnat J. P., Joffraud J. J., Cardinal M., & Renou J. P. (2004a). Taux de sel du saumon fumé et qualité gustative. In C.-F. Association pour le développement de l'institut de la viande, FRANCE (Ed.), *Journées des sciences du muscle et technologies des viandes N°10*. Rennes , FRANCE.
- Foucat, L., Donnat J. P., Joffraud J. J., Cardinal M., & Renou J. P. (2004b). Distribution du sel dans le saumon fumé en relation avec la distribution du gras : étude par imagerie RMN du ^1H et du ^{23}Na . (poster). In C.-F. Association pour le développement de l'institut de la viande, FRANCE (Ed.), *Journées des sciences du muscle et technologies des viandes N°10*. Rennes , FRANCE.
- Fox, P. F., O'Connor, T. P., McSweeney, P. L., Guinee, T. P., & O'Brien, N. M. (1996). Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects. *Advances in food and nutrition research*, 39, 163-328.
- Fox, P. F., & Cogan, T. M. (2004). Factors that affect the quality of cheese. In P. F. Fox, P. L. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1 (pp. 583-608). London: Elsevier.
- Friel, E. N., & Taylor, A. J. (2001). Effect of salivary components on volatile partitioning from solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3898-3905.
- Gàl, S., & Bànkay, D. (1971). Hydration of sodium chloride bound by casein at medium water activities. *Journal of Food Science*, 36(5), 800-803.
- Gaucheron, F. (2004). *Minéraux et produits laitiers. Interactions caséines-cations*. Paris: Lavoisier. Tec&Doc.
- Gaviao, M. B., Engelen, L., & van der Bilt, A. (2004). Chewing behavior and salivary secretion. *European Journal of Oral Sciences*, 112(1), 19-24.
- Genovese, A., Piombino, P., Gambuti, A., & Moio, L. (2009). Simulation of retronasal aroma of white and red wine in a model mouth system. Investigating the influence of saliva on volatile compound concentrations. *Food Chemistry*, 114(1), 100-107.
- Gervais, P., & Sauvageot, F. (1984). Un exemple de batterie d'épreuves permettant d'évaluer les aptitudes sensorielles individuelles pour la dégustation de denrées alimentaires. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 17, 69-73.
- Geurts, T. J., Walstra, P., & Mulder, H. (1974). Transport of salt and water during salting of cheese. I. Analysis of the processes involved. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 28(2), 102-129.
- Gierczynski, I. (2007). *Modification de structure et impact sur la libération et la perception des arômes. Application à des systèmes fromagers modèles*. Université de Bourgogne - Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Dijon (FRA).
- Gierczynski, I., Labouré, H., Sémon, E., & Guichard, E. (2007). Impact of hardness of model fresh cheese on aroma release: in vivo and in vitro study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3066-3073.
- Gierczynski, I., Labouré, H., & Guichard, E. (2008). In vivo aroma release of milk gels of different hardnesses: inter-individual differences and their consequences on aroma perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), 1697-1703.
- Gierczynski, I., Guichard, E., & Labouré, H. (2011). Aroma perception in dairy products: the roles of texture, aroma release and consumer physiology. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(3), 141-152.
- Gillette, M. (1985). Flavor effects of sodium chloride. *Food Technology*, 39(6), 47-&.
- Girgis, S., Neal, B., Prescott, J., Prendergast, J., Dumbrell, S., Turner, C., & Woodward, M. (2003). A one-quarter reduction in the salt content of bread can be made without detection. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(4), 616-620.
- Gobet, M., Mouaddab, M., Guichard, E., Le Quéré, J.-L., Moreau, C., & Foucat, L. (2006). Aroma diffusion and salt interactions in food. ^1H DOSY and ^{23}Na DQF NMR studies on a model system. In *The 8th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science*. University of Nottingham (GBR).

- Gobet, M. (2008). *Etude par spectroscopies de RMN ^{23}Na , ^{31}P et ^1H : effets de la teneur en sel (NaCl) dans des matrices alimentaires*. Université de Bourgogne, (thèse) Dijon (FRA).
- Gobet, M., Foucat, L., & Moreau, C. (2009a). Investigation of sodium ions in cheeses by Na-23 NMR spectroscopy In M. Guojonsdottir, P. Belton & G. Webb (Eds.), *Magnetic Resonance in Food Science: Challenges in a Changing World*, (pp. 57-64).
- Gobet, M., Mouaddab, M., Cayot, N., Bonny, J. M., Guichard, E., Le Quéré, J. L., Moreau, C., & Foucat, L. (2009b). The effect of salt content on the structure of iota-carrageenan systems: Na-23 DQF NMR and rheological studies. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47(4), 307-312.
- Gobet, M., Rondeau-Mouro, C., Buchin, S., Le Quéré, J.-L., Guichard, E., Foucat, L., & Moreau, C. (2010). Distribution and mobility of phosphates and sodium ions in cheese by solid-state ^{31}P and double-quantum filtered ^{23}Na NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48(4), 297-303.
- Gonzalez, R., Montoya, I., & Carcel, J. (2001). Review: The use of electromyography on food texture assessment. *Food Science and Technology International*, 7(6), 461-471.
- Gostan, T., Moreau, C., Juteau, A., Guichard, E., & Delsuc, M.-A. (2004). Measurement of aroma compound self-diffusion in food models by DOSY. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 42(6), 496-499.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red - a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *Journal of Cell Biology*, 100(3), 965-973.
- Guichard, E. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International*, 18(1), 49-70.
- Guichard, E. (2006). Flavour retention and release from protein solutions. *Biotechnology Advances*, 24(2), 226-229.
- Guichard, E., Fabre, M., & Relkin, P. (2008). Flavor release from food emulsions varying in their composition in fat and proteins and its effect on flavor perception. *American Laboratory*, 40(3), 13-17.
- Guinee, T. P. (1985). *Studies on the movements of sodium chloride and water in cheese and the effects thereof on cheese ripening*. PhD Thesis, National University of Ireland, Cork.
- Guinee, T. P. (2002b). Cheese analogues. In J. W. F. a. P. F. F. H. Roginski (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (pp. pp 428-434.). Academic Press, London.
- Guinee, T. P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 99-109.
- Guinee, T. P., Caric, M., & Kalab, M. (2004). Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In P. F. Fox, P. L. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 2: Major Cheese Groups (pp. 349-350). London: Elsevier.
- Guinee, T. P., & Fox, P. F. (2004). Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. General aspects of cheese technology. In P. F. Fox, P. L. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1 (pp. 207-259). London: Elsevier.
- Guinee, T. P., & Fox, P. F. (2004a). Major Cheese Groups. In P. F. Fox, P. L. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 2). London: Elsevier.
- Guo, M. R., Gilmore, J. A., & Kindstedt, P. S. (1997). Effect of sodium chloride on the serum phase of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 80(12), 3092-3098.
- Guojonsdottir, M., Traoré, A., & Renou, J.-P. (2012). Validation of the quantification of total and restricted sodium in bread using ^{23}Na double quantum filtering NMR. In *11th International Conference on the applications of Magnetic Resonance in food*). Wageningen, Pays-Bas.
- Guyot, C., Bonnafont, C., Lesschaeve, I., Issanchou, S., Voilley, A., & Spinnler, H. E. (1996). Effect of fat content oil odor intensity of three aroma compounds in model emulsions: delta-decalactone, diacetyl, and butyric acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2341-2348.
- Haahr, A. M., Bardow, A., Thomsen, C. E., Jensen, S. B., Nauntofte, B., Bakke, M., Adler-Nissen, J., & Bredie, W. L. P. (2004). Release of peppermint flavour compounds from chewing gum: effect of oral functions. *Physiology & Behavior*, 82(2-3), 531-540.

- Hansson, A., Giannouli, P., & Van Ruth, S. (2003). 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*, 51(16), 4732-4740.
- Hardy, J. J., & Steinberg, M. P. (1984). Interaction between sodium-chloride and paracasein as determined by water sorption. *Journal of Food Science*, 49(1), 127-131.
- Hardy, J. J. (2004). *Le chlorure de sodium dans le lait et les produits fromagers*. Paris: Lavoisier. Tec&Doc.
- Hassan, A. N., Frank, J. F., Farmer, M. A., Schmidt, K. A., & Shalabi, S. I. (1995). Formation of yogurt microstructure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. *Journal of Dairy Science*, 78(12), 2629-2636.
- Hassan, A. N., Frank, J. F., & Qvist, K. B. (2002). Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Dairy Science*, 85(7), 1705-1708.
- He, F. J., & MacGregor, G. A. (2010). Reducing Population Salt Intake Worldwide: From Evidence to Implementation. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 52(5), 363-382.
- Heertje, I., Vandervlist, P., Blonk, J. C. G., Hendrickx, H., & Brakenhoff, G. J. (1987). Confocal scanning laser microscopy in food research - some observations. *Food Microstructure*, 6(2), 115-120.
- Heertje, I., Nederlof, J., Hendrickx, H., & Lucassenreynnders, E. H. (1990). The observation of the displacement of emulsifiers by confocal scanning laser microscopy. *Food Structure*, 9(4), 305-316.
- Hellemann, U. (1992). Perceived taste of NaCl and acid mixtures in water and bread. *International Journal of Food Science and Technology*, 27(2), 201-211.
- Hennelly, P. J., Dunne, P. G., O'Sullivan, M., & O'Riordan, D. (2005). Increasing the moisture content of imitation cheese: effects on texture, rheology and microstructure. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 415-420.
- Henson, L. S. (1999). Reduced sodium process cheese and method for making it. In, vol. US Patent No. 5871797).
- Herbert, S., Bouchet, B., Riaublanc, A., Dufour, E., Gallant, D. J., & Devaux, M. F. (1999). Quantification of milk gel microstructure using confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Scanning*, 21, 124.
- Herbert, S., Bouchet, B., Riaublanc, A., Dufour, E., & Gallant, D. J. (1999a). Multiple fluorescence labelling of proteins, lipids and whey in dairy products using confocal microscopy. *Lait*, 79(6), 567-575.
- Hodgson, M., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (2003). Simultaneous Real-Time Measurements of Mastication, Swallowing, Nasal Airflow, and Aroma Release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5052-5057.
- Hogan, S. A., Chaurin, V., O'Kennedy, B. T., & Kelly, P. M. (2012). Influence of dairy proteins on textural changes in high-protein bars. *International Dairy Journal*, 26(1), 58-65.
- Holland, B., Unwin, I. D., & Buss, D. H. (1989). Milk Products and Eggs 4th Supplement to McCance and Widdowson's The Composition of Foods. In 4th edn): Royal Society of Chemistry/Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Cambridge, UK.
- Holley, A. (2006). Processing information about flavour. In A. Voilley & P. Etiévant (Eds.), *Flavour in food* CRC Press ed., (pp. 36-61). Cambridge, CB1 6AH, UK: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Hollowood, T. A., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (2002). The effect of viscosity on the perception of flavour. *Chemical Senses*, 27(7), 583-591.
- Hong, Y. H., & Creamer, L. K. (2002). Changed protein structures of bovine beta-lactoglobulin B and alpha-lactalbumin as a consequence of heat treatment. *International Dairy Journal*, 12(4), 345-359.
- Hoogenkamp, H. W. (1996). Casein and caseinate. Today and tomorrow. *World of Ingredients*(JAN/FEB), 32.

- Horio, T., & Kawamura, Y. (1989). Effects of texture of food on chewing patterns in the human subject. *Journal of Oral Rehabilitation*, *16*(2), 177-183.
- Horne, D. S., & Banks, J. M. (2004). Rennet-induced coagulation of milk. In P. F. Fox, P. L. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1 (pp. 47-70). London: Elsevier.
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, *85*(2), 162-169.
- Hussein, M. M., Kachikian, R., & Pidel, A. R. (1983). Analysis for Flavor Residuals in the Mouth by Gas Chromatography. *Journal of Food Science*, *48*, 884-885.
- Hutchings, J. B., & Lillford, P. J. (1988). The perception of food texture - the philosophy of the breakdown path. *Journal of Texture Studies*, *19*, 103-115.
- Issanchou, S., & Lesschaeve, I. (1993). La formation d'un jury d'analyse sensorielle. *Annales des Falsifications et des Expertises Chimiques*, *86*(920), 241-252.
- Jaccard, G., Wimperis, S., & Bodenhausen, G. (1986). Multiple-quantum NMR spectroscopy of $S=3/2$ spins in isotropic phase: A new probe for multiexponential relaxation. *Journal of Chemical Physics*, *85*(11), 6282-6293.
- Jack, F. R., Piggott, J. R., & Paterson, A. (1995). Cheddar cheese texture related to salt release during chewing, measured by conductivity - Preliminary study. *Journal of Food Science*, *60*(2), 213-217.
- Jaros, D., Petrag, J., Rohm, H., & Ulberth, F. (2001). Milk fat composition affects mechanical and rheological properties of processed cheese *Applied Rheology*, 19-25.
- Jouenne, E., & Crouzet, J. (1997). Influence of sodium chloride and urea on volatile compounds- β -lactoglobulin interactions. In A. B. Zacharoff (Ed.), *Interaction of food matrix with small ligands influencing flavour and texture*, vol. 2 (pp. 37-43). Gothenburg (Sweden): European Communities.
- Jouenne, E., & Crouzet, J. (2000). Determination of apparent binding constants for aroma compounds with beta-lactoglobulin by dynamic coupled column liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(11), 5396-5400.
- Jung, D. M., de Ropp, J. S., & Ebeler, S. E. (2002). Application of Pulsed Field Gradient NMR Techniques for Investigating Binding of Flavor Compounds to Macromolecules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(15), 4262-4269.
- Juteau, A., Cayot, N., Chabanet, C., Doublier, J. L., & Guichard, E. (2004). Flavour release from polysaccharide gels: different approaches for the determination of kinetic parameters. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(7-8), 394-402.
- Kalab, M., Yun, J., & Yiu, S. H. (1987). Textural properties and microstructure of process cheese food rework. *Food Microstructure*, *6*(2), 181-192.
- Kälviäinen, N., Roininen, K., & Tuorila, H. (2000). Sensory characterization of texture and flavor of high viscosity gels made with different thickeners. *Journal of Texture Studies*, *31*, 407-420.
- Kaplan, N. M. (2000). The dietary guideline for sodium: should we shake it up? No. *American Journal of Clinical Nutrition*, *71*(5), 1020-1026.
- Keast, R. S. J., Dalton, P. H., & Breslin, P. A. S. (2004). *Flavor interactions at the sensory level*.
- Kemp-Harper, R., Brown, S. P., Hughes, C. E., Styles, P., & Wimperis, S. (1997). ^{23}Na NMR methods for selective observation of sodium ions in ordered environments. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *30*, 157-181.
- Kilcast, D., & Angus, F. (2007). *Reducing salt in foods : practical strategies*. Cambridge: Woodhead Publishing limited.
- Koliandris, A., Lee, A., Ferry, A.-L., Hill, S., & Mitchell, J. (2008). Relationship between structure of hydrocolloid gels and solutions and flavour release. *Food Hydrocolloids*, *22*(4), 623-630.
- Kubickova, J., & Grosch, W. (1998). Evaluation of flavour compounds of Camembert cheese. *International Dairy Journal*, *8*(1), 11-16.
- Kuchida, K., Kono, S., Konishi, K., Van Vleck, L. D., Suzuki, M., & Miyoshi, S. (2000). Prediction of crude fat content of longissimus muscle of beef using the ratio of fat area calculated from

- computer image analysis: Comparison of regression equations for prediction using different input devices at different stations. *Journal of Animal Science*, 78(4), 799-803.
- Labbe, D., Schlich, P., Pineau, N., Gilbert, F., & Martin, N. (2009). Temporal dominance of sensations and sensory profiling: A comparative study. *Food Quality and Preference*, 20(3), 216-221.
- Landy, P., Rogacheva, S., Lorient, D., & Voilley, A. (1998). Thermodynamic and kinetic aspects of the transport of small molecules in dispersed systems. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 12(1), 57-65.
- Langourieux, S., & Crouzet, J. (1995). Protein-aroma interactions. In E. Dickinson & D. Lorient (Eds.), *Food macromolecules and colloids*, (pp. 123-133). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Lassoued, N., Delarue, J., Launay, B., & Michon, C. (2008). Baked product texture: Correlations between instrumental and sensory characterization using Flash Profile. *Journal of Cereal Science*, 48(1), 133-143.
- Lauverjat, C., Loubens, C. d., Délérís, I., Tréléa, I. C., & Souchon, I. (2009a). Rapid determination of partition and diffusion properties for salt and aroma compounds in complex food matrices. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 407-415.
- Lauverjat, C., Délérís, I., Tréléa, C. I., Salles, C., & Souchon, I. (2009b). Salt and aroma compound release in model cheeses in relation to their mobility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 9878-9887.
- Lauverjat, C. (2009c). *Compréhension des mécanismes impliqués dans la mobilité et la libération du sel et des composés d'arôme et leur rôle dans la perception*. (thèse) AgroParisTech.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (1999). *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. New York: Chapman & Hall.
- Lawless, H. T., Rapacki, F., Horne, J., & Hayes, A. (2003). The taste of calcium and magnesium salts and anionic modifications. *Food Quality and Preference*, 14(4), 319-325.
- Lawrence, G., Salles, C., Septier, C., Busch, J., & Thomas-Danguin, T. (2009). Odour-taste interactions: A way to enhance saltiness in low-salt content solutions. *Food Quality and Preference*, 20(3), 241-248.
- Lawrence, G., Salles, C., Palicki, O., Septier, C., Busch, J., & Thomas-Danguin, T. (2011). Using cross-modal interactions to counterbalance salt reduction in solid foods. *International Dairy Journal*, 21(2), 103-110.
- Lawrence, G., Buchin, S., Achilleos, C., Berodier, F., Septier, C., Courcoux, P., & Salles, C. (2012). In vivo sodium release and saltiness perception in solid lipoprotein matrices. 1. Effect of composition and texture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(21), 5287-5298.
- Le Guen, S., & Vreeker, R. (2003). Interactions between flavour compounds and milk proteins under static and dynamic conditions. In J. L. LeQuéré & P. X. Etievant (Eds.), *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century*, (pp. 182-187).
- Le Quéré, J.-L., & Salles, C. (2001). Goat cheese flavour compounds. In G. Freund (Ed.), *Recent advances on goat milk quality, raw material for cheesemaking*, (pp. 115-122). Surgères: ITPLC Editions.
- Le Quéré, J.-L., Gierczynski, I., Langlois, D., & Sémon, E. (2006). Nosespace with an ion trap mass spectrometer: quantitative aspects. In W. L. P. Bredie & M. A. Petersen (Eds.), *Flavour Science: Recent Advances And Trends*, vol. 43 (pp. 589-592): Elsevier, Oxford.
- Lebecque, A., Laguet, A., Devaux, M. F., & Dufour, E. (2001). Delineation of the texture of Salers cheese by sensory analysis and physical methods. *Lait*, 81(5), 609-624.
- Leclercq, S., & Blancher, G. (2012). Multimodal Sensory Integration during Sequential Eating--Linking Chewing Activity, Aroma Release, and Aroma Perception over Time. *Chemical Senses*, *Epub ahead of print*.
- Lee, B. O., Kilbertus, G., & Alais, C. (1981). Ultrastructural-study on processed cheese - effect of different parameters. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 36(6), 343-348.

- Lee, S. K., Buwalda, R. J., Euston, S. R., Foegeding, E. A., & McKenna, A. B. (2003). Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 36(3), 339-345.
- Lee, S. K., Anema, S., & Klostermeyer, H. (2004). The influence of moisture content on the rheological properties of processed cheese spreads. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(7), 763-771.
- Lefier, D., Grappin, R., Grosclaude, G., & Curtat, G. (1987). Sensory properties and nutritional quality of low-sodium gruyere cheese. *Lait*, 67(4), 451-464.
- Lemiere, J., & Vial, J.-C. (2008). *Microscopie optique non linéaire de ganglions lymphatiques comme alternative à l'histologie classique*. (rapport de stage) Grenoble (FRA): CNRS UMR 5588.
- Lethuaut, L., Weel, K. G. C., Boelrijk, A. E. M., & Brossard, C. D. (2004). Flavor perception and aroma release from model dairy desserts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3478-3485.
- Lethuaut, L., Brossard, C., Meynier, A., Rousseau, F., Llamas, G., Bousseau, B., & Genot, C. (2005). Sweetness and aroma perceptions in dairy desserts varying in sucrose and aroma levels and in textural agent. *International Dairy Journal*, 15(5), 485-493.
- Liem, D. G., Miremedi, F., & Keast, R. S. J. (2011). Reducing Sodium in Foods: The Effect on Flavor. *Nutrients*, 3(6), 694-711.
- Likens, S. T., & Nickerson, G. B. (1964). Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 5.
- Lim, J., & Johnson, M. B. (2012). The role of congruency in retronasal odor referral to the mouth. *Chemical Senses*, 37(6), 515-521.
- Lindinger, W., Hansel, A., & Jordan, A. (1998). Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS): on-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels. *Chemical Society Reviews*, 27(5), 347-354.
- Linforth, R., Martin, F., Carey, M., Davidson, J., & Taylor, A. J. (2002). Retronasal transport of aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1111-1117.
- Linforth, R., Hodgson, M., & Taylor, A. (2003). *Studies of retronasal flavour delivery*.
- Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., & Hornelas-Urbe, Y. (1998). Microstructure and texture of cheese analogs containing different types of fat. *Journal of Texture Studies*, 29(5), 569-586.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Beaucher, E., & Ollivon, M. (2008). Multiscale characterization of the organization of triglycerides and phospholipids in Emmental cheese: from the microscopic to the molecular level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2406-2414.
- Lubbers, S., Landy, P., & Voilley, A. (1998). Retention and release of aroma compounds in foods containing proteins. *Food Technology*, 52(5), 68-214.
- Lucey, J. A., Munro, P. A., & Singh, H. (1998). Rheological properties and microstructure of acid milk gels as affected by fat content and heat treatment. *Journal of Food Science*, 63(4), 660-664.
- Lynch, J., Liu, Y. H., Mela, D. J., & Macfie, H. J. H. (1993). A time intensity study of the effect of oil mouthcoatings on taste perception. *Chemical Senses*, 18(2), 121-129.
- Malone, M. E., Appelqvist, I. A. M., & Norton, I. T. (2003a). Oral behaviour of food hydrocolloids and emulsions. Part 1. Lubrication and deposition considerations. *Food Hydrocolloids*, 17(6), 763-773.
- Malone, M. E., Appelqvist, I. A. M., & Norton, I. T. (2003b). Oral behaviour of food hydrocolloids and emulsions. Part 2. Taste and aroma release. *Food Hydrocolloids*, 17(6), 775-784.
- Marchesseau, S., Gastaldi, E., Lagaude, A., & Cuq, J. L. (1997). Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1483-1489.
- Marshall, R. J. (1990). Composition, structure, rheological properties, and sensory texture of processed cheese analogs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50(2), 237-252.
- Martinho, J. M. G., Santos, A. M., Fedorov, A., Baptista, R. P., Taipa, M. A., & Cabral, J. M. S. (2003). Fluorescence of the single tryptophan of cutinase: Temperature and pH effect on protein conformation and dynamics. *Photochemistry and Photobiology*, 78(1), 15-22.

- Mattes, R. D. (2007). Effects of linoleic acid on sweet, sour, salty, and bitter taste thresholds and intensity ratings of adults. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(5), G1243-G1248.
- Mayer, H. K. (2001). Bitterness in processed cheese caused by an overdose of a specific emulsifying agent? *International Dairy Journal*, 11(4-7), 533-542.
- Mayr, D., van Ruth, S. M., & Mark, T. D. (2003). Evaluation of the influence of mastication on temporal aroma release of ripe and unripe bananas, using a model mouth system and gas chromatography-olfactometry. *European Food Research and Technology*, 217(4), 291-295.
- McMahon, D. J., Fife, R. L., & Oberg, C. J. (1999). Water partitioning in Mozzarella cheese and its relationship to cheese meltability. *Journal of Dairy Science*, 82(7), 1361-1369.
- McMahon, D. J., Paulson, B., & Oberg, C. J. (2005). Influence of calcium, pH, and moisture on protein matrix structure and functionality in direct-acidified nonfat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3754-3763.
- Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1991). *Sensory evaluation techniques*. Boca Raton: CRC Press.
- Meiselman, H. L., & Halpern, B. P. (1973). Enhancement of taste intensity through pulsatile stimulation. *Physiology & Behavior*, 11(5), 713-716.
- Mese, H., & Matsuo, R. (2007). Salivary secretion, taste and hyposalivation. *Journal of Oral Rehabilitation*, 34(10), 711-723.
- Mestres, M., Moran, N., Jordan, A., & Buettner, A. (2005). 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*, 53(2), 403-409.
- Mestres, M., Kieffer, R., & Buettner, A. (2006). Release and Perception of Ethyl Butanoate during and after Consumption of Whey Protein Gels: Relation between Textural and Physiological Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1814 -1821.
- Mialon, V. S., & Ebeler, S. E. (1997). Time-intensity measurement of matrix effects on retronasal aroma perception. *Journal of Sensory Studies*, 12(4), 303-316.
- Michalski, M. C., Ollivon, M., Briard, V., Leconte, N., & Lopez, C. (2004). Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior. *Chemistry and Physics of Lipids*, 132(2), 247-261.
- Mickleborough, T. D., & Fogarty, A. (2006). Dietary sodium intake and asthma: an epidemiological and clinical review. *International Journal of Clinical Practice*, 60(12), 1616-1624.
- Mimran, A., & du Cailar, G. (2008). Dietary sodium: the dark horse amongst cardiovascular and renal risk factors. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(7), 2138-2141.
- Mioche, L., Bourdiol, P., Martin, J. F., & Noel, Y. (1999). Variations in human masseter and temporalis muscle activity related to food texture during free and side-imposed mastication. *Archives of Oral Biology*, 44(12), 1005-1012.
- Mioche, L., Bourdiol, P., Monier, S., & Martin, J. F. (2002). The relationship between chewing activity and food bolus properties obtained from different meat textures. *Food Quality and Preference*, 13(7-8), 583-588.
- Mioche, L., Bourdiol, P., & Monier, S. (2003). Chewing behaviour and bolus formation during mastication of meat with different textures. *Archives of Oral Biology*, 48(3), 193-200.
- Mishellany-Dutour, A., Woda, A., Labouré, H., Bourdiol, P., Lachaze, P., Guichard, E., & Feron, G. (2012). Retro-Nasal Aroma Release Is Correlated with Variations in the In-Mouth Air Cavity Volume after Empty Deglutition. *Plos One*, 7(7).
- Mistry, V. V., & Anderson, D. L. (1993). Composition and microstructure of commercial full-fat and low-fat cheeses. *Food Structure*, 12(2), 259-266.
- Moreau, C., & Guichard, E. (2006). Flavor-Food compound interactions by NMR spectroscopy. In G. A. Webb (Ed.), *Modern Magnetic Resonance Applications in Materials Science and Food Science* ed., vol. Part 3 Food Science (pp. 1589-1593).

- Mosca, A. C., van de Velde, F., Bult, J. H. F., van Boekel, M. A. J. S., & Stieger, M. (2012). Effect of gel texture and sucrose spatial distribution on sweetness perception. *Lwt-Food Science and Technology*, *46*(1), 183-188.
- Mouaddab, M., Foucat, L., Donnat, J.-P., Renou, J.-P., & Bonny, J.-M. (2007). Absolute quantification of Na⁺ bound fraction by double-quantum filtered ²³Na NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, *189*(1), 151-155.
- Mouaddab, M. (2008). *Méthodes de spectroscopie et d'imagerie RMN double-quanta pour l'étude de l'eau et du sodium en interaction dans les tissus biologiques et les produits agro-alimentaires.* (thèse) Université d'Auvergne.
- Mulsow, B. B., Jaros, D., & Rohm, H. (2007). Processed cheese and cheese analogues. In A. Tamime (Ed.), *Structure of dairy products*, (pp. 210-235).
- Nasri, N., Beno, N., Septier, C., Salles, C., & Thomas-Danguin, T. (2011). Cross-modal interactions between taste and smell: Odour-induced saltiness enhancement depends on salt level. *Food Quality and Preference*, *22*(7), 678-682.
- Nederkoorn, C., Smulders, F. T. Y., & Jansen, A. (1999). Recording of swallowing events using electromyography as a non-invasive measurement of salivation. *Appetite*, *33*(3), 361-369.
- Neyraud, E., Prinz, J., & Dransfield, E. (2003). NaCl and sugar release, salivation and taste during mastication of salted chewing gum. *Physiology & Behavior*, *79*(4-5), 731-737.
- Noble, A. C. (1995). Application of time-intensity procedures for the evaluation of taste and mouthfeel. *American Journal of Enology and Viticulture*, *46*(1), 128-133.
- Noble, A. C. (1996). Taste-aroma interactions. *Trends in Food Science & Technology*, *7*(12), 439-444.
- Noel, Y., Zannoni, M., & Hunter, E. A. (1996). Texture of Parmigiano Reggiano cheese: Statistical relationships between rheological and sensory variates. *Lait*, *76*(3), 243-254.
- Nongonierma, A. B., Springett, M., Le Quééré, J. L., Cayot, P., & Voilley, A. (2006). Flavour release at gas/matrix interfaces of stirred yoghurt models. *International Dairy Journal*, *16*(2), 102-110.
- Noort, M. W. J., Bult, J. H. F., Stieger, M., & Hamer, R. J. (2010). Saltiness enhancement in bread by inhomogeneous spatial distribution of sodium chloride. *Journal of Cereal Science*, *52*(3), 378-386.
- Normand, V., Avison, S., & Parker, A. (2004). Modeling the kinetics of flavour release during drinking. *Chemical Senses*, *29*(3), 235-245.
- Odake, S., Roozen, J. P., & Burger, J. J. (1998). Effect of saliva dilution on the release of diacetyl and 2-heptanone from cream style dressings. *Food / Nahrung*, *42*(06), 385-391.
- Ollivon, M. (2006). Lipid-flavour interactions. In A. Voilley & P. Etiévant (Eds.), *Flavour in food* CRC Press ed., vol. Part 3 (pp. 133-155). Cambridge, CB1 6AH, UK: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Ong, L., Dagastine, R. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2011). Microstructure of milk gel and cheese curd observed using cryo scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Lwt-Food Science and Technology*, *44*(5), 1291-1302.
- Ottenhoff, F. A. M., Vanderbilt, A., Vanderglas, H. W., & Bosman, F. (1992). Control of elevator muscle-activity during simulated chewing with varying food resistance in humans. *Journal of Neurophysiology*, *68*(3), 933-944.
- Overington, A. R., Eyres, G. T., Delahunty, C. M., Silcock, P., Niimi, J., Holland, R., & Coolbear, T. (2010). Flavour release and perception in cheese bases. *Australian Journal of Dairy Technology*, *65*(3), 162-164.
- Panouillé, M., Saint-Eve, A., de Loubens, C., Déléris, I., & Souchon, I. (2011). Understanding of the influence of composition, structure and texture on salty perception in model dairy products. *Food Hydrocolloids*, *25*(4), 716-723.
- Panouillé, M., Saint-Eve, A., Déléris, I., Le Bleis, F., Chaunier, L., & Souchon, I. (2012). Relations between bread structure, bolus formation and dynamics of salty and texture perceptions. In *2nd International Conference on Food Oral Processing*). Beaune, France.
- Pastorino, A. J., Hansen, C. L., & McMahon, D. J. (2003a). Effect of salt on structure-function relationships of cheese. *Journal of Dairy Science*, *86*(1), 60-69.

- Pastorino, A. J., Ricks, N. P., Hansen, C. L., & McMahon, D. J. (2003b). Effect of calcium and water injection on structure-function relationships of cheese. *Journal of Dairy Science*, *86*(1), 105-113.
- Pavia, M., Guamis, B., Trujillo, A. J., Capellas, M., & Ferragut, V. (1999). Changes in microstructural, textural and colour characteristics during ripening of Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *International Dairy Journal*, *9*(2), 91-98.
- Pedersen, A. M., Bardow, A., Jensen, S. B., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*, *8*(3), 117-129.
- Pereira, R., Bennett, R., Hemar, Y., & Campanella, O. (2001). Rheological and microstructural characteristics of model processed cheese analogues. *Journal of Texture Studies*, *32*(5-6), 349-373.
- Pereira, R. B. (2000). *Sensory, rheological and microstructural characteristics of model emulsified dairy systems*. Massey University, New Zealand.
- Phan, V. A., Yven, C., Lawrence, G., Chabanet, C., Reparet, J. M., & Salles, C. (2008). In vivo sodium release related to salty perception during eating model cheeses of different textures. *International Dairy Journal*, *18*(9), 956-963.
- Piggott, J. R. (2000). Dynamism in flavour science and sensory methodology. *Food Research International*, *33*(3-4), 191-197.
- Pionnier, E., Chabanet, C., Mioche, L., Le Quéré, J.-L., & Salles, C. (2004a). 1. In Vivo Aroma Release during Eating of a Model Cheese: Relationships with Oral Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(3), 557-564.
- Pionnier, E., Chabanet, C., Mioche, L., Taylor, A. J., Le Quéré, J.-L., & Salles, C. (2004b). 2. In vivo nonvolatile release during eating of a model cheese: relationships with oral parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(3), 565-571.
- Porion, P., Al Mukhtar, M., Meyer, S., Faugere, A. M., van der Maarel, J. R. C., & Delville, A. (2001). Nematic ordering of suspensions of charged anisotropic colloids detected by Na-23 nuclear magnetic resonance. *Journal of Physical Chemistry B*, *105*(43), 10505-10514.
- Prinz, J. F., & Lucas, P. W. (1997). An optimization model for mastication and swallowing in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *264*(1389), 1715-1721.
- Rabe, S., Krings, U., & Berger, R. G. (2003). Initial dynamic flavour release from sodium chloride solutions. *European Food Research and Technology*, *218*(1), 32-39.
- Reddy, R., Bolinger, L., Shinnar, M., Noyszewski, E., & Leigh, J. S. (1995). Detection of residual quadrupolar interaction in human skeletal-muscle and brain in-vivo via multiple-quantum filtered sodium NMR-spectra. *Magnetic Resonance in Medicine*, *33*(1), 134-139.
- Reineccius, G. (2002). Instrumental methods of analysis. In A. J. Taylor (Ed.), *Food flavour technology*, (pp. 210-251). Sheffield Academic Press, Sheffield.
- Reiners, J., Nicklaus, S., & Guichard, E. (2000). Interactions between β -lactoglobulin and flavour compounds of different chemical classes. Impact of the protein on the odour perception of vanillin and eugenol. *Lait*, *80*, 347-360.
- Relkin, P., Fabre, M., & Guichard, E. (2004). Effect of fat nature and aroma compound hydrophobicity on flavor release from complex food emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(20), 6257-6263.
- Renou, J.-P., Belton, P. S., & Webb, G. A. (2011). *Magnetic Resonance in Food Science : an exciting future*: The Royal Society of Chemistry.
- Repoux, M., Sémon, E., Feron, G., Guichard, E., & Labouré, H. (2011). Inter-individual variability in aroma release during sweet mint consumption. *Flavour and Fragrance Journal, Online*.
- Repoux, M., Septier, C., Palicki, O., Guichard, E., Feron, G., & Labouré, H. (2012a). Solid cheese consumption: Quantification of oral coating. *Archives of Oral Biology*, *57*(1), 81-86.
- Repoux, M., Labouré, H., Courcoux, P., Andriot, I., Sémon, E., Feron, G., & Guichard, E. (2012b). Combined effect of cheese characteristics and food oral processing on in vivo aroma release. *Flavour and Fragrance Journal*, (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ffj.3110.

- Rijniers, L. A., Magusin, P., Huinink, H. P., Pel, L., & Kopinga, K. (2004). Sodium NMR relaxation in porous materials. *J. Magn. Reson.*, 167(1), 25-30.
- Roberts, D. D., & Acree, T. E. (1995). 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*, 43(8), 2179-2186.
- Roberts, D. D., Elmore, J. S., Langley, K. R., & Bakker, J. (1996). Effects of sucrose, guar gum, and carboxymethylcellulose on the release of volatile flavor compounds under dynamic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1321-1326.
- Rosett, T. R., Shirley, L., Schmidt, S. J., & Klein, B. P. (1994). Na⁺ binding as measured by ²³Na nuclear-magnetic-resonance spectroscopy influences the perception of saltiness in gum solutions. *Journal of Food Science*, 59(1), 206-210.
- Rosett, T. R., Wu, Z. H., Schmidt, S. J., Ennis, D. M., & Klein, B. P. (1995). KCl, CaCl₂, Na⁺ Binding, and Salt Taste of Gum Systems. *Journal of Food Science*, 60(4), 849-853, 867.
- Rosett, T. R., Kendregan, S. L., & Klein, B. P. (1997). Fat, protein, and mineral components of added ingredients affect flavor qualities of tomato soups. *Journal of Food Science*, 62(1), 190-193.
- Rougier, T. (2006). *Caractérisation et modélisation des transferts d'eau et de solutés en vue d'une aide à la formulation des aliments composites. Cas des assemblages base céréalière – fourrage humide protéique.* (thèse) ENSIA MASSY.
- Saint-Eve, A., Kora, E. P., & 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.
- Saint-Eve, A., Juteau, A., Atlan, S., Martin, N., & Souchon, I. (2006a). Complex viscosity induced by protein composition variation influences the aroma release of flavored stirred yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3997-4004.
- Saint-Eve, A., Martin, N., Guillemin, H., Sémon, E., Guichard, E., & Souchon, I. (2006b). Flavored Yogurt Complex Viscosity Influences Real-Time Aroma Release in the Mouth and Sensory Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7794-7803.
- Saint-Eve, A., Lauverjat, C., Magnan, C., Déléris, I., & Souchon, I. (2009). Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. *Food Chemistry*, 116(1), 167-175.
- Sakurai, K., Oobatake, M., & Goto, Y. (2001). Salt-dependent monomer-dimer equilibrium of bovine beta-lactoglobulin at pH 3. *Protein Sci*, 10(11), 2325-2335.
- Salles, C. (2006). Odour-taste interactions in flavour perception. In A. Voilley & P. Etiévant (Eds.), *Flavour in Food* CRC Press ed., vol. Part 3 (pp. 345-368). Cambridge, CB1 6AH, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Salles, C. (2007). The chewing simulator: development and applications. In *Seminaire Unilever*. Vlaardingen (NLD).
- Salles, C., Chagnon, M.-C., Feron, G., Guichard, E., Labouré, H., Morzel, M., Sémon, E., Tarrega, A., & Yven, C. (2011). In-mouth mechanisms leading to flavor release and perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1), 67-90.
- Savary, G. (2006). *Impact de la structure de gels composites à base de polyosides sur la libération d'arôme : exemple des bases de fruits-sur-sucre.* Université de Bourgogne - Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Dijon (FRA).
- Savary, G., Guichard, E., Doublier, J.-L., & Cayot, N. (2006). Mixture of aroma compounds: Determination of partition coefficients in complex semi-solid matrices. *Food Research International*, 39(3), 372-379.
- Schlich, P. (1993). Uses of change over designs and repeated measurements in sensory and consumer studies. *Food Quality and Preference*, 4(4), 223-235.
- Seuvre, A. M., Diaz, M. A. E., & Voilley, A. (2000). Influence of the food matrix structure on the retention of aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4296-4300.

- Seuvre, A. M., Diaz, M. A. E., & Voilley, A. (2001). Retention of aroma compounds by beta-lactoglobulin in different conditions. *Food Chemistry*, 77(4), 421-429.
- Shimp, L. A. (1985). Process cheese principles. *Food Technology*, 39(5), 63-&.
- Simons, C. T., Boucher, Y., & Carstens, E. (2003). Suppression of central taste transmission by oral capsaicin. *Journal of Neuroscience*, 23(3), 978-985.
- Smith, A. K., & Campbell, B. E. (2007). Microstructure of milk components. In A. Tamime (Ed.), *Structure of dairy products*, (pp. 59-71).
- Soupe, J. (2004). *Ingrédients laitiers minéralisés industriels*. Paris: Lavoisier. Tec&Doc.
- Spinnler, H. E. (2011). Role of lipids in the olfactive perception of dairy products. *Sciences Des Aliments*, 30(1-4), 105-121.
- Stampanoni, C. R., & Noble, A. C. (1991). The influence of fat, acid, and salt on the perception of selected taste and texture attributes of cheese analogs - a scalar study. *Journal of Texture Studies*, 22(4), 367-380.
- Stien, L. H., Kiessling, A., & Marine, F. (2007). Rapid estimation of fat content in salmon fillets by colour image analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 73-79.
- Stone, H., Sidel, J., Oliver, S., Woolsey, A., & Singleton, R. C. (1974). Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technology*, November, 24-34.
- Strazzullo, P., D'Elia, L., Kandala, N. B., & Cappuccio, F. P. (2009). Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *British Medical Journal*, 339.
- Sutheerawattananonda, M., Fulcher, R. G., Martin, F. B., & Bastian, E. D. (1997). Fluorescence image analysis of process cheese manufactured with trisodium citrate and sodium chloride. *Journal of Dairy Science*, 80(4), 620-627.
- Swails, J. M., Miller, B. R., III, & Roitberg, A. E. (2010). Effect of pH on protein conformation and function in GM2-activator protein. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 239.
- Tamime, A. Y., Kalab, M., Davies, G., & Younis, M. F. (1990). Microstructure and firmness of processed cheese manufactured from cheddar cheese and skim milk powder cheese base. *Food Structure*, 9(1), 23-37.
- Tamime, A. Y. (2007). *Structure of dairy products*. Oxford, UK: Blackwell publishing.
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K., & Michel, M. (2007a). Microstructure of concentrated and dried milk products. In A. Tamime (Ed.), *Structure of dairy products*, (pp. 104-133).
- Tarrega, A., Yven, C., Sémon, E., & Salles, C. (2008). Aroma release and chewing activity during eating different model cheeses. *International Dairy Journal*, 18(8), 849-857.
- Tarrega, A., Yven, C., Sémon, E., & Salles, C. (2011). In-mouth aroma compound release during cheese consumption: Relationship with food bolus formation. *International Dairy Journal*, 21(5), 358-364.
- Taylor, A. J., Linforth, R. S. T., Harvey, B. A., & Blake, A. (2000). Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for in vivo analysis of volatile flavour release. *Food Chemistry*, 71(3), 327-338.
- Thomas-Danguin, T., Rouby, C., Sicard, G., Vigouroux, M., Farget, V., Johansson, A., Bengtson, A., Hall, G., Ormel, W., de Graaf, C., Rousseau, F., & Dumont, J. P. (2003). Development of the ETOC: a European test of olfactory capabilities. *Rhinology*, 41(3), 142-151.
- Tian, X., & Fisk, I. D. (2012). Salt release from potato crisps. *Food & Function*, 3(4), 376-380.
- Tournier, C., Grass, M., Septier, C., Bertrand, D., & Salles, C. (2012). Influence of mastication and salivation on salt release during bread consumption and relationships with food bolus formation. In *2nd International Conference on Food Oral Processing*. Beaune, France.
- Tromelin, A., Andriot, I., & Guichard, E. (2006). Protein-flavour interactions. In A. Voilley & P. Etiévant (Eds.), *Flavour in food* CRC Press ed., vol. Part 3 (pp. 172-207). Cambridge, CB1 6AH, UK: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Uhrinova, S., Smith, M. H., Jameson, G. B., Uhrin, D., Sawyer, L., & Barlow, P. N. (2000). Structural Changes Accompanying pH-Induced Dissociation of the -Lactoglobulin Dimer. *Biochemistry*, 39(13), 3565-3574.

- Valentin, D., Chrea, C., & Hoang Nguyen, D. (2006). Taste-odour interaction in sweet taste perception. In W. J. Spillane (Ed.), *Optimising sweet taste in foods*, (pp. 66-84). Cambridge (GBR): Woodhead Publishing Limited.
- Valentova, H., & Pokorny, J. (1998). Effect of edible oils and oil emulsions on the perception of basic tastes. *Nahrung-Food*, 42(6), 406-408.
- van Ruth, S. M., & Roozen, J. P. (2000). Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system. *Food Chemistry*, 71(3), 339-345.
- van Ruth, S. M., Grossmann, I., Geary, M., & Delahunty, C. M. (2001). Interactions between artificial saliva and 20 aroma compounds in water and oil model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2409-2413.
- van Ruth, S. M., & Villeneuve, E. (2002). Influence of beta-lactoglobulin, pH and presence of other aroma compounds on the air/liquid partition coefficients of 20 aroma compounds varying in functional group and chain length. *Food Chemistry*, 79(2), 157-164.
- van Ruth, S. M., Dings, L., Buhr, K., & Posthumus, M. A. (2004). In vitro and in vivo volatile flavour analysis of red kidney beans by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Food Research International*, 37(8), 785-791.
- van Vliet, T. (2002). On the relation between texture perception and fundamental mechanical parameters for liquids and time dependent solids. *Food Quality and Preference*, 13(4), 227-236.
- Vanderklaauw, N. J., & Smith, D. V. (1995). Taste quality profiles for 15 organic and inorganic salts. *Physiology & Behavior*, 58(2), 295-306.
- Vinas, M. A. G., Ballesteros, C., Martin-Alvarez, P. J., & Cabezas, L. (2007). Relationship between sensory and instrumental measurements of texture for artisanal and industrial manchego cheeses. *Journal of Sensory Studies*, 22(4), 462-476.
- Voilley, A. (2006). Flavour retention and release from the food matrix: an overview. In A. Voilley & P. Etiévant (Eds.), *Flavour in food* CRC Press ed., vol. Part 3 (pp. 117-132). Cambridge, CB1 6AH, UK: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Vos, P. G. (1998). *Bourdon Vos testhandleiding [Bourdon vos test manual]*. Lisse: Swets & Zeitlinger B.V.
- Walstra, P., & Jenness, R. (1984). *Dairy chemistry & physics*.
- Walstra, P. (1993). *The syneresis of curd* (2nd edition, P.F.Fox, ed., Chapman & Hall, London ed.). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology - Vol.1, General Aspects.
- Weel, K. G. C., Boelrijk, A. E. M., Alting, A. C., van Mil, P., Burger, J. J., Gruppen, H., Voragen, A. G. J., & Smit, G. (2002). Flavor release and perception of flavored whey protein gels: Perception is determined by texture rather than by release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5149-5155.
- Wendin, K., Langton, M., Caous, L., & Hall, G. (2000). Dynamic analyses of sensory and microstructural properties of cream cheese. *Food Chemistry*, 71(3), 363-378.
- WHO. (2007). *Reducing salt intake in populations : Report of a WHO Forum and Technical meeting, 5-7 Octobre 2006, Paris, France*. Genève, Suisse: WHO.
- Wilkinson, C., Dijksterhuis, G. B., & Minekus, M. (2000). From food structure to texture. *Trends in Food Science & Technology*, 11(12), 442-450.
- Woda, A., Foster, K., Mishellany, A., & Peyron, M. A. (2006). Adaptation of healthy mastication to factors pertaining to the individual or to the food. *Physiology & Behavior*, 89(1), 28-35.
- Woessner, D. E. (2001). NMR relaxation of spin-3/2 nuclei: Effects of structure, order, and dynamics in aqueous heterogeneous systems. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 13(5), 294-325.
- Wright, K. M., Hills, B. P., Hollowood, T. A., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (2003). Persistence effects in flavour release from liquids in the mouth. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(3), 343-350.
- Wright, S. J., Centonze, V. E., Stricker, S. A., DeVries, P. J., Paddock, S. W., & Schatten, G. (1993). Introduction to confocal microscopy and three dimensional reconstruction. In B. Matsumoto

- (Ed.), *Methods in cell biology*, vol. vol.38 : cell biological applications of confocal microscopy (pp. 1-45). Academic Press, San Diego.
- Yang, J., Powers, J. R., Clark, S., Dunker, A. K., & Swanson, B. G. (2003). Ligand and flavor binding functional properties of beta-lactoglobulin in the molten globule state induced by high pressure. *Journal of Food Science*, *68*(2), 444-452.
- Ye, X., Yoshida, S., & Ng, T. B. (2000). Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *The International Journal of Biochemistry ; Cell Biology*, *32*(11-12), 1143-1150.
- Yven, C., Patarin, J., Magnin, A., Labouré, H., Repoux, M., Guichard, E., & Feron, G. (2012). Consequences of individual chewing strategies on bolus rheological properties at the swallowing threshold. *Journal of Texture Studies*, *43*(4), 309-318.
- Zhang, C., Huang, K., Yu, P., & Liu, H. (2011). Salting-out induced three-liquid-phase separation of Pt(IV), Pd(II) and Rh(III) in system of S201-acetonitrile-NaCl-water. *Separation and Purification Technology*, *80*(1), 81-89.
- Zorrilla, S. E., & Rubiolo, A. C. (1994). A model for using the diffusion cell in the determination of multicomponent diffusion-coefficients in gels or foods. *Chemical Engineering Science*, *49*(13), 2123-2128.

ANNEXES

Annexe 1 :

Andriot, I., Boisard, L., Vergoignan, C., Salles, C., & Guichard, E. (2011). Sodium ions in model cheeses at molecular and macroscopic levels. In J.-P. Renou, P. S. Belton & G. A. Webb (Eds.), *Magnetic Resonance in Food Science. An Exciting Future (Special publication No. 332)*, (pp. 67-70). Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry.

SODIUM IONS IN MODEL CHEESES AT MOLECULAR AND MACROSCOPIC LEVELS

I. Andriot¹, L. Boisard², C. Vergoignan², C. Salles², E. Guichard²

¹Lipids-Aromas Platform, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR1324 INRA, UMR6265 CNRS, Université de Bourgogne, Agrosup Dijon, F-21000 Dijon.

²FLAVI Research Group, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR1324 INRA, UMR6265 CNRS, Université de Bourgogne, Agrosup Dijon, F-21000 Dijon.

1. INTRODUCTION

The excessive consumption of sodium is one of the causes of nutritional-related health problems. The reduction of salt content without affecting technological and sensorial properties of foodstuffs is currently a challenge for the food industry.¹ There is a need to develop tools to quantify the "active" sodium ions in food products at molecular and macroscopic levels to better understand the in-mouth salt release. In this context, methods for the quantification of the bound fraction of sodium were developed.

2. MATERIALS AND METHODS

Model cheeses

Model cheeses with three different structures were made using a processed cheese technology² (65°C, 7 min 30, 2000 rpm) with three ratios of lipids/proteins (0.5, 0.75 and 1), and two salt concentrations (0 and 10 g.L⁻¹ of NaCl). The water content was equal to 50% for all the cheeses studied.

²³Na NMR

At molecular level, the quantification of total sodium and bound sodium was performed by ²³Na NMR.^{3,4} A cylindrical sample (Ø = 0.9 cm, length = 5 cm) was taken from a cheese sample and inserted in a 10 mm NMR tube. Another 5 mm NMR tube containing a solution of Na₇Dy(PPP)₂ in D₂O ([Na⁺] = 0.4 M) was inserted as external reference.

²³Na single-quantum (SQ) and double-quantum-filtered (DQF) NMR experiments were recorded at 132.29 MHz on a Bruker Avance-500 spectrometer equipped with a 10 mm broad-band probe. All the NMR experiments were carried out at 25°C.

Partition coefficient

At macroscopic level, the partition coefficients of sodium ions in cheeses were determined according to the method developed by Laurverjat *et al.*⁵ A piece of cheese (10 g) was put in 1 L of ultrapure water (MilliQ). After 24 hours of equilibrium at 25°C, an aliquot of water was taken. The quantification of sodium released in water was performed by a conductimetric detection, after ionic separation using HPLC (Dionex ICS-3000). Knowing

Table 1: Quantification of total sodium and bound sodium, creation time and relaxation time by ^{23}Na NMR.

Cheeses	[Na ⁺] (g·L ⁻¹)	Total sodium		Ratio Area "bound Na ⁺ "/ Area "Total Na"	Bound sodium		
		Relaxation time (ms)			Creation time (ms)	Relaxation time (ms)	
		T_{2S}^{DQ}	T_{2F}^{DQ}			T_{opt}^{DQ}	T_{2S}^{DQ}
Soft cheese without NaCl	6.91 ± 0.11	1.86 ± 0.01	5.65 ± 0.02	19.08 ± 0.58	1.60 ± 0.02	0.51 ± 0.01	9.81 ± 0.05
Soft cheese with NaCl	11.01 ± 0.06	1.73 ± 0.05	6.13 ± 0.03	18.6 ± 0.47	1.62 ± 0.00	0.51 ± 0.00	10.46 ± 0.00
Intermediate cheese without NaCl	7.21 ± 0.17	1.63 ± 0.29	4.42 ± 0.66	19.39 ± 0.05	1.19 ± 0.01	0.35 ± 0.01	8.96 ± 0.05
Intermediate cheese with NaCl	10.96 ± 0.16	1.43 ± 0.04	3.79 ± 0.08	20.37 ± 0.44	1.15 ± 0.44	0.34 ± 0.01	8.61 ± 0.19
Firm cheese without NaCl	7.26 ± 0.15	1.53 ± 0.05	3.92 ± 0.03	19.27 ± 0.29	1.14 ± 0.01	0.35 ± 0.00	8.10 ± 0.00
Firm cheese with NaCl	11.12 ± 0.21	1.43 ± 0.01	3.85 ± 0.01	19.30 ± 0.05	1.16 ± 0.00	0.35 ± 0.00	8.39 ± 0.03

the initial concentration of sodium in cheeses, the partition coefficients were calculated. Comparisons between the different obtained values were done using a Newman-Keuls test.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Total sodium amount was quantified by ^{23}Na NMR with a good precision (Table 1). At molecular level, the relaxation time of total sodium (T_{2S}^{DQ} , T_{2F}^{DQ}) decreases when the firmness increases, thus the sodium mobility decreases. For an identical composition, when the sodium content increases, the sodium mobility decreases. Moreover, when the protein content increases, which induces an increase of firmness, the sodium ions are less mobile. Concerning the bound sodium, the ratio of "Area bound sodium/ Area total sodium" is approximately the same whatever the composition of cheeses.

The creation time of bound sodium (T_{opt}^{DQ}) decreases when the cheeses firmness increases, thus the system is more organised around the bound sodium. The values of relaxation time for bound sodium (T_{2S}^{DQ} , T_{2F}^{DQ}) have the same behaviour as those of total sodium; i.e. the relaxation time of bound sodium decreases when the firmness increases, thus the bound sodium mobility decreases. For an identical composition, when the sodium content increases, the bound sodium mobility decreases.

Thus, the ^{23}Na relaxation time measurements and the DQF parameters highlight the impact of the composition (ratio of lipids/proteins) on the interactions between the sodium ions and the food matrices, confirming preliminary results obtained by *Gober et al.*⁴ At macroscopic level, the partition coefficients (Table 2) are always lower than 1, which means that a part of sodium is retained by the cheese matrices. The partition coefficient of sodium decreases with the increase of cheese firmness. These results are in agreement with those obtained at molecular level.

Table 2: Partition coefficient of sodium in cheese determined at 25°C.

Cheeses	Ratio Lipids/Proteins	[Na ⁺] _{total} (g·L ⁻¹)	Partition coefficient
Soft cheese without NaCl	1	7.2	0.79 ^a
Soft cheese with NaCl	1	11.1	0.82 ^a
Intermediate cheese without NaCl	0.75	7.2	0.76 ^b
Intermediate cheese with NaCl	0.75	11.1	0.76 ^b
Firm cheese without NaCl	0.5	7.2	0.69 ^c
Firm cheese with NaCl	0.5	11.1	0.72 ^c

^{a,b,c}: significantly different at 0.05

4. CONCLUSION

This study allows to better understand the role of sodium in foodstuffs. It highlights that NMR is a powerful tool to quantify total sodium and bound sodium ions. Results on mobility at molecular level explain the differences in the macroscopic sodium release in water. A better understanding of sodium mobility in function of food composition and structure will help to better explain saltiness.

References

1. D. Kilcast and F. Angus, eds., *Reducing salt in foods*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England (GBR), 2007.
2. A. Tarrega, C. Yven, E. Sémon and C. Salles, *Int. Dairy J.*, 2008, **18**, 849.
3. M. Mouaddab, L. Foucat, J.-P. Donnat, J.-P. Renou and J.-M. Bonny, *J. Magn. Reson.*, 2007, **189**, 151.
4. M. Gobet, C. Rondeau-Mouro, S. Buchin, J.-L. Le Quéré, E. Guichard, L. Foucat and C. Moreau, *Magn. Reson. Chem.*, 2010, **48**, 297.
5. C. Laverjat, C. de Loubens, I. Déléris, I. C. Tréléa and I. Souchon, *J. Food Eng.*, 2009, **93**, 407.

Annexe 2 :

**Aide-mémoire remis aux sujets du panel lors du profil sensoriel : description des
descripteurs en bouche.**

Descripteurs de saveurs, goût, sensations, arômes

✧ INTENSITE SALEE

Définition du descripteur : Présence plus ou moins forte de sel.

Quand ? Pendant et après la mise en bouche **Où ?** Dans l'ensemble de la bouche, le nez

Mode opératoire : En mâchant le produit

Echelle et références produits

NON PERCUE



Eau

TRES INTENSE



Solution salée

Descripteurs de saveurs, goût, sensations, arômes

✧ INTENSITE AROMATIQUE GLOBALE

Définition du descripteur : Goût plus ou moins prononcé.

Quand ? Pendant et après la mise en bouche **Où ?** Dans l'ensemble de la bouche, le nez

Mode opératoire : En mâchant le produit

Echelle et références produits

NON PERCUE



TRES INTENSE



Camembert de Normandie au Lait cru

Descripteurs de saveurs, goût, sensations, arômes

✧ NOTE FRUITEE

Définition du descripteur : qui rappelle le goût d'un ou plusieurs fruits.

Quand ? Pendant et après la mise en bouche **Où ?** Dans l'ensemble de la bouche, le nez

Mode opératoire : En mâchant le produit

Echelle et références produits

NON PERCUE



TRES INTENSE



Yaourt multi-fruits (Fruits des bois + Abricot)

Descripteurs de saveurs, goût, sensations, arômes

✧ NOTE LACTEE

Définition du descripteur : Qui a le goût de lait, de crème.

Quand ? Pendant et après la mise en bouche **Où ?** Dans l'ensemble de la bouche, le nez

Mode opératoire : En mâchant le produit

Echelle et références produits

NON PERCUE



TRES INTENSE



Lait entier stérilisé

Descripteurs de saveurs, goût, sensations, arômes

✧ NOTE BEURRE / GRAS

Définition du descripteur : Goût plus ou moins prononcé de beurre, de gras.

Quand ? Pendant et après la mise en bouche **Où ?** Dans l'ensemble de la bouche, le nez

Mode opératoire : En mâchant le produit

Echelle et références produits



Descripteurs de texture

✧ TEXTURE MORCELEE

Définition du descripteur : Qui se fractionne, qui fait de petits morceaux en bouche.

Quand ? Pendant et après la mastication **Où ?** Entre les dents et sur la langue

Mode opératoire : En mâchant le produit

Echelle et références produits



Descripteurs de texture

✧ LISSE EN BOUCHE

Définition du descripteur : Qui glisse en bouche (contraire de rugueux), notion de fluidité en bouche.

Quand ? Dès la mise en bouche **Où ?** Sur le palais

Mode opératoire : En mâchant le produit

Echelle et références produits

PAS LISSE



Parmesan

TRES LISSE



Cancoillotte

Descripteurs de texture

✧ GRAS EN BOUCHE

Définition du descripteur : Qui nappe la bouche, qui laisse un film huileux/lipidique en bouche.

Quand ? Après la mastication, après avoir avalé le produit **Où ?** Sur la langue et le palais

Mode opératoire : En passant la langue sur le palais

Echelle et références produits

PAS GRAS



Fromage blanc à 0%

TRES GRAS



Brillat Savarin

Descripteurs de texture

◇ ELASTIQUE

Définition du descripteur : Qui résiste à la mastication, qui est caoutchouteux.

Quand ? Pendant la mastication

Où ? Entre les dents

Mode opératoire : En mâchant

Echelle et références produits

PAS ELASTIQUE



Yaourt nature

TRES ELASTIQUE



Ficello

Descripteurs de texture

◇ DURETE

Définition du descripteur : Qui est difficile à croquer, contraire de mou.

Quand ? Dès la mise en bouche et pendant la mastication

Où ? Entre les dents

Mode opératoire : En mâchant

Echelle et références produits

MOU



Kidiboo

DUR



Parmesan

Descripteurs de texture

✧ COLLANT

Définition du descripteur : Qui colle aux dents et aux palais.

Quand ? Dès la mise en bouche et pendant la mastication **Où ?** Sur le palais, entre les dents

Mode opératoire : En mâchant, en passant la langue sur le palais

Echelle et références produits

PAS COLLANT



Yaourt nature

TRES COLLANT



Cancoillotte

Descripteurs de texture

✧ COMPACT

Définition du descripteur : Qui reste dense en bouche, qui est épais, difficile à mastiquer.

Quand ? Pendant la mastication **Où ?** Entre les dents

Mode opératoire : En mâchant

Echelle et références produits

PAS COMPACT



Mousse ail et fines herbes

TRES COMPACT



Emmental Carrefour

Annexes 3 et 4 :

Publications issues du travail de thèse



Structure and composition of model cheeses influence sodium NMR mobility, kinetics of sodium release and sodium partition coefficients

Lauriane Boisard^{a,b,c}, Isabelle Andriot^{a,b,c}, Christine Arnould^d, Christine Achilleos^e, Christian Salles^{a,b,c}, Elisabeth Guichard^{a,b,c,*}

^a CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^b INRA, UMRI 1224 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^c Université de Bourgogne, UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^d Plateforme Dips-Gel, Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne, UMR 1347 Agrobiologie, F-21000 Dijon, France

^e INRA, UR 342 Technologie et Analyses Laitières, rue de Vauxelles, BP 20080, F-33081 Palgey, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2012

Received in revised form 5 September 2012

Accepted 6 September 2012

Available online 18 September 2012

Keywords:

²³Na NMR

Sodium mobility

Sodium release

Partition coefficient

Microstructure

Model cheese

Lipid/protein ratio

Salt content

ABSTRACT

The mobility and release of sodium ions were assessed in model cheeses with three different lipid/protein ratios, with or without added NaCl. The rheological properties of the cheeses were analysed using uniaxial compression tests. Microstructure was characterised by confocal laser scanning microscopy. ²³Na nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was used to study the molecular mobility of sodium ions in model cheeses through measurements of the relaxation and creation times. Greater mobility was observed in cheeses containing a lower protein content and with added NaCl. The kinetics of sodium release from the cheese to an aqueous phase was correlated with the mobility of sodium ions. The highest rates of sodium release were observed with a lower protein content and with added NaCl. The water/cheese partition coefficients of sodium increased when NaCl was added or the protein content was higher. The study highlighted the effect of model cheese characteristics on molecular and macroscopic behaviours of sodium.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The health authorities are increasingly calling for a reduction in the salt content (NaCl) of foodstuffs. In this context, cheese is one of the products most markedly targeted because of its high sodium content. Reducing salt levels is a major challenge for the food industry (Kilcast & Angus, 2007). NaCl plays an important role in cheeses as it influences microbial growth, enzyme activity, water activity, casein hydration, cheese ripening and cheese organoleptic properties (Guinee & Fox, 2004). Variations in salt content also modify the rheological properties (Saint-Eve, Laverjat, Magnan, Déléris, & Souchon, 2009) and microstructure of model cheeses (Floury et al., 2009), due to Na⁺ binding to caseins (Hardy & Steinberg, 1984). Moreover, the modifications of salt content and model cheese composition influence both in-mouth sodium release during chewing and salty perception (Jack, Piggott, & Paterson, 1995; Lawrence et al., 2012; Morley, 2012; Panouillé, Saint-Eve, de Loubere, Déléris, & Souchon, 2011; Phan et al., 2008).

In order to maintain salty perception in salt-reduced cheeses, one strategy has consisted of replacing NaCl with substitutes (KCl, CaCl₂, MgCl₂) but these minerals have not been found to be convincing because they generate bitterness (Fitzgerald & Buckley, 1985). Another solution could be to enhance the salty perception at an identical salt level by increasing the mobility of sodium ions in products. Indeed, the increase in mobility could enhance the release of sodium ions in saliva during consumption, and then lead to an increase in salty perception.

By studying edible gum solutions, Rosett, Shirley, Schmidt, and Klein (1994) showed that a higher degree of saltiness perception was induced by a lower Na⁺ binding to ionic gum (xanthan, kappa carrageenan). They used sodium nuclear magnetic resonance (²³Na NMR) spectroscopy and this appeared to be a useful technique to study the mobility of sodium ions in a non-destructive manner. Other ²³Na NMR studies have already been carried out in biopolymer gels and biological tissues (Kemp-Harper, Brown, Hughes, Styles, & Wimperis, 1997; Navon, Shinar, Eliav, & Sen, 2001; Woessner, 2001). ²³Na NMR spectroscopy has also been applied to cheeses (Gobet et al., 2010) and model cheeses (Andriot, Boisard, Vergnignan, Salles, & Guichard, 2011) to highlight the effect of cheese composition (moisture, fat, calcium, sodium contents) on

* Corresponding author. Address: Institut National de la Recherche Agronomique, 17 rue de Sully, F-21000 Dijon, France. Tel.: +33 (0) 380695277; fax: +33 (0) 380693207.

E-mail address: elisabeth.guichard@dijon.inra.fr (E. Guichard).

sodium mobility. Nevertheless, these authors did not attempt to relate these data to kinetics of sodium release, and no link with salty perception was investigated.

During eating, salt must be released from the product into the saliva before it can be perceived. The salt release can be studied by in-mouth saliva collection (Pionnier et al., 2004; Salles et al., 2011), or by experimental methods associated with mechanistic modelling which enable to determine physicochemical properties such as partition or diffusion coefficients (Lauverjat, Dèlèris, Trélea, Salles, & Souchon, 2009). In their study on model cheeses, Lauverjat et al. (2009) found that higher NaCl diffusion coefficients were obtained with lower firmness and dry matter values, and higher contents of NaCl and fat. Until now, the study of sodium molecular mobility by ^{23}Na NMR and the study of in vitro sodium release have never been carried out simultaneously in model cheeses.

The aim of this study was therefore to develop a cross-disciplinary approach designed to investigate the molecular mobility and the in vitro release of sodium ions in model cheeses with differing fat, protein and NaCl contents. More precisely, this study aims to establish links between the mobility of sodium ions studied using ^{23}Na NMR spectroscopy, the kinetics of sodium release from model cheeses to an aqueous phase and the water/cheese partition coefficients of sodium at equilibrium. These parameters will be discussed depending on the composition, the structure, and the texture of the model cheeses.

2. Materials and methods

2.1. Composition and preparation of the model cheeses

The model cheese composition was adapted from that developed by Tarrega, Yven, Sémon, and Salles (2008). The ingredients used were rennet casein (Eural Poitouaine, Nantes, France), acid casein (BBA Lactalis, France), commercial melting salts (Kasomel 2185; Prayon Europhos, Engis, Belgium), anhydrous milk fat (Cormans, Goe-Limbourg, Belgium), deionised water (Milli-Q[®]; Millipore, Bedford, MA), NaCl and citric acid (both Sigma Aldrich Steinheim, Germany) (Table 1).

Six model cheeses were prepared and contained three different lipid (L)/protein (P) ratios (L/P (w/w): 28/20, 24/24 and 20/28) and two levels of added salt (NaCl): 0% and 1%. The L/P ratios were calculated from the dry matter contents of milk fat (lipid) and caseins (protein). The six model cheeses were labelled according to their L/P ratios and their salt contents (indicated with an 's' when salt was added) (Table 1).

To prepare the model cheeses, the ingredients were placed in a cutter mixer (R3VV, Robot Coupe, Montceau-les-Mines, France) in the following order: water, NaCl, citric acid, rennet casein, acid casein, melting salts and milk fat. Batches of 500 g of model cheeses were prepared at 75 °C, with a mixing speed set at 2500 rpm for 7 min 30 s. The model cheeses were then placed in plastic cups, in order to facilitate their subsequent utilisation. The cups were kept at -20 °C for 25 min. This fall in the temperature promoted rapid structuralisation of the model cheeses. The cups of model cheeses were then vacuum-sealed and stored at 4 °C for further experiments.

The pH values were controlled using a pH electrode (1083B, Hanna Instruments, France) for the six model cheeses and were found to be within the same range, between 6.67 and 6.85 (Table 1). Dry matter contents were determined with a moisture analyser (XM 120; Precisa, Poissy, France) for each model cheese and did not vary significantly between products (Table 1).

The ash content of model cheeses was determined according to the International Dairy Federation (IDF) standard method (IDF 27, 1964). The ash residue was treated with 6M hydrochloric acid

(HCl) and the total sodium content in the solution was determined by atomic absorption spectroscopy. The resulting sodium contents in the model cheeses are shown in Table 1. The sodium content of model cheeses without added NaCl came from melting salts (negligible quantities in the other ingredients) whereas the sodium content in the salt-supplemented model cheeses came from both melting salts and added NaCl.

2.2. Texture analysis: rheological measurements

A uniaxial compression test was performed on model cheeses using a TA-XT2 texture analyser (Stable Micro Systems Ltd., Champlan, France) at 13 °C. The model cheeses had been produced two weeks before the analysis and then stored at 4 °C in sealed vacuum packs. Cylindrical samples (18 mm height × 13 mm diameter) were cut in the middle of the cheeses using a cork-borer. Each sample was placed in a closed plastic tube and stored at 13 °C at least 15 min before the compression test. This step enabled the sample to relax from sampling strain and to avoid desiccation. The samples were compressed with a 35-mm plate at a constant speed of 0.8 mm s⁻¹ to reach 10% of their initial height (90% compression). Four replicates were obtained. The modulus of deformability (M_5), the stress at maximal deformation (σ) and the work to maximal deformation (W) were calculated from the force-displacement curve.

The modulus of deformability, which is the initial slope of the curve, characterised the elastic properties of the model cheeses. Higher values indicated lower elastic properties. The stress at maximal deformation and work to maximal deformation characterised the mechanical resistance of the model cheeses.

2.3. Microstructure analysis: confocal laser scanning microscopy

Small pieces (about 8 × 8 × 3 mm) were cut from model cheeses and placed on glass slides. Fatty acids and protein network were stained according to the method described by Floury et al. (2009). The dyeing solution was prepared by mixing 600 μL Nile Red fluorescent dye (0.04% w/v in propane-1,2-diol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 300 μL Acridine Orange dye for microscopy (0.1% w/v in distilled water; Sigma-Aldrich). The samples were stained by adding 15 μL of the dyeing solution, covered with a glass slip and placed in the dark at 4 °C for 30 min.

The microstructure was observed using a confocal Leica TCS SP2 microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Protein measurements (green) were performed using an argon/krypton laser with an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength between 502 and 563 nm. Measurements for fatty acids (red) were carried out using a helium/neon laser with an excitation wavelength of 543 nm and an emission wavelength between 594 and 697 nm. For each sample, images at five different locations in the model cheese (pseudoreplicates) were collected. The locations varied from the centre to the outer part of the model cheese. Images with 512 × 512 pixel resolution were acquired using an oil immersion objective (HC PL APO CS 40 × 0.75-1.25). Three independent replicates were performed. The final overlay corresponded to the combined images of the fatty acids and the protein network in sequential confocal microscopy acquisition series.

2.4. Sodium NMR spectroscopy and data processing

Sodium ion mobility was studied at a molecular level using ^{23}Na NMR spectroscopy because the quadrupolar ^{23}Na nucleus (spin $I = 3/2$), with its short recycling time, is easily observable under NMR spectroscopy. The samples were prepared according to the method described by Gobet, Foucat, and Moreau (2009): a cylindrical

Table 1

Composition and rheological properties of the model cheeses. Model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added NaCl), L28P20s (L/P = 28/20, with added NaCl), L24P24 (L/P = 24/24, without added NaCl), L24P24s (L/P = 24/24, with added NaCl), L20P28 (L/P = 20/28, without added NaCl) and L20P28s (L/P = 20/28, without added NaCl).

	Model cheeses					
	L28P20	L28P20s	L24P24	L24P24s	L20P28	L20P28s
L/P ratio ^a	28/20	28/20	24/24	24/24	20/28	20/28
Composition (g/100 g)						
Rennet casein	17.0	17.0	20.4	20.4	25.8	23.8
Acid casein	4.3	4.3	5.1	5.1	5.0	6.0
Milk fat	28.0	28.0	24.0	24.0	20.0	20.0
Deionised water	47.9	47.9	47.7	47.7	47.4	47.4
Melting salts	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
NaCl	0	1	0	1	0	1
Citric acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Model cheese characteristics						
Sodium content (g/100 g) ^b	0.67 ± 0.02	1.06 ± 0.05	0.66 ± 0.01	1.06 ± 0.04	0.67 ± 0.01	1.06 ± 0.02
pH ^c	6.75 ± 0.01	6.68 ± 0.04	6.85 ± 0.01	6.70 ± 0.04	6.85 ± 0.03	6.73 ± 0.01
Dry matter (g/100 g) ^d	58.0 ± 0.6	52.7 ± 0.3	52.8 ± 0.4	53.1 ± 0.4	52.7 ± 0.3	53.0 ± 0.5
Rheological properties						
W (kJ m ⁻³) ^e	231 ± 5.1 ^A	122 ± 8.3 ^A	361 ± 21.8 ^B	319 ± 32.3 ^B	522 ± 37.8 ^B	462 ± 20.5 ^A
σ (kPa) ^f	1556 ± 20.2 ^B	498 ± 46.9 ^A	2167 ± 81.2 ^C	2013 ± 135.2 ^C	3016 ± 133.7 ^C	2896 ± 148.0 ^C
M _D (kPa) ^g	223 ± 23.0 ^A	355 ± 51.6 ^A	380 ± 34.2 ^B	343 ± 60.3 ^B	456 ± 63.1 ^B	497 ± 55.6 ^B

^a Values in the same line with different subscript letters were significantly different ($p < 0.05$).

^b L/P ratio corresponding to the lipid/protein ratio and calculated from the dry matter contents of milk fat and caseins.

^c Sodium content and pH values are shown in the Table as mean ± standard deviation (SD); ($n = 2$).

^d Dry matter contents are shown in the Table as mean ± SD ($n = 3$).

^e W: work at maximal deformation. (mean ± SD, $n = 4$).

^f σ: stress at maximal deformation. (mean ± SD, $n = 4$).

^g M_D: modulus of deformability. (mean ± SD, $n = 4$).

section (length = 4 cm and width = 9–10 mm) was taken from the core of the model cheese using a cork-borer. The section was then removed gently from the cork-borer and inserted into a 10-mm NMR tube, avoiding sharp changes in product structure. A 5-mm NMR tube filled with a reference solution of Na₂Dy(PPP)₂ in D₂O ([Na⁺] = 0.40 M) was then introduced into the model cheese sample of the 10-mm NMR tube. This solution was used as an external reference to check the sodium ion content of the samples. Indeed, the Dy(PPP)₂⁷⁺ ion induces an upfield shift of Na⁺ ($\delta \approx 30$ ppm) from the cheese resonance position. The Na⁺ content of the reference solution was checked using an aqueous solution of NaCl (11.82 g L⁻¹). A $\pi/2$ pulse length of 15–17.5 μ s was used for the ²³Na NMR experiments, which were performed at 25 °C and recorded at 132.29 MHz on a Bruker Avance III 500 MHz (11.7 T) spectrometer equipped with a 10-mm broadband probe. The method and the NMR parameters for data processing are described here above, but they are precisely explained in the article by Gobet et al. (2010).

Two different NMR sequences were used: the single quantum (SQ) sequence, which is a common single impulsion sequence supplying information on total sodium, and the double quantum filtered (DQF) sequence, which allows the selective detection of a signal from 'bound' sodium ions, i.e. ions with a limited movement. Several parameters can be obtained from SQ and DQF NMR experiments (Andriot et al., 2011; Gobet et al., 2009). For instance, ²³Na SQ relaxation times (longitudinal and transverse) are the times required for total sodium nuclei to return to equilibrium after excitation. The ²³Na longitudinal relaxation time is termed T₁ whereas the transverse relaxation time is called T₂. The latter comprises two decaying components: T₂^{fast} for the 'fast' relaxation time, which characterises the central transition ($-1/2 \rightarrow 1/2$) and T₂^{slow} for the 'slow' relaxation time, which characterises the outer transition ($-3/2 \rightarrow -1/2$ and $1/2 \rightarrow 3/2$) of the sodium nucleus (Jaccard, Wimpey, & Bodenhausen, 1986; Kemp-Harper et al., 1997). The 'fast' and 'slow' relaxation times are also taken into account for the DQF sequence of 'bound' sodium ions and are called T₂^{fast} and T₂^{slow}. These relaxation times allow the characterisation of the bound

state of sodium ions and can be linked to sodium ion mobility: the longer the relaxation time, the more mobile are the sodium ions. Moreover, based on the DQF sequence, the creation time (t^{DQ}) represents the moment of the maximum intensity of the DQF signal. The smaller this parameter, the more organised is the environment around 'bound' sodium ions.

In addition, a relative quantification of the 'bound' fraction of sodium was achieved by comparing the integrals (areas) of the DQF and SQ signals (ratio A_{DQ}/A_{SQ}).

2.5. Kinetics of sodium release from model cheeses to an aqueous phase

A cylindrical piece of model cheese (25 g) was put in a glass vessel (2 L) and immersed in 1 L Milli-Q water for 7 h. The release kinetics of sodium ions in water under stirring conditions (100 rpm, constant speed) were monitored at 25 °C. Samples of the aqueous phase were collected at successive time points: 2, 5, 10, 15 min, then every 15 min until 120 min and finally every 60 min until the end of the experiments. The release of sodium ions from the model cheese was determined by measuring the sodium concentration in the aqueous samples collected using a sodium ion selective electrode (ROSS[®], Thermo Fisher Scientific, Beverly, MA). This electrode measured the free sodium ions in solution. Measurements were performed on 2-mL samples added with 200 μ L of sodium Ionic Strength Adjustor (ISA, 4 M NH₄Cl and 4 M NH₄OH, Cat. No. 841111, Thermo Fisher Scientific). This ISA solution was used to maintain a constant background ionic strength and to adjust the pH. The sodium concentration values were obtained from a calibration curve. The sodium concentration values were also validated by conductimetric detection, after ionic separation using high performance liquid chromatography (HPLC, Dionex IC5-3000). The sodium release curves were obtained with the sodium concentrations of these successive samples, with three replicates for each of the six model cheeses. The slopes of the sodium release kinetics were calculated between the initial sampling time (2 min) and the four following sampling times (5, 10, 15 and 30 min).

These slopes were used to calculate the sodium release rate (in $\text{mg L}^{-1} \text{min}^{-1}$) from the initial time.

2.6. Water/cheese partition coefficient of sodium

The Na^+ water/cheese partition coefficient is defined by the following equation:

$$K_{\text{Na}} = \frac{[\text{Na}]_{\text{aq}}^{\text{eq}}}{[\text{Na}]_{\text{cs}}^{\text{eq}}}$$

$[\text{Na}]_{\text{aq}}^{\text{eq}}$ is the equilibrium sodium concentration in the water phase and $[\text{Na}]_{\text{cs}}^{\text{eq}}$ is the equilibrium sodium concentration in the model cheese. $[\text{Na}]_{\text{cs}}^{\text{eq}}$ actually corresponds to the following equality:

$[\text{Na}]_{\text{aq}}^{\text{eq}} = [\text{Na}]_0^{\text{cs}} - [\text{Na}]_{\text{aq}}^{\text{eq}}$, where $[\text{Na}]_0^{\text{cs}}$ is the initial sodium concentration in the model cheeses.

For the experiments, 5 g of model cheese were placed in a bottle (100 mL, Schott, France) filled with 75 mL deionised water. Therefore, the mass of 5 g and the volume of 75 mL were taken into account for the calculation of the Na^+ water/cheese partition coefficient (K_{Na}).

The six model cheeses were tested simultaneously with five replicates for each model cheese. Thirty bottles were thus prepared and placed in an air oven maintained at 25 °C. The experiment was performed for 16 h, time which was long enough to reach thermodynamic equilibrium for all the samples. After 16 h, the aqueous phase was collected and filtered over glass wool. The sodium content in this phase was then determined with a sodium ion selective electrode (ROSS®) and validated by HPLC, as described in the paragraph above.

2.7. Statistical analysis

Rheological data, NMR results, sodium release rates and partition coefficients were subjected separately to analysis of variance (ANOVA) and, wherever appropriate, to a least significant differences test (LSD) to determine significant differences between the products. The level of significance was determined at $p < 0.05$. Pearson correlation coefficients (r) were also calculated between the parameters thus studied. Analyses were performed using STATISTICA® Software (version 10, StatSoft, France).

3. Results and discussion

3.1. Texture of model cheeses

The six model cheeses displayed significant differences in their rheological parameters, determined by the values for stress at maximal deformation (σ), work to maximal deformation (W) and modulus of deformability (M_0) (Table 1). Analysis of variance revealed a significant effect of the L/P ratio on W ($F_{(2;18)} = 214.1$, $p < 0.001$) and σ ($F_{(2;18)} = 511.0$, $p < 0.001$), but also a significant effect of the NaCl content on W ($F_{(1;18)} = 30.8$, $p < 0.001$) and σ ($F_{(2;18)} = 128.0$, $p < 0.001$). The mechanical resistance of model cheeses increased when the L/P ratio fell, but was lower in cheeses with added NaCl. Lebecque, Laguët, Devaux, and Dufour (2001) also reported that milk proteins contribute to firmness and that milk fat contributes to smoothness in cheese. Moreover, Floury, Rouaud, Le Poulennec, & Famelart (2009) evidenced a reduction in hardness when the NaCl concentration increased. In the present study, the increase in NaCl content led to more sodium ions that can be bound by caseins. The greater binding of Na^+ ions by the caseins led to better hydration of these proteins (Hardy & Steinberg, 1984). Therefore, this increase in hydration capacity could explain the decrease in resistance that was observed when NaCl was

added. Among the six model cheeses, the one with the highest fat content and the highest sodium content (L28P20s) displayed the least mechanical resistance and was the only one to fracture under the compression conditions applied.

Analysis of variance performed on the modulus of deformability (M_0) showed a significant effect of the L/P ratio ($F_{(2;18)} = 19.9$, $p < 0.001$); M_0 increased when the L/P ratio fell, highlighting its weaker elasticity, as observed on lipoprotein model cheeses in the findings of Lawrence et al. (2012). Nevertheless, the effect of NaCl on elasticity was only significant in the model cheese with the 28/20 L/P ratio ($F_{(1;18)} = 8.2$, $p = 0.046$) with a decrease in elasticity due to the addition of NaCl. The lowest resistance observed with the model cheese L28P20s was not linked to the poorest elasticity.

3.2. Microstructure of model cheeses and relationship with texture

The inclusion of fat globules was well distributed in a homogeneous protein network in the six model cheeses, as shown by the confocal micrographs (Fig. 1). This homogeneity thus makes the study of sodium mobility possible in a homogeneous environment. The effect of the L/P ratio on microstructure can be seen clearly in Fig. 1. The protein network was denser and there were fewer fat droplets when the protein content was higher (lower L/P ratio). Moreover, fat droplet size can also be determined by fat content. Higher fat content resulted in larger fat droplets for the model cheeses with added NaCl.

Whatever the L/P ratio, model cheeses without added NaCl contained smaller fat droplets (about 5 μm in size) than those with added NaCl (about 10 μm in size), in agreement with the findings of Wendin, Langton, Casus, and Hall (2000), who found an increase in the fat droplet size in cream cheeses with a higher salt content. The effect of NaCl, and more precisely of Na^+ ions, on the protein network can explain the fat droplet size. Indeed, Na^+ binding led to a more hydrated protein network, as previously mentioned. Therefore, one hypothesis could be that bigger spaces are available for bigger fat inclusions in the protein network of salt-supplemented cheeses. Oppositely, the smaller size of the droplets in model cheeses without added NaCl can explain the increase in mechanical resistance. Indeed, in agreement with Pereira, Bennett, Hemar, and Campanella (2001), we found that small fat droplets, distributed uniformly throughout the protein network, gave a greater resistance to the forces applied, probably due to an increase in protein-protein and protein-fat interactions. The fracture, which only occurred for the L28P20s product under compression test, could be mainly explained by a weakening of the microstructure due to both higher NaCl level and higher lipid content. Indeed, NaCl changed microstructure by Na^+ binding to caseins, and fat droplets changed it by disrupting the protein network continuity, mainly when their size increased (Lopez, Briand-Bion, Beaucher, & Ohivon, 2008).

3.3. Sodium mobility studied using ^{23}Na NMR

Sodium ion mobility was evidenced by studying two populations of sodium ions: the global population corresponding to total sodium and a population with restricted movement corresponding to 'bound' sodium.

3.3.1. Total sodium

3.3.1.1. Effect of lipid/protein (L/P) ratio on relaxation times. The SQ longitudinal relaxation time (T_1) was influenced significantly by the L/P ratio (Table 2); for the same sodium content, T_1 was shorter ($F_{(2;12)} = 266.2$, $p < 0.001$) in model cheeses with the highest protein content (L/P = 20/28) compared to those with the highest lipid content (L/P = 28/20), the intermediate model cheese having an

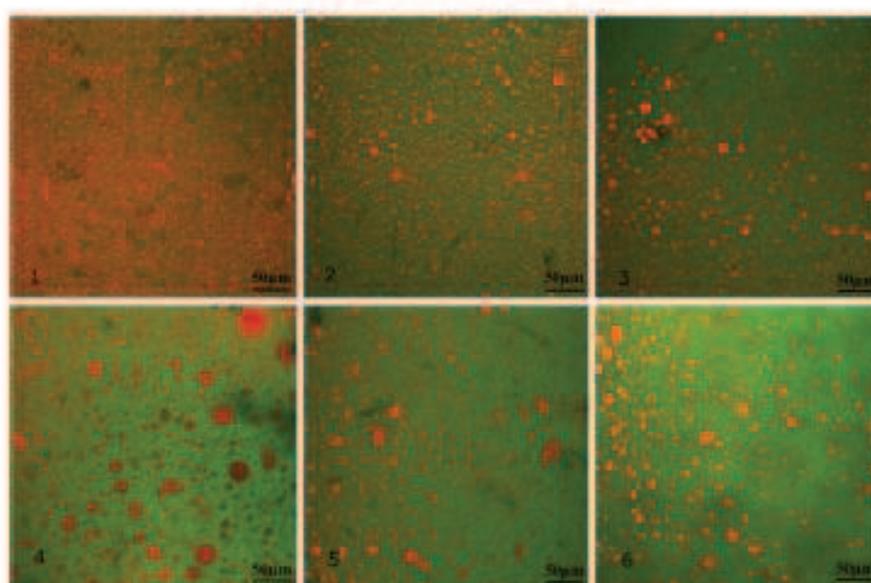


Fig. 1. Confocal microscopic observations of the six model cheeses. Observations 1, 2, and 3 correspond to three different lipid (L)/protein (P) ratios (L/P (w/w): 28/20, 24/24 and 20/28) with 0% added NaCl, respectively. Observations 4, 5, and 6 correspond respectively to the same ratios, but with 1% added NaCl.

Table 2

^{23}Na relaxation times (T_1 , T_{21}^{SQ} , T_{22}^{SQ} , T_{23}^{SQ} , T_{24}^{SQ}), crosslink time (t^*) and signal area ratio ($A_{\text{DQ}}/A_{\text{SQ}}$) from single quanta (SQ) and double quanta (DQ) NMR experiments performed on model cheeses. Model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added NaCl); L28P20s (L/P = 28/20, with added NaCl); L24P24 (L/P = 24/24, without added NaCl); L24P24s (L/P = 24/24, with added NaCl); L20P28 (L/P = 20/28, without added NaCl) and L20P28s (L/P = 20/28, without added NaCl).

Cheeses	SQ experiments			DQ experiments			Ratio $A_{\text{DQ}}/A_{\text{SQ}}$
	T_1 (ms)	T_{21}^{SQ} (ms)	T_{22}^{SQ} (ms)	T_{23}^{SQ} (ms)	T_{24}^{SQ} (ms)	t^* (ms)	
L28P20	10.64 ± 0.17 ^a	3.81 ± 0.16 ^a	1.17 ± 0.10 ^a	9.47 ± 0.11 ^a	0.36 ± 0.01 ^a	1.21 ± 0.02 ^a	18.39 ± 0.42 ^a
L28P20s	11.93 ± 0.18 ^a	4.69 ± 0.23 ^a	1.18 ± 0.11 ^a	9.90 ± 0.06 ^a	0.44 ± 0.02 ^a	1.43 ± 0.05 ^a	18.16 ± 0.08 ^a
L24P24	9.41 ± 0.13 ^b	3.01 ± 0.07 ^b	1.12 ± 0.04 ^b	8.45 ± 0.05 ^b	0.28 ± 0.01 ^b	0.98 ± 0.02 ^b	18.23 ± 0.96 ^a
L24P24s	10.73 ± 0.20 ^b	4.08 ± 0.19 ^b	1.19 ± 0.08 ^b	8.98 ± 0.16 ^b	0.40 ± 0.03 ^b	1.31 ± 0.07 ^b	18.45 ± 0.33 ^a
L20P28	8.49 ± 0.22 ^b	2.77 ± 0.13 ^b	1.08 ± 0.08 ^b	7.53 ± 0.21 ^b	0.26 ± 0.02 ^b	0.90 ± 0.06 ^b	18.41 ± 0.63 ^a
L20P28s	9.71 ± 0.04 ^b	3.49 ± 0.13 ^b	1.10 ± 0.03 ^b	8.30 ± 0.08 ^b	0.34 ± 0.01 ^b	1.14 ± 0.04 ^b	18.28 ± 0.03 ^a

^{a,b} Values in the same column with different subscript letters were significantly different ($p < 0.05$). Means are given (SD; $n = 3$).

intermediate position. The effect of the L/P ratio was exactly the same with respect to the SQ 'slow' relaxation time T_{22}^{SQ} ($F_{(2;12)} = 71.1$, $p < 0.001$). This suggested that sodium ions were less mobile when the protein content increased and when the lipid content decreased. Nevertheless, the present study cannot distinguish between the effect of increasing lipid on mobility, nor the effect of decreasing protein on mobility. Yet, sodium mobility can be explained by rheological parameters, because cheeses with higher protein content and lower lipid content were more resistant and less elastic. In this way, negative correlations were evidenced between the SQ longitudinal relaxation time (T_1) and the work to maximal deformation (W) ($r = -0.91$); between the SQ 'slow' relaxation time (T_{22}^{SQ}) and W ($r = -0.83$); between T_1 and the modulus of deformability (M_0) ($r = -0.53$); and between T_{22}^{SQ} and M_0 ($r = -0.45$).

3.3.1.2. Effect of salt content on relaxation times. For the same L/P ratio, T_1 and T_{22}^{SQ} were influenced by the sodium content and were always significantly higher ($F_{(1;12)}(T_1) = 269.6$, $F_{(1;12)}(T_{22}^{\text{SQ}}) = 131.4$, $p < 0.001$) in model cheeses with added NaCl. This suggests that the sodium ions were more mobile in salted model cheeses. Here again, the mobility could be linked to the differences observed in terms of microstructural and rheological properties of the model

cheeses. Indeed, model cheeses with added NaCl were found to be less resistant than those without added NaCl (for an identical L/P ratio). Larger fat globules and weaker protein network in model cheeses with added NaCl could explain the increase in the mobility of sodium ions. This was particularly the case in the L28P20s product which fractured during the compression test and had the highest SQ relaxation times. Surprisingly, no significant difference was observed regarding the SQ 'fast' relaxation time (T_{21}^{SQ}), although this was the case with the DQF experiment.

3.3.2. Bound sodium

The DQF NMR experiments performed on these model cheeses evidenced the presence of a fraction of 'bound' sodium ions as Gobet et al. (2009) also observed in iota-carrageenan systems. The 'bound' sodium ions are termed in this way because they are in a more specifically ordered environment than the other ions, and they presented limited mobility.

3.3.2.1. Effect of L/P ratio and salt content on relaxation times. The results concerning the DQF 'slow' relaxation time (T_{23}^{DQ}) are presented in Table 2. This parameter followed the same course as T_{22}^{SQ} : for the same sodium content, T_{23}^{DQ} decreased significantly ($F_{(2;12)} = 299.6$, $p < 0.001$) when the L/P ratio fell (model cheeses with increasing

Table 3

Sodium release rates and water/cheese partition coefficients at 25 °C in model cheeses. Model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added NaCl); L28P20s (L/P = 28/20, with added NaCl); L24P24 (L/P = 24/24, without added NaCl); L24P24s (L/P = 24/24, with added NaCl); L20P28 (L/P = 20/28, without added NaCl) and L20P28s (L/P = 20/28, without added NaCl).

Cheese	Rate of sodium release (mg L ⁻¹ min ⁻¹)				Na partition coefficients
	2–5 min	2–10 min	2–15 min	2–30 min	
L28P20	0.87 ± 0.11 ^a	0.71 ± 0.11 ^{ab}	0.60 ± 0.10 ^{cd}	0.46 ± 0.09 ^{cd}	0.57 ± 0.04 ^a
L28P20s	2.40 ± 0.28 ^b	1.60 ± 0.11 ^c	1.46 ± 0.06 ^d	1.09 ± 0.05 ^d	0.74 ± 0.05 ^b
L24P24	0.96 ± 0.14 ^a	0.56 ± 0.08 ^b	0.48 ± 0.09 ^{cd}	0.35 ± 0.03 ^{cd}	0.69 ± 0.06 ^b
L24P24s	1.57 ± 0.32 ^b	1.31 ± 0.15 ^{cd}	1.15 ± 0.10 ^{cd}	0.88 ± 0.03 ^{cd}	0.80 ± 0.02 ^c
L20P28	0.76 ± 0.07 ^a	0.59 ± 0.02 ^b	0.53 ± 0.02 ^{cd}	0.39 ± 0.01 ^d	0.68 ± 0.05 ^b
L20P28s	1.46 ± 0.12 ^b	1.38 ± 0.14 ^c	1.16 ± 0.03 ^d	0.89 ± 0.01 ^d	0.82 ± 0.03 ^c

^{a–d} Values in the same column with different subscript letters were significantly different ($p < 0.05$) and values in the same line with different subscript letters were significantly different ($p < 0.05$). Means are given (\pm SD, $n = 3$).

protein content). And, for the same L/P ratio, T_{21}^{DQ} increased significantly when the sodium content rose ($F_{(0,12)} = 94.4$, $p < 0.001$). The least resistant model cheese (L28P20s) displayed the greatest mobility of 'bound' sodium ions (highest T_{21}^{DQ}). This could be confirmed by a negative correlation ($r = -0.96$) between the work to maximal deformation (W) and the DQF 'slow' relaxation time (T_{21}^{DQ}). In addition, significant differences were observed between the DQF 'fast' relaxation times (T_{21}^{DQ}) of the six model cheeses, in contrast to SQ findings. The effects of NaCl ($F_{(1,12)} = 134.9$, $p < 0.001$) and the L/P ratio ($F_{(2,12)} = 47.3$, $p < 0.001$) were the same as for T_{21}^{DQ} .

3.3.2.2. Effect of L/P ratio and salt content on creation time. The DQF creation times, τ^{DQ} , followed the same behaviour as the DQF relaxation times. Values fell significantly ($F_{(2,12)} = 68.4$, $p < 0.001$) when the L/P ratio decreased, and rose significantly ($F_{(1,12)} = 145.2$, $p < 0.001$) when the sodium content increased. This meant that the system was more ordered around 'bound' sodium ions when the protein content increased, which was in line with the least mobility of 'bound' sodium ions. In addition, an increase in sodium content led to a weaker organisation of the environment around 'bound' sodium ions, a phenomenon that could explain the rheological properties of the model cheese. Indeed, model cheeses with longer creation times (less organised environment around 'bound' sodium ions) were the least resistant (correlation between τ^{DQ} and W : $r = -0.81$). The highest τ^{DQ} value corresponded to the model cheese which fractured, i.e. the least resistant (L28P20s). It was therefore interesting to highlight that the model cheese with the least ordered environment around 'bound' sodium ions, was also the one with the largest fat globules and the weakest resistance.

3.3.2.3. Effect of model cheese characteristics on 'bound' sodium fraction. Furthermore, a comparison of the integrals (areas) of DQF and SQ signals (ratio A_{DQ}/A_{SQ}) produced a relative quantification of the 'bound' sodium fraction. In our case, no significant differences ($p > 0.05$) were found between the six model cheeses (average ratio of 18.32%). This result meant that the L/P ratio and the salt content did not affect the 'bound' sodium fraction. One explanation could be that the dry matter content was the main parameter governing the 'bound' sodium fraction. Indeed, the six model cheeses had constant dry matter contents (average of 52.9%) and no significant differences were found for the 'bound' sodium fraction between the six model cheeses.

3.4. Kinetics of sodium release from model cheeses in an aqueous phase

The sodium release curves displayed firstly, a phase of rapid sodium release and then a flattening phase that started at around 3 hours for all the model cheeses. In view of the short residence

time of model cheese in the mouth during eating, only the very early phase of the curves was considered here. For this reason, slopes from the sodium release curves were measured for the first 30 min in order to determine the rates of sodium release. The results are presented in Table 3. The sodium release rates were significantly higher for model cheeses with added NaCl than for model cheeses without added NaCl at each of the considered sampling times: 2–5 min ($F_{(1,12)} = 96.9$, $p < 0.001$), 2–10 min ($F_{(1,12)} = 169.9$, $p < 0.001$), 2–15 min ($F_{(1,12)} = 209.3$, $p < 0.001$), and 2–30 min ($F_{(1,12)} = 126.1$, $p < 0.001$). This suggested that sodium from added NaCl was more easily released than 'endogenous' sodium which came from melting salts. Another explanation could be the effect of NaCl on microstructure. Thus, the added sodium coming from NaCl appeared to be less retained in the model cheese network than the sodium from melting salts. Additionally, the effect of the L/P ratio was only observed in model cheeses with added NaCl with an increase in sodium release in the L28P20s model cheese when compared to L24P24s and L20P28s. These sodium release kinetics could be explained by the structure of the least resistant model cheese (L28P20s) which became weaker under stirring conditions, thus promoting sodium release. The course of sodium release between 2 and 5 min is compared with mechanical resistance (W) and the evolution of NMR relaxation and creation times (T_1 and τ^{DQ}) in Fig. 2. $T_1/10$ values are presented for the purposes of convenience concerning the scale of the graph. For an identical L/P ratio, this graph illustrates the relationships between the reduction in resistance (due to the addition of NaCl), the

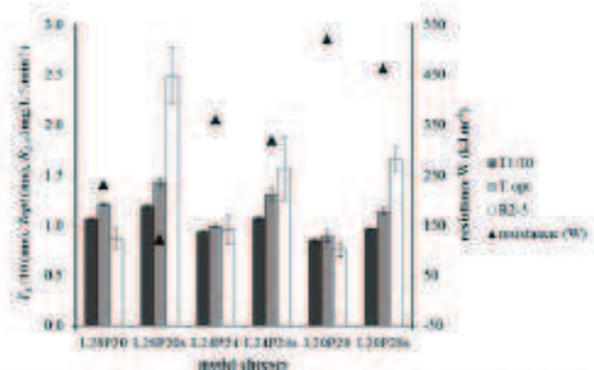


Fig. 2. Means values for $T_1/10$ (relaxation time), τ^{DQ} (creation time), R_{21} (rate of sodium release between 2 and 5 min) and W (resistance) for the six model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added NaCl); L28P20s (L/P = 28/20, with added NaCl); L24P24 (L/P = 24/24, without added NaCl); L24P24s (L/P = 24/24, with added NaCl); L20P28 (L/P = 20/28, without added NaCl) and L20P28s (L/P = 20/28, without added NaCl). Values are shown in the Figure as mean \pm standard deviation (SD), ($n = 3$, except for W : $n = 4$).

increase in the sodium release rate and the increase in NMR parameters showing a greater mobility of sodium ions. Negative correlations were determined between resistance and the sodium release rate values ($r = -0.55$) and between resistance and NMR parameters (correlation coefficients given in paragraph 3.3). Conversely, a positive correlation was found between the release rate values and NMR parameters ($r = 0.73$ with T_2 and $r = 0.78$ with T_2^*). Moreover, for an identical sodium content, an increase in the L/P ratio (from L20P28 to L28P20) induced a reduction in rheological resistance, an increase in sodium ion mobility (T_2 and T_2^*) and an increase in the sodium release rate.

3.5. Partition coefficient of sodium water/model cheese

Table 3 shows that the sodium partition coefficients between cheese and water were influenced by the composition of the model cheeses. For the same L/P ratio, the partition coefficients were significantly higher when NaCl was added ($F_{(1,24)} = 72.5$, $p < 0.001$), which suggested that sodium from NaCl was more easily released than "endogenous" sodium which came from melting salts. Here again, another explanation could be the effect of NaCl on microstructure.

The effect of the L/P ratio under these equilibrium conditions was observed on both the versions with and without added NaCl ($F_{(2,24)} = 13.9$, $p < 0.001$). For an identical sodium content, the model cheese with a higher L/P ratio presented a lower sodium partition coefficient although it displayed higher rates of sodium release. The lower partition coefficient could be explained by a higher fat content which rendered the model cheese more hydrophobic and less available for water absorption, limiting sodium release. Furthermore, at a macroscopic level, the sodium partition coefficients (Table 3) were always lower than 1, which meant that part of the sodium was retained by the model cheeses. This result confirmed previous studies which found partition coefficients were between 0.50 and 0.95 in model cheeses (Lauverjat et al., 2009) or between 0.79 and 0.81 in gels (Zorrilla & Rubiolo, 1994). The values of sodium partition coefficients (Table 3) also confirmed the evidence regarding 'bound' sodium ions, because the total amount of sodium was not recovered in the aqueous phase. Moreover, the maximum value of the partition coefficient obtained for the L20P28 model cheese was 0.82. This was consistent with the average of 18.3% bound sodium found by calculating the ratio of the NMR peak areas for bound/total sodium.

4. Conclusion

The results obtained during this study showed how composition and microstructure of model cheeses modified the in vitro mobility and release of sodium ions. A decrease in lipid/protein ratio and in salt (NaCl) content led to a stronger microstructure of the model cheeses. This structuralisation then led to a lower molecular mobility of sodium ions and lower release kinetics of sodium ions. In view of these results, it appears very difficult to enhance salt release, and thus salty perception, in low-fat and low-salt food products. Food industries must take into account the behaviour of salt in food products and its interactions with different food components.

Acknowledgments

The authors are grateful to Barbara Bulle and Valerie Febvret for their technical assistance with sodium release experiments, and to Guillaume Houzé, Fromageries BEL SA France, for his help in the formulation of model cheeses. This work received support from the Regional Council for Burgundy.

References

- Andriot, I., Boizard, L., Vergaignan, C., Salles, C., & Guichard, E. (2011). Sodium ions in model cheeses at molecular and macroscopic levels. In J.-P. Remou, P. S. Bolton, & G. A. Webb (Eds.), *Magnetic resonance in food science: An exciting future* (Special Publication No. 332) (pp. 67–70). Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry.
- Fitzgerald, E., & Buckley, J. (1985). Effect of total and partial substitution of sodium chloride on the quality of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, *68*(12), 3127–3134.
- Rouly, J., Camber, B., Rousseau, F., Lopez, C., Tissier, J.-P., & Famelart, M.-H. (2009). Reducing salt level in food: Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure–texture relationships. *DWT – Food Science and Technology*, *42*(10), 1611–1620.
- Rouly, J., Rouaud, O., Le Poellenne, M., & Famelart, M.-H. (2009). Reducing salt level in food: Part 2. Modelling salt diffusion in model cheese systems with regards to their composition. *DWT – Food Science and Technology*, *42*(10), 1621–1628.
- Gibet, M., Foucat, L., & Moreau, C. (2009). Investigation of sodium ions in cheese by ^{23}Na NMR spectroscopy. In *The sixth international conference on characterization of magnetic resonance in food science*. Reykjavik (ISL): The Royal Society of Chemistry and Physics of Lipids.
- Gibet, M., Moudjahid, M., Cayot, N., Bomy, J. M., Guichard, E., Le Quére, J.-L., et al. (2009). The effect of salt content on the structure of NaCa-carrageenan systems: Na-23 DQF NMR and rheological studies. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *47*(4), 307–312.
- Gibet, M., Rondau-Mouru, C., Buchin, S., Le Quére, J.-L., Guichard, E., Foucat, L., et al. (2010). Distribution and mobility of phospholipids and sodium ions in cheese by solid-state ^{31}P and double-quantum filtered ^{23}Na NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *48*(4), 297–308.
- Galano, T. P., & Fox, P. F. (2004). Salt in cheese: Physical, chemical and biological aspects. General aspects of cheese technology. In P. F. Fox, P. L. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Galano (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol. 1, pp. 207–259). London: Elsevier.
- Hardy, J. J., & Steinberg, M. P. (1984). Interaction between sodium-chloride and casein as determined by water sorption. *Journal of Food Science*, *49*(1), 127–131.
- IDF-ZZ. (1984). Determination of the ash content of processed cheese products.
- Jacquot, C., Wimpey, S., & Bodenhausen, G. (1986). Multiple-quantum NMR spectroscopy of $S=3/2$ spins in isotropic phase: A new probe for multireponential relaxation. *Journal of Chemical Physics*, *85*(11), 5282–5293.
- Jack, F. R., Piggott, J. R., & Paterson, A. (1995). Cheddar cheese texture related to salt release during chewing, measured by conductivity – Preliminary study. *Journal of Food Science*, *60*(2), 213–217.
- Kemp-Harper, R., Brown, S. P., Hughes, C. E., Styles, P., & Wimpey, S. (1997). ^{23}Na NMR methods for selective observation of sodium ion in ordered environments. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *30*, 157–181.
- Kilcast, D., & Angus, F. (2007). *Reducing salt in foods: Practical strategies*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Lauverjat, C., Défèr, I., Tribbia, C. I., Salles, C., & Souchon, I. (2009). Salt and aroma compound release in model cheeses in relation to their mobility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(21), 9878–9887.
- Lawrence, G., Buchin, S., Achille, C., Brodeur, F., Sepiere, C., Courcoux, P., & Salles, C. (2012). In vivo sodium release and saltiness perception in solid lipid protein matrices. I. Effect of composition and texture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(21), 5287–5298.
- Lebricole, A., Laguer, A., Desvire, M. F., & Dufour, E. (2001). Delineation of the texture of Salers cheese by sensory analysis and physical methods. *Lait*, *81*(5), 609–624.
- Lopez, C., Briard-Rion, V., Braucher, E., & Ollivon, M. (2008). Multiscale characterization of the organization of triglycerides and phospholipids in Emmental cheese: From the microscopic to the molecular level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(7), 2405–2414.
- Mooney, W. (2012). Novel strategies for reducing sodium. *Food Technology*, *66*(1), 53–62.
- Navon, G., Shinar, H., Eliaz, U., & Seo, Y. (2001). Multiquantum filter and order in tissues. *NMR in Biomedicine*, *14*(2), 112–132.
- Panouille, M., Saint-Eve, A., de Loubens, C., Défèr, I., & Souchon, I. (2011). Understanding of the influence of composition, structure and texture on salty perception in model dairy products. *Food Hydrocolloids*, *25*(4), 715–723.
- Pereira, R., Bennett, R., Heman, Y., & Campanella, O. (2001). Rheological and microstructural characteristics of model processed cheese analogues. *Journal of Texture Studies*, *32*(5–6), 349–373.
- Phan, V. A., Yven, C., Lawrence, G., Chabanet, C., Reparet, J.-M., & Salles, C. (2008). In vivo sodium release related to salty perception during eating of model cheeses of different textures. *International Dairy Journal*, *18*(9), 986–993.
- Pionnier, E., Chabanet, C., Michie, L., Taylor, A. J., Le Quére, J.-L., & Salles, C. (2004). In vivo nonvolatile release during eating of a model cheese: Relationships with oral parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(3), 965–971.
- Rosen, T. R., Shirley, L., Schmidt, S. J., & Klein, B. P. (1994). Na⁺ binding as measured by ^{23}Na Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy influences the perception of saltiness in gum solutions. *Journal of Food Science*, *59*(1), 205–210.

- Saint-Eve, A., Lauerjat, C., Magnan, C., Durris, I., & Souchon, I. (2009). Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. *Food Chemistry*, 116(1), 167–175.
- Salles, C., Chagnon, M. C., Féron, G., Guichard, E., Laboure, H., Monel, M., et al. (2011). In-mouth mechanisms leading to flavor release and perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1), 67–90.
- Tarega, A., Wei, C., Sémon, E., & Salles, C. (2008). Aroma release and chewing activity during eating different model cheeses. *International Dairy Journal*, 18(8), 849–857.
- Wenlin, K., Langton, M., Casas, L., & Hall, G. (2000). Dynamic analysis of sensory and microstructural properties of cream cheese. *Food Chemistry*, 71(3), 363–378.
- Wessner, D. E. (2001). NMR relaxation of spin-3/2 nuclei: Effects of structure, order, and dynamics in aqueous heterogeneous systems. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 13(5), 294–325.
- Zinilli, S. E., & Rubiolo, A. C. (1994). A model for using the diffusion cell in the determination of multicomponent diffusion-coefficients in gels or foods. *Chemical Engineering Science*, 49(15), 2123–2128.

TITLE

Effects of salt and fat contents on the microstructure of model cheeses, eating events and *in vivo* aroma release

AUTHORS

Lauriane Boisard^{a,b,c}, Carole Tournier^{a,b,c}, Etienne Sémon^{a,b,c}, Elodie Noirot^d, Elisabeth Guichard^{a,b,c*} and Christian Salles^{a,b,c}

^a CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^b INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^c Université de Bourgogne, UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^d Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne, Plateforme DimaCell, UMR1347 Agroécologie, F-21000 Dijon, France.

* Corresponding author: Elisabeth Guichard

Institut National de la Recherche Agronomique, 17 rue de Sully, F-21000 Dijon, France.

Telephone number: +33 (0) 380693277

Fax number: +33 (0) 380693227

e-mail: elisabeth.guichard@dijon.inra.fr

ABSTRACT

The effects of the lipid/protein ratio (20/28; 24/24; 28/20) and salt content (0; 1%) of model cheeses were investigated simultaneously with respect to chewing behaviour, swallowing events and *in vivo* aroma release. Chewing parameters were measured by electromyography. Swallowing events were recorded manually. *In vivo* aroma release was investigated using on-line atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry. The values for chewing activity and time before swallowing were higher with lower lipid/protein ratios and lower salt contents, due to the greater mechanical resistance of the model cheeses. The corresponding microstructure was made up of smaller and more circular fat droplets in a stronger protein network. Furthermore, the maximum intensity and in-mouth release rate of aroma decreased as the lipid/protein ratio fell. This could be explained by a retention effect of the proteins, which was stronger than the chewing effect. A rise in salt content triggered more rapid aroma release from the protein phase of the model cheese to the oral cavity, and thence to the nasal cavity. The larger droplet size in salt-supplemented model cheeses slowed down the transfer of aroma release, so that the level of aroma release was higher after swallowing. Different salt and fat contents led to different kinetics of aroma release, with the more rapid swallowing of model cheeses containing added salt and with a higher L/P ratio. It is suggested that this was due to greater salivation and lubrication. Moreover, the number of swallows was positively correlated to the total amount of aroma release.

KEYWORDS

Aroma release, model cheese, swallowing, chewing, microstructure, composition

1. INTRODUCTION

During the eating of food, the in-mouth process leads to food breakdown which induces the release of flavour compounds. Volatile and non-volatile compounds are released into the saliva, and volatile compounds are transferred into the vapour phase to reach olfactory receptors in the nasal cavity. During food consumption, volatile compounds released into expired air can be monitored real-time by nose-space atmospheric pressure chemical ionisation – mass spectrometry (APCI-MS) (Taylor *et al.*, 2000) or using nose-space proton transfer reaction -mass spectrometry (PTR-MS) (Lindinger *et al.*, 1998b). Not only the nature of the aroma compounds, but also the physiological characteristics of subjects and the properties of the products consumed can influence *in vivo* aroma release (Gierczynski *et al.*, 2011). The physiological parameters that influence aroma release have already been reviewed (Salles *et al.*, 2011b), and include: respiratory rate (Hanaoka *et al.*, 2001), saliva composition and salivary flow-rate (Friel & Taylor, 2001), mouth and throat geometry (Wright & Hills, 2003) and also mastication and swallowing (Pionnier *et al.*, 2004).

Cheese is a good model to study these combined effects because it is possible to vary its composition (lipids, protein), microstructure and texture and to change the salt content, in order to comply with nutritional guidelines.

The mastication (i.e. chewing activity) of cheese can be investigated using surface electromyography (EMG). Chewing activity and aroma release have already been studied simultaneously by EMG and APCI-MS during the consumption of model cheeses (Tarrega *et al.*, 2008); the amount of aroma release increased in line with chewing activity (chewing amplitude, chewing work and number of chewing cycles), which varied according to the texture of the model cheeses. Indeed, not only texture but also structure are intimately linked to food composition and can therefore influence chewing parameters. But texture can also

affect swallowing, as has been shown with liquids, syrups and agar paste (Tsukada *et al.*, 2009). In addition, some studies have shown that aroma release patterns may differ before and after swallowing (Buettner & Schieberle, 2000a). A study of solid processed model cheeses showed that more ethyl propanoate was released during the pre-swallowing step and more nonan-2-one was released during the post-swallowing step (Repoux *et al.*, 2012), highlighting an interaction between aroma compounds and physiological parameters. However, the number of swallowing events is rarely taken into account in studies performed on aroma release from cheeses, even though it is considered as a key parameter influencing aroma release from products such as lemon-flavoured confectionery chews (Blissett *et al.*, 2006), liquid food (Buettner *et al.*, 2001) and candies (Déléris, Isabelle *et al.*, 2011).

As previously mentioned, changes to food composition can affect aroma release (Gierczynski *et al.*, 2011). For instance, the amounts of heptan-2-one and ethyl hexanoate released during the consumption of high-fat model cheeses were lower than those released from low-fat model cheeses. By contrast, when the fat content increased, the release of diacetyl also rose (Lauverjat *et al.*, 2009). During that study, no significant differences in aroma compound release were observed during the consumption of model cheeses with different salt contents, whereas the exhausting effect of salt on aroma release has already been mentioned with other products (Salles, 2006). In addition, the effects of salt/fat interactions have been investigated with respect to salty perception (Lawrence *et al.*, 2012 ; Phan *et al.*, 2008), but very few studies have investigated the combined effects of fat and salt on aroma release and chewing activity.

It was therefore deemed necessary to perform more complete studies in order to investigate the effects of both cheese characteristics (fat, protein and salt (NaCl) contents; texture and

microstructure) and in-mouth processes (mastication and swallowing) on aroma release during the consumption of model cheeses.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Preparation and composition of the model cheeses

The ingredients used were rennet casein (Eurial Poitouaine, Nantes, France), acid casein (BBA Lactalis, France), commercial melting salts (Kasomel 2185, Prayon, Europhos, Engis, Belgium), anhydrous milk fat (Cormans, Goe-Limbourg, Belgium), deionised water (Milli-Q[®], Bedford, MA, USA), NaCl (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) and citric acid (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) (**Table 1**).

Six model cheeses were prepared and contained three different lipid (L)/protein (P) ratios (L/P (w/w): 28/20, 24/24 and 20/28) calculated from the dry matter contents of milk fat (lipid) and caseins (protein), with two levels of added salt (NaCl): 0 and 1 %. The six model cheeses were labelled according to their L/P ratios and salt contents (indicated with an 's' when salt was added) (**Table 1**).

To prepare the model cheeses, the ingredients were placed in a cutter mixer (R3VV, Robot Coupe, Montceau-les-Mines, France) in the following order: water, NaCl, citric acid, rennet casein, acid casein, melting salts and milk fat. Batches of 500 g were prepared at 75°C, with a mixing speed set at 2500 rpm for 7 min 30 s. The content of each batch was shared between 3 or 4 plastic cups. The cups were kept at -20°C for 25 min before being vacuum-sealed, and then stored at 4°C.

The pH values of the six model cheeses were controlled using a pH electrode (1083B, Hanna Instruments, Tanneries, France) and were found to be within the same range, between 6.67 and 6.85 (**Table 2**). The dry matter content of each cheese was determined with a moisture analyzer (XM 120, Precisa, Poissy, France) and did not vary significantly between cheeses (**Table 2**). In order to determine the sodium content, the ash content of the model cheeses was first of all determined according to the International Dairy Federation (IDF) standard method (IDF-27, 1964). The ash residue was then treated with 6 M hydrochloric acid (HCl). The total sodium content in the solution was determined by atomic absorption spectroscopy (Varian spectrophotometer type 220 FS, SpectraA Technologies, Bangalore, India). These sodium determinations were performed by the Agrobio laboratory (Vezin le Coquet, France). The resulting sodium contents in the model cheeses are shown in **Table 2**. The sodium content of model cheeses without added NaCl arose from the melting salts (negligible quantities in the other ingredients), whereas the sodium content came from both the melting salts and added NaCl in the model cheeses containing added NaCl.

The model cheeses were also flavoured with a solution of food grade aroma compounds (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in propylene glycol (Cooper, Melun, France). One gram of solution (per kg of cheese) was added, giving a “cheesy note” and containing (for 1 g prepared solution): diacetyl (butane-2,3-dione) (2.8 mg), ethyl butanoate (3.5 mg), ethyl hexanoate (6.3 mg), heptan-2-one (5.1 mg), octan-3-one (5.1 mg), nonan-2-one (5.4 mg) and propylene glycol (*qs* 1 g). This solution of aroma compounds was added 45 s before the end of the process. This time point was chosen to limit the loss of aroma compounds due to heat, and to allow a good distribution of the aroma mixture throughout the model cheeses. Among the six aroma compounds used for flavouring, one compound presented very low hydrophobicity (*i.e.* a low log P value): diacetyl (log P = -1.34). Two other compounds

belonged to the chemical class of esters and presented two different levels of hydrophobicity: ethyl butanoate (log P = 1.85) and ethyl hexanoate (log P = 2.83). The three final compounds belonged to the chemical class of ketones, and also displayed different levels of hydrophobicity: heptan-2-one (log P = 1.73), octan-3-one (log P = 2.22) and nonan-2-one (log P = 2.71). All log P values were obtained using EPI software (Epi Suite™, v3.20, 2000-2007, U.S. Environmental Protection Agency).

The model cheeses were vacuum-sealed and preserved at 4°C for 2 weeks before consumption. Furthermore, all products were checked for total coliforms, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Staphylococcus*.

2.2. Quantification of aroma content in the model cheeses

The final aroma concentrations in model cheeses after this process were quantified following simultaneous distillation-extraction (SDE) on a Likens-Nickerson apparatus (Likens & Nickerson, 1964). The sample spherical flask (250 mL) contained 20 g model cheese, 100 mL deionised water, 36 g NaCl and 0.5 g antifoaming agent (AFE 1030 K, Rore Technologies, Mardeuil, France). Fifty microlitres of standard solution (ethyl pentanoate in absolute ethanol: 0.26 g.L⁻¹) were added for aroma quantifications. Co-distillation was performed at 100°C with 25 mL distilled dichloromethane in the solvent spherical flask.

SDE was performed for 45 min. The organic phase of the extract was then collected and concentrated to 500 µL at 70°C with a Kuderna-Danish apparatus immersed in a thermostat-controlled water bath.

An aliquot of 1 µL was injected into an HP6890 gas chromatograph, coupled to a MSD 5973 mass selective detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) operated in the electron ionisation mode (70 eV). The mass spectrometer scanned the mass (m/z) from 29 to 350 in

855 ms. The ion source was set at 230°C and the transfer line at 250°C. The operating conditions were as follows: DB-Wax column (Agilent J&W, 30 m length, 0.32 mm i.d., 0.5 µm film thickness) held initially at 40°C and then raised by 3°C.min⁻¹ up to 240°C. Helium was used as the carrier gas at a linear velocity (44 cm.min⁻¹). Quantitative data were obtained by electronic integration of the total ion current (TIC) peak areas using the ChemStation program (Agilent Technologies).

Four replicate aroma extractions were performed on each type of model cheese and on each batch (two batches being made of each model cheese). The extraction yields and chromatographic response coefficients for each aroma compound were taken into account when calculating the final concentrations (Table 2). The differences in concentrations between model cheeses arose from heating during the manufacturing process, which caused different losses of aroma. Only global mean values (means of two batches with four repetitions of quantification per batch) are presented in Table 2, although the concentrations were quantified for each batch of model cheese served. However, for all data analyses, the concentrations found for each batch were considered, and not just the mean values.

2.3. Texture and microstructure analysis

An uniaxial compression test was performed on the model cheeses at 13°C using a TA XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems Ltd., Champlan, France). The modulus of deformability (M_D), stress at maximal deformation (σ) and work to maximal deformation (W) were calculated from the curves of the compression test. Moreover, the microstructure of the model cheeses was observed using confocal laser scanning microscopy; examples of these confocal micrographs have been presented elsewhere (Boisard *et al.*, 2012). Image analysis was performed on 256 pixels x 256 pixels portions of the confocal micrographs using ImageJ software (version 1.46f2, NIH, USA). The red channel was selected for the analyses. Images

were converted to 8-bit grayscale and background noise was reduced using the despeckle function. Brightness and contrast were then adjusted automatically by the software and the IsoData automatic threshold was used for all the model cheeses analysed, except for the L28P20s model cheese where the IJ_isodata threshold was applied (it was not possible to distinguish the droplets using the IsoData automatic threshold). After this thresholding step, a binary image was generated in which fat droplets were clearly separated from the background. In order to split closely touching droplets, the ImageJ watershed function was applied. Finally, the mean size of fat droplets (MS , in μm^2) and their circularity were measured. The formula for circularity was $4\pi \times [\text{Area}] / [\text{Perimeter}]^2$. A value of 1.0 indicated a perfect circle, whereas a value approaching 0.0 indicated an infinitely elongated polygon. The percentage area occupied by fat in the micrograph (PF , in %) was also calculated and corresponded to the percentage of the total area occupied by fat droplets (in μm^2) compared to the entire micrograph area (in μm^2). For each model cheese, five replicates (micrograph portions) per sample from five different micrographs were analysed.

2.4. *In vivo* aroma release

2.4.1 Subjects

The study was performed with the assistance of ten healthy subjects (6 women, 4 men) aged from 20 to 30 years. Each subject attended the centre for three separate 90-minute sessions, and received financial compensation for their participation. They were asked not to drink, eat, smoke or use any persistent-flavoured products for at least 1 h before the session. They received an information form and gave their signed consent before the experiment started. The study protocol was validated by the local Ethics Committee (Comité de Protection des

Personnes Est-1;(CPP) France, N°2010/22) on 7 June 2010 and approved by the French Agency for the Safety of Healthcare Products (AFSSAPS, France) on 27 January 2011.

2.4.2. Procedure

Retronasal aroma release in the breath of the subjects was measured on-line using Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry (APCI-MS) during consumption of the flavoured model cheeses. During each session, a subject was first of all given a dummy product in order to familiarise him or herself with the protocol. The subjects then received successively ten cheese samples of 5 g (\pm 0.2 g) each, served at 13°C. Between two samples, the subject was asked to clean his or her mouth with bread, apple, and water. The experimental design for product servings consisted in a Williams' Latin square design. When the three sessions had been completed by each subject, five replicates for the six model cheeses had been tested. For on-line measurements of aroma release, the subject positioned the plastic tube of the APCI-MS in one nostril and breathed normally. He or she was then asked to place the cheese sample into his or her mouth and to keep the mouth closed while eating it. A free consumption protocol was chosen; i.e. the subject was free to chew and swallow as usual, without restraint. The recording lasted until the product had been completely eaten (3 min recording).

Air from the nose was sampled at a flow rate of 49 mL/min and introduced through a heated (150°C) deactivated fused silica tube (i.d. 0.53 mm) into the ionisation source of an ion trap mass spectrometer (Esquire-LC, Bruker Daltonique, Wissenbourg, France) (Le Quéré, Jean Luc *et al.*, 2006). A 6 kV positive ion corona pin discharge was applied. Ionised aroma compounds were followed according to their MH^+ molecular ion: diacetyl, (m/z 87), heptan-2-one (m/z 115), ethyl butanoate (m/z 117), octan-3-one (m/z 129), nonan-2-one (m/z 143) and ethyl hexanoate (m/z 145).

2.4.3. APCI-MS data analysis

Prior to analysis, the aroma release curves obtained from APCI-MS measurements were smoothed in order to eliminate any signal fluctuations due to the subject's breathing pattern. Three main parameters were extracted from each individual release curve (Gierczynski *et al.*, 2007): area under the curve (AUC (a.u.)) which corresponded to the quantity of aroma release, maximum intensity of aroma release (I_{max} (a.u.)) and time to reach this maximum intensity (T_{max} (min)).

The time before the first swallow (T_{bs} (s)) was recorded and the three parameters listed above were studied before and after this event. Thus, the AUC was noted AUC_1 before the first swallow and AUC_2 after the first swallow. I_{max_1} , I_{max_2} , T_{max_1} and T_{max_2} were considered in the same way. The RR_1 (I_{max_1} / T_{max_1} (a.u./min)) parameter was calculated as representing the rate of aroma release during the period before the first swallow (Repoux *et al.*, 2012). The ratio between the quantity of aroma released after and before swallowing (AUC_2 / AUC_1) was also considered.

The values for the areas of aroma release (AUC , AUC_1 , AUC_2) and the maximum intensities (I_{max} , I_{max_1} , I_{max_2}) presented in the paragraphs below correspond to the values (after smoothing) divided by the quantified concentrations of aroma compounds (for a given cheese and a given batch).

2.5. Chewing activity and swallowing measurements

2.5.1. Procedure

Muscular chewing activity during model cheese consumption was measured by surface electromyography (EMG) at the same time as aroma release. Electromyographic signals from the left and right superficial masseter and anterior temporalis muscles were recorded using gold surface electrodes (Grass Telefactor, West Warwick, RI, USA) (Yven *et al.*, 2012). The data were collected as described in previous studies (Mioche *et al.*, 2002 ; Tarrega *et al.*, 2008).

Five chewing parameters were determined: the number of chewing cycles during the chewing sequence (N_c), the duration of the total chewing sequence (D_t (s)), the duration of a chewing cycle (D_c (s)) (which is the duration of the total chewing sequence divided by the number of chewing cycles), the total muscle work of the total chewing sequence (W_t (mV.s)) (which is the surface area of the muscle activity signal), and the muscle work of a chewing cycle (W_c (mV.s)). The data collected were averaged for the four muscles. Simultaneously with consumption of the model cheeses by the subjects, swallowing patterns were also followed. The subjects were asked to indicate each swallow by a knocking signal. The time elapsing before the first swallow (T_{bs}) and the number of swallows (N_s) were recorded manually.

2.6. Statistical analysis

Rheological data, image analyses, APCI-MS and EMG data underwent separate 3-way analysis of variance (ANOVA, factors: L/P ratio, salt content, subject, and interactions). Whenever appropriate, a least significant differences (LSD) test was performed to determine any significant differences between the products. The level of significance was fixed at $p < 0.05$. Pearson correlation coefficients (r) were also calculated between some of the study parameters in order to highlight any correlations. In addition, principal components analysis

(PCA) was used to study any variability in chewing and swallowing parameters. All analyses were performed using STATISTICA[®] Software (version 10, StatSoft, France).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Texture analysis

The rheological properties of the model cheeses are presented in Table 2. Their resistance was illustrated by the stress at maximal deformation (σ) and work to maximal deformation (W) parameters, which followed the same trend, increasing when the L/P ratio decreased. Moreover, for the same L/P ratio, they were lower with the versions without added salt than with the versions containing added salt. In our case, differences in textures are only due to changes in the L/P ratio and to the addition of salt, as the pH and dry extract values remained constant (Table 2).

Higher values for the modulus of deformability M_D indicated lower elasticity. The results showed that model cheeses with a lower L/P ratio were less elastic, highlighting the effect of fat on deformability (Xiong *et al.*, 1991). The effect of salt on elasticity was only noted for the model cheese with an L/P ratio equal to 28/20, where elasticity decreased significantly when salt was added ($p < 0.001$). This latter result agreed with the findings of a study led by Elzeny (1991) on soft white cheeses prepared from the rennet coagulation of salted milk, where elasticity decreased when the salt content in the milk rose from 5% to 10%.

3.2. Microstructure and image analysis

The percentage area occupied by fat in the micrograph (*PF*), the mean size of fat droplets (*MS*) and the circularity of fat droplets are shown for the six model cheeses in Table 3. A significant effect of the L/P ratio in the model cheeses on *PF* was observed ($p < 0.001$), with a logical decrease in *PF* when the L/P ratio decreased. At an identical L/P ratio, no significant difference was observed between the versions with and without added salt, which was coherent because the same amount of milk fat was used. The *PF* values found by image analysis were slightly higher than the percentages of fat incorporated during the preparation process (respectively 35.3% and 32.7% for L28P20 and L28P20s rather than 28%; respectively 29% and 28.5% for L24P24 and L24P24s rather than 24%; and respectively 22.4% and 24.3% for L20P28 and L20P28s rather than 20%). They did however remain within the same range. Image analysis thus provided relevant information and constituted a rapid method to estimate the fat contents of food products, as has already been proved on the longissimus muscle of beef (Kuchida *et al.*, 2000) or salmon fillets (Stien *et al.*, 2007).

The results concerning the mean size (*MS*) of fat droplets revealed a significant effect of salt addition ($p < 0.001$). Model cheeses without added salt displayed fat droplets with a significantly smaller mean size than model cheeses with added salt. This result explained the reduction in mechanical resistance in model cheeses containing added salt. Larger fat droplets led to a less well-organised network and thus a less resistant matrix (Pavia *et al.*, 1999). The effect of the L/P ratio on *MS* was only significant ($p < 0.001$) for the three model cheeses with added salt, where the *MS* values were significantly higher (larger droplets) for the L28P20s model cheese than for the L24P24s and L20P28s cheeses. This analysis of fat droplet size corroborated previous observations regarding confocal micrographs of the model cheeses (Boisard *et al.*, 2012).

The circularity of fat droplets was only affected by the salt content in model cheese with the highest lipid content, where circularity increased significantly ($p < 0.001$) when salt was added. Circularity exerted a significant effect of the L/P ratio, increasing significantly ($p < 0.001$) when the L/P ratio decreased. Indeed, Everett & Olson (2003) had already shown that small areas of fat were more circular than larger areas, suggesting that larger areas consisted of either globule clusters or pools of free oil. Therefore, when the L/P ratio decreased, the increased circularity and small size of fat droplets led to improved organisation of the matrix network and thus participated in greater mechanical resistance.

3.3. Eating events

3.3.1. Chewing activity

In order to study differences in chewing when eating the different model cheeses, a PCA was applied to the mean values of chewing, swallowing and rheological parameters. The first two components accounted for 89.5% of total variability between the model cheeses (Figure 1).

When considering chewing parameters on the PCA plot, not only the number of cycles (N_c), chewing duration (D_t), muscle work of a chewing cycle (W_c) and total muscle work of the total chewing sequence (W_t), but also rheological parameters (W and σ) appeared to be strongly correlated (and inversely correlated to the L/P ratio). Moreover, they were mainly associated with PC1 which accounted for 74.29% of variability between products. An ANOVA test confirmed these findings by showing that the L/P ratio significantly affected chewing parameters ($p < 0.001$), with an increase in N_c , D_t , W_t , and W_c when the L/P ratio decreased. These results were related to the rheological properties, showing an increase in mechanical resistance when the L/P ratio decreased and hence an increase in the number of

cycles, time and work to chew the product (Tarrega *et al.*, 2008). This means that harder products were chewed for longer, with greater force and using more chewing cycles. For instance, a strong correlation was highlighted between N_c and D_t ($r = 0.945$).

Although the duration of chewing cycles (D_c) seemed to be correlated with the L/P ratio on the PCA plot, ANOVA did not reveal any significant effect of the L/P ratio. This result highlighted the fact that the effect of the L/P ratio on D_t , as previously mentioned, was due to an increase in the number of chewing cycles rather than the duration of each chewing cycle.

The second component (PC2) of the PCA plot accounted for 15.21% of variability between products and could mainly be explained by the salt content. As the effect of salt on chewing parameters was not clearly evidenced on the PCA plot, additional ANOVA tests were performed and showed that an increase in the salt content led to a significant reduction in N_c , W_t and W_c ($p < 0.001$), probably due to a decrease in the resistance of model cheeses when salt was added. However, no effect of salt on D_t and D_c was observed, explaining why the chewing parameters on the PCA plot were mainly driven by the L/P ratio.

The subjects displayed significantly different chewing patterns (N_c , from 22 to 97 cycles; D_t , from 24.6 to 68.9 s; D_c , from 0.62 to 1.21 s; W_t , from 0.5 to 7.9 mV.s; and W_c , from 0.01 to 0.10 mV.s – data not shown), but these did not mask the marked differences observed between the chewing activity relative to products differing in terms of their L/P ratio and salt content.

3.3.2. Time before the first swallow and number of swallows during consumption

In order to study differences in swallowing, mean values for the time before the first swallow (T_{bs}) and the number of swallows (N_s) were also considered in the PCA applied to chewing

parameters (Figure 1). T_{bs} appeared to be strongly correlated to the chewing parameters. ANOVA also indicated that the model cheeses were swallowed significantly later ($p < 0.001$) when the L/P ratio decreased. Our interpretation is that model cheeses with a lower L/P ratio required a larger number of chewing cycles because of their greater mechanical resistance. In this way, a correlation between the number of chewing cycles and the time before the first swallow was highlighted ($r = 0.884$). Model cheeses with a lower L/P ratio required a larger number of chewing cycles and a longer time was required to obtain a swallowable bolus, as already observed with other types of cheese (Yven *et al.*, 2012). This explained the longer time elapsing before the first swallow. Conversely, the shortest T_{bs} observed for the highest L/P ratio could have been caused by the facilitation of bolus formation and lubrication of the food due to its higher fat content (Gaviao *et al.*, 2004).

Furthermore, model cheeses containing added salt tended to be swallowed more rapidly than the corresponding model cheeses without added salt ($p = 0.074$), probably due to the weaker resistance of model cheeses with added salt. Another explanation could be that the addition of salt induced a more salty perception and a greater salivation (Neyraud *et al.*, 2003), the latter triggering more rapid swallowing.

It was possible to consider the number of swallows using the free consumption protocol. Despite differences between the subjects ranging from 1 to 12 swallows (averages per subject, all model cheeses considered) the number of swallows during cheese consumption was not affected significantly by the composition of the model cheese: neither the salt content nor the L/P ratio modified significantly the number of swallows throughout whole consumption. Yet the salt content and number of swallows seemed to be associated on the PCA plot (Figure 1). This could be explained by an effect of salt on texture or by an effect of microstructure on mouth-feel and salivation, leading to an effect on swallowing. Indeed, it had previously been

shown that the amount of saliva secreted correlated to the number of swallows (Nederkoorn *et al.*, 1999).

3.4. Aroma release

3.4.1. Aroma release rate before swallowing (RR_1)

The aroma release rate before swallowing (RR_1) was calculated for each model cheese and each aroma compound. Figure 2 shows that RR_1 was affected by the L/P ratio; RR_1 values fell when the L/P ratio decreased, meaning that the presence of proteins might reduce the initial aroma release rate because of molecular interactions (Guichard, 2002). For model cheeses with an L/P ratio equal to 28/20, the addition of salt led to a significant increase in RR_1 ($p < 0.001$) for all aroma compounds except diacetyl. One explanation was the salting out effect on aroma release, which might be more strongly expressed in high-fat model cheeses where sodium ions are more mobile (Andriot, Isabelle *et al.*, 2011 ; Boisard *et al.*, 2012). In addition, RR_1 decreased when the hydrophobicity of the compounds increased. Indeed, the RR_1 of diacetyl ($\log P = -1.34$) was much higher than the RR_1 of nonan-2-one ($\log P = 2.71$). In both categories (esters and ketones), RR_1 decreased when compound hydrophobicity increased: $RR_1(\text{ethyl butanoate}) > RR_1(\text{ethyl hexanoate})$, and $RR_1(\text{heptan-2-one}) > RR_1(\text{octan-3-one}) > RR_1(\text{nonan-2-one})$. And indeed, mass transfer coefficients decreased when compound hydrophobicity increased (Voilley, 2006).

3.4.2. Maximum intensity of aroma release

In light of these results, it appeared that global *Imax* always corresponded to *Imax₂*. Indeed, *Imax* was always higher after swallowing (*Imax₂*) than before (*Imax₁*), and this was observed with all the matrices, all the aroma compounds and all subjects (data not shown). The same observation had already been made during other studies (Hansson *et al.*, 2003 ; Lauverjat *et al.*, 2009). This phenomenon was attributed to opening of the velum-tongue border during swallowing, allowing the transport of aroma compounds from the oral cavity to the nasal cavity (Buettner *et al.*, 2001 ; Mestres *et al.*, 2006).

In our case, because *Imax₁* and *Imax₂* displayed similar trends, only *Imax₂* is described herewith.

It can be seen in Figure 3 that the effects of aroma compounds on aroma release were product-dependent. Nevertheless, it was generally observed that a decrease in the L/P ratio led to a decrease in *Imax₂*. This result differed from previous findings regarding model cheeses (Tarrega *et al.*, 2008), where the highest *Imax* values were found for model cheeses with the lowest L/P ratio. However, the authors of that study did not verify the homogeneity of the microstructure, which could affect aroma release. Furthermore, they did not quantify aroma concentrations in the model cheeses. Therefore, these higher *Imax* value might not be only due to a greater chewing activity, but also to higher initial aroma concentrations in model cheeses with the lowest L/P ratio. Indeed, in our case, model cheeses with the lowest lipid/protein content presented the highest quantified aroma concentrations (Table 2), and these were taken into account in the *Imax* data.

Furthermore, during the present study, although chewing parameters increased for model cheeses with a low L/P ratio, the decrease in *Imax₂* values could be explained by the trapping effect of the protein network which was thicker and stronger in model cheeses with a lower L/P ratio (Bryant *et al.*, 1995). Moreover, their associated microstructure was more rigid and

contained more circular droplets, which contributed to a more stabilised system (Guinee *et al.*, 2004). Another hypothesis was that more saliva was incorporated into the boluses of cheeses with a lower fat content (Repoux *et al.*, 2012), leading to dilution of the aroma compounds (Otake *et al.*, 1998) and a lower rate of aroma release. In addition, no clear effect of salt on I_{max_2} values was evidenced, but seemed to depend on the L/P ratio. For ketones, an increase in the salt content induced a slight rise in I_{max_2} values for model cheeses with an L/P ratio equal to 28/20, whereas it induced a fall in I_{max_2} values for model cheeses with an L/P ratio of 24/24. No clear effect was observed regarding the L/P ratio equal to 20/28.

Furthermore, I_{max_2} values presented marked inter-individual differences (sometimes from one to ten-fold), but these differences did not prevent any variability between products.

3.4.3. Time to reach the maximum intensity of aroma release

Because T_{max_1} and T_{max_2} values presented similar profiles, only T_{max_2} are described in this section; in fact, global T_{max} values corresponded to T_{max_2} values in all cases.

In terms of the composition of the model cheeses, a decrease in the L/P ratio (increase in protein content) with all aroma compounds led to a significant increase in T_{max_2} ($p < 0.001$), meaning that the corresponding maximum intensity of aroma release (I_{max_2}) was attained later (Figure 4) for low-fat and higher protein content model cheeses. This could be explained by the fact that the entire in-mouth process (chewing activity, aroma release) was longer when the L/P ratio decreased. However, whatever the L/P ratio, versions containing added salt always presented T_{max_2} values that were significantly lower ($p < 0.001$) than those of versions without added salt (Figure 4). This highlighted the effect of texture and mastication, but it might also have reflected the “salting out” effect of NaCl which promoted more rapid aroma

release from the aqueous phase at the start of the eating process. A minor correlation was found between $Tmax_2$ values and the time elapsing before the first swallow ($r = 0.577$). This may have been to I_{max_2} values being attained sooner when the product was swallowed more rapidly.

As for aroma compound properties, $Tmax_2$ values increased from esters to ketones and in line with hydrophobicity in each category (*i.e.* increase in log P), unlike a previous study on a model cheese where aroma compounds were found to have no effect on the $Tmax$ parameter (Pionnier *et al.*, 2004). Interestingly, the behaviour of diacetyl (lowest hydrophobicity, log P = -1.34) contrasted with that of the other compounds: the $Tmax_2$ value was the highest (I_{max_2} reached later) whereas the $Tmax_1$ value was the lowest, meaning that I_{max_1} was reached sooner (data not shown for $Tmax_1$). This meant that highly hydrophilic compounds were released later after swallowing, which corresponded to the lowest I_{max_2} value. As aroma compounds are more or less hydrophobic depending on their nature, the organization of fat globules in the protein network might interfere differently with these aroma compounds (Charles *et al.*, 2000). In each category, the more hydrophobic compounds had a greater affinity for fat and thus higher retention, release was slower and maximum intensity was reached later.

At the same time, $Tmax_2$ was found to be highly subject-dependent, ranging from 0.54 s to 1.29 s (data not shown), which showed that this parameter presented inter-individual differences alongside the effects of composition (L/P ratio, salt) and aroma compound properties.

3.4.4. Area under the curve

3.4.4.1. Consideration of the AUC_2 / AUC_1 ratio (after/before the first swallow)

The AUC_1 and AUC_2 values shown here corresponded to the raw AUC_1 and AUC_2 values divided by the quantified concentrations of the corresponding aroma compounds in the model cheeses.

AUC and $Imax$ (i.e. $Imax_2$) displayed the same patterns, so for this reason the AUC data are not presented here, although they are linked to the number of swallows in the next paragraph.

To serve as an illustration, the ratio corresponding to the mean AUC_2 value (for each ion and each model cheese) divided by the mean AUC_1 value (for each ion and each model cheese) was calculated and is shown in Figure 5. This ratio was always higher than 1, meaning that the amount of aroma release was always higher after swallowing (AUC_2) than before (AUC_1). The same observation had already been made during previous studies (Lauverjat *et al.*, 2009 ; Mestres *et al.*, 2006 ; Repoux *et al.*, 2012). Moreover, correlations were evidenced between AUC_1 and $Imax_1$ ($r = 0.649$) and, to a lesser extent, between AUC_2 and $Imax_2$ ($r = 0.485$). Figure 5 shows that the L/P ratio and salt content also affected aroma release. Overall, the AUC_2 / AUC_1 ratio was higher when the L/P ratio was higher, suggesting an effect of the fat/protein contents on the aroma release profile. Fats retained the aroma compounds and delayed their release until after swallowing. This could also be linked to the fact that model cheeses with a higher L/P ratio were swallowed more rapidly, leaving more time after swallowing for aroma release. In addition, with the more hydrophobic compound (nonan-2-one), the effect of salt could be clearly established, through an increase in the AUC_2 / AUC_1 ratio when salt was added. This could be explained by the increase in droplet size when salt was added. Larger droplets delayed the transfer of aroma compounds (Charles *et al.*, 2000) and release after swallowing.

Furthermore, the AUC_2 / AUC_1 ratio was significantly higher with ketones than with esters ($p < 0.001$), highlighting the fact that more ketones were released after swallowing than esters. The same phenomenon had previously been observed with processed cheeses (Repoux *et al.*, 2012) where the release of nonan-2-one mainly occurred during the post-swallowing step. In addition, the AUC_2 / AUC_1 ratio increased when the hydrophobicity of the compounds increased in each category (ketones and esters). Indeed, for ketones, the AUC_2 / AUC_1 ratios ranged from 5.4 to 8.8 for nonan-2-one ($\log P = 2.71$), from 3.7 to 5.8 for octan-3-one ($\log P = 2.22$), and from 3.2 to 4.5 for heptan-2-one ($\log P = 1.73$). In the same way, for esters, the AUC_2 / AUC_1 ratios ranged from 2.7 to 4.2 for ethyl hexanoate ($\log P = 2.83$), and 1.7 to 2.7 for ethyl butanoate ($\log P = 1.85$). The mass transfer of aroma compounds might be one way to explain the effect of hydrophobicity on aroma release. Indeed, mass transfer coefficients decrease when compound hydrophobicity increases (Voilley, 2006). This could explain why more markedly hydrophobic compounds are released more slowly and after swallowing than less hydrophobic compounds.

3.4.4.2. Aroma release and the number of swallows

Although no effect of composition could be identified regarding the number of swallows during consumption, an interesting link between this number and aroma release (AUC) was evidenced. Figure 6 (heptan-2-one is shown) illustrates this link by presenting the area under the curve and the number of swallows during consumption. It can be seen that subjects who presented a larger number of swallows also presented a higher quantity of aroma release (higher AUC value). The link between AUC and the number of swallows existed in all subjects (except subject S6), whatever the overall quantity of aroma they released. Subject S6 presented with an unexpectedly large number of swallows, coupled with low aroma release.

This could be related to this subject having a particular chewing pattern (extremely small number of chewing cycles) which led to a low level of aroma release despite the large number of swallows. After excluding this subject, a correlation ($r = 0.566$) was highlighted between the number of swallows and the quantity of aroma release (*AUC*). This could be due to an increase in aroma release after swallowing (Hodgson *et al.*, 2003) and the succession of swallows leading to an increase in global aroma release. In addition, it was seen that the quantity of aroma release also correlated well to the number of chewing cycles ($r = 0.689$) and to chewing duration ($r = 0.721$). This could explain why some subjects (e.g. subjects S8 and S9) presented similar quantities of aroma release whereas the number of times they swallowed differed. All these different findings highlight the fact that aroma release was affected by both chewing and swallowing under a free consumption protocol. These two aspects need to be addressed during future studies of *in vivo* aroma release.

4. CONCLUSION

The effects of changes to the fat and salt content are increasingly being studied in food science, undoubtedly because of the attached health issues. Thanks to this study, we were able to point out that modifications to these two parameters could trigger numerous changes, ranging from the microstructure of the product to the way the product was eaten (chewing, swallowing), as presented in Table 4. A decrease in the L/P ratio gave rise to a microstructure made up of smaller and more circular fat droplets in a denser protein network, thus making the products harder. This increase in hardness led to an increase in chewing activity, due to the adaptation of mastication to variations in texture (Ottenhoff *et al.*, 1992 ; Woda *et al.*, 2006). This increase in chewing activity was not associated with an increase in aroma release, as had previously been observed during other studies on model cheeses (Repoux *et al.*, 2012 ;

Tarrega *et al.*, 2008). During our study, a decrease in aroma release was more closely related to a combined effect of retention by proteins and fat droplet size which changed the microstructure of the cheeses.

The effect of the salt content could be explained by a two-step process: first of all, the increase in salt content triggered more rapid aroma release from the protein phase of the model cheese to the oral cavity, and thence to the nasal cavity. This could explain the higher initial aroma release values (RR_1) obtained for model cheeses containing added salt. The most hydrophobic aroma compounds were then transferred from the lipid phase to the protein phase. However, larger droplet size in the salt-complemented model cheeses slowed down this transfer, which could explain the second phase of slower aroma release and therefore a higher proportion of aroma release after swallowing (higher AUC_2 / AUC_1 values).

The salt and fat contents appeared to trigger different kinetics of aroma release, but they also governed swallowing events, where model cheeses with added salt and a higher L/P ratio were swallowed more rapidly. It is suggested that this was due to greater salivation and lubrication.

This study highlights the need to understand *in vivo* aroma release from cheese products using a multidimensional approach that covers factors ranging from the microstructure of products to physiological behaviour during consumption.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Isabelle Andriot and Megghane Baulard for carrying out the SDE experiments, Barbara Bulle for preparing the model cheeses, Christine Arnould for performing the confocal micrographs, Christine Achilléos for rheological measurements and Guillaume Houzé, from Fromageries BEL SA France, for his assistance with the formulation of the model cheeses. This work received support from the Regional Council for Burgundy.

REFERENCES

- [1] A.J. Taylor, R.S.T. Linforth, B.A. Harvey, A. Blake. **2000**, 71.
- [2] W. Lindinger, A. Hansel, A. Jordan, *Int J Mass Spectrom.* **1998**, 173, 191.
- [3] I. Gierczynski, E. Guichard, H. Labouré. **2011**, 26.
- [4] C. Salles, M.C. Chagnon, G. Feron, E. Guichard, H. Labouré, M. Morzel, et al., *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2011**, 51, 67.
- [5] K. Hanaoka, N. Vallet, P. Giampaoli, B. Heyd, P. McLeod, *Food Chem.* **2001**, 72, 97.
- [6] E.N. Friel, A.J. Taylor, *J Agric Food Chem.* **2001**, 49, 3898.
- [7] K.M. Wright, B.P. Hills, *Int J Food Sci Technol.* **2003**, 38, 361.
- [8] E. Pionnier, C. Chabanet, L. Mioche, J.L. Le Quéré, C. Salles, *J Agric Food Chem.* **2004**, 52, 557.
- [9] A. Tarrega, C. Yven, E. Sémon, C. Salles. **2008**, 18.
- [10] T. Tsukada, H. Taniguchi, S. Ootaki, Y. Yamada, M. Inoue. **2009**, 106.
- [11] A. Buettner, P. Schieberle, *Food Chem.* **2000**, 71, 347.
- [12] M. Repoux, H. Labouré, P. Courcoux, I. Andriot, E. Sémon, G. Feron, et al., *Flavour Frag J.* **2012**, (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ffj.3110.
- [13] A. Blissett, J. Hort, A.J. Taylor. **2006**, 37.
- [14] A. Buettner, A. Beer, C. Hannig, M. Settles. **2001**, 26.
- [15] I. Déléris, A. Saint-Eve, F. Dakowski, E. Sémon, J.L. Le Quéré, H. Guillemin, et al., *Food Chem.* **2011**, 127, 1615.
- [16] C. Lauverjat, I. Déléris, I.C. Trelea, C. Salles, I. Souchon, *J Agric Food Chem.* **2009**, 57, 9878.
- [17] C. Salles, in *Flavour in Food*, (Eds: Voilley A., Etiévant P., CRC Press ed), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, CB1 6AH, UK, **2006**, pp. 345-68.
- [18] V.A. Phan, C. Yven, G. Lawrence, C. Chabanet, J.M. Reparet, C. Salles. **2008**, 18.
- [19] G. Lawrence, S. Buchin, C. Achilleos, F. Berodier, C. Septier, P. Courcoux, et al. **2012**, 60.
- [20] IDF-27, *Determination of the ash content of processed cheese products*, **1964**.
- [21] S.T. Likens, G.B. Nickerson, *Proc Am Soc Brew Chem.* **1964**, 5, 13.
- [22] L. Boisard, I. Andriot, C. Arnould, C. Achilleos, C. Salles, E. Guichard, *Food Chem.* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.035>.
- [23] J.L. Le Quéré, I. Gierczynski, D. Langlois, E. Sémon, in *Flavour Science: Recent Advances And Trends*, (Eds: Bredie W. L. P., Petersen M. A.), Elsevier, Oxford, **2006**, pp. 589-92.

- [24] I. Gierczynski, H. Labouré, E. Sémon, E. Guichard, *J Agric Food Chem.* **2007**, *55*, 3066.
- [25] C. Yven, J. Patarin, A. Magnin, H. Labouré, M. Repoux, E. Guichard, et al., *J Texture Stud.* **2012**, *43*, 309.
- [26] L. Mioche, P. Bourdiol, S. Monier, J.F. Martin. **2002**, *13*.
- [27] Y.L.L. Xiong, J.M. Aguilera, J.E. Kinsella. **1991**, *56*.
- [28] H.M. Elzeny, *Rennet coagulation of salted milk and rheology of soft white cheese prepared from it*. Department of Food Science and Human Nutrition, Michigan State University, **1991**.
- [29] K. Kuchida, S. Kono, K. Konishi, L.D. Van Vleck, M. Suzuki, S. Miyoshi, *J Anim Sci.* **2000**, *78*.
- [30] L.H. Stien, A. Kiessling, F. Marine, *J Food Compos Anal.* **2007**, *20*.
- [31] M. Pavia, B. Guamis, A.J. Trujillo, M. Capellas, V. Ferragut. **1999**, *9*.
- [32] D.W. Everett, N.F. Olson. **2003**, *86*.
- [33] M.B. Gaviao, L. Engelen, A. van der Bilt. **2004**, *112*.
- [34] E. Neyraud, J. Prinz, E. Dransfield. **2003**, *79*.
- [35] C. Nederkoorn, F.T.Y. Smulders, A. Jansen. **1999**, *33*.
- [36] E. Guichard, *Food Rev Int.* **2002**, *18*.
- [37] I. Andriot, L. Boisard, C. Vergoignan, C. Salles, E. Guichard, in *Magnetic Resonance in Food Science*, (Eds: J. P. Renou, P. S. Belton, G. A. Webb), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2011**, pp. 67-70.
- [38] A. Voilley, in *Flavour in food*, (Eds: Voilley A., Etiévant P., CRC Press ed), Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, CB1 6AH, UK, **2006**, pp. 117-32.
- [39] A. Hansson, P. Giannouli, S. Van Ruth, *J Agric Food Chem.* **2003**, *51*, 4732.
- [40] M. Mestres, R. Kieffer, A. Buettner, *J Agric Food Chem.* **2006**, *54*, 1814.
- [41] A. Bryant, Z. Ustunol, J. Steffe. **1995**, *60*.
- [42] T.P. Guinee, M. Caric, M. Kalab, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, (Eds: Fox P.F., McSweeney Paul LH, Cogan Timothy M. , Guinee Timothy P.), Elsevier, London, **2004**, pp. 349-50.
- [43] S. Odake, J.P. Roozen, J.J. Burger, *Food / Nahrung.* **1998**, *42*, 385.
- [44] M. Charles, V. Rosselin, L. Beck, F. Sauvageot, E. Guichard, *J Agr Food Chem.* **2000**, *48*.
- [45] M. Hodgson, R.S.T. Linforth, A.J. Taylor. **2003**, *51*.
- [46] F.A.M. Ottenhoff, A. Vanderbilt, H.W. Vanderglas, F. Bosman, *J Neurophysiol.* **1992**, *68*, 933.
- [47] A. Woda, K. Foster, A. Mishellany, M.A. Peyron. **2006**, *89*.

TABLES AND FIGURES

Table 1: Composition of the model cheeses.

Composition of the model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added salt); L28P20s (L/P = 28/20, with added salt); L24P24 (L/P = 24/24, without added salt); L24P24s (L/P = 24/24, with added salt); L20P28 (L/P = 20/28, without added salt) and L20P28s (L/P = 20/28, with added salt).

	model cheeses					
	L28P20	L28P20s	L24P24	L24P24s	L20P28	L20P28s
L/P ratio ¹	28/20	28/20	24/24	24/24	20/28	20/28
Composition (g / 100 g)						
Rennet casein	17.0	17.0	20.4	20.4	23.8	23.8
Acid casein	4.3	4.3	5.1	5.1	6.0	6.0
Milk fat	28.0	28.0	24.0	24.0	20.0	20.0
Deionised water	47.9	47.9	47.7	47.7	47.4	47.4
Melting salts	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
NaCl	0	1	0	1	0	1
Citric acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

¹. L/P ratio corresponding to the lipid/protein ratio and calculated from the dry matter contents of milk fat and caseins.

Table 2: Characteristics of the model cheeses

Model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added salt); L28P20s (L/P = 28/20, with added salt); L24P24 (L/P = 24/24, without added salt); L24P24s (L/P = 24/24, with added salt); L20P28 (L/P = 20/28, without added salt) and L20P28s (L/P = 20/28, with added salt).

	model cheeses					
	L28P20	L28P20s	L24P24	L24P24s	L20P28	L20P28s
<u>Chemical properties</u>						
Sodium content (%) ¹	0.67±0.02	1.06±0.05	0.66±0.01	1.06±0.04	0.67±0.01	1.06±0.02
pH ¹	6.75±0.01	6.68±0.04	6.85±0.01	6.70±0.04	6.85±0.03	6.73±0.01
Dry matter (%) ¹	53.0±0.6	52.7±0.3	52.8±0.4	53.1±0.4	52.7±0.3	53.0±0.5
<u>Rheological properties</u>						
W (kJ.m ⁻³) ²	230.9±5.1 ^b	121.6±8.3 ^a	360.8±21.8 ^d	319.3±32.3 ^c	521.9±37.8 ^f	462.3±29.5 ^e
σ (kPa) ³	1556.3±20.2 ^b	498.3±46.9 ^a	2167.2±81.2 ^d	2012.9±135.2 ^c	3016.1±133.7 ^f	2695.8±148.0 ^e
M _D (kPa) ⁴	222.6±23.0 ^a	355.3±61.6 ^b	380.3±24.2 ^b	343.2±69.3 ^b	455.9±83.1 ^c	497.0±55.6 ^c
<u>Average measured concentrations of aroma compounds in the model cheeses (10⁻¹ mg / 1 kg cheese)</u>						
Diacetyl	1.8±0.1 ^a	2.3±0.1 ^b	1.9±0.4 ^a	2.2±0.2 ^b	2.0±0.2 ^a	3.2±0.2 ^c
Ethyl butanoate	13.9±1.7 ^a	19.2±2.7 ^b	15.5±3.3 ^a	17.3±4.9 ^{ab}	24.1±6.0 ^c	31.1±4.2 ^d
Heptan-2-one	42.9±5.5 ^a	49.0±2.2 ^{bc}	44.0±7.7 ^a	46.3±5.1 ^{ab}	51.1±2.0 ^c	51.1±1.3 ^c
Octan-3-one	33.9±4.8 ^a	38.1±1.1 ^b	33.3±6.3 ^a	38.9±1.8 ^b	44.9±5.9 ^c	50.5±2.7 ^d
Nonan-2-one	9.0±2.1 ^a	10.1±0.2 ^{ab}	9.0±1.4 ^a	10.7±1.0 ^{ab}	12.6±1.6 ^b	22.8±7.1 ^c
Ethyl hexanoate	13.8±2.5 ^a	16.4±0.7 ^a	13.3±2.5 ^a	15.3±0.9 ^a	21.5±4.7 ^b	36.6±8.2 ^c

¹ sodium content, pH values and dry matter contents are expressed as mean ± standard deviation (SD), ($n = 3$).

² W: Work at maximal deformation.

³ σ: Stress at maximal deformation.

⁴ M_D: Modulus of deformability.

^{a-f} Values in the same line with different subscript letters were significantly different ($p < 0.05$). Means are given ± SD, ($n = 4$).

Table 3: Parameters obtained after image analysis of confocal micrographs of the model cheeses: percentage area occupied by fat in the micrograph (*PF*, %), mean size of fat droplets (*MS*, μm^2) and circularity of fat droplets (index, no unit. 1 corresponding to a perfect circle).

Model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added salt); L28P20s (L/P = 28/20, with added salt); L24P24 (L/P = 24/24, without added salt); L24P24s (L/P = 24/24, with added salt); L20P28 (L/P = 20/28, without added salt) and L20P28s (L/P = 20/28, with added salt).

Model cheeses	<i>PF</i> (%)	<i>MS</i> (μm^2)	circularity
L28P20	35.3±1.0 ^d	21.9±0.6 ^a	0.671±0.009 ^a
L28P20s	32.7±3.1 ^{cd}	38.6±2.1 ^c	0.720±0.023 ^b
L24P24	29.0±0.7 ^{bc}	20.5±0.7 ^a	0.747±0.006 ^{bc}
L24P24s	28.5±1.4 ^{bc}	27.5±1.6 ^b	0.758±0.009 ^{bc}
L20P28	22.4±1.1 ^a	19.0±0.2 ^a	0.778±0.014 ^c
L20P28s	24.3±2.0 ^{ab}	30.2±2.2 ^b	0.769±0.016 ^c

^{a-d} Values in the same column with different subscript letters were significantly different ($p < 0.05$). Means are given \pm SD, ($n = 5$).

Figure 1: Principal component analysis plot for the averaged values of rheological data (W , σ and M_D), chewing and swallowing parameters obtained for each model cheese (differing in L/P ratio and salt content).

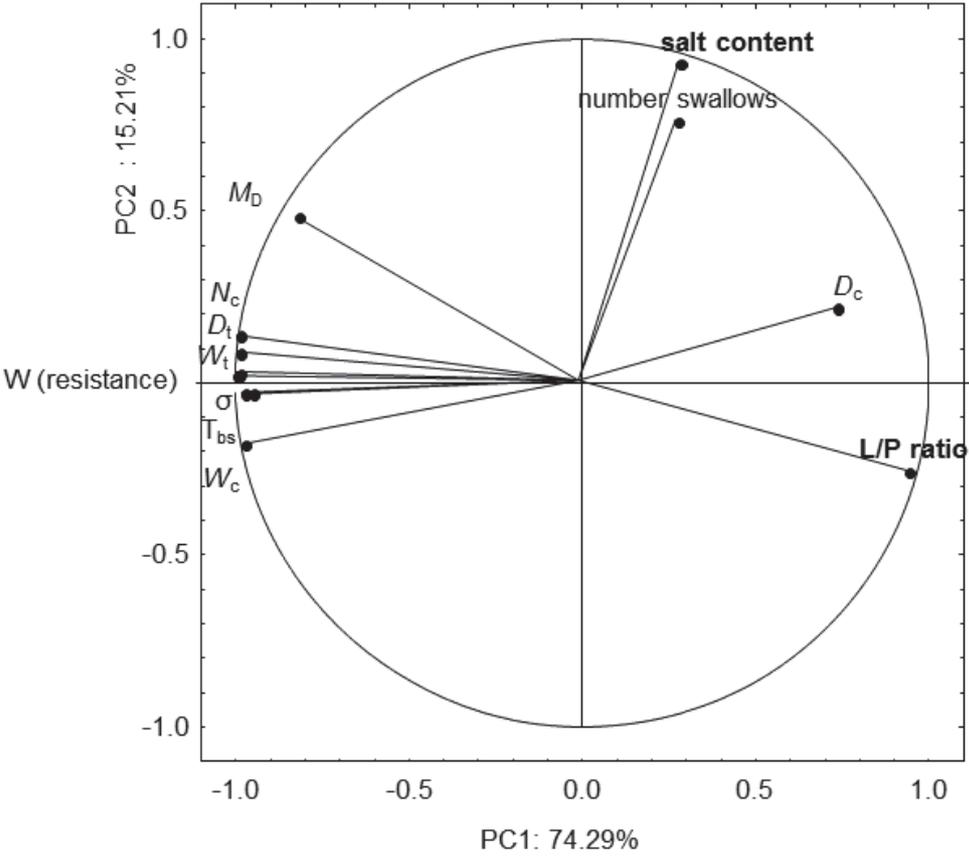
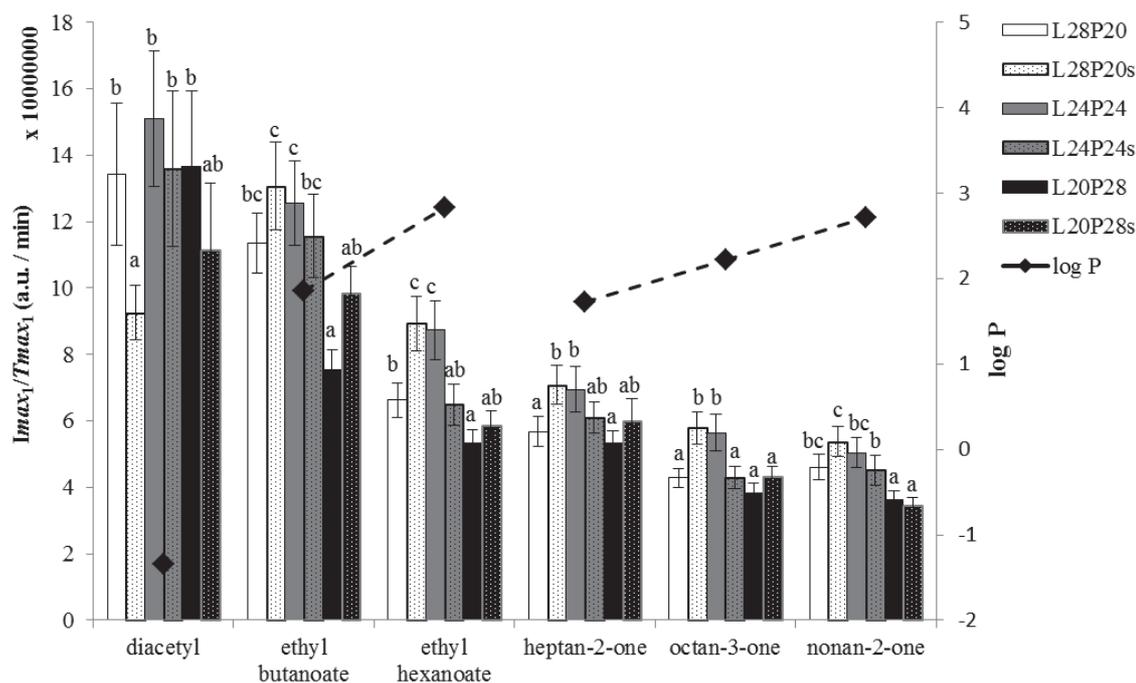
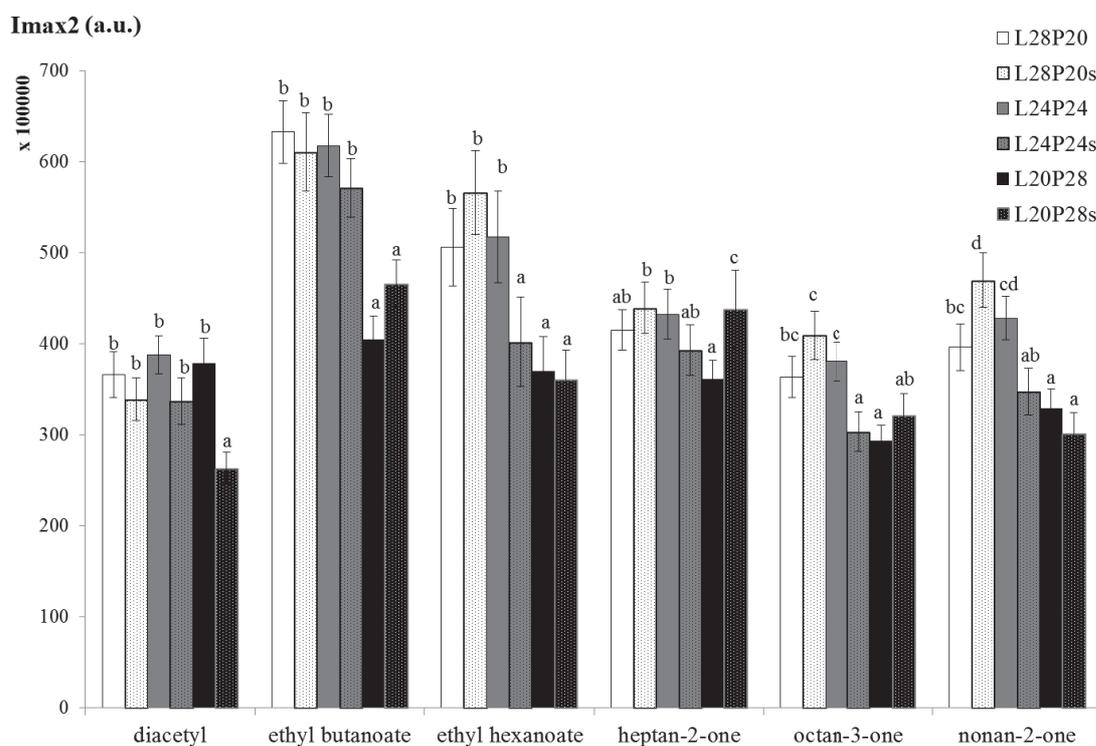


Figure 2: Variations in I_{max_1}/T_{max_1} values as a function of aroma compounds and model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added salt); L28P20s (L/P = 28/20, with added salt); L24P24 (L/P = 24/24, without added salt); L24P24s (L/P = 24/24, with added salt); L20P28 (L/P = 20/28, without added salt) and L20P28s (L/P = 20/28, with added salt).



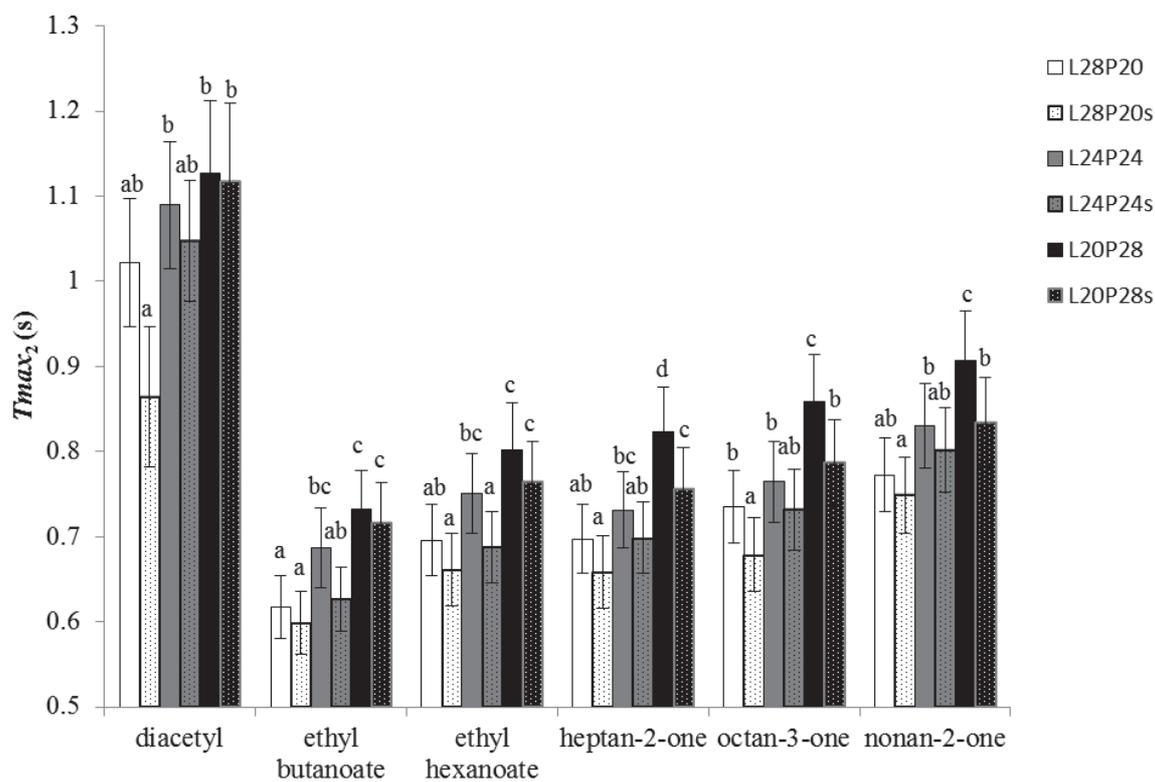
^{a-c} Values for the same aroma compound, with different subscript letters, were significantly different ($p < 0.05$).

Figure 3: Variations in I_{max2} values as a function of aroma compounds and model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added salt); L28P20s (L/P = 28/20, with added salt); L24P24 (L/P = 24/24, without added salt); L24P24s (L/P = 24/24, with added salt); L20P28 (L/P = 20/28, without added salt) and L20P28s (L/P = 20/28, with added salt).



^{a-c} Values for the same aroma compound, with different subscript letters, were significantly different ($p < 0.05$).

Figure 4: Variations in T_{max_2} values as a function of aroma compounds and model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added salt); L28P20s (L/P = 28/20, with added salt); L24P24 (L/P = 24/24, without added salt); L24P24s (L/P = 24/24, with added salt); L20P28 (L/P = 20/28, without added salt) and L20P28s (L/P = 20/28, with added salt).



^{a-c} Values for the same aroma compound, with different subscript letters, were significantly different ($p < 0.05$).

Figure 5: Evolution of AUC_2 / AUC_1 ratios as a function of aroma compounds and model cheeses: L28P20 (L/P = 28/20, without added salt); L28P20s (L/P = 28/20, with added salt); L24P24 (L/P = 24/24, without added salt); L24P24s (L/P = 24/24, with added salt); L20P28 (L/P = 20/28, without added salt) and L20P28s (L/P = 20/28, with added salt).

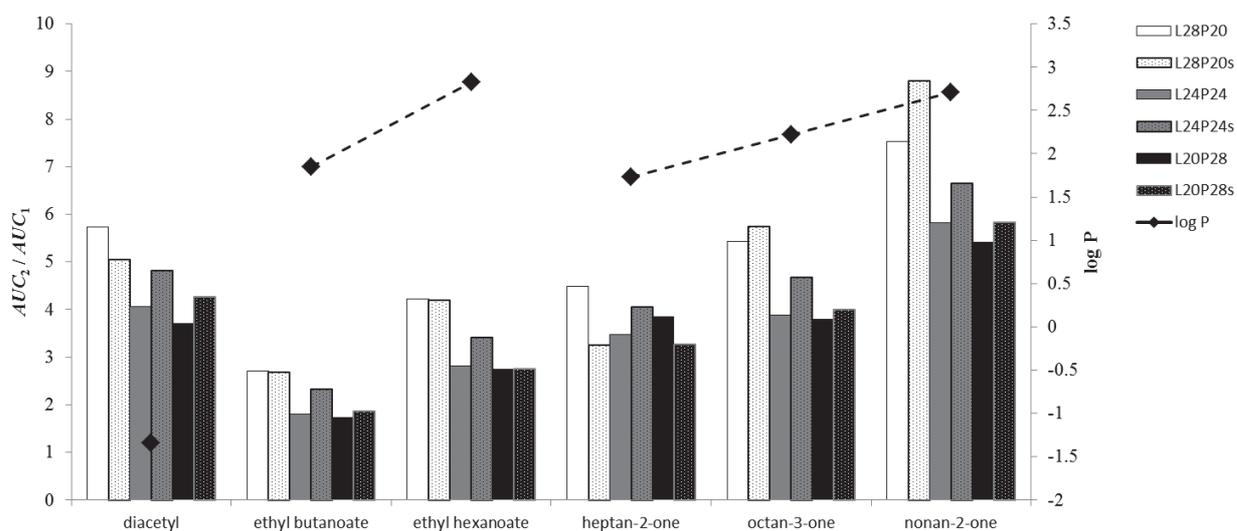


Figure 6: Aroma release (AUC of heptan-2-one, all model cheeses considered) and number of swallows during consumption as a function of different subjects (S1 to S10).

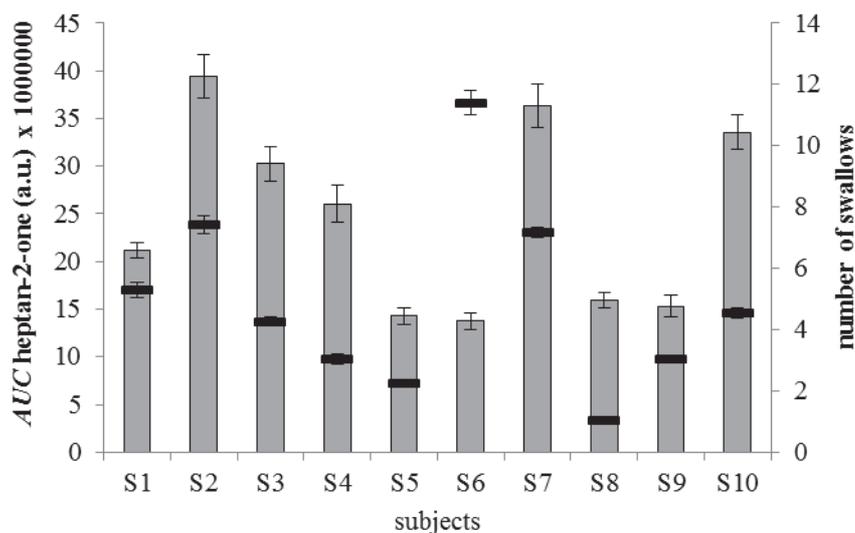


Table 4: Overview of the effects of the L/P ratio and the addition of salt on all the parameters investigated in the model cheeses.

Experiment	Parameters	↘ L/P ratio ¹	↗ Salt ¹
Rheology	<i>W</i> (resistance)	↗	↘
	σ (stress)	↗	↘
	<i>MD</i> (\Leftrightarrow 1/elasticity)	↗	↗ (only for 28/20 ratio)
Microstructure: image analysis	<i>PF</i> (percentage fat)	↘	-
	<i>MS</i> (droplet size)	↘ (only for salty cheeses)	↗
	<i>circularity</i>	↗	↗ (only for 28/20 ratio)
Chewing activity	<i>Nc</i> (number cycles)	↗	↘
	<i>Dt</i> (total duration)	↗	-
	<i>Dc</i> (cycle duration)	-	-
	<i>Wt</i> (total work)	↗	↘
	<i>Wc</i> (cycle work)	↗	↘
Swallowing	<i>Tbs</i> (time before 1st sw.)	↗	↘
	<i>Ns</i> (number swallows)	-	-
Aroma release	<i>RR1</i> (<i>Imax1/Tmax1</i>)	↘	↗ (only for 28/20 ratio)
	<i>Imax</i>	~ ↘	-
	<i>Tmax</i>	↗	↘
	<i>AUC2/AUC1</i>	↘	~ ↗

¹ In the columns, ↗ corresponds to a significant increase, ↘ corresponds to a significant decrease, - corresponds to no significant effect. The addition of ~ before ↗ or before ↘ indicates a trend but not a significant effect.

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail est de comprendre les effets d'un changement de composition des modèles fromagers sur la mobilité, la libération et la perception de molécules de la saveur (sel, composés d'arôme). Six modèles fromagers aromatisés ont été formulés (3 ratios lipides/protéines (L/P) et 2 teneurs en sel). La microstructure et les propriétés rhéologiques des modèles fromagers ont été caractérisées respectivement par microscopie confocale et par compression uniaxiale. La mobilité des ions sodium a été analysée par RMN ^{23}Na et leur cinétique de libération suivie dans l'eau et en situation de consommation. La libération rétronasale des composés d'arôme a été suivie par nose-space APCI-MS, simultanément au suivi des déglutitions, et de la mastication par électromyographie. Enfin, les propriétés sensorielles des modèles fromagers (intensité salée, arôme, texture) ont été étudiées. Une diminution du ratio L/P et une diminution de la teneur en sel diminuent la taille des gouttelettes lipidiques et augmentent la fermeté. Cela conduit à une diminution de la mobilité des ions sodium, de la quantité de sodium libéré dans la salive, de la perception salée, un retard dans le maximum de libération d'arôme et une diminution de la perception aromatique. Ces effets peuvent être expliqués par la répartition lipides/protéines observée en microscopie, par une déglutition plus tardive et une plus grande activité masticatoire.

ABSTRACT

The aim of this work is to understand the effects of changes in the composition of model cheeses on mobility, release and perception of flavor molecules (salt, aroma compounds). Six flavoured model cheeses were formulated (3 lipid/protein (L/P) ratios and 2 salt contents). The microstructure and the rheological properties of the model cheeses were characterized respectively by confocal microscopy and by uniaxial compression test. The mobility of sodium ions was analyzed by ^{23}Na NMR, the kinetics of sodium release followed in water and then during consumption of the model cheeses. The retronasal release of aroma compounds was followed by nose-space APCI-MS, simultaneously with the study of swallowing and chewing by electromyography. The sensory properties of the model cheeses (saltiness, aroma, texture) were studied. A decrease in the L/P ratio and a decrease in salt content reduce the fat droplet size and increase the hardness. This leads to a decrease in sodium ion mobility, in sodium release in saliva and in salty perception. Moreover, the maximum intensity of aroma release is reached later and the aroma perception is decreased. These effects can be explained by the observed lipid/protein distribution in microscopy, by the later swallowing and by the higher chewing activity.