



# **Approche pour favoriser l'égouttage et la déminéralisation lors de la fabrication fromagère à partir de concentrés d'osmose inverse du lait**

**Mémoire**

**Isabelle Fournier**

**Maîtrise en sciences des aliments - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Isabelle Fournier, 2019

**Approche pour favoriser l'égouttage et la déminéralisation lors  
de la fabrication fromagère à partir de concentrés d'osmose  
inverse du lait**

**Mémoire**

**Isabelle Fournier**

Sous la direction de :

Yves Pouliot, directeur de recherche

Michel Britten, codirecteur de recherche

## Résumé

L'ajustement protéique du lait de fromagerie par ultrafiltration (UF) est une pratique courante, mais très peu d'études ont porté sur l'utilisation de l'osmose inverse (OI) pour la fabrication fromagère. La préconcentration du lait de fromagerie par OI permettrait d'améliorer l'éco-efficience du procédé, ainsi que d'augmenter l'efficacité de production et les rendements.

Des travaux récents ont montré que les fromages fabriqués à partir des concentrés d'OI contiennent une teneur importante en lactose et en minéraux et sont plus humides que les autres types de fromages. Dans le cadre de ce projet de recherche, l'ajustement du pH, le lavage du caillé et l'utilisation d'un agent chélateur du calcium sont les leviers qui ont été évalués pour leur potentiel à égoutter et à déminéraliser le fromage. Les propriétés fromagères ont été étudiées en comparaison avec celles des concentrés d'UF.

Dans cette étude, il a été possible d'explorer une nouvelle application d'un sel habituellement utilisé pour la fabrication des fromages fondus. Le salage à sec avec le citrate de sodium (TSC) a amélioré la rétention du gras de 4,56 % dans les fromages d'OI, mais des études complémentaires de distribution minérale seront nécessaires pour déterminer s'il s'agit d'un levier d'intérêt. Dans les conditions testées, le lavage du caillé n'a pas amélioré les propriétés des concentrés d'OI. L'acidification a permis d'augmenter les rendements, la rétention du gras et l'égouttage et a diminué la teneur en minéraux et le ratio calcium total / protéines du fromage modèle. Les rendements obtenus lors de la fabrication fromagère à partir des concentrés d'OI étaient de 2 à 3 % supérieurs à ceux obtenus en UF. Cette étude suggère que le pH peut jouer un rôle majeur dans l'amélioration de la qualité des fromages faits de concentrés d'OI et que ce type de concentré peut contribuer à améliorer significativement les rendements fromagers par rapport à l'UF.

## Abstract

The protein adjustment of cheese milk by ultrafiltration (UF) is a common practice, but very few studies have focused on the use of reverse osmosis (RO) for cheesemaking. Milk preconcentration by RO prior to cheesemaking could improve the eco-efficiency of the process, as well as to increase production efficiency and yields.

Previous studies have shown that cheeses made from RO concentrates have a high content of lactose, minerals and moisture in comparison to other types of cheeses. As part of this research project, pH adjustment, curd washing and the use of a calcium chelating agent are the levers that have been evaluated for their potential to decrease the level of moisture and minerals in the cheese. Cheesemaking properties of RO concentrates have been studied in comparison with those of UF concentrates and non-concentrated milk.

In this study, it was possible to explore a new application of a chelating salt usually used in processed cheese. Dry salting with trisodium citrate (TSC) improved fat recovery by 4.56%, but further studies of mineral distribution will be necessary to determine if it is a lever of interest. In the conditions tested, washing the curd with water or with TSC solution did not improve the properties of RO concentrates. Acidification helped to increase yields, fat recovery and curd drainage and decreased the mineral content and total calcium / protein ratio of model cheese. The yields obtained during cheesemaking from RO concentrates were 2 to 3 % higher than those obtained with UF. This study confirms the importance of controlling pH in cheesemaking and its fundamental impact on cheese mineralization and moisture. It also suggests that pH can play a major role in improving the quality of cheese made from RO concentrates and that this type of concentrate can significantly improve cheese yields compared to UF.

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations .....	ix
Remerciements.....	x
Avant-propos .....	xii
Introduction .....	1
Chapitre 1 – Revue de littérature .....	3
1.1 La composition du lait.....	3
1.1.1 Les protéines.....	4
1.1.2 L'équilibre minéral entre la phase soluble et colloïdale .....	6
1.1.2.1 Modification de la température.....	8
1.1.2.2 Modification du pH .....	9
1.1.2.3 Effet de l'addition de sels sur l'équilibre minéral du lait.....	10
1.2 La fabrication fromagère.....	12
1.2.1 Préparation du lait .....	13
1.2.1.1 Traitement thermique.....	13
1.2.1.2 Chlorure de calcium.....	13
1.2.1.3 Standardisation.....	14
1.2.2 Coagulation .....	15
1.2.3 Égouttage.....	16
1.2.3.1 Décaillage et cuisson.....	16
1.2.3.2 Soutirage et pressage.....	17
1.2.3.3 Salage .....	18
1.2.4 Affinage.....	19
1.3 Utilisation de concentrés et éco-efficience en industrie laitière .....	20
1.4 Les procédés baromembranaires.....	21
1.4.1 La microfiltration .....	22
1.4.2 L'ultrafiltration.....	22
1.4.3 La nanofiltration.....	22
1.4.4 L'osmose inverse .....	23
1.4.5 Application en fromagerie.....	23
1.5 Particularités de la fabrication fromagère à partir des concentrés.....	24
1.5.1 Impact du pouvoir tampon sur l'acidification du concentré .....	24
1.5.2 Effet de la concentration du lait sur la coagulation par la présure ...	25
1.5.3 Effet de la concentration du lait sur la synérèse du gel .....	26
1.5.4 Effet de la concentration du lait sur les rendements fromagers.....	27
1.5.5 Caractéristiques des fromages faits à partir des concentrés d'OI ...	27
1.5.5.1 Perte de matière grasse .....	28
1.5.5.2 Acidité et minéralisation.....	28
1.5.5.3 Humidité .....	29
1.5.5.4 Impact sur l'affinage.....	29
1.6 Adaptation du procédé fromager aux concentrés d'OI .....	30
1.6.1 Le facteur de concentration.....	30

1.6.2	Les paramètres de coagulation et le pH de soutirage .....	30
1.6.3	La fermeté du gel .....	31
1.6.4	Le lavage du caillé.....	31
1.6.5	L'emploi d'agents chélateurs du calcium.....	33
Chapitre 2	– Hypothèse de recherche et objectifs .....	35
2.1	Problématique .....	35
2.2	Hypothèse de recherche.....	35
2.3	Objectifs.....	36
Chapitre 3	– Étude des approches favorisant l'égouttage et la déminéralisation de fromages modèles fabriqués à partir de concentrés d'osmose inverse .....	37
3.1	Avant-propos .....	37
3.2	Résumé .....	37
3.3	Abstract .....	40
3.4	Introduction.....	41
3.5	Materials and Methods .....	43
3.5.1	Skim milk and Cream Supply .....	43
3.5.2	Preparation of Concentrates .....	43
3.5.3	pH Adjustment.....	44
3.5.4	Determination of Cutting Time.....	44
3.5.5	Model Cheese Production .....	45
3.5.6	Composition Analyses.....	47
3.5.7	Cheese Mass Balance .....	47
3.5.8	Cheese Rheological Properties.....	48
3.5.9	Statistical Analysis.....	48
3.6	Results and Discussion .....	49
3.6.1	Composition of Cheese Milks.....	49
3.6.2	Comparison of Cheeses from UF and RO Concentrates .....	50
3.6.3	Effect of Curd Washing with Water and pH.....	51
3.6.3.1	Effect of RO-Curd Washing with Water .....	51
3.6.3.2	Effect of pH on RO Cheeses .....	51
3.6.4	Effect of Chelating Agent on Cheeses Made from UF and RO Retentates .....	54
3.6.4.1	Effect of Curd Washing with TSC on RO and UF Cheeses .....	54
3.6.4.2	Effect of Dry Salting with TSC on RO and UF Cheeses .....	54
3.6.4.3	Cheese Rheology .....	55
3.7	Conclusions.....	58
3.8	Acknowledgments .....	58
Conclusion générale	.....	59
a)	Retour sur la méthodologie .....	59
b)	Synthèse des résultats.....	61
c)	Perspectives.....	65
Bibliographie	.....	67

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition approximative du lait de différentes espèces [8]. .....	3
Tableau 2 : Teneur en lactose des fromages en fonction du pourcentage d'eau de lavage utilisé pour le délactosage [109]. .....	33
Table 3: Composition <sup>1</sup> of UF and RO concentrates used for cheesemaking. ....	49
Table 4: Influence of milk filtration, pH adjustment and curd washing (+W) on yield, recovery and cheese composition <sup>1</sup> (Experiment 1).....	53
Table 5: Influence of pH and curd washing (+WC) and dry salting (+SC) with trisodium citrate <sup>1</sup> on the properties of cheese made from UF and RO concentrates <sup>2</sup> (Experiment 2). .....	57
Tableau 6: Synthèse de l'effet de la concentration par OI et des leviers technologiques étudiés sur les paramètres de composition et de propriété fromagère mesurés lors des expériences 1 et 2. ....	64

## Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique des équilibres minéraux entre la phase soluble et la phase colloïdale de la micelle de caséine selon plusieurs traitements physicochimiques du lait, tiré de Gaucheron (2011) [15]. .....	6
Figure 2 : Le modèle avec sous-micelles de la micelle de caséine tel que décrit par Slattery (1973) [16], Schmidt (1982) [17], Walstra (1990) [18] et Rollema (1992) [19], image adaptée de Bylund (2015) [20] et l'équilibre minéral entre sa phase soluble et colloïdale. ....	7
Figure 3: Modification de la structure micellaire lors de l'acidification, tiré de Croguennec et al. (2008) [34]. .....	10
Figure 4: Procédé général de la fabrication fromagère, tiré de Fox et al. (2017) [44]......	12
Figure 5: Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation par la présure, tiré de Croguennec et al. (2008) [34]. .....	16
Figure 6: Les composés laitiers séparés en fonction du type de filtration membranaire utilisé, incluant la microfiltration (MF), l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (RO), tiré de Kumar et al. (2013) [72]. ...	21
Figure 7 : Effect pH on RO cheese moisture in Experiment 1, without washing (-W) or with washing (+W). .....	52
Figure 8 : Effect of moisture content on cheese complex modulus ( $G^*$ 1 Hz) in Experiment 2. Cheeses were made from RO (white symbols) and UF (black symbols) concentrates. The pH of concentrates was adjusted at 5.80 (circles) or 6.20 (triangle), with the addition of trisodium citrate in the washing solution (diamonds) or as a dry-salting agent (squares).....	56

## Liste des abréviations

ANOVA	Analyse de la variance ( <i>analysis of variance</i> )
CCP	Phosphate de calcium colloïdal
CMP	Caséinomacropeptide
FCV	Facteur de concentration volumique
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ( <i>Fourier Transform InfraRed spectroscopy</i> )
G*	Module complexe ( <i>complex modulus</i> )
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
ICP-OES	<i>Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy</i>
IMCU	<i>International milk-clotting units</i>
LCR	<i>Low-concentrated retentate</i>
LPC	Préfromage liquide ( <i>Liquid pre-cheese</i> )
MCR	<i>Medium-concentrated retentate</i>
MF	Microfiltration
MFR	Vitesse maximale de raffermissement ( <i>maximal firming rate</i> )
NCN	Azote non caséique ( <i>non-casein nitrogen</i> )
NF	Nanofiltration
NPN	Azote non protéique ( <i>non-protein nitrogen</i> )
OI	Osmose inverse
RCT	Temps de coagulation ( <i>rennet coagulation time</i> )
RO	<i>Reverse osmosis</i>
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
UF	Ultrafiltration
VCF	<i>Volumic concentration factor</i>

## Remerciements

Mon parcours à la maîtrise en Sciences des aliments aura été très enrichissant de par toutes les activités et projets auxquels j'ai pu participer et toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer. J'ai beaucoup appris lors de la réalisation de mon projet de recherche, mais encore plus en échangeant avec les différents étudiants et professionnels rencontrés au cours des deux dernières années.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur, Yves Pouliot, qui a assuré le suivi de mon projet en me laissant assez de liberté pour élaborer mes propres hypothèses. Je te remercie également pour ton support et tes encouragements, qui ont été très appréciés lorsque les résultats obtenus ne correspondaient pas à ceux attendus. J'ai apprécié ta flexibilité quant au cadre du projet, ainsi que ta disponibilité et ton souci du détail.

Je tiens également à remercier Michel Britten, mon codirecteur, qui a su me transmettre ses connaissances de la transformation fromagère, malgré la distance. J'ai apprécié nos discussions qui à chaque fois, faisaient une réelle différence dans l'avancement de mon projet et le développement de mes connaissances. Tes encouragements et tes commentaires positifs ont fait une différence dans mon parcours.

Je veux aussi remercier les professionnels de laboratoire, spécialement Diane Gagnon, qui a été indispensable à la réalisation de mon projet par son dévouement et son habileté à résoudre des problèmes. Je remercie également l'équipe de la chaire de recherche industrielle, dont les avis et commentaires ont été précieux tout au long de mon projet. Je remercie spécialement Agathe Lauzin et Iris Dussault-Chouinard, qui ont été d'une aide précieuse lors de la phase expérimentale de mon projet. Finalement, je remercie mes collègues et amies, Amandine Bouyer, Amélie Bérubé, Iris Dussault-Chouinard et Virginie Damphousse qui ont fait la différence dans mon parcours par leur attitude positive et leur joie de vivre.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance envers les organismes subventionnaires pour leur soutien financier de la Chaire de recherche industrielle CRSNG-Novalait en efficience des procédés de transformation du lait. Merci à Novalait et à la Commission canadienne du lait pour ma bourse de recherche. Enfin, je remercie les évaluateurs de mon mémoire pour leur temps et leurs précieux conseils.

En terminant, un grand merci à ma famille, spécialement à mes parents, Louis et Dominique, et à ma sœur, Camille, qui ont su m'encourager tout au long de mon parcours et s'intéresser à mes projets même si leur domaine respectif est plutôt éloigné du monde scientifique. Votre appui m'est très précieux.

## Avant-propos

Ce projet de recherche a été réalisé dans le cadre de la programmation de la Chaire de recherche industrielle CRSNG-Novalait en efficacité des procédés de transformation du lait, sous la direction du professeur Yves Pouliot. Il traite plus particulièrement de l'adaptation du procédé fromager aux concentrés d'OI du lait. Les cinq chapitres de ce mémoire sont précédés par une introduction, justifiant le projet et définissant l'objectif scientifique.

Le chapitre 1 fait état des connaissances de la littérature scientifique en lien avec le projet et des notions qui ont été abordées dans l'analyse des résultats. Dans un premier temps, la composition du lait est détaillée, plus précisément au niveau des caractéristiques des protéines et des facteurs influençant l'équilibre minéral entre la phase soluble et colloïdale. Ensuite, les principales étapes du procédé de fabrication fromagère sont présentées. Dans un troisième temps, la problématique de l'éco-efficacité en industrie laitière est abordée. La quatrième section traite des différents procédés baromembranaires et de leur application en fromagerie. Finalement, les particularités de la fabrication fromagère à partir des concentrés ainsi que les différentes méthodes envisageables pour adapter le procédé fromager à leurs caractéristiques spécifiques sont détaillées. Au chapitre 2, la problématique et l'hypothèse de recherche sont énoncées, ainsi que les différents objectifs poursuivis au cours de ce projet.

Le chapitre 3 présente la partie expérimentale du projet, ainsi que les principaux résultats obtenus sous la forme d'un article scientifique rédigé en anglais et intitulé : « *Drainage and Demineralization of Model Cheeses Made from Reverse Osmosis Concentrates* ». L'article a été soumis pour publication dans la revue *International Dairy Journal*. L'auteur de ce mémoire a également rédigé l'article scientifique (première auteure) et a planifié et réalisé l'entièreté de la phase expérimentale du projet. La planification du projet et l'analyse des résultats ont été supervisées par le Dr Yves Pouliot (directeur) et le Dr Michel Britten (codirecteur), qui sont les coauteurs de l'article et qui ont également révisé le manuscrit. Les

résultats présentés au chapitre 3 ont été présentés sous forme d'affiches scientifiques, lors du Forum Techno Novalait le 16 juin 2018, ainsi que lors du Colloque STELA les 27 et 28 mai 2019.

Le chapitre 3 est suivi d'une section conclusion qui est séparée en trois parties. Dans le retour sur la méthodologie, les limites expérimentales et la portée critique des résultats sont présentées. La synthèse des résultats fait le lien avec l'hypothèse de départ et les différents objectifs. Elle met en évidence l'avancement des connaissances au niveau de l'utilisation des concentrés d'OI pour la fabrication fromagère. Finalement, les perspectives pour de futurs projets sont présentées. Le chapitre 4 regroupe toutes les références citées dans ce mémoire sous forme de bibliographie.

## Introduction

En 2015, plus de 60 000 tonnes de fromages de spécialités, plus de 65 000 tonnes de cheddar et plus de 96 000 tonnes de mozzarella ont été produites au Québec [1]. La production fromagère pose un défi de valorisation, car pour chaque kilogramme de fromage produit, presque 9 L de lactosérum doivent être traités, en plus des eaux de lavage. Puisque la protection de l'environnement est un sujet de préoccupation mondiale, l'industrie doit développer des méthodes pour améliorer l'écocoefficience du procédé fromager. La préconcentration par procédé baromembranaire du lait destiné à la fabrication fromagère a permis à l'industrie d'améliorer les rendements fromagers. Cependant, le perméat généré par l'ultrafiltration (UF) du lait pose un problème environnemental potentiel en raison de sa charge polluante. La valorisation du lactose qui constitue plus de 75 % des solides du perméat d'UF pose un défi de taille à l'industrie laitière au Canada et ailleurs dans le monde, alors que les solides non-gras du lait sont en surplus sur le marché et vendus à prix très bas.

Parmi l'ensemble des procédés membranaires, la concentration du lait par osmose inverse (OI) présente l'avantage de produire un perméat à haute valeur, c'est-à-dire de l'eau pouvant être réutilisée à l'usine. Alors que les concentrés d'UF sont déjà largement utilisés dans la fabrication fromagère pour augmenter les rendements et l'efficacité de production, très peu d'études portent sur l'utilisation des concentrés d'OI. La teneur élevée en solides de la phase soluble des concentrés d'OI pourrait contribuer à augmenter les rendements fromagers à des niveaux supérieurs à ceux obtenus pour l'UF, ce qui se traduirait par un gain économique potentiel non négligeable.

Cependant, l'utilisation des concentrés nécessite quelques ajustements du procédé de fabrication traditionnel. Par exemple, à des valeurs de facteur de concentration volumique (FCV) relativement élevées ( $> 2X$ ), la proportion de lactosérum diminue par rapport au volume occupé par le caillé et l'agitation en cuves devient problématique [2, 3]. De plus, les concentrés d'OI, et d'UF dans une

moindre mesure, ont une teneur en minéraux supérieure à celle du lait. Des études précédentes ont montré que les fromages fabriqués à partir concentrés d'OI sont surminéralisés, contiennent plus de lactose et sont plus humides [4, 5]. Par conséquent, pour faciliter l'utilisation des concentrés d'OI, des niveaux suffisants d'égouttage et de déminéralisation des fromages doivent être atteints.

Il semble donc d'intérêt de s'attarder à l'adaptation du procédé fromager aux concentrés d'OI. Des travaux récents ont d'ailleurs montré qu'il était possible d'améliorer les propriétés de coagulation par la présure en abaissant le pH d'emprésurage, ce qui permet de déminéraliser partiellement les micelles de caséines et d'accélérer la cinétique de coagulation par la présure [4, 6]. L'objectif de la présente étude était d'évaluer le potentiel de différentes approches technologiques à favoriser l'égouttage et la déminéralisation de fromages modèles fabriqués à partir de concentrés d'OI. Plus précisément, l'ajustement du pH, l'ajout d'une phase de lavage du caillé et l'utilisation d'un agent chélateur du calcium ont été proposés pour adapter le procédé fromager aux concentrés d'OI.

# Chapitre 1 – Revue de littérature

## 1.1 La composition du lait

Le lait est un fluide biologique complexe qui contient principalement de l'eau, du gras, des protéines et du lactose. L'eau, le lactose, les sels organiques et inorganiques, les vitamines et les autres petits composés représentent près de 90 % de la masse du lait. La phase protéique du lait, composée des protéines du lactosérum et des caséines, est dispersée dans cette solution aqueuse. Les lipides y forment une émulsion de type huile dans eau sous forme de globules de gras allant de 0,1 à 20 µm de diamètre [7].

La composition du lait varie grandement selon l'espèce (Tableau 1), l'individualité de l'animal, les croisements, l'état de santé de l'animal, son alimentation, la période de lactation, l'âge, les saisons, l'intervalle entre les traites [7, 8], etc. Sa composition peut varier tant par la teneur en chacun de ses constituants que par leur qualité et leurs propriétés physicochimiques. En industrie fromagère, il est primordial de standardiser le lait de fromagerie pour assurer la régularité du procédé, des rendements de production et du produit fini.

Tableau 1 : Composition approximative du lait de différentes espèces [8].

Espèce	Solides totaux	Gras	Protéines	Lactose	Cendres
Humain	12,2	3,8	1,0	7,0	0,2
Vache	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
Chèvre	12,3	4,5	2,9	4,1	0,8
Mouton	19,3	7,4	4,5	4,8	1,0
Porc	18,8	6,8	4,8	5,2	-
Cheval	11,2	1,9	2,5	6,2	0,5
Âne	11,7	1,4	2,0	7,4	0,5
Renne	33,1	16,9	11,5	2,8	-
Lapin domestique	32,8	18,3	11,9	2,1	1,8
Bison	14,6	3,5	4,5	5,1	0,8
Éléphant indien	31,9	11,6	4,9	4,7	0,7
Ours polaire	47,6	33,1	10,9	0,3	1,4
Phoque gris	67,7	53,1	11,2	0,7	-

Lors de la fabrication fromagère, puisque près de 90 % du lait est éliminé sous forme de lactosérum contenant des protéines, du lactose et des minéraux, la qualité des caséines, et dans une moindre mesure, des lipides, influence majoritairement la qualité du fromage final. Le phosphate de calcium, plus précisément son équilibre entre la phase micellaire et la phase soluble des caséines, joue également un rôle important dans la qualité des fromages produits.

### 1.1.1 Les protéines

Les protéines du lait peuvent être classées en deux grandes catégories, soit les protéines du lactosérum et les caséines. Les caséines représentent 80 % de la protéine totale et précipitent lorsqu'on acidifie le lait à un pH de 4,6, qui correspond à leur point isoélectrique. Les protéines qui demeurent en solution sont de l'azote non caséique (NCN), composé majoritairement des protéines sériques [9]. Les protéines du lactosérum sont composées majoritairement de la  $\beta$ -lactoglobuline et de l' $\alpha$ -lactalbumine. La partie caséique du lait est principalement composée de quatre protéines, soit l' $\alpha_{s1}$ -, l' $\alpha_{s2}$ -, la  $\beta$ - et la  $\kappa$ -caséine, qui représentent respectivement 38, 10, 36 et 13 % des caséines totales du lait. Une proportion de 90 à 95 % des caséines est sous forme de micelles qui peuvent avoir un diamètre allant de 30 à 300 nm [7]. Les micelles de caséines sont très hydratées (2 à 3 g H<sub>2</sub>O par g de protéine) et contiennent, sur une base sèche, 6 % de phosphate de calcium colloïdal (CCP) [9].

La structure exacte des micelles de caséines n'est pas connue, mais plusieurs modèles ont été proposés. Le modèle le plus accepté est le modèle avec sous-micelles, qui décrit la micelle de caséine comme un arrangement composé de plusieurs sous-micelles ayant chacune un poids moléculaire d'environ 106-107 Da. La  $\kappa$ -caséine est située en périphérie de la micelle et ses chaînes hydrophiles c-terminales dépassent de la micelle, ce qui lui confère une stabilité électrostatique et stérique. Les différents modèles en sous-micelles varient principalement par la nature des liaisons entre celles-ci, généralement représentées par des ponts de CCP entre les caséines sensibles au calcium ( $\alpha_{s1}$ ,

$\alpha_{s2}$  et  $\beta$ ). Les caséines dites sensibles au calcium ont chacune plusieurs résidus de sérine phosphorylés, avec des groupements phosphates pouvant lier les cations [10]. Quant à la  $\kappa$ -caséine, elle a un seul résidu phosphoséryl. Il est possible de classer les différents types de caséines selon leur capacité à lier les cations :  $\alpha_{s2}$ - >  $\alpha_{s1}$ - >  $\beta$ - >  $\kappa$ -caséine. Dans ce modèle, le centre de la micelle est composé de sous-micelles dépourvues de  $\kappa$ -caséine, hydrophobe et riche en caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$ . Ce modèle ne fait toutefois pas l'unanimité et des modèles alternatifs ont été proposés dans les dernières décennies.

Un modèle sans sous-micelles a été proposé, dans lequel les caséines sensibles au calcium sont reliées entre elles par des *nanoclusters* de phosphate de calcium [11]. Celui-ci a été actualisé par un modèle présentant une distribution protéique plus ou moins homogène, avec une lisière sans phosphate de calcium en périphérie de la micelle [12]. Les *nanoclusters* de phosphate de calcium sont aléatoirement distribués dans le reste de la micelle.

Dans le modèle à double liaison, la micelle se forme suite à un processus de polymérisation, qui inclut deux types de liaisons, soit la réticulation par liaisons hydrophobes et la formation de liens par les *nanoclusters* de phosphate de calcium [13, 14]. L'intégrité micellaire est maintenue, car les interactions hydrophobes surpassent les répulsions électrostatiques. Les caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  et  $\beta$  peuvent se lier entre elles par liaison hydrophobe ou par réticulation entre un groupement phosphoséryl chargé négativement et un groupement de phosphate de calcium chargé positivement. La surface de la micelle est principalement composée de  $\kappa$ -caséine, car elle pourrait seulement se lier aux autres caséines par liaison hydrophobe de sa section N-terminale.

### 1.1.2 L'équilibre minéral entre la phase soluble et colloïdale

La structure de la micelle de caséine dépend de l'environnement dans lequel elle se trouve. L'équilibre minéral entre la phase micellaire et soluble varie grandement selon divers paramètres, comme la température, le pH, la force ionique, etc. La Figure 1 [15] décrit l'effet des principaux traitements physicochimiques sur l'équilibre minéral de la micelle de caséine.

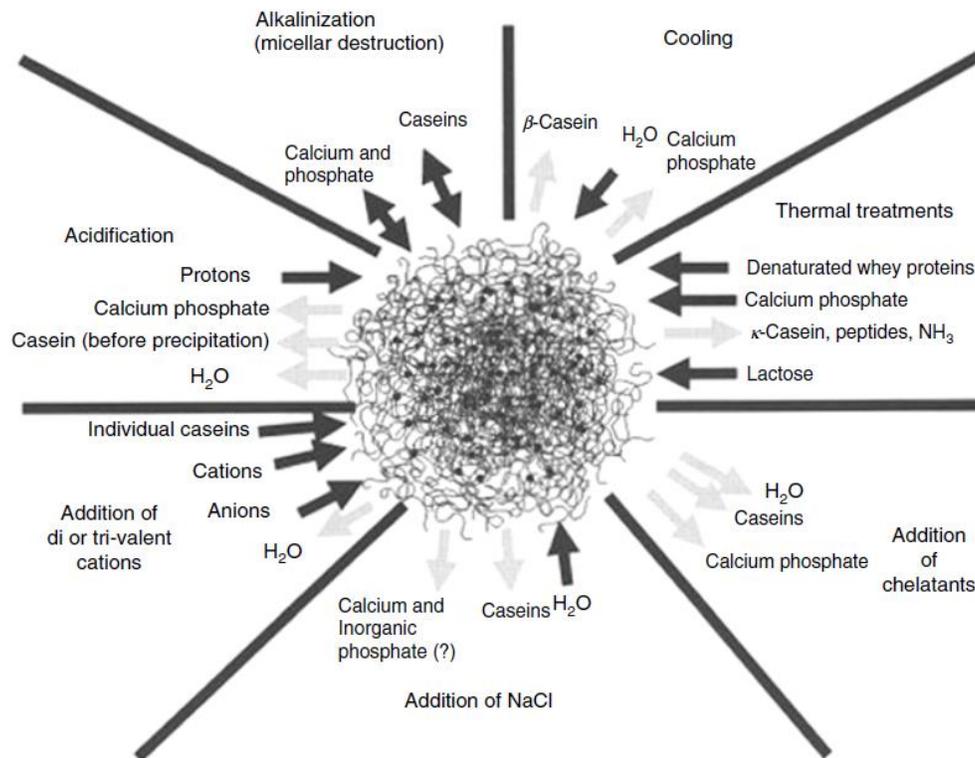


Figure 1: Représentation schématique des équilibres minéraux entre la phase soluble et la phase colloïdale de la micelle de caséine selon plusieurs traitements physicochimiques du lait, tiré de Gaucheron (2011) [15].

À son état initial, le lait de vache cru contient environ 1200 mg de calcium par litre, ce qui correspond environ à 30 mM, dont 30 % sont sous forme soluble. Le calcium soluble se retrouve majoritairement associé au citrate, mais environ 30 % de celui-ci est présent sous forme de  $Ca^{2+}$ . La forme  $Ca^{2+}$  représente donc 10 % du calcium

total du lait (2-3 mM) [9]. Le calcium colloïdal du lait comprend le caséinate de calcium, qui contient du phosphate organique, qui correspond aux résidus phosphoséryls des caséines, et du phosphate de calcium, qui correspond à du phosphate inorganique. Dans la micelle de caséine type,  $10^4$  polypeptides de caséine sont associés entre eux par  $3 \times 10^3$  micro granules de phosphate de calcium [10]. La Figure 2 [16-20] présente le modèle avec sous-micelles de la micelle de caséine et l'équilibre minéral entre sa phase soluble et colloïdale. Les conditions physicochimiques dans lesquelles se retrouvent les micelles de caséines ont un impact majeur sur leur intégrité, par leur effet sur la dissociation des caséines et des sels minéraux [21].

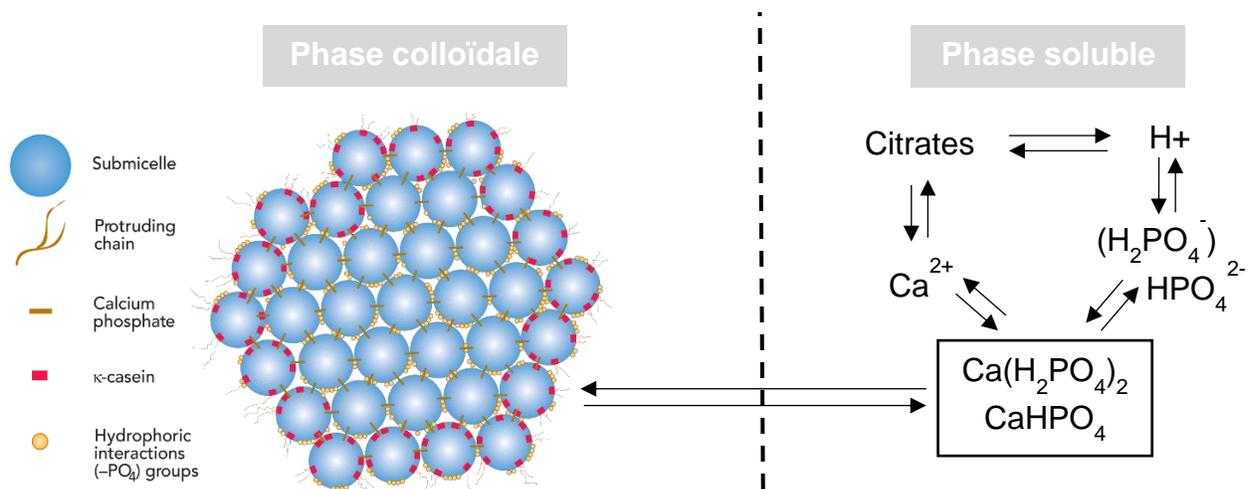


Figure 2 : Le modèle avec sous-micelles de la micelle de caséine tel que décrit par Slattery (1973) [16], Schmidt (1982) [17], Walstra (1990) [18] et Rollema (1992) [19], image adaptée de Bylund (2015) [20] et l'équilibre minéral entre sa phase soluble et colloïdale.

### 1.1.2.1 *Modification de la température*

Les changements induits dans la micelle de caséine par la modification de la température du lait ne sont pas de même nature s'il est chauffé ou refroidi. Généralement, les micelles de caséines supportent très bien les traitements thermiques [10] tels que la pasteurisation ou la thermisation. Toutefois, des changements peuvent avoir lieu au niveau de la micelle et l'intensité de ceux-ci dépend fortement de la sévérité du traitement thermique appliqué. Lors du chauffage du lait, le phosphate de calcium devient moins soluble et est transféré sous sa forme colloïdale [22], associé à la micelle de caséine. Une baisse de la teneur en calcium et en phosphate inorganique est donc observée dans la fraction soluble du lait [23]. Le chauffage a très peu d'effet sur les autres minéraux du lait, notamment sur le sodium, le potassium, le magnésium et le citrate [24]. Lorsque la température atteinte est de moins de 95 °C pendant quelques minutes, les modifications de l'équilibre minéral de la micelle de caséine sont considérées réversibles [10, 25]. Au contraire, les changements au niveau de la micelle et des équilibres minéraux sont considérés irréversibles lorsque le traitement appliqué est sévère, par exemple, 120 °C pendant 20 minutes [10, 22, 25]. L'entreposage réfrigéré a également un impact sur l'équilibre minéral de la micelle de caséine. Lorsque la température est abaissée, la solubilité du phosphate de calcium augmente. Dans le lait, il passe donc de sa forme colloïdale, associé à la micelle de caséine, à sa forme soluble [26]. De plus, lorsque la température diminue, les interactions hydrophobes de la micelle de caséine deviennent plus faibles, ce qui se traduit par la dissolution d'une fraction des caséines [27]. Lors d'un entreposage réfrigéré de plus de 24 h, des caséines, du calcium, du magnésium, du phosphate et du citrate sont libérés de la micelle de caséine [28]. Une augmentation de près de 10 % du calcium et du phosphate inorganique peut être observée dans la phase soluble du lait après un tel entreposage [7, 29]. Ces changements demeurent réversibles et l'équilibre minéral initial de la micelle de caséine peut être retrouvé si la température du lait est augmentée.

### 1.1.2.2 *Modification du pH*

L'équilibre minéral entre la phase soluble et colloïdale de la micelle de caséine est très fortement influencé par le pH du lait. Le lait a un fort pouvoir tampon sur une large gamme de pH [30], principalement en raison des groupements  $\beta/\gamma$  carboxyle, du phosphate, du citrate, et des groupements  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> et guanidine [25].

Lors de l'acidification du lait, la charge de surface des micelles de caséine est modifiée suite à la régression d'ionisation des fonctions acides et à la protonation des fonctions amines. Parallèlement, les protons libérés lors de l'acidification sont captés par le HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, ce qui conduit à la formation de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>. La diminution de la concentration de cet ion entraîne la dissociation du CaHPO<sub>4</sub> qui est à saturation dans la phase soluble, et qui est constamment régénéré par solubilisation du CCP présent dans la micelle de caséine sous forme de *nanoclusters*. Ce phénomène est accompagné de la dissociation d'une fraction caséique dans la phase soluble du lait, essentiellement composée de  $\beta$ - et  $\kappa$ -caséines. Si l'acidification est effectuée à une température supérieure à 20 °C, la structure de la micelle est majoritairement conservée [31, 32].

L'acidification du lait à une valeur supérieure à 6,0 permet de solubiliser une partie du CCP, ce qui augmente la teneur en Ca<sup>2+</sup>, qui joue un rôle déterminant dans la coagulation enzymatique [33]. À partir de pH 5,6, le calcium complexé dans la micelle commence à se dissoudre. À pH 5,2, la totalité du CCP est solubilisée et le calcium résiduel est complexé par les sites phosphoséryls. Il est à noter que les caséines s'agrègent à pH 4,6, c'est-à-dire lorsque leur point isoélectrique est atteint. L'ensemble de ces phénomènes est illustré à la Figure 3 [34]. Les changements complexes qui ont lieu lors de l'acidification du lait sont fortement dépendants des conditions environnementales, telles la concentration du système, la vitesse d'acidification et la température [35]. Plus précisément, lorsque l'acidification est trop rapide, le potentiel de surface des micelles de caséines diminue brutalement. Les micelles sont alors déstabilisées et s'agrègent entre elles, ce qui résulte en une précipitation locale [34].

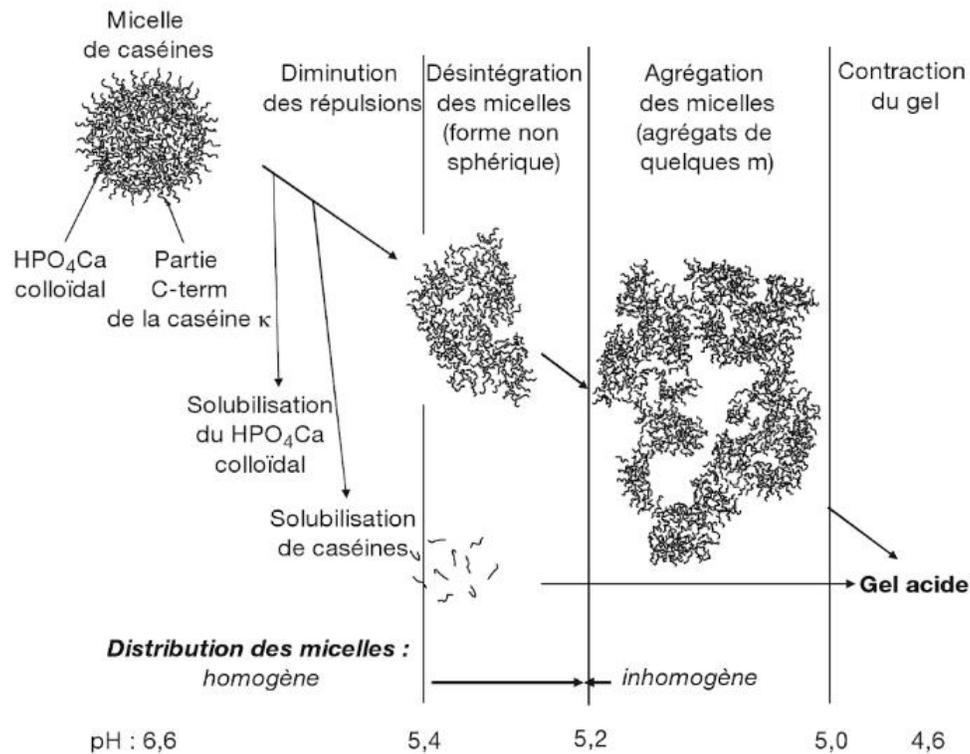


Figure 3: Modification de la structure micellaire lors de l'acidification, tiré de Croguennec et al. (2008) [34].

### 1.1.2.3 Effet de l'addition de sels sur l'équilibre minéral du lait

Il est possible de modifier l'équilibre minéral de la micelle de caséine par la séquestration du calcium soluble. Les agents chélateurs, tels l'EDTA, le citrate et l'oxalate, ont une forte affinité pour les cations, spécialement pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . La chélation des cations  $\text{Ca}^{2+}$  de la phase aqueuse du lait conduit à une dissolution du CCP, par un mécanisme similaire à celui décrit dans la section précédente. Le citrate va se lier au  $\text{Ca}^{2+}$ , qui sera régénéré par dissociation du phosphate de calcium soluble. Ce dernier sera à son tour régénéré par dissolution du CCP de la micelle de caséine. Une plus grande concentration totale de calcium et de phosphate est alors observée dans la phase soluble du lait [25, 36-40].

D'autre part, l'ajout de NaCl augmente la force ionique du lait, il y a réduction des coefficients d'activité des ions présents dans la phase soluble du lait, ce qui augmente la dissociation des ions. Également, l'addition de NaCl réduit faiblement le pH dans le milieu et augmente la proportion de calcium dans la phase soluble du lait. Le sodium remplace les cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ou les protons liés aux résidus phosphoséryls des caséines [33, 41]. L'addition de 0,8 % de NaCl dans le lait à son pH natif a pour effet de solubiliser 90 mg de calcium, 8 mg de magnésium et 91 mg de potassium, tout en permettant de fixer 160 mg de sodium supplémentaire par kilogramme de lait [33]. Ces changements dans l'équilibre minéral de la micelle de caséine apportés par l'ajout de NaCl ont également pour effet d'augmenter l'hydratation des micelles, mais leur taille et leur charge demeurent constantes.

Également, l'ajout de cations comme le calcium, le magnésium, le fer (trivalent), le zinc et le cuivre a un effet sur l'équilibre minéral de la micelle de caséine par leur capacité à se lier aux groupements citrate et phosphate de la phase soluble du lait [42]. L'équilibre minéral est alors déplacé vers la phase colloïdale et la concentration en caséines solubles diminue. Lors de l'ajout de 10 mM de calcium au lait, près de 80 % de celui-ci se lie aux micelles et les caractéristiques physicochimiques de la micelle sont fortement modifiées : le potentiel zêta des micelles de caséine diminue, et leur hydratation et leur hydrophobicité augmentent [43]. L'ajout de 8,0 mM de magnésium ou de fer diminue la stabilité de la micelle de caséine à la chaleur (115 °C, 30 min) [42]. L'ampleur des changements observés dépend du type de cation ajouté, de la concentration utilisée et des modifications de pH apportées par l'ajout de ceux-ci. Dans la littérature, le cation le plus étudié est le calcium, pour le rôle qu'il joue dans la transformation fromagère, notamment lors de la coagulation par la présure.

## 1.2 La fabrication fromagère

La fabrication fromagère est un procédé relativement simple qui consiste principalement en un procédé de concentration, mais elle implique plusieurs phénomènes chimiques et physiques complexes. Le procédé général de la fabrication fromagère est illustré à la Figure 4 [44]. Les différents paramètres du procédé de fabrication sont élaborés de façon à obtenir certaines caractéristiques propres au type de fromage fabriqué, par exemple, au niveau du choix des ferments, de la température de cuisson, de la vitesse d'acidification, du type de pressage, etc. Les différentes étapes de la fabrication fromagère visent à contrôler les caractéristiques physicochimiques du fromage final, surtout par la modification de la minéralisation de la caséine.

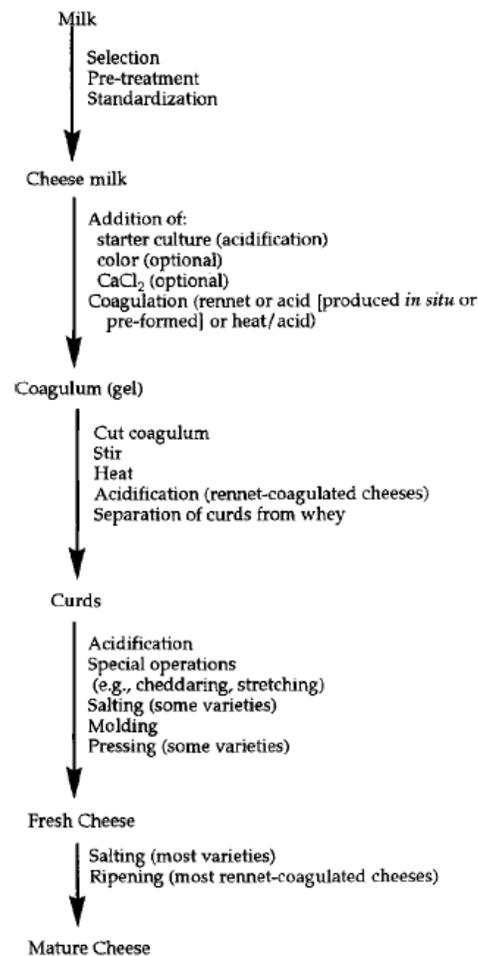


Figure 4: Procédé général de la fabrication fromagère, tiré de Fox et al. (2017) [44].

## 1.2.1 Préparation du lait

Avant la fabrication fromagère, le lait peut subir différents traitements, dans le but de réduire sa charge microbienne ou de modifier sa composition. Le lait peut donc subir un traitement thermique plus ou moins sévère, ainsi qu'un ajustement de sa teneur en calcium, par ajout de  $\text{CaCl}_2$ , ou de sa teneur en protéines et en gras.

### 1.2.1.1 *Traitement thermique*

Avant le transfert en cuve, le lait est habituellement pasteurisé ou thermisé. Un procédé de thermisation (63 °C pour une durée de 16 s) est habituellement utilisé lorsque le lait a été entreposé à froid un certain temps avant la production fromagère [27]. Cela permet de réduire la charge bactérienne totale du lait et de contrôler l'activité enzymatique liée à la présence des bactéries psychrotrophes dans le lait [45, 46]. Un procédé de pasteurisation peut également être utilisé pour traiter le lait thermiquement. La pasteurisation flash (HTST) est réalisée à 72 °C pendant 15 s dans un échangeur de chaleur à plaque et en continu. La pasteurisation peut également avoir lieu à plus basse température dans la cuve de fabrication, mais le traitement est plus long (LTLT), c'est-à-dire 63 °C pendant 30 min. Aucune bactérie pathogène ne survit au traitement de pasteurisation et la majorité de celles-ci sont même inactivées par un traitement thermique moins sévère [47]. La pasteurisation permet d'augmenter les rendements de production de 0,1 à 0,4 %, par la dénaturation partielle des protéines du lactosérum qui peuvent se complexer avec la  $\kappa$ -caséine et qui sont donc retenues dans le fromage [45].

### 1.2.1.2 *Chlorure de calcium*

Le chlorure de calcium est habituellement ajouté au lait à un taux de 20 à 35 g/100 L [45] pour son effet positif sur l'étape de coagulation, par son apport en cations  $\text{Ca}^{2+}$ , par l'augmentation de la concentration en CCP et une légère baisse du pH [48]. Cela se traduit par une diminution du temps de coagulation par la présure et par l'augmentation de la vitesse de raffermissement et de la fermeté du

gel. L'augmentation de la teneur en calcium micellaire réduit la répulsion électrostatique entre les micelles de caséines et la légère baisse de pH augmente l'action de la présure et la vitesse d'agrégation [49]. L'ajout de  $\text{CaCl}_2$  (0,1 g/L) permet même d'augmenter les rendements de production [50], par son action sur la phase d'agrégation, ce qui permet d'éviter la fracturation du gel lors du décaillage et des premières minutes d'agitation [51].

### 1.2.1.3 *Standardisation*

Comme la composition du lait a tendance à varier en fonction des saisons et des particularités de l'animal, il est habituellement nécessaire de standardiser la teneur en solides du lait pour la fabrication fromagère, dans le but de bien contrôler les différents paramètres de fabrication et de répondre aux exigences légales de teneur en gras et d'humidité pour le type de fromage fabriqué. En effet, la composition du lait a un impact majeur sur les propriétés de coagulation et de synérèse du gel, ainsi que sur les rendements. Les propriétés fromagères sont influencées par la teneur en plusieurs composants du lait, comme la teneur en protéines [52, 53], la teneur et la composition des caséines [54-56], le ratio protéines sur gras [57], l'équilibre minéral et la taille des micelles de caséines [58]. Dans les fromageries de plus grande échelle, le lait est donc d'abord écrémé, puis la crème et le lait écrémé sont remélangés dans les proportions désirées pour la fabrication fromagère, habituellement lors d'un procédé en continu [59]. Il est aussi possible de standardiser la teneur en protéines du lait en y intégrant un rétentat obtenu par microfiltration (MF) ou UF, ainsi qu'en y ajoutant différentes poudres de lait [44].

Comme le pH de réception du lait a également tendance à varier en fonction de sa qualité microbiologique et de la période durant laquelle il a été entreposé, il est recommandé d'abaisser le pH d'emprésurage de 0,1 à 0,2 unité [44]. Cela permet de contrôler l'équilibre minéral de la micelle de caséine et l'étape de coagulation qui suivra. Il est possible d'ajuster le pH du lait par l'utilisation de ferments, de gluco- $\delta$ -lactone ou d'acide lactique.

## 1.2.2 Coagulation

Différents types de coagulation peuvent être utilisés pour transformer le lait en fromage, notamment la coagulation acide, mixte ou présure. La coagulation est atteinte par la déstabilisation des micelles de caséines, par voie acide suite à la neutralisation des charges négatives à la surface des micelles ou par voie enzymatique suite à la libération de la partie hydrophile de la micelle de caséine (caséinomacropéptide, CMP). Lors de la fabrication des fromages obtenus par coagulation acide, tels le fromage cottage et Quarg, le lait est acidifié jusqu'au point isoélectrique des micelles de caséines (pH 4,6), ce qui leur permet donc de précipiter et de former un gel qui emprisonne la matière grasse et une partie du lactosérum et des solides qu'il contient.

La coagulation enzymatique se distingue en deux phases illustrées à la Figure 5 [34] : la phase d'hydrolyse et la phase d'agrégation. Dans la phase primaire de la coagulation enzymatique, l'enzyme hydrolyse la partie C-terminale hydrophile et chargée négativement de la  $\kappa$ -caséine, située au pourtour de la micelle de caséine. Il y a donc libération du CMP dans la phase aqueuse du lait et il commence à se produire une déstabilisation des micelles de caséines par la réduction de leur potentiel de surface et de leur degré d'hydratation. Lorsque 85 à 90 % de la  $\kappa$ -caséine est hydrolysée, les micelles commencent à s'agréger [27, 60], ce qui correspond à la deuxième phase de la coagulation enzymatique. Les chaînes de micelles augmentent en longueur et en épaisseur, formant un réseau tridimensionnel dans lequel de l'eau et les composés majeurs du lait sont retenus, notamment le gras, le lactose, les protéines du lactosérum et les minéraux. La coagulation enzymatique est principalement affectée par le pH, la force ionique et la température. Le phénomène de coagulation par la présure peut être décrit en combinant trois facteurs, soit (1) la protéolyse de la  $\kappa$ -caséine, qui suit la cinétique de Michaelis-Menten, (2) la nécessité qu'une proportion minimale de celle-ci soit hydrolysée avant que les micelles puissent s'agréger et (3) l'agrégation de la paracaséine via la cinétique de Von Smoluchowski [61].

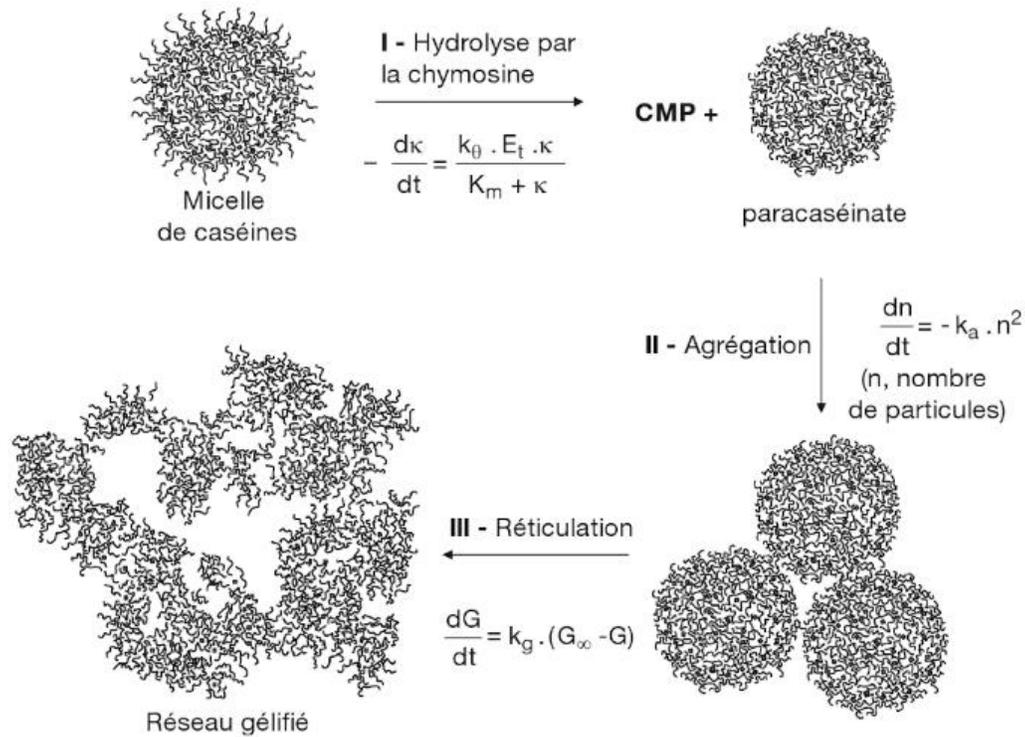


Figure 5: Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation par la présure, tiré de Croguennec et al. (2008) [34].

### 1.2.3 Égouttage

La majorité des étapes de la fabrication fromagère visent à égoutter le fromage, mais elles ont également d'autres objectifs parallèles. Ces étapes seront détaillées dans cette section, qui traitera donc de la coupe du gel, de la cuisson, du soutirage, du pressage et du salage.

#### 1.2.3.1 Décaillage et cuisson

Le gel est habituellement coupé à une fermeté prédéterminée, qu'elle soit mesurée subjectivement par le fromager d'expérience ou objectivement et en continu par méthode rhéologique. Quand le gel a atteint la fermeté désirée, il peut être coupé en cubes plus ou moins petits, dépendamment du type de fromage fabriqué, avec

des couteaux spécialement conçus pour cette étape. La taille des cubes obtenus varie en fonction de la fermeté du gel à la coupe, ainsi qu'en fonction de la vitesse et du temps de coupe. Si le gel est très mou lorsqu'il est coupé, le fromage final obtenu sera plus sec [62]. Si le gel est plus ferme à la coupe, le fromage final obtenu sera plus humide. La coupe du gel permet de favoriser la synérèse du gel, par l'augmentation de la surface de contact avec le lactosérum. Un brassage constant permet également de favoriser la synérèse, en empêchant les grains de fusionner, en augmentant les collisions entre ceux-ci et permettant un maintien constant de la température dans la cuve au cours de la cuisson [63]. La température de cuisson et la vitesse d'augmentation de la température sont fonction du type de fromage fabriqué. Globalement, la coupe du gel à faible fermeté, en grains de petite taille, le brassage constant et la cuisson à température élevée sont des paramètres qui favorisent au maximum la synérèse du gel. L'acidification par les bactéries lactiques influence également la synérèse, car plus le pH diminue, plus les grains se contractent et expulsent du lactosérum [45].

#### 1.2.3.2 *Soutirage et pressage*

Le soutirage est une étape critique dans le procédé fromager, car la concentration en CCP du fromage est principalement déterminée au moment où le fromage et le lactosérum se séparent [64, 65]. La concentration en CCP du fromage influencera ensuite sa structure et ses propriétés physiques, et donc, sa qualité. Lorsque le pH souhaité est atteint, que la cuisson est complétée et qu'un niveau suffisant de synérèse a été atteint, le lactosérum est soutiré et les grains commencent à fusionner entre eux. Dans la fabrication du fromage cheddar, cette étape est appelée "cheddarisation". L'acidification par les bactéries lactiques à un pH inférieur à 5,8 solubilise le CCP, ce qui crée une texture fibreuse dans la masse de fromage, caractérisée de type chair de poulet [63]. Ce phénomène s'accompagne d'un raffermissement de la masse fromagère et de l'expulsion du lactosérum. La synérèse est poussée encore plus loin par le moulage et le pressage du fromage, dont l'égouttage est fonction de sa propre masse ou forcée par pressage mécanique. Le pressage mécanique, utilisé dans la fabrication des

fromages à pâte dure, fermes et semi-fermes, permet la fusion complète des grains. Dans un fromage de type cheddar, le fromage est pressé à 2,7 kPa [44].

### 1.2.3.3 *Salage*

Le salage est une étape qui favorise également la synérèse, sous l'effet de la pression osmotique, mais ce n'est pas une méthode efficace pour contrôler l'humidité du fromage, contrairement à l'acidification et la cuisson [44]. Deux méthodes de salage des fromages sont principalement utilisées : le salage à sec sur les grains ou le salage en saumure. Dans les fromages de types cheddar, la masse fromagère est coupée en cubes après la cheddarisation et le sel est ajouté à sec sur les grains, qui sont ensuite mélangés pour garantir une application uniforme du sel, transférés en moules puis pressés [66]. La majorité des fromages sont salés en saumure, c'est-à-dire par immersion du fromage, préalablement moulé et pressé, dans une solution saturée de sel. Le temps de saumurage dépend du type de fromage fabriqué, ainsi que de la taille du fromage et de sa forme [66] et peut varier de 15 minutes à 2 jours [27]. Le sel diffuse dans la masse fromagère et le bloc expulse de l'eau. La quantité de sel absorbée dépend de la concentration de la saumure ou de la quantité de sel ajoutée (salage à sec), de l'humidité du fromage, de la température de l'environnement et du rapport surface/volume du fromage [67].

Le salage a pour objectif la conservation du fromage, l'augmentation de la sécurité et la contribution au goût salé. Plus précisément, le salage, de même qu'un contrôle du pH, de l'activité de l'eau et du potentiel redox, permettent de préserver le fromage, en minimisant la croissance des micro-organismes indésirables ou pathogènes. En influençant la composition du fromage, la croissance microbienne, l'activité enzymatique et certains paramètres biochimiques, le salage a également un effet sur la saveur et les arômes du fromage, sa rhéologie et sa texture, ses performances à la cuisson et donc sa qualité générale [66, 68].

#### 1.2.4 Affinage

L'affinage est une étape de la fabrication fromagère au cours de laquelle le fromage développe sa texture, sa saveur et ses arômes qui varient en fonction de la composition du ferment, du pH de la pâte fromagère, de la composition du fromage (humidité, protéines, gras et minéraux) et des conditions de maturation (température et humidité relative) [45]. C'est principalement au cours de l'affinage que les fromages se différencient, par le passage d'un fromage sans goût et spongieux à une très large gamme de fromages aux textures et arômes distinctifs. Au cours de l'affinage, plusieurs réactions biochimiques ont lieu dans le fromage, notamment la glycolyse, la protéolyse et la lipolyse. Plusieurs changements secondaires complexes ont également lieu, ce qui confère au fromage final toute la subtilité de ses arômes [69]. Les composés volatils qui découlent de la dégradation du lactose, du citrate, des lipides et des protéines sont responsables de ces arômes particuliers.

La période d'affinage peut être relativement courte pour les fromages à pâte molle (quelques semaines) ou très longue pour des fromages à pâte cuite, comme le parmesan (plus de 30 mois) [45]. Comme cette période d'affinage occasionne des coûts importants, plusieurs méthodes ont été développées pour accélérer la vitesse d'affinage des fromages, et donc réduire le temps entre la production et la vente. L'ajout de ferments d'appoint est une méthode à faible coût, qui ne nécessite aucun équipement et qui ne pose aucun problème au niveau légal [70]. L'ajout de cultures d'appoint peut être vu comme une façon de redonner au fromage la biodiversité perdue lors de la pasteurisation du lait et de l'ajout d'un ferment acidifiant prédéterminé [45].

### 1.3 Utilisation de concentrés et éco-efficience en industrie laitière

La protection de l'environnement est plus que jamais un sujet de préoccupation mondiale et l'éco-efficience prend de plus en plus d'importance dans le domaine industriel. La notion d'éco-efficience représente le rapport de la valeur d'un produit sur les impacts environnementaux résultant de toutes les étapes de la vie de celui-ci. L'amélioration de l'éco-efficience d'un procédé peut passer par une meilleure utilisation des ressources, la récupération ou la réutilisation de certains composants, un gain de rendement, la réduction de la demande énergétique, la réduction de la demande en eau, la diminution de la quantité de déchets à traiter, etc. Ainsi, l'amélioration de l'éco-efficience d'un procédé représente un avantage pour l'industrie par ce qu'elle permet de réduire certains coûts ou d'améliorer la performance d'un procédé.

Au Canada, les produits laitiers représentent 16,0 % du marché manufacturier alimentaire, atteignant une valeur de 17,0 milliards de dollars en 2015. Le Québec se classe au premier rang de la production laitière canadienne, cumulant près de 40 % du revenu canadien qui totalise 6,02 milliards de dollars. Parallèlement, la majorité des fromages canadiens sont fabriqués au Québec. En 2015, plus de 60 000 tonnes de fromages de spécialités (42,07 % de la production canadienne), plus de 65 000 tonnes de cheddar (44,70 %) et plus de 96 000 tonnes de mozzarella (74,83 %) ont été produites au Québec [1]. La production fromagère pose un défi de valorisation, car pour chaque kilogramme de fromage produit, presque 9 L de lactosérum doivent être traités, en plus des eaux de lavage. Les effluents laitiers ont un impact environnemental important, notamment en raison de leurs caractéristiques physicochimiques comme leur pH et leur teneur en minéraux, en solides, en phosphore, en azote et en matière organique, tels le lactose, les protéines et le gras laitier [71]. Puisque les effluents laitiers ne peuvent pas être disposés tels quels dans l'environnement, leurs différentes composantes peuvent être valorisées par séparation (lactose, protéines, etc.) ou être traitées par voie biologique ou par voie physicochimique. Également, la filtration membranaire du lait destiné à la fabrication fromagère permettrait à l'industrie de

réduire la quantité de lactosérum à traiter, en plus de générer un perméat pouvant être facilement réutilisé ou valorisé. Dans une vision plus globale, il serait même possible de concentrer le lait directement à l'usine laitière ou même à la ferme pour ainsi réduire les coûts de transport du lait et les impacts environnementaux y étant reliés.

## 1.4 Les procédés baromembranaires

Les procédés baromembranaires sont largement utilisés en industrie laitière pour la concentration, la séparation, la purification et la fragmentation des composés laitiers. Ils ont révolutionné la transformation dans ce secteur par leur large champ d'application. Les utilisations les plus fréquentes des systèmes membranaires en industrie laitière sont la MF utilisée pour augmenter la durée de vie du lait de consommation, la concentration et la séparation des différents nutriments du lactosérum, le traitement des différentes protéines laitières et la standardisation des laits de fromagerie [3]. La Figure 6 [72] illustre les différents types de filtration utilisés dans l'industrie laitière, ainsi que les différents composés du lait séparés lors des différents procédés.

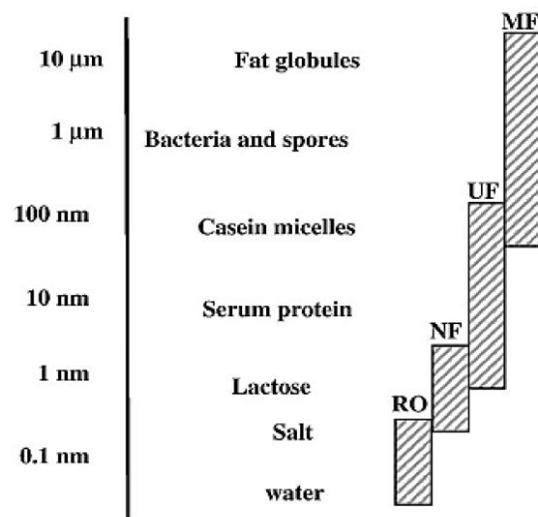


Figure 6: Les composés laitiers séparés en fonction du type de filtration membranaire utilisé, incluant la microfiltration (MF), l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (RO), tiré de Kumar et al. (2013) [72].

#### 1.4.1 La microfiltration

La MF permet de séparer les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 200 000 Da [73] en utilisant une membrane ayant une taille de pores variant de 10 µm à 0,1 µm de diamètre. La pression transmembranaire utilisée est inférieure à celle utilisée pour l'UF et les flux de perméation sont plus élevés. Parmi les composants du lait, il est possible de séparer les cellules somatiques, les globules de gras, les bactéries et les micelles de caséines [74-76], ainsi que d'autres molécules protéiques du lait, comme la  $\beta$ -lactoglobuline [77].

#### 1.4.2 L'ultrafiltration

L'UF implique la circulation d'un liquide tangentiellement à une membrane ayant des pores de 0,001 à 0,1 µm de diamètre, sous une pression inférieure à 10 MPa. Cette méthode de filtration sépare donc sélectivement les macromolécules ayant un poids moléculaire de 1 000 à 200 000 Da [73] du solvant et des solutés dissous. Le perméat issu de cette filtration contient de l'eau, du lactose, de l'azote non protéique (NPN) et des sels minéraux. Le rétentat obtenu est concentré en protéines et, dans le cas de la filtration de lait entier, en matière grasse. Le traitement des laits par UF à des fins de fabrication fromagère remonte à la fin des années soixante, avec le procédé MMV [78]. Cette technologie est particulièrement utilisée en industrie pour la standardisation en protéines des laits de fromagerie, ainsi que pour la production d'ingrédients laitiers.

#### 1.4.3 La nanofiltration

La nanofiltration (NF) est un procédé intermédiaire entre l'UF et l'OI. Elle peut séparer les composés ayant un poids moléculaire entre 200 et 1000 Da [73] des autres composés du lait. Le perméat est donc essentiellement composé de sels minéraux, d'ions monovalents et d'eau, alors que le rétentat contient les protéines et le gras, ainsi que le lactose dépendamment de la taille des pores de la membrane. Ce procédé est surtout utilisé pour la concentration et la déminéralisation partielle du lactosérum de fromagerie [79-81].

#### 1.4.4 L'osmose inverse

L'OI est un procédé de séparation membranaire qui utilise des pressions au moins cinq à dix fois supérieures à celles utilisées pour l'UF [3]. La pression appliquée doit être supérieure à la pression osmotique afin de forcer l'eau à traverser la membrane de filtration. Les membranes d'OI séparent les solutés ayant une masse moléculaire d'environ 150 Da ou moins [73]. Par conséquent, la matière grasse, les protéines, le lactose et tous les minéraux non dissociés sont retenus et concentrés par la membrane. Le perméat se compose donc seulement d'eau et de certains minéraux monovalents [73]. L'encrassement des membranes réduit l'efficacité des systèmes de filtration, ce qui limite l'application de l'OI à la concentration du lait qui est très chargé en solides. Diverses méthodes et configurations ont été développées pour limiter l'encrassement de ces membranes. Il est à noter que l'encrassement est diminué de beaucoup lorsque l'OI est menée sur du lait écrémé. La fabrication de fromage à partir de rétentats d'OI est plus récente, avec la fabrication d'un fromage cheddar en 1983 [82]. La filtration par OI propose l'avantage de générer un perméat essentiellement composé d'eau, qui pourra être réutilisé en usine comme eau de procédé pour le rinçage ou le lavage des équipements, ou encore, pour des procédés tels la diafiltration.

#### 1.4.5 Application en fromagerie

L'utilisation des procédés membranaires en industrie fromagère offre plusieurs avantages, tels un meilleur contrôle de la composition des fromages, l'amélioration des rendements et la réduction de consommation de quelques ingrédients (présure, ferments, chlorure de calcium) [72, 83]. L'UF est le type de filtration le plus utilisé en fromagerie. Il est possible de diviser les concentrés laitiers en trois catégories selon le niveau de concentration. Les rétentats faiblement concentrés (*low concentrated retentate*, LCR), qui vont de 1,2 à 2 X, offrent l'avantage d'améliorer les rendements fromagers, de mieux contrôler la composition des fromages et permettent la fabrication fromagère traditionnelle, c'est-à-dire en

cuve. Les rétentats moyennement concentrés (*medium concentrated retentate*, MCR), qui vont de 2 à 6 X, permettent d'améliorer davantage les rendements fromagers que les LCR, mais nécessitent divers ajustements au niveau des équipements. Finalement, le préfromage liquide (*liquid pre-cheese*, LPC) permet la fabrication fromagère en continu (sans cuve), est très économique et ne produit qu'une très faible quantité de lactosérum [2, 3]. La filtration par OI du lait de fromagerie n'a été que très peu étudiée, mais elle présente les mêmes avantages que l'UF, en plus de générer un perméat qui pourra être réutilisé à même l'usine de transformation. Par contre, les fromages fabriqués présentent quelques particularités, notamment au niveau de leur composition élevée en lactose et en minéraux.

## 1.5 Particularités de la fabrication fromagère à partir des concentrés

La fabrication de fromage à partir de rétentats d'OI a été brièvement étudiée au cours des années 80, avec la fabrication d'un fromage cheddar (FCV = 2X) [82]. Relativement peu d'études ont porté sur ce sujet depuis, alors que plusieurs études ont porté sur la fabrication fromagère à partir de concentrés d'UF. Les particularités de la fabrication fromagère à partir de ces deux types de concentrés seront détaillées dans cette section.

### 1.5.1 Impact du pouvoir tampon sur l'acidification du concentré

Le rétentat de lait concentré par OI et par UF est concentré dans la même proportion en protéines et en minéraux complexés. Les sels minéraux, tels le calcium, le magnésium et le phosphore, en grande partie liés aux micelles de caséines, sont donc présents en quantité importante dans les rétentats d'UF et d'OI. L'effet tampon est d'autant plus important que la concentration en minéraux est élevée. En effet, les constituants responsables de l'effet tampon sont surtout les protéines et les sels minéraux [84].

Cette caractéristique modifie sensiblement le procédé fromager habituel, puisque le contrôle du pH est certainement un des facteurs ayant le plus d'incidence sur la fabrication fromagère. En effet, le pouvoir tampon accru de la pâte fromagère a une influence sur la cinétique d'acidification par les bactéries lactiques, la valeur de pH finale, la cinétique de coagulation par la présure, les caractéristiques rhéologiques du caillé et la capacité du fromage à conserver l'eau au cours de l'affinage. Selon le FCV, une production plus élevée d'acide lactique par les bactéries est nécessaire pour obtenir un pH optimal dans le fromage. En effet, le pouvoir tampon augmente avec le FCV, comme la concentration en minéraux colloïdaux augmente dans le rétentat. Pour pallier le pouvoir tampon des rétentats d'UF, le lait est souvent préacidifié avant la fabrication fromagère [25]. Dans le cas des rétentats d'OI, la quantité de ferments nécessaire à l'acidification du lait est réduite de 50 % lors de la fabrication du fromage [82]. Cette diminution de la quantité de ferments est nécessaire, car la concentration en lactose est très élevée dans les concentrés laitiers d'OI, ce qui contrebalancerait le pouvoir tampon plus important de ceux-ci. Dans le même ordre d'idée, il a été nécessaire pour Barbano et Bynum (1984) [85] de diminuer la quantité initiale de ferments de 20 à 30 % et de diminuer le temps de maturation à 30 °C de 10 à 20 % pour obtenir une acidification normale lors de la fabrication du fromage à partir des rétentats d'OI de lait.

### 1.5.2 Effet de la concentration du lait sur la coagulation par la présure

Les rétentats de lait obtenus par filtration sur membrane d'UF ou d'OI sont plus visqueux que le lait régulier. Leur teneur en protéines plus importante confère aux rétentats des propriétés d'écoulement pseudoplastiques, au contraire du lait qui a un comportement newtonien. Le lait concentré présente donc des particularités au niveau du procédé. Le brassage du caillé après l'ajout de la présure demande plus de force et la dispersion uniforme de la présure est difficile à atteindre [73].

D'autres parts, si la même quantité de présure est ajoutée à des volumes égaux de lait et de rétentat d'UF, le temps de prise n'est pas affecté par l'augmentation

de la teneur en protéines, mais le temps entre le moment de prise et la coupe du gel est réduit [86, 87]. De façon similaire, les temps de coagulation (RCT) et les temps pour atteindre la vitesse maximale de raffermissement (MFR) obtenus pour le lait écrémé et le rétentat d'UF sont similaires [5]. Dans le cas des rétentats de NF et d'OI, les RCT et MFR obtenus sont plus longs [4, 5]. Comme la teneur en protéines est augmentée par rapport au lait, il y a une augmentation de la vitesse de la réaction enzymatique. En effet, la disponibilité du substrat (micelles de caséines) augmente pour la même quantité d'enzyme. À pH 6,6 et à la teneur en caséine normale du lait, la coagulation se produit lorsque 80 à 90 % de la  $\kappa$ -caséine a été hydrolysée. Cependant, dans un rétentat d'UF ayant un FCV de 4, une hydrolyse de seulement 50 % de cette protéine est nécessaire pour la formation du gel [61]. Comme la teneur en protéines des rétentats est élevée, la quantité de présure nécessaire est réduite de 60 % lors de la fabrication de fromage à partir des rétentats d'OI du lait [82]. Les gels formés à partir des rétentats sont plus fermes que ceux obtenus à partir du lait, car le réseau protéique très minéralisé y est plus développé. À cause de cette fermeté accrue, un ajustement des équipements peut être nécessaire pour la coupe du gel ou le brassage du caillé.

### 1.5.3 Effet de la concentration du lait sur la synérèse du gel

Plus la concentration du lait par UF ou OI est poussée, moins il y a de lactosérum qui est expulsé lors de la formation du gel, de la coupe et de la cuisson. Lorsque le FCV est élevé, comme c'est le cas pour les MCR, la fabrication fromagère en cuve peut s'avérer problématique. Le brassage devient difficile, car le lactosérum qui entoure habituellement le gel est presque qu'inexistant [2, 3]. Pour conserver les équipements de fabrication fromagère traditionnelle tout en utilisant les rétentats, il est nécessaire de maintenir un FCV relativement bas. Également, il est possible de faire varier divers paramètres lors de la fabrication fromagère pour maximiser la synérèse du gel. Des ajustements pourraient notamment être faits au niveau de la fermeté du gel, de la sévérité de la cuisson et du pH d'emprésurage et de soutirage.

#### 1.5.4 Effet de la concentration du lait sur les rendements fromagers

En ce qui concerne la fabrication du fromage cheddar, l'OI a été proposée pour préconcentrer le lait entier de 20 à 25 % de solides [82, 85]. La fabrication fromagère à partir de lait préconcentré est effectuée en utilisant les équipements traditionnels et la composition brute du fromage obtenu est identique à celle du fromage provenant du lait non concentré. Avec une réduction de 20 % du volume de lait par OI, une augmentation de 2 à 3 % du rendement fromager est attendue par rapport au rendement théorique calculé à ce FCV [85].

Une réduction du volume du lait par OI de 15 % a été considérée comme optimale [88]. Pour le fromage cottage, une augmentation de 5 % du rendement peut être réalisée avec une réduction du volume du lait écrémé de 8 % par OI [89]. Lors de la fabrication fromagère à partir de rétentats sans gras ayant un même taux de protéines, il est possible d'obtenir un meilleur rendement de production en OI qu'en UF [4, 5]. Une partie du lactosérum très chargé en solides est piégée dans le réseau protéique du fromage et les pertes en fines et en matière grasse dans le lactosérum sont réduites, ce qui contribue au rendement [73].

Dans le cas des LCR, le coût de l'UF est balancé par une augmentation de l'efficacité de production en raison de l'augmentation de la production de fromage par bassin, par une diminution de la quantité de présure nécessaire à la coagulation et finalement, par une légère augmentation du rendement, généralement de l'ordre de moins de 1 % pour la majorité des variétés de fromage [73].

#### 1.5.5 Caractéristiques des fromages faits à partir des concentrés d'OI

Les fromages fabriqués à partir des concentrés laitiers sont plus concentrés en minéraux, et en lactose dans le cas de l'OI, qu'un fromage traditionnel. Lors de l'OI, plus le FCV du lait est élevé, plus la teneur en lactose et en minéraux du rétentat est importante. Il en va de même pour le fromage fabriqué à partir de ce

rétentat. Les défauts des fromages d'OI sont donc plus ou moins importants selon le FCV du lait utilisé [3].

#### 1.5.5.1 *Perte de matière grasse*

Un des impacts négatifs de la concentration du lait entier par OI pour la fabrication fromagère est la perte de matière grasse dans le lactosérum qui peut augmenter, à cause d'un effet d'homogénéisation partiel pendant le traitement de filtration. Une pression soudaine au cours de la filtration peut induire une lipolyse dans le lait et le fromage, car il y a une perturbation et une rupture des globules de gras. Cet inconvénient est évité lorsque la filtration est conduite sur du lait écrémé plutôt que sur du lait entier. En effet, l'ajout d'un concentré protéique au lait permet de solidifier la structure du gel, et donc de réduire les pertes en fines et en matière grasse dans le lactosérum [73]. Également, l'augmentation de la teneur en solides du lait permet de diminuer les pertes de matière grasse dans le lactosérum et d'augmenter la rétention du gras dans le fromage [85].

#### 1.5.5.2 *Acidité et minéralisation*

Pour la plupart des variétés de fromage, l'utilisation de rétentats conduit à des produits ayant un goût acide marqué [90]. Les rétentats vont également contenir davantage de sels de calcium. La quantité de calcium total et la répartition du calcium entre la phase aqueuse et la micelle de caséine jouent un rôle majeur dans les caractéristiques rhéologiques des fromages produits. Au cours de l'acidification, une grande quantité de sels de calcium est libérée dans la phase aqueuse du caillé. La texture du fromage devient alors grumeleuse et sableuse [91] et l'élasticité du fromage produit devient faible [92]. Le pH et son influence sur le contenu en minéraux ont un impact majeur sur la fonctionnalité du fromage. De plus, la proportion du calcium qui est associé aux micelles de caséines a plus d'impact sur la fonctionnalité du fromage que la teneur totale en calcium [2]. Dans les concentrés d'OI et d'UF, les caséines sont davantage minéralisées [4, 6, 93].

### 1.5.5.3 *Humidité*

Les LPC fabriqués à partir des rétentats d'OI contiennent non seulement les caséines, mais également la totalité des solides du lactosérum. Si toutes les protéines de lactosérum du lait sont conservées, elles représentent environ 20 % des protéines totales dans le fromage [73]. Les fromages fabriqués à partir de LCR et de MCR contiennent quant à eux une partie des solides et des protéines du lactosérum dans leur phase aqueuse. Les solides dissouts dans la phase aqueuse des fromages, par exemple les acides aminés, les peptides, le lactose, les minéraux et les acides organiques, lient l'eau et participent donc à réduire leur pression de vapeur et leur  $A_w$  [94]. Les fromages fabriqués à partir de concentrés d'UF ou d'OI sont donc moins sensibles au séchage lors de l'affinage [73]. La proportion élevée en solides non gras dans les concentrés peut également contribuer à augmenter l'humidité des fromages [95]. Les fromages fabriqués à partir des concentrés d'OI sont plus humides que ceux fabriqués à partir des concentrés d'UF [4, 5].

### 1.5.5.4 *Impact sur l'affinage*

Dans le fromage d'OI, il existe une forte concentration de lactose résiduel, ce qui peut conduire à une reprise de la fermentation lactique (post-acidification) après plusieurs jours dans la salle d'affinage. Les qualités organoleptiques du produit s'en retrouvent le plus souvent diminuées. De plus, il a été observé que les fromages fabriqués à partir des rétentats d'UF s'affinent plus lentement que les fromages traditionnels [96-100]. Généralement, plus la quantité de protéines du lactosérum incorporée au fromage est importante, plus le développement des arômes est lent. Le fort pouvoir tampon des fromages fabriqués à partir des rétentats d'UF à pH 6,7 est la cause la plus probable de ce ralentissement d'affinage [73]. En effet, elle retarde ou même inhibe complètement l'autolyse des ferments lactiques mésophiles [101] et par conséquent l'hydrolyse du réseau de protéines.

## 1.6 Adaptation du procédé fromager aux concentrés d'OI

Tel que discuté dans la section précédente, les fromages fabriqués à partir des concentrés d'OI présentent des particularités pouvant affecter leur qualité. Comme l'utilisation de ce type de concentré permet une augmentation des rendements de production, il est d'intérêt d'explorer les différents leviers qui permettraient d'adapter le procédé fromager aux concentrés d'OI.

### 1.6.1 Le facteur de concentration

Comme mentionné précédemment, la sévérité des défauts des fromages fabriqués à partir des rétentats est relativement proportionnelle au FCV atteint. Par exemple, lorsque la concentration est moins poussée, l'effort à fournir pour rétablir la concentration en minéraux est moins important. Dépendamment de l'importance de la concentration, des ajustements des conditions de fabrication peuvent être nécessaires et même des ajustements des équipements dans le cas de rétentats hautement concentrés [3].

### 1.6.2 Les paramètres de coagulation et le pH de soutirage

Comme les problèmes de fonctionnalités du fromage sont en majorité expliqués par une teneur en calcium micellaire trop importante [2], il peut être intéressant de tenter de transférer une partie de ce calcium micellaire sous forme soluble. Le calcium sous forme soluble causerait moins de défauts de texture dans le fromage que le calcium micellaire. Ainsi, il serait possible de faire varier les paramètres de coagulation par la présure dans le but de favoriser le passage du calcium micellaire sous la forme soluble. L'utilisation d'un pH d'emprésurage plus faible, ainsi que l'emprésurage à faible température favoriseraient le calcium sous forme soluble. La réduction du pH d'emprésurage des rétentats d'OI permet d'égoutter davantage le fromage et améliore les propriétés de coagulation [4, 6]. Dans le même ordre d'idée, la valeur finale de pH au soutirage pourrait être abaissée dans le but de déminéraliser les fromages.

### 1.6.3 La fermeté du gel

La fermeté du gel à la coupe est un facteur important dans la fabrication fromagère, car elle influencera la cinétique d'expulsion du lactosérum et la structure du gel, et donc la facilité à fabriquer en cuve dans le cas des fromages faits de lait concentré. Lors de la fabrication fromagère, le taux de synérèse du gel est influencé par plusieurs facteurs, tels que le prétraitement du lait, les conditions de coagulation et les propriétés rhéologiques et microstructurales du gel lors de la coupe [102, 103].

La cinétique d'expulsion du lactosérum est déterminée par le gradient de pression induit par la structure du gel et par la résistance causée par les niveaux de porosité et de perméabilité du gel [104]. En fromagerie, la synérèse est un paramètre de fabrication important puisqu'elle influence l'acidité, l'humidité, ainsi que le contenu en minéraux et en lactose du fromage final. Ces paramètres influencent à leur tour la qualité générale du fromage, en jouant un rôle sur la texture, la couleur et la saveur [105]. L'augmentation de la fermeté du gel à la coupe conduit à une augmentation de l'humidité finale du fromage et du rendement [62].

Également, en agissant sur la structure du gel, la fermeté du gel à la coupe pourrait possiblement influencer l'efficacité du lavage à retirer le lactose ou les minéraux solubles du caillé. En système laitier concentré, il est attendu que les gels aient une porosité différente des gels de lait régulier, puisque la composition minérale de leurs micelles diffère. En effet, la différence de porosité entre les gels de lait de bufflonne et de lait de vache est expliquée par une différence dans la composition de la micelle et dans la structure générale de la micelle [106]. Les teneurs en calcium total et en calcium micellaire ainsi que la proportion en  $\alpha$ - et  $\beta$ -caséines sont plus élevées dans le lait de bufflonne que dans le lait de vache.

### 1.6.4 Le lavage du caillé

Dans la fabrication fromagère traditionnelle, le lavage du caillé, aussi appelé délactosage, est une façon intéressante de retirer une partie du lactose du caillé,

habituellement à l'étape de cuisson. Dans un système concentré où il y a une très grande quantité de minéraux sous forme soluble et colloïdale, il est également possible qu'un lavage des grains permette de réduire la teneur en minéraux du fromage final. Lorsqu'on applique cette technologie aux caillés d'OI, il est essentiel de maintenir la quantité d'eau de lavage au minimum pour limiter les pertes de rendement. Également, si la totalité de l'eau récupérée lors de l'OI du lait est réutilisée pour le lavage du caillé, la préconcentration du lait de fromagerie semble une avenue moins intéressante. Le lavage de caillés fabriqués à partir de rétentat ne semble pas avoir été étudié, mais plusieurs études traitent du dé lactosage du caillé traditionnel. Quelques études montrent même l'efficacité du lavage à retirer le lactose lorsqu'une quantité réduite d'eau est utilisée.

En 2006, Upreti et al. [107] ont fabriqué un fromage cheddar en intégrant une étape de lavage du caillé, effectuée après 30 minutes de cuisson (38 °C). Le dé lactosage a été réalisé en soutirant 50 % du lactosérum et en remplaçant ce volume par une quantité équivalente d'eau de lavage. La cuisson a ensuite été poursuivie à 38 °C pendant 30 minutes supplémentaires. Ainsi, il a été possible d'obtenir un fromage ne contenant que 0,30 % de lactose, alors que le lait utilisé pour la fabrication fromagère en contenait 4,61 %.

En 2011, Lee et al. [108] ont voulu mesurer l'efficacité d'un dé lactosage pour un fromage de type Colby par trempage et par lavage en continu après cuisson, c'est-à-dire après soutirage total. Dans le cas du dé lactosage par trempage, les grains de fromage ont été submergés dans l'eau de lavage (10 °C) pendant cinq minutes, avec ou sans agitation. Dans le cas du dé lactosage en continu, les grains ont été rincés avec de l'eau de lavage (10 °C) pendant sept minutes, avec ou sans agitation. Pour les deux types de lavages, le volume d'eau utilisé correspondait à 7,96 % de la masse de lait de départ. Ainsi, il a été possible d'obtenir des fromages ayant des teneurs en lactose de 0,02 % avec le lavage par trempage (avec et sans agitation) et de 0,06 et 0,11 % avec le lavage en continu, respectivement sans et avec agitation. La teneur en lactose du lait de départ était de 4,5 %.

En 2012, Hou et al. [109] ont évalué l'efficacité du lavage des grains à retirer le lactose du caillé pour trois volumes différents d'eau de lavage. Dans les trois cas, dix minutes de temps de repos après la coupe ont été accordées et une partie du lactosérum a été soutirée et remplacée par un volume équivalent d'eau de lavage (38 °C) après 15 minutes de cuisson ( $T_{\text{initiale}}=31$  °C et  $T_{\text{soutirage}}=34$  °C). La cuisson a ensuite été poursuivie jusqu'à 38,5 °C et la totalité du lactosérum a été soutirée à pH 6,15. Le lait utilisé pour la fabrication fromagère contenait 4,89 % de lactose. Les différentes proportions d'eau de lavage utilisées et les teneurs en lactose des caillés correspondants sont indiquées au Tableau 2.

Tableau 2 : Teneur en lactose des fromages en fonction du pourcentage d'eau de lavage utilisé pour le délactosage [109].

Proportion d'eau de lavage (% $m_{\text{eau}}/m_{\text{lait}}$ )	Teneur en lactose du caillé (% $m_{\text{lactose}}/m_{\text{fromage}}$ )
16,1	0,26
21,6	0,25
33,0	0,15

#### 1.6.5 L'emploi d'agents chélateurs du calcium

Bien que l'emploi d'agents chélateurs en fromagerie ne soit pas autorisé au Canada ni aux États-Unis, sauf dans les produits de fromage fondu, il demeure intéressant d'étudier leur action dans différents types de fromages d'un point de vue exploratoire. Quelques auteurs ont déjà étudié l'effet de l'ajout d'agents chélateurs aux fromages. Le citrate de sodium (TSC) semble le composé le plus utilisé, et donc, le plus étudié en fromagerie.

L'ajout de TSC au fromage lors de l'étape de salage a notamment été étudié par deux auteurs. Pour Brickley et al. (2009), l'ajout de ce composé lors du salage du fromage cheddar mène à une diminution de la fermeté des fromages au fil de l'affinage, sans toutefois modifier la protéolyse [110]. De plus, le fromage qui contient la quantité la plus élevée de TSC est le fromage ayant la texture la plus

molle, et ce, tout au long de la période d'affinage. Les auteurs expliquent cette diminution de fermeté par le changement d'équilibre du calcium résultant de l'ajout du TSC. En effet, le calcium colloïdal est séquestré par le TSC au fil de l'affinage. Pour Mizuno et al. (2005), l'ajout de ce composé lors du salage de la mozzarella sans gras augmente la capacité de fonte du fromage pour toutes les concentrations testées [111]. Également, l'élasticité du fromage était augmentée lorsqu'une faible quantité de TSC (1 %) était utilisée. Les auteurs ont noté une diminution significative du calcium et du phosphore insolubles avec l'ajout de TSC, sans toutefois noter aucun autre changement significatif dans la composition du fromage. Les protéines du fromage étaient plus hydratées lors de l'ajout de TSC et le nombre et la taille des poches de sérum diminuaient. Ils avancent que les effets du TSC sont probablement causés par la diminution de la teneur en CCP et par une augmentation des répulsions électrostatiques entre les protéines.

Pastorino et al. (2003) ont évalué l'effet de l'injection à haute pression d'une solution de TSC dans des blocs de fromage cheddar [112]. Après 14 jours d'entreposage à 4 °C, les blocs ont été injectés une, trois ou cinq fois avec une solution tampon de TSC à pH 5,27 qui contenait 40 % m/m d'acide citrique trisodique dihydraté et 6,25 % m/m d'acide citrique anhydre. Cette injection réduit la teneur en phosphate lié, mais n'affecte pas la teneur en calcium lié. Il y a expansion de la matrice protéique et une augmentation de la fermeté du fromage, à cause de la solubilisation du phosphate et possiblement à cause de la diminution de la teneur en calcium ionisé.

## Chapitre 2 – Hypothèse de recherche et objectifs

### 2.1 Problématique

La composition spécifique des concentrés d'OI limite leur utilisation en fabrication fromagère. En effet, les fromages produits sont surminéralisés et plus humides. Ils contiennent également une forte teneur en lactose qui limite leur diversité d'application, mais qui représente un atout important au niveau du rendement. Il est possible d'améliorer les propriétés de coagulation par la présure en abaissant le pH d'emprésurage, mais des leviers supplémentaires doivent être développés pour optimiser la fabrication. Des modifications complémentaires pourraient être réalisées au niveau de la phase d'égouttage du procédé. L'objectif général du projet vise donc à adapter la phase d'égouttage du procédé fromager aux caractéristiques spécifiques des concentrés laitiers d'OI (7 % de protéines) dans le but de favoriser l'égouttage et la déminéralisation des fromages.

### 2.2 Hypothèse de recherche

Les performances fromagères des concentrés laitiers d'OI peuvent être optimisées par l'abaissement du pH, l'ajout d'une étape de lavage des grains et l'emploi d'un agent chélateur du calcium.

## 2.3 Objectifs

Afin de valider l'hypothèse formulée, ce projet de recherche a été élaboré en fonction des trois objectifs suivants.

- 2.3.1 Évaluer l'efficacité du lavage des grains à déminéraliser et à égoutter le fromage modèle d'OI en fonction du pH d'emprésurage (6,2; 6,0; 5,8; 5,6).
- 2.3.2 Évaluer le potentiel de l'abaissement du pH d'emprésurage (5,8) et de l'utilisation du TSC comme agent chélateur du calcium, sous forme de lavage des grains et de salage à sec, à égoutter le fromage d'OI et à le déminéraliser en comparaison avec l'UF.
- 2.3.3 Évaluer l'effet des différents traitements sur les rendements, la rétention des constituants, la composition des fromages et leur rhéologie.

## Chapitre 3 – Étude des approches favorisant l'égouttage et la déminéralisation de fromages modèles fabriqués à partir de concentrés d'osmose inverse

### 3.1 Avant-propos

Ce chapitre présente un article qui a été soumis à la revue *International Dairy Journal* sous le titre *Drainage and Demineralization of Model Cheeses Made from Reverse Osmosis Concentrates*. Il a pour but de cibler des leviers d'intérêts pour favoriser l'égouttage et la déminéralisation des fromages fabriqués à partir de concentrés d'OI, de même que de comparer leurs propriétés fromagères à celles des concentrés d'UF. Les leviers technologiques étudiés dans le cadre de cet article sont l'ajustement du pH, le lavage du caillé et l'utilisation du TSC, à titre d'agent chélateur du calcium, ce qui permettrait d'améliorer les propriétés fromagères des concentrés laitiers.

### 3.2 Résumé

L'utilisation de concentrés d'OI pour augmenter la teneur en protéines du lait de fromagerie représente un défi en raison de leur teneur élevée en lactose et en minéraux. Des travaux antérieurs ont montré qu'une diminution du pH d'emprésurage permettait d'améliorer les propriétés de coagulation des concentrés d'OI. Cependant, le caillé possédait une teneur élevée en humidité et en minéraux colloïdaux. Le but de cette étude était d'évaluer différentes approches favorisant l'égouttage et la déminéralisation des fromages fabriqués à partir de concentrés d'OI avec matière grasse. L'impact de l'acidification, du lavage du caillé et de l'utilisation du TSC a été étudié lors de la production de fromages modèles. Les propriétés fromagères ont été étudiées en comparaison avec celles des

concentrés d'UF. Les fromages fabriqués à base de concentré d'OI avaient des rendements supérieurs à ceux fabriqués à base de concentré d'UF, en raison de leur teneur élevée en lactose et minéraux. Le lavage du caillé a diminué la teneur en cendres des fromages et la rétention du gras, ce qui a entraîné des pertes de rendement. Le lavage du caillé avec la solution de TSC a réduit la rétention des protéines et du gras, ce qui a également réduit les rendements. Le salage à sec avec le TSC a diminué la rétention des protéines, ainsi que le rendement ajusté en humidité ( $Y_{ma}$ ), mais a augmenté la rétention du gras dans le fromage. L'acidification des concentrés d'OI a augmenté le  $Y_{ma}$ , la rétention du gras et l'égouttage du caillé et a diminué la teneur totale en calcium du fromage modèle. L'abaissement du pH a amélioré les propriétés fromagères des concentrés d'UF et d'OI, en favorisant la déminéralisation partielle du réseau de caséines et en augmentant l'égouttage du caillé et la rétention du gras. Cette étude montre que l'UF et l'OI modifient les propriétés de fabrication fromagère et que l'ajustement du pH peut jouer un rôle majeur dans l'amélioration de la qualité des fromages fabriqués à partir de concentrés.

*Drainage and Demineralization of Model Cheeses Made from Reverse Osmosis Concentrates*

I. Fournier<sup>a</sup>, M. Britten<sup>a, b</sup>, Y. Pouliot<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>: STELA Dairy Research Center, Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Department of Food Science, Université Laval, Québec, Canada, G1V 0A6

<sup>b</sup>: Food Research and Development Center (FDRC), Agriculture and Agri-Food Canada, St-Hyacinthe, Canada, J2S 8E3

\*: Corresponding author:

Yves Pouliot

STELA Dairy Research Center  
Pavillon Paul-Comtois  
2425 rue de l'Agriculture, Local 2322C  
Université Laval  
Québec, QC, Canada  
G1V 0A6  
Phone number: 418-656-5988  
E-mail address: [yves.pouliot@fsaa.ulaval.ca](mailto:yves.pouliot@fsaa.ulaval.ca)

### 3.3 Abstract

The concentration of milk by reverse osmosis (RO) can increase cheese yield, but is challenging due to the high amounts of lactose and milk salt in the RO concentrates. The aim of this study was to investigate different approaches to promote drainage and demineralization in full-fat cheeses made from RO concentrates. The impact of reducing the concentrate pH, curd washing and the usage of trisodium citrate (TSC) were investigated in model cheese productions. Cheesemaking properties of RO concentrates were studied in comparison with ultrafiltration (UF) concentrates. Cheeses made from RO concentrate showed higher yields than cheeses made from UF concentrate, because of their high lactose content. Curd washing with water decreased fat recovery and reduced cheese yields. Curd washing with TSC decreased protein and fat recovery, also negatively impacting cheese yield. Dry salting with TSC decreased protein recovery but increased fat recovery. Reducing the pH of RO concentrates decreased the total calcium content of the model cheese, and increased curd drainage, moisture adjusted cheese yield and fat recovery. Lowering the pH improved the cheesemaking properties of both UF and RO concentrates by reducing the mineral content of the casein network and increasing curd drainage and fat recovery. This study shows that UF and RO alter cheesemaking properties, and that pH adjustment can play a major role in improving the cheesemaking properties of concentrates.

### 3.4 Introduction

Membrane separation processes are widely used in the dairy industry to concentrate and fractionate milk components. A large number of applications have focused on increasing protein content in cheese milk [3, 73, 113]. Ultrafiltration (UF) concentrate has been widely used for cheesemaking at various concentrations as it increases cheese yields and cheese plant productivity. Ultrafiltration is most commonly used for protein concentration of cheese milk up to a volumetric concentration factor (VCF) of 2 X, which can be used with existing cheesemaking equipment. Intermediate VCF (2 – 5 X) can be used for making feta cheese but requires specially designed equipment because of the increased curd firmness [114]. Above a VCF of 5 X, liquid precheeses can be used for making fresh cheeses such as Quarg or cream cheese, as they require very little whey drainage and no cheese vats [73]. At VCF values of 2 X and less, the cost of UF is balanced by the increase in productivity, by lower quantities of rennet required for coagulation and by a slight increase (<1%) in cheese yields [73]. Very few studies have focused on reverse osmosis (RO) concentrate for cheesemaking since the range of applications is limited due to its high lactose and mineral content. Nevertheless, the higher solids content of its soluble fraction can significantly increase cheese yields, which translates into a potential economic gain.

The use of UF or RO concentrate requires some adjustment of the traditional cheesemaking process. For example, at relatively high VCF values (> 2X), the proportion of cheese whey is decreased compared to the curd volume and agitation in vats becomes problematic [2, 3]. Moreover, concentrates made from RO, and to a lesser extent UF, have a higher mineral content than milk. Previous studies have shown that cheeses made from RO concentrates contain excessive minerals and moisture [4, 5]. The pH influences the cheese mineral content which has a strong impact on cheese functionality. Excessive calcium unfavourably affects the functional properties of cheeses, such as the melting properties of Mozzarella [115].

To facilitate the use of RO concentrate for cheesemaking, curd drainage and demineralization should be improved and there are several options for increasing both. The preacidification of cheese milk is known to convert colloidal calcium into its soluble forms that can be removed from curds during whey drainage. Micellar calcium phosphate is also completely solubilized at pH 5.2 [10]. The rennet coagulation properties of RO concentrate can be improved by decreasing the renneting pH, which promotes the demineralization of casein micelles, accelerating coagulation kinetics and increasing curd drainage [4, 6]. In addition, soluble minerals can be removed with water during curd washing [30], which further solubilizes colloidal calcium phosphate and increases casein hydration [116], leading to a softer cheese texture [115]. Calcium chelating agents have the potential to promote demineralization during cheesemaking. Dry salting of cheddar cheese made from regular milk with trisodium citrate (TSC) produced a lower cheese firmness during ripening, which was attributed to the changes in calcium equilibrium from colloidal to soluble form, induced by the chelation of calcium [110]. Dry salting of non-fat mozzarella (1% w/w) with TSC increased its melting capacity and elasticity, as it decreased the amount of bound calcium without any other changes in cheese composition [111]. When TSC was added, the proteins in the cheese were more hydrated, and the number and size of serum pockets decreased. The calcium chelating properties of TSC could offer advantages for cheesemaking with RO concentrates.

This study's objective was to evaluate the potential of different technological approaches (pH adjustment, curd washing with water, and the use of TSC, in wash water or by dry salting the curd) to promote drainage and demineralization of model cheeses made from RO concentrate. The first series of experiments (Experiment 1) investigated the effect of pH adjustment (6.2 to 5.6) combined with curd washing using model cheese production from RO concentrate. These results were compared with cheeses made UF concentrate. The second series of experiments (Experiment 2) investigated the effects of an acidified concentrate and the addition of calcium chelating agent (trisodium citrate), as a either curd washing solution or

a dry-salting agent, on both UF and RO concentrates. The effects of all treatments (Experiments 1 and 2) on yields, fat and protein recovery, and cheese composition and rheology were determined.

### 3.5 Materials and Methods

#### 3.5.1 Skim milk and Cream Supply

Pasteurized skim milk was obtained from a local milk supplier and was stored at 4 °C until filtration. Raw cream (41.6-46.2% fat) was picked up at a local milk facility and pasteurized upon arrival at 63 °C for 30 minutes using a cooker with double jacket (Stephan Universal Machine UMC 5, STEPHAN food service equipment GmbH, Hamelin, Germany). The cream was not agitated until it reached 40 °C, at which time a slight manual agitation was performed until the end of pasteurization.

#### 3.5.2 Preparation of Concentrates

Skim milk was filtered by a pilot scale filtration unit (1812 Lab Unit, Filtration Engineering Company Inc., Champlin, MN, USA) equipped with a 0.32 m<sup>2</sup> spiral wound membrane. UF concentration was performed using a polyethersulfone membrane (model ST3B-1812F, Synder Filtration, Vacaville, CA, USA) with molecular weight cut-off of 10 000 Da. RO concentration was performed using a polyamide membrane with an average NaCl rejection rate of 99% (Model AG1812C 34B, General Electric, Trevose, PA, USA). During UF and RO filtration, inlet pressures were 4.1 and 22.4 bars, respectively. Skim milk was preheated to 50 °C and this temperature was maintained throughout filtration. Prior to filtration, the protein content of the milk was determined by FTIR (LactoScope FTIR Advanced, Delta Instruments B.V., Drachten, The Netherlands). Milk was concentrated by UF and RO until the protein concentration of the retentate reached approximately 10%. Membranes were cleaned according to the manufacturer's procedures.

UF and RO retentates were then diluted back to 7.5% of true protein with pasteurized cream and permeate in order to obtain a protein-to-fat ratio of 1. The protein and fat contents UF and RO samples were then confirmed by FTIR and were readjusted, if needed.

### 3.5.3 pH Adjustment

Samples were heated to 60 °C for 2 minutes, cooled to 32 °C and held at 32 °C for 1 h under orbital agitation in a water bath (OLS 200; Grant Instruments, Cambridge, UK) prior to pH adjustment. In Experiment 1, the pH of the samples was adjusted to 5.60, 5.80, 6.00 and 6.20 for RO concentrates and to 6.20 for UF concentrate using 21% (w/w) lactic acid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1 M NaOH (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Similarly, in Experiment 2, the pH of the samples was adjusted to 6.20 and 5.80 for UF and RO concentrates. The adjustment of pH was done under magnetic bar agitation to avoid local pH stress and measured with a SympHony pH meter (VWR Scientific, Radnor, PA, USA). Samples were left to equilibrate at 4 °C until cheesemaking (minimum 18 h, 46 h maximum). Right before cheesemaking, samples were heated to 60 °C for 2 minutes, cooled to 32 °C, and held at 32 °C for 1 h under orbital agitation in a water bath. The pH was adjusted again, if needed.

### 3.5.4 Determination of Cutting Time

Prior to cheesemaking, cutting time was determined from coagulation kinetics measured by dynamic rheology, as described by Perreault et al. (2016) [117]. The rheological properties of renneted milk concentrates were monitored using a stress-controlled rheometer (ARES-G2; TA instruments, New Castle, DE, USA) equipped with concentric cylinders (27.7 and 30 mm in diameter; TA instruments). A volume of 25 µL of diluted rennet (1/10, v/v) was added to 25 mL of concentrate to achieve a final concentration of 0.01% (EC 3.4.23.4; 0.065 IMCU mL<sup>-1</sup> e ChymOplus; Fromagex, Rimouski, QC, CA). The renneted sample was mixed for 30 s, then poured into the cylindrical container maintained at 32 °C with a Peltier

thermal control system (C-PTD 200; TA instruments). Measurements were started 2 min exactly after the addition of rennet to the milk. The storage modulus ( $G'$ ) was recorded with TRIOS software (v3.3.1.4668, TA Instruments, New Castle, DE, USA) at a constant strain of 0.1% and a frequency of 1 Hz. Cutting time was defined as the time when  $G'$  reached 40 Pa.

### 3.5.5 Model Cheese Production

Various treatments targeting better curd demineralization and drainage during cheesemaking with UF and RO concentrates were tested using laboratory-scale direct acid model cheese production. Two series of experiments were performed and repeated three times. In the first series of experiments, the effects of pH adjustment (6.20; 6.00; 5.80; 5.60) and curd washing with a small volume of water (presence or absence of washing) were evaluated on RO cheese. The effect of washing was also evaluated at a pH of 6.20 for cheeses made from UF concentrate. The amount of water used for curd washing corresponded to 15% of the mass of milk used for cheese production. In the second series of experiments, the effect of calcium chelating salt was evaluated during cheese making with RO and UF concentrates at pH 6.2. Trisodium citrate (TSC, EMD Chemicals, Darmstadt, Germany) was used under two modes of application: in the curd washing solution ( $[TSC] = 0.5\%$ ) or used as a dry-salting agent (0.5% of curd mass after drainage). For comparison, model cheeses were also produced from RO and UF concentrates at pH 5.8, with no TSC added.

Model cheese productions were performed according to Morin et al. (2008) [118], with some minor changes. Before the preparation of model cheeses, concentrates were prepared as described in sections 3.5.1 and 3.5.2, and the pH was adjusted as described in section 3.5.3. Cheese vats were placed in an orbital shaking bath (OLS 200; Grant Instruments, Cambridge, UK) at 32 °C without agitation. A mass of 145 g of tempered milk was renneted to a final rennet concentration of 0.01% (ChymO-plus; Fromagex) and 144 g of renneted milk was poured into the 12 x 12 cm cheese vat. A polyoxymethylene cover layered with cheesecloth was then

placed on the vat until reaching the cutting time. As explained in Section 3.5.4, cutting time was defined by dynamic rheology as the time needed for the gel to reach a  $G'$  value of 40 Pa. The gel was cut using a stainless steel knife to obtain 1 cm<sup>3</sup> curds and left without agitation for a 2 min healing time. In case of curd washing, weighed and preheated (32 °C) washing solution (distilled water for Experiment 1 and 0.5% TSC solution for Experiment 2) was added immediately following healing time and orbital agitation was started at 40 rpm. After 10 minutes, agitation was increased to 60 rpm and temperature was gradually increased to 42 °C over the next 45 min. After 55 minutes of cooking, curds were drained by reversing the vat on the cheesecloth placed on top of the polyoxymethylene cover and covered for 30 min.

For cheeses made in the first series of experiments, curds from concentrates were transferred to two 50 mL plastic centrifuge tubes (Falcon). For cheeses made in the second series of experiments, after drainage, curds were coarsely ground (Spice & Nut Grinder, SG-10c, Cuisinart, Woodbridge, ON, Canada). For the dry salt treatment, TSC salt was incorporated into ground curds. All ground curds from the second series of experiments were left to drain for another 30 min before being transferred to centrifuge tubes (i.d. = 25 mm). The centrifugation was performed at 4,400 x g for 60 min (32 °C) using a swinging bucket rotor A-4-44 and a 5804 R Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) to achieve cheese pressing. Whey expelled from cheese during centrifugation was mixed with whey obtained from curd drainage and the final masses of cheese and whey were recorded.

Samples of acidified concentrates and whey were stored at -18 °C until composition analysis. Model cheeses were stored at 4 °C in vacuum-sealed bags until further analysis.

### 3.5.6 Composition Analyses

Milk concentrates and wheys were analyzed for protein, fat, moisture and ash contents. Total and non-protein nitrogen were quantified in duplicate by the Kjeldahl method [119]. A conversion factor of 6.38 was used for nitrogen to protein conversion. Fat content was measured by FTIR (LactoScope™ FTIR Advanced, Delta Instruments B.V., Drachten, Netherlands) based on Fourier transform infrared principle. Total solids were determined after vacuum-drying at 100 °C for 5 h and ashes were obtained after calcination overnight at 550 °C (Furnace Furnatrol 1 Thermolyne; ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Seven days after production, cheese moisture was determined by gravimetry, after dehydration of ground curd in a forced air oven at 100 °C for 5 h (AOAC, 2005b). Protein, fat and ash content of cheeses were calculated from mass balance and compositional analysis of concentrate and whey. Calcium concentration in cheese was measured using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) (photometer Optima4300 DV; PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Ashes of concentrates and wheys were dissolved with 2.5 g of 20% (w/v) of glacial trichloroacetic acid (TCA; Anachemia, Radnor, PA, USA) and diluted to 50 g with HPLC-grade water. The solution was vortexed and filtered through a 0.45 µm polyethersulfone syringe filter (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) before ICP-OES analysis.

### 3.5.7 Cheese Mass Balance

Actual cheese yield (Y) was calculated according to equation (1):

$$Y = Yield (\%) = \frac{m_{Curd}}{m_{Milk}} \times 100 \% \quad (1)$$

As the moisture content of the model cheeses varied with production conditions, moisture adjusted yield (Y<sub>ma</sub>) was calculated at 50% moisture content using equation (2):

$$Yma = \text{Moisture adjusted yield (\%)} = \left[ \frac{\left(1 - \frac{\text{Cheese moisture}}{\text{Whey moisture}}\right)}{\left(1 - \frac{50}{\text{Whey moisture}}\right)} \right] \times \text{Yield (\%)} \quad (2)$$

The recoveries of true protein ( $K_p$ ) and fat ( $K_f$ ) were calculated according to equations (3) and (4) respectively:

$$K_p = \text{True protein recovery (\%)} = \left(1 - \frac{\text{True protein}_{\text{Whey}} (\%)}{\text{True protein}_{\text{Milk}} (\%)}\right) \times 100 \quad (3)$$

$$K_f = \text{Fat recovery (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Fat}_{\text{Whey}} (\%)}{\text{Fat}_{\text{Milk}} (\%)}\right) \times 100 \quad (4)$$

### 3.5.8 Cheese Rheological Properties

A stress-controlled rheometer (ARES-G2, TA Instruments, New Castle, DE, USA) equipped with 25 mm serrated parallel plates (TA Instruments, New Castle, DE, USA) was used to record the complex modulus ( $G^*$ ) at constant strain (0.1%) and frequency (1 Hz). The method used is similar to the one described by Perreault et al. (2017) [120]. Model cheeses were pressed by centrifugation and the cylindrical samples were removed from the tubes and for each, a 3 mm slice was cut at 2 cm from the bottom end. Cheese slices were tempered at 20 °C for 30 min in Petri dishes to avoid drying. Before the test, cheese slices were conditioned by applying a force of 1 N for 5 min. Temperature was held constant (20 °C) throughout the test.

### 3.5.9 Statistical Analysis

All experiments were repeated three times with different batches of milk. Analysis of variance (ANOVA) with Tukey test was performed on all measurements (95% confidence level) using SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). In the first series of experiments, the effect of cheesemaking conditions (RO pH 6.20, RO pH 6.00, RO pH 5.80, RO pH 5.60 or UF pH 6.20) and the presence or absence of curd washing (+W or -W) were evaluated. The interaction between cheesemaking conditions and curd washing was also assessed. In the second series of

experiments, the effect of cheesemaking conditions (pH 6.20, pH 5.80, +WC or +SC) and the type of filtration (UF or RO) were evaluated. The interaction between cheesemaking conditions and filtration was also assessed. Differences were considered significant when p values were less than 0.05. Mean values and standard errors are reported.

### 3.6 Results and Discussion

#### 3.6.1 Composition of Cheese Milks

Table 3 shows the overall composition of cheese milks for Experiments 1 and 2, as a function of the type of concentrate used (UF or RO). The target protein and fat contents of cheese milks were about twice the contents of regular milk. RO milks contained approximately 2 X more “other solids”, including lactose and minerals, than UF ( $p < 0.05$ ) because lactose is lost during UF filtration [73, 86, 121]. During concentration of milk by RO, only water and ionized minerals are lost in the permeate [73]. Total ash and calcium (mg/g protein) were inferior in UF concentration than in RO concentration since a portion of soluble minerals is removed from the permeate during UF [73, 122].

Table 3: Composition<sup>1</sup> of UF and RO concentrates used for cheesemaking.

Type of fluid	UF	RO	STD error <sup>2</sup>	UF	RO	STD error <sup>2</sup>
	Experiment 1			Experiment 2		
Total solids (%)	19.28 <sup>B</sup>	25.11 <sup>A</sup>	0.42	19.63 <sup>b</sup>	24.77 <sup>a</sup>	0.35
Protein (%)	7.64 <sup>A</sup>	7.37 <sup>B</sup>	0.02	7.51 <sup>a</sup>	7.45 <sup>a</sup>	0.16
Fat (%)	7.37 <sup>A</sup>	7.34 <sup>A</sup>	0.06	7.16 <sup>a</sup>	7.22 <sup>a</sup>	0.09
Protein-to-fat ratio	1.04 <sup>A</sup>	1.01 <sup>A</sup>	0.01	1.05 <sup>a</sup>	1.03 <sup>a</sup>	0.03
Other solids (%)	4.27 <sup>B</sup>	10.40 <sup>A</sup>	0.50	4.97 <sup>b</sup>	10.10 <sup>a</sup>	0.23
Ash (%)	1.02 <sup>B</sup>	1.53 <sup>A</sup>	0.01	1.05 <sup>b</sup>	1.53 <sup>a</sup>	0.01
Ca (%)	0.22 <sup>B</sup>	0.24 <sup>A</sup>	0.01	0.23 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.01
Ca (mg/g protein)	28.77 <sup>B</sup>	32.67 <sup>A</sup>	0.02	30.24 <sup>b</sup>	33.88 <sup>a</sup>	0.04

<sup>A-B/a-b</sup> Values in the same row without a common superscript are significantly different (Tukey,  $p < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Based on triplicate experiments.

<sup>2</sup> Standard error.

### 3.6.2 Comparison of Cheeses from UF and RO Concentrates

Yields, protein and fat recovery, and cheese composition are presented in Table 4 for Experiment 1 and in Table 5 for Experiment 2. Actual yield (Y) was calculated from the mass of cheese obtained and the mass of milk used for cheese production. RO cheeses had higher Y than their UF homologues ( $p < 0.05$ ). However, actual yield did not permit a meaningful comparison of cheeses differing in moisture content or of cheeses made from milks of differing composition [123]. For comparison, yields were adjusted to 50% moisture content in the cheese ( $Y_{ma}$ ). Cheeses made from RO milk had higher  $Y_{ma}$  than UF cheeses ( $p < 0.05$ ), which is in agreement with previous studies [4, 5]. Cheeses made from RO milk contains more whey solids, which contributes to yields. There is no difference between protein and fat recovery of UF and RO cheeses. Overall, fat recovery is inferior for cheeses made during Experiment 2 than for cheeses made during Experiment 1, because of the additional grinding step.

Cheese composition data, including moisture, protein, fat, “other solids”, ash and calcium content, are presented in Table 4 for Experiment 1 and in Table 5 for Experiment 2. Under the cheesemaking conditions in this study, model cheeses made from RO concentrate had 3.2-3.5% more moisture than cheeses made from UF concentrate ( $p < 0.05$ ), which could be attributed to a slower protein network rearrangement during curd cooking. Also, excessive content of CCP (colloidal calcium phosphate) could lead to a reduction of the phosphate groups available for curd formation in the secondary phase of rennet coagulation, which may reduce curd contraction and syneresis during cooking [124]. Cheeses made from RO concentrate contained more “other solids”, including lactose, ash and calcium (mg/g protein), than their homologue made from UF concentrate ( $p < 0.05$ ). During RO filtration, all milk solids are retained in the retentate, whereas lactose and minerals are lost during UF [78, 86, 121]. Therefore, since the soluble fraction of the RO retentate contained more lactose and minerals, so did the soluble fraction of the cheese made from this concentrate.

### 3.6.3 Effect of Curd Washing with Water and pH

#### 3.6.3.1 *Effect of RO-Curd Washing with Water*

All Experiment 1 results (Section 3.6.3), including yields, recoveries and cheese composition, are presented in Table 2. In this experiment, pH modification (5.60; 5.80; 6.00; 6.20) was investigated in combination with curd washing in RO model cheese production for its potential effect on curd mineralization and syneresis. The amount of water used for curd washing corresponded to 15% of the mass of milk used for cheese production, which is less than the usual quantity used for curd washing (~30% for Gouda) [125]. The quantity of curd washing water was decreased to allow some loss of minerals, while limiting yield losses to a minimum. Curd washing with water decreased ash content of model cheeses ( $p < 0.05$ ). Curd washing with water also had a slight negative influence on Y<sub>ma</sub> ( $p < 0.05$ ), but there were no significant differences between individual values for washed and non-washed cheeses (Table 4). There is a relationship ( $p < 0.05$ ) between the cheesemaking condition (pH or type of filtration) and curd washing with water on fat recovery of the cheese. Curd washing of RO curd increased fat losses in whey at pH 6.20 ( $p < 0.05$ ). As mentioned in Section 3.5.5, wash water was added at the beginning of the cooking stage. It is possible that the renneted gel was not firm enough at this stage to support the addition of the washing solution, as most fat is lost from the surfaces of the curd particles during the cutting and the early stages of stirring in the cheese vat [123].

#### 3.6.3.2 *Effect of pH on RO Cheeses*

As shown in Figure 7, it was possible to decrease cheese moisture at a constant linear rate by reducing the pH from 6.20 to 5.60 in Experiment 1 ( $p < 0.05$ ). In acidified milks the gel formation rate is higher, which promotes whey expulsion from the curd [126]. Reducing the pH of milk creates a stronger gel due to faster chymosin action and a decrease in electrostatic repulsion between micelles, leading to better curd contraction [9]. A similar moisture content was obtained in cheeses made from UF concentrate at pH 6.20 and from RO concentrate at pH

5.80 ( $p>0.05$ ). Reducing the pH from 6.20 to 5.80 or lower, reduced the calcium content of the curd ( $p<0.05$ ) since some CCP was solubilized and eliminated in the whey. This observation agrees with a number of other studies [127-129] which have established that for a given calcium content, the ratio of insoluble-to-soluble calcium increases as the pH increases. In our study, a similar calcium-to-protein ratio (mg Ca / g protein) was obtained for RO cheeses at pH 5.80 and UF cheeses at pH 6.20 ( $p>0.05$ ).

Decreasing the pH of RO from 6.20 to 5.80 or lower increased fat recovery in cheese ( $p<0.05$ ). It even compensated the negative effect of curd washing on fat recovery, as values obtained for cheeses with lower pH were similar to those obtained for non-washed cheeses made at pH 6.20. It is known that curd demineralization reduces gel firmness [48], which can better sustain the deformation that occurs during curd cooking stage under agitation and minimize curd shattering. There is no statistically significant effect of pH on protein recovery. Decreasing the pH of RO cheeses from 6.20 to 6.00, 5.80 and 5.60 resulted in increased Y<sub>ma</sub>, which is a result of the increased fat recovery.

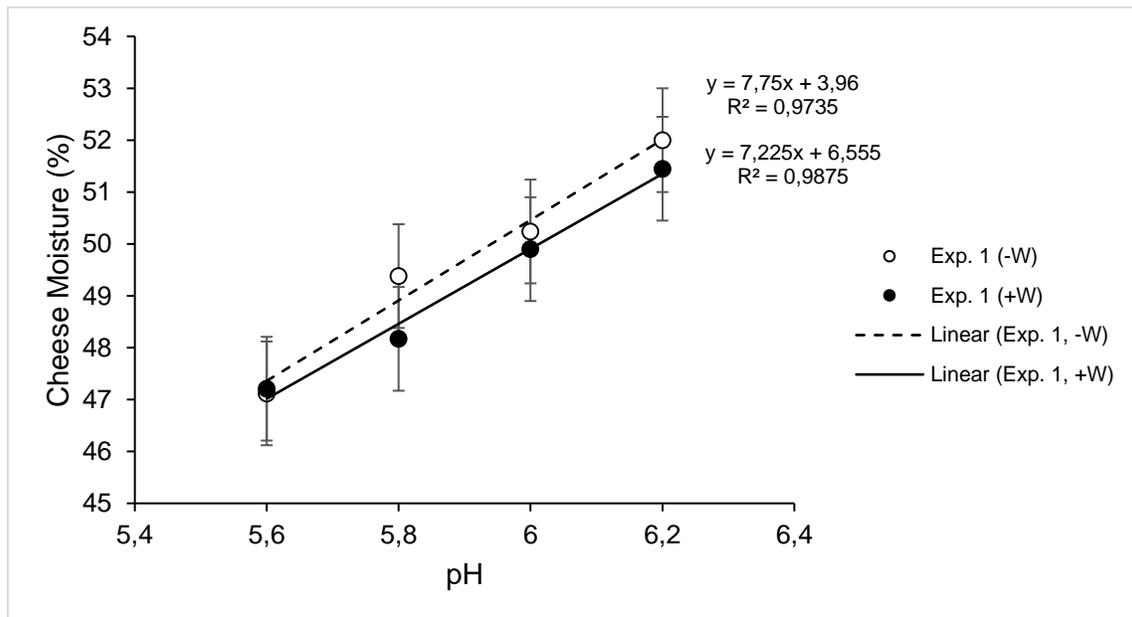


Figure 7 : Effect pH on RO cheese moisture in Experiment 1, without washing (-W) or with washing (+W).

Table 4: Influence of milk filtration, pH adjustment and curd washing (+W) on yield, recovery and cheese composition<sup>1</sup> (Experiment 1).

Type of fluid	UF		RO		6.00		5.80		5.60		STD error <sup>2</sup>
pH	6.20		6.20		6.00		5.80		5.60		
Curd washing	-W	+W	-W	+W	-W	+W	-W	+W	-W	+W	
<i>Yield and recovery</i>											
Y <sup>3</sup> (%)	27.57 <sup>e</sup>	27.35 <sup>e</sup>	32.61 <sup>a</sup>	31.35 <sup>b</sup>	32.23 <sup>ab</sup>	31.16 <sup>bc</sup>	31.58 <sup>ab</sup>	30.08 <sup>cd</sup>	29.91 <sup>d</sup>	29.55 <sup>d</sup>	0.48
Yma <sup>4</sup> (%)	28.54 <sup>e</sup>	28.63 <sup>e</sup>	30.65 <sup>cd</sup>	30.09 <sup>d</sup>	32.00 <sup>ab</sup>	31.21 <sup>bc</sup>	32.17 <sup>ab</sup>	31.57 <sup>abc</sup>	32.36 <sup>a</sup>	31.79 <sup>ab</sup>	0.38
K <sub>p</sub> <sup>5</sup> (%)	76.48 <sup>ab</sup>	76.54 <sup>a</sup>	75.87 <sup>ab</sup>	74.04 <sup>b</sup>	76.23 <sup>ab</sup>	76.31 <sup>ab</sup>	76.26 <sup>ab</sup>	76.75 <sup>a</sup>	77.27 <sup>a</sup>	77.37 <sup>a</sup>	0.90
K <sub>f</sub> <sup>6</sup> (%)	90.71 <sup>bc</sup>	90.78 <sup>bc</sup>	91.86 <sup>abc</sup>	80.99 <sup>d</sup>	90.33 <sup>bc</sup>	89.68 <sup>c</sup>	93.73 <sup>ab</sup>	93.37 <sup>ab</sup>	94.51 <sup>a</sup>	93.54 <sup>ab</sup>	1.22
<i>Cheese composition</i>											
Moisture (%)	48.52 <sup>de</sup>	47.95 <sup>ef</sup>	52.00 <sup>a</sup>	51.45 <sup>ab</sup>	50.24 <sup>bc</sup>	49.90 <sup>c</sup>	49.38 <sup>cd</sup>	48.17 <sup>ef</sup>	47.12 <sup>f</sup>	47.21 <sup>f</sup>	0.75
Protein (% <sub>dm</sub> <sup>7</sup> )	44.70 <sup>a</sup>	44.55 <sup>a</sup>	39.42 <sup>bc</sup>	39.80 <sup>bc</sup>	38.34 <sup>c</sup>	39.30 <sup>bc</sup>	38.28 <sup>c</sup>	39.23 <sup>bc</sup>	40.27 <sup>b</sup>	40.76 <sup>b</sup>	0.72
Fat (% <sub>dm</sub> )	48.46 <sup>a</sup>	48.33 <sup>a</sup>	44.34 <sup>b</sup>	41.95 <sup>d</sup>	42.44 <sup>cd</sup>	43.35 <sup>bcd</sup>	43.36 <sup>bcd</sup>	44.30 <sup>b</sup>	43.5 <sup>bcd</sup>	43.73 <sup>bc</sup>	0.53
Other solids (% <sub>dm</sub> )	6.84 <sup>c</sup>	7.12 <sup>c</sup>	16.23 <sup>b</sup>	18.24 <sup>ab</sup>	19.22 <sup>a</sup>	17.35 <sup>ab</sup>	18.35 <sup>ab</sup>	16.46 <sup>ab</sup>	16.17 <sup>b</sup>	15.51 <sup>b</sup>	1.03
Ash (% <sub>dm</sub> )	4.13 <sup>de</sup>	4.08 <sup>def</sup>	4.99 <sup>a</sup>	4.76 <sup>b</sup>	4.75 <sup>b</sup>	4.65 <sup>b</sup>	4.43 <sup>c</sup>	4.25 <sup>d</sup>	4.01 <sup>ef</sup>	3.87 <sup>f</sup>	0.09
Ca (% <sub>dm</sub> )	1.28 <sup>a</sup>	1.28 <sup>a</sup>	1.25 <sup>ab</sup>	1.27 <sup>ab</sup>	1.21 <sup>c</sup>	1.23 <sup>bc</sup>	1.11 <sup>d</sup>	1.12 <sup>d</sup>	1.01 <sup>e</sup>	1.00 <sup>e</sup>	0.01
Ca (mg/g protein)	28.66 <sup>b</sup>	28.68 <sup>b</sup>	31.86 <sup>a</sup>	32.09 <sup>a</sup>	31.51 <sup>a</sup>	31.43 <sup>a</sup>	28.88 <sup>b</sup>	28.45 <sup>b</sup>	25.00 <sup>c</sup>	24.43 <sup>c</sup>	0.62

<sup>a-h</sup> Values in the same row without a common superscript are significantly different (Tukey, p<0.05).

<sup>1</sup> Based on triplicate experiments.

<sup>2</sup> Standard error.

<sup>3</sup> Actual cheese yield.

<sup>4</sup> Cheese yield adjusted to 50% moisture.

<sup>5</sup> Protein recovery.

<sup>6</sup> Fat recovery.

<sup>7</sup> % dry matter.

### 3.6.4 Effect of Chelating Agent on Cheeses Made from UF and RO Retentates

#### 3.6.4.1 *Effect of Curd Washing with TSC on RO and UF Cheeses*

All Experiment 2 results (Section 3.6.4), including yields, retention, and cheese composition and rheology, are presented in Table 5. Using TSC as a washing solution reduced protein and fat recovery ( $p < 0.05$ ), which contributed to lowering the  $Y_{ma}$  of UF and RO cheeses ( $p < 0.05$ ). Citrate chelates soluble calcium and causes the dissociation of CCP, which can induce casein losses in whey [31, 32]. As noted above, washing RO curd with water increased fat losses in whey ( $p < 0.05$ ), probably because the renneted gel was not firm enough at the beginning of the cooking stage to support the addition of the washing solution, and most fat is lost from the surfaces of the curd at this stage of the cheesemaking process [123]. This effect was more pronounced when using TSC as a washing solution since fat recovery in RO cheeses was impacted at an even higher level than UF cheeses ( $p < 0.05$ ). Adding TSC to the washing water increased this effect as citrate's chelating of calcium weakened the protein matrix even more, leading to more fat losses in whey.

#### 3.6.4.2 *Effect of Dry Salting with TSC on RO and UF Cheeses*

Using TSC for dry salting increased cheese moisture ( $p < 0.05$ ). In our study, the demineralized paracasein may have bound more water, decreasing the extent of syneresis. Since only total calcium was determined, it was not possible to measure the effect of TSC on the calcium equilibrium of the cheeses. This therefore does not exclude that TSC may have influenced calcium partitioning between its colloidal and soluble form in the cheeses. Using TSC as a dry-salting agent also decreased  $Y_{ma}$  only for RO cheeses ( $p < 0.05$ ). The quantity of TSC used for dry salting corresponded to 0.5% of the mass of curd obtained after the first drainage period. Since the mass of RO curd was greater than UF curd, more TSC was added to the RO curd for salting, which may explain that the negative impact on yield was only observed for RO cheeses. Calcium can affect cheese yields [30, 50, 130], mostly because it causes a high degree of casein aggregation, which can

prevent fracturing of the curd. Dry salting with TSC had a negative impact on protein recovery ( $p < 0.05$ ), which reduced cheese yields. Citrate chelates soluble calcium and causes the dissociation of CCP, which can induce some casein losses in whey [31, 32]. Using TSC for dry salting increased fat recovery ( $p < 0.05$ ), which partly compensated for lower yield caused by protein losses in whey. Adding TSC can increase fat emulsification by solubilizing caseins, which can emulsify the free fat [131]. Soluble caseins have high surface activity and they are known to adsorb strongly at an oil–water interface [132].

#### 3.6.4.3 *Cheese Rheology*

Dynamic low amplitude oscillatory rheology was used to determine viscoelastic properties of model cheeses made in Experiment 2. The complex modulus recorded at 1 Hz ( $G^*_{1 \text{ Hz}}$ ) is presented in Table 5. The type of concentrate (UF or RO) had no influence on the complex modulus at 1 Hz ( $p > 0.05$ ), which is an indicator of cheese rigidity [133]. However, cheesemaking conditions influenced  $G^*_{1 \text{ Hz}}$  ( $p < 0.05$ ), as RO cheeses dry salted with TSC were softer than other types of cheeses. As shown in Figure 8,  $G^*_{1 \text{ Hz}}$  was highly influenced by cheese moisture, which agrees with other studies [120, 134, 135]. Increasing the moisture content of the cheese decreases  $G^*_{1 \text{ Hz}}$ . In addition, salting with TSC decreased the protein-to-fat ratio in the cheese and likely demineralized the protein matrix, both these factors can contribute to softening of the cheese [112, 136, 137]. The relationship between pH, casein-bound calcium and cheese texture is widely recognized [136]. In this study, it was not possible to link cheese mineralization to its viscoelastic properties, even though the rheological properties of cheese are known to be influenced by the ratio of soluble-to-colloidal Ca, the degree of paracasein hydration and the type/extent of protein interactions [138]. High-pH cheeses (5.3-5.6), such as gouda or Emmental, are generally considered to have a longer and softer texture than cheeses with a lower pH (4.9-5.3), such as cheddar and Parmesan, which have a shorter and crumbly texture [136].

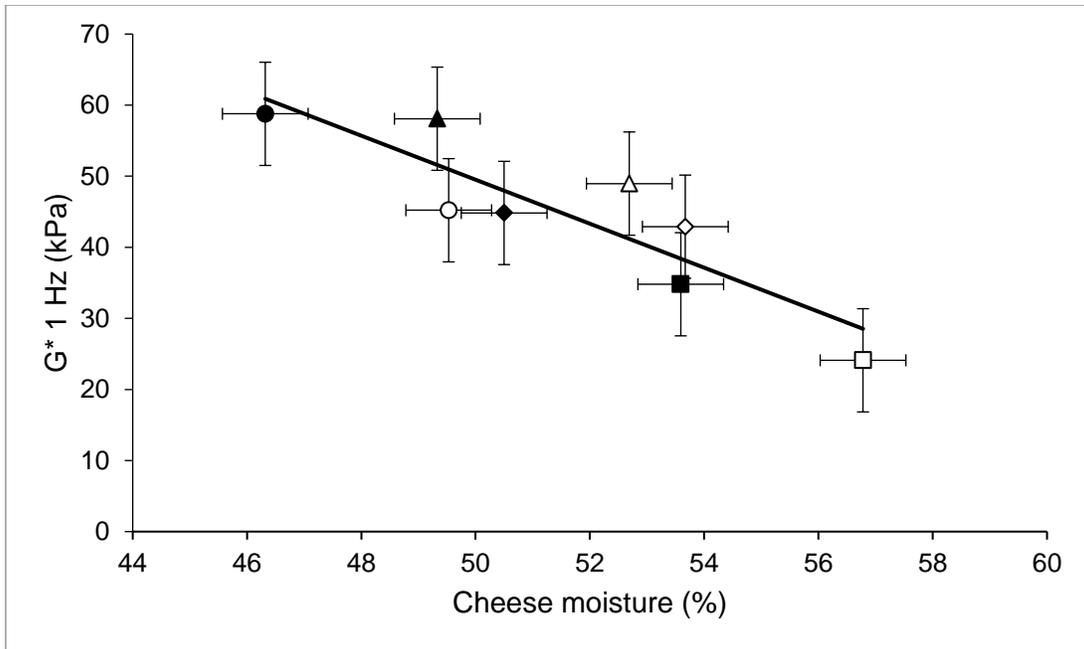


Figure 8 : Effect of moisture content on cheese complex modulus ( $G^*$  1 Hz) in Experiment 2. Cheeses were made from RO (white symbols) and UF (black symbols) concentrates. The pH of concentrates was adjusted at 5.80 (circles) or 6.20 (triangle), with the addition of trisodium citrate in the washing solution (diamonds) or as a dry-salting agent (squares).

Table 5: Influence of pH and curd washing (+WC) and dry salting (+SC) with trisodium citrate<sup>1</sup> on the properties of cheese made from UF and RO concentrates<sup>2</sup> (Experiment 2).

	UF				RO				STD error <sup>3</sup>
	pH 6.20	pH 6.20 +WC	pH 6.20 +SC	pH 5.80	pH 6.20	pH 6.20 +WC	pH 6.20 +SC	pH 5.80	
<i>Yield and recovery</i>									
Y <sup>4</sup> (%)	25.82 <sup>d</sup>	25.26 <sup>d</sup>	29.65 <sup>c</sup>	25.40 <sup>d</sup>	31.45 <sup>b</sup>	29.16 <sup>c</sup>	34.55 <sup>a</sup>	29.73 <sup>c</sup>	0.55
Y <sub>ma</sub> <sup>5</sup> (%)	26.25 <sup>d</sup>	24.94 <sup>e</sup>	26.95 <sup>cd</sup>	27.67 <sup>bc</sup>	28.90 <sup>ab</sup>	26.20 <sup>d</sup>	27.58 <sup>c</sup>	30.13 <sup>a</sup>	0.38
K <sub>p</sub> <sup>6</sup> (%)	76.36 <sup>a</sup>	74.46 <sup>bc</sup>	74.05 <sup>bc</sup>	76.47 <sup>a</sup>	75.55 <sup>ab</sup>	72.96 <sup>c</sup>	73.10 <sup>c</sup>	75.21 <sup>ab</sup>	0.52
K <sub>f</sub> <sup>7</sup> (%)	83.93 <sup>cd</sup>	76.18 <sup>e</sup>	90.59 <sup>ab</sup>	92.61 <sup>a</sup>	82.43 <sup>d</sup>	72.28 <sup>f</sup>	86.99 <sup>bc</sup>	91.56 <sup>a</sup>	1.21
<i>Cheese composition and rheology</i>									
Moisture (%)	49.33 <sup>c</sup>	50.50 <sup>c</sup>	53.59 <sup>b</sup>	46.32 <sup>d</sup>	52.69 <sup>b</sup>	53.67 <sup>b</sup>	56.78 <sup>a</sup>	49.53 <sup>c</sup>	0.75
Protein (% <sub>odm</sub> <sup>8</sup> )	47.33 <sup>ab</sup>	48.59 <sup>a</sup>	44.68 <sup>c</sup>	44.85 <sup>bc</sup>	41.75 <sup>d</sup>	44.58 <sup>c</sup>	41.12 <sup>d</sup>	40.81 <sup>d</sup>	0.93
Fat (% <sub>odm</sub> )	48.28 <sup>a</sup>	47.10 <sup>a</sup>	48.68 <sup>a</sup>	48.44 <sup>a</sup>	42.71 <sup>b</sup>	42.94 <sup>b</sup>	44.24 <sup>b</sup>	44.61 <sup>b</sup>	0.83
Other solids (% <sub>odm</sub> )	4.39 <sup>b</sup>	4.31 <sup>b</sup>	6.64 <sup>b</sup>	6.72 <sup>b</sup>	15.54 <sup>a</sup>	12.48 <sup>a</sup>	14.64 <sup>a</sup>	14.58 <sup>a</sup>	1.29
Ash (% <sub>odm</sub> )	4.47 <sup>c</sup>	4.34 <sup>cd</sup>	4.14 <sup>d</sup>	3.73 <sup>e</sup>	5.23 <sup>a</sup>	5.15 <sup>ab</sup>	4.93 <sup>b</sup>	4.46 <sup>c</sup>	0.11
Ca (% <sub>odm</sub> )	1.41 <sup>ab</sup>	1.42 <sup>ab</sup>	1.30 <sup>cd</sup>	1.19 <sup>e</sup>	1.39 <sup>b</sup>	1.49 <sup>a</sup>	1.34 <sup>bc</sup>	1.23 <sup>de</sup>	0.06
Ca (mg/g protein)	29.78 <sup>b</sup>	29.39 <sup>b</sup>	29.25 <sup>b</sup>	26.59 <sup>c</sup>	33.47 <sup>a</sup>	33.37 <sup>a</sup>	32.74 <sup>a</sup>	30.20 <sup>b</sup>	1.70
G* <sub>1 Hz</sub> <sup>9</sup> (kPa)	58 <sup>a</sup>	45 <sup>ab</sup>	35 <sup>bc</sup>	59 <sup>a</sup>	49 <sup>ab</sup>	43 <sup>abc</sup>	24 <sup>c</sup>	45 <sup>ab</sup>	7

<sup>a-e</sup> Values in the same row without a common superscript are significantly different (Tukey, p<0.05).

<sup>1</sup> Trisodium citrate dihydrate (EMD Chemicals, Darmstadt, Germany).

<sup>2</sup> Based on triplicate experiments.

<sup>3</sup> Standard error.

<sup>4</sup> Actual cheese yield.

<sup>5</sup> Cheese yield adjusted to 50% moisture.

<sup>6</sup> Protein recovery.

<sup>7</sup> Fat recovery.

<sup>8</sup> % dry matter.

<sup>9</sup> Complex modulus at a frequency of 1 Hz.

### 3.7 Conclusions

The aim of this study was to investigate approaches promoting drainage and demineralization of cheeses made from RO concentrate. Acidification of concentrates decreased the total calcium to protein ratio of the model cheese, and increased curd drainage, Y<sub>ma</sub> and fat recovery. Under the conditions tested, curd washing with water or with a solution of TSC did not facilitate the use of RO concentrates for cheesemaking, as it did not impact cheese mineralization and even decreased cheese yield and fat recovery. Dry salting with TSC increased cheese moisture and positively influenced fat recovery. Further investigation, regarding the effect of TSC on calcium equilibrium in cheese is needed to determine the potential of dry salting with TSC to improve the cheesemaking properties of concentrates. This study confirmed the importance of controlling pH to improve the cheesemaking performance of concentrates, and its fundamental impact on cheese mineralization and moisture. It also suggests that pH can play a major role in improving cheesemaking from RO concentrates. Even though cheeses made from RO concentrates had higher Y<sub>ma</sub> than cheeses made from UF concentrates, widespread usage of RO concentrates in the cheesemaking industry is still a challenge because of their high lactose and mineral content, which limits the range of applications. However, economic gain can be expected from this technology because it enhances production efficiency and significantly increases yields.

### 3.8 Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Novalait Inc. (IRDPJ-461630-12) and the Canadian Dairy Commission (CDC). The authors thank Diane Gagnon, Mélanie Martineau and Pascal Lavoie from the Department of Food Science at Laval University for their technical assistance during the experiments and Barb Conway for the editing of this manuscript.

## Conclusion générale

### a) Retour sur la méthodologie

La méthodologie utilisée a été déterminée par rapport à la littérature existante et aux méthodes officielles utilisées pour les analyses de lait et de fromage. L'ensemble des expériences a été répété trois fois dans le but de garantir la reproductibilité des résultats obtenus, à chaque fois avec un lot de lait différent. Toutes les analyses ont également été répétées deux à trois fois par échantillon. L'analyse de la variance a été réalisée avec un test de Tukey avec un niveau de confiance de 95 %, un test considéré particulièrement sévère et peu puissant, comme il vise à éviter toute erreur de type I. Il est donc possible d'affirmer avec confiance que les différences observées sont réelles.

Au premier objectif, la quantité d'eau utilisée pour le lavage des grains a été déterminée en s'inspirant de trois études détaillées dans la section 1.6.4 du Chapitre 1 [108, 109, 139]. Une quantité d'eau de lavage correspondant à 15 % de la masse de lait de départ a donc été utilisée pour le lavage des grains, ce qui est inférieur à la quantité habituellement utilisée pour le lavage du caillé, qui est d'environ 30 % dans les fromages de type Gouda [125]. L'objectif de l'utilisation d'une quantité d'eau réduite pour le lavage du caillé était de limiter l'utilisation d'eau au maximum. En effet, si l'on retire 50 % de l'eau du lait par OI, mais que la même quantité est réutilisée pour le lavage du caillé lors de la production du fromage, il n'y aura aucun effet positif sur l'éco-efficience du procédé fromager. Par exemple, aucune eau de procédé ne pourra être réutilisée à l'usine. De plus, la solution de lavage a été ajoutée dès le début de la cuisson pour maximiser le temps de contact avec le gel, dans le but de favoriser la déminéralisation du caillé. Cependant, le gel en début de cuisson n'était probablement pas assez structuré pour supporter la perturbation causée par l'ajout de la solution de lavage, ce qui a donc conduit à une diffusion du gras dans le lactosérum et à une baisse de rendement. En effet, lors de la fabrication fromagère, la majorité de la matière

grasse est perdue à la surface des grains pendant la coupe du gel et lors des premières minutes de brassage dans la cuve de fabrication [123].

Au deuxième objectif, le potentiel du TSC à déminéraliser le fromage modèle a été évalué. Au Canada, cet agent chélateur du calcium est uniquement autorisé dans les produits de fromage fondu. Il n'est donc à ce jour pas autorisé dans les fromages normalisés, comme le cheddar et la mozzarella. D'un point de vue expérimental, il demeurerait toutefois intéressant d'évaluer son effet sur la minéralisation des fromages. Il aurait été très pertinent d'évaluer son effet sur la distribution du calcium entre la phase soluble et colloïdale dans les fromages produits, mais il n'a pas été possible de l'inclure dans l'objectif 2 par manque de temps pour réaliser la partie expérimentale du projet. Dans l'éventualité où le TSC serait à nouveau étudié en fabrication fromagère à partir de concentrés laitiers, ces analyses devraient être effectuées en priorité, car la distribution du calcium entre la phase soluble et colloïdale influence la rhéologie du fromage [2].

Ces deux premiers objectifs impliquaient une fabrication fromagère en système modèle. Le système utilisé était grandement simplifié par rapport à un procédé industriel traditionnel. Cette simplification a été réalisée dans le but de contrôler un maximum de paramètres de fabrication et donc de garantir la reproductibilité des résultats. Notamment, aucun ferment n'a été utilisé pour la fabrication fromagère. Le pH des concentrés a donc été ajusté par acidification directe à l'aide de l'acide lactique jusqu'au pH visé par l'étude. En conséquence, les fromages obtenus par ce procédé contiennent plus de lactose et ont un pH final plus élevé qu'un fromage fabriqué selon un procédé traditionnel. Les bactéries lactiques sont ajoutées au lait avant l'étape d'emprésurage et transforment le lactose en acide lactique, ce qui abaisse le pH des grains et du lactosérum [140]. Également, la centrifugation a été utilisée comme méthode pour égoutter les caillés produits en remplacement d'un pressage mécanique traditionnel. Cette méthode de pressage est souvent utilisée lors de la fabrication fromagère en système modèle à cause de la faible masse de caillé produite. Lors de la centrifugation, la partie solide, qui représente le caillé, est pressée au fond du tube. Lors d'une centrifugation, la

séparation des particules est régie par la loi de Stokes, définie par l'équation (6) [141] :

$$\text{Vitesse de sédimentation} = V_S = \frac{2r^2 g \Delta\rho}{9\eta} \quad (6)$$

Dans cette équation, la composante  $V_S$  est la vitesse de sédimentation,  $r$  correspond au rayon de la particule en solution,  $\Delta\rho$  est la différence de densité entre la particule et le milieu où la particule est contenue,  $g$  correspond à l'accélération due à la force centrifuge et  $\eta$  est la viscosité de la solution. Or, la densité de la phase soluble des fromages produits variait fort probablement en fonction du type de filtration (UF ou OI), ainsi qu'en fonction de la présence ou de l'absence du sel (TSC). Il en est de même pour la viscosité. Ainsi, il est possible que l'humidité des fromages d'OI et des fromages salés avec le TSC ait été légèrement surestimée par ce facteur. Finalement, quelques étapes du procédé fromager traditionnel ont été délaissées, notamment la cheddarisation, le salage avec le NaCl, ainsi que l'affinage.

Les méthodes d'analyses utilisées pour réaliser le troisième objectif étaient en majorité les méthodes officielles. En revanche, la matière grasse et le lactose ont été mesurés par FTIR à l'aide du LactoScope™, qui est un appareil approuvé officiellement par AOAC International et l'IDF (International Dairy Federation) pour l'analyse rapide des matières grasses, des protéines, du lactose et des extraits secs dans le lait et les produits laitiers.

## b) Synthèse des résultats

Ce projet avait pour objectif d'adapter le procédé fromager aux caractéristiques spécifiques des concentrés laitiers d'OI à 7 % de protéines et avec matière grasse, dans le but de favoriser l'égouttage et la déminéralisation. L'hypothèse émise dans le cadre de cette étude était que les performances fromagères des concentrés laitiers d'OI pouvaient être optimisées par l'abaissement du pH, l'ajout d'une étape

de lavage des grains et l'emploi d'un agent chélateur du calcium. Les performances fromagères des concentrés d'OI sont améliorées lorsque le levier technologique contribue à déminéraliser et à abaisser l'humidité du fromage, en plus de ne pas affecter négativement les bilans fromagers, tels que le rendement et la rétention du gras. Cette hypothèse de recherche a été validée en partie, puisque l'abaissement du pH d'emprésurage a permis d'améliorer l'ensemble des performances fromagères des concentrés d'OI, tandis que l'utilisation du TSC sous forme de salage a permis d'améliorer certaines performances et que le lavage des grains n'a pas eu d'effet positif sur celles-ci. Les différents effets observés dans le cadre de ce projet sont synthétisés au Tableau 6 et l'atteinte des objectifs 1 et 2 en relation avec l'objectif 3 sera discutée dans les deux prochains paragraphes.

Le premier objectif du projet visait à évaluer l'efficacité du lavage des grains à déminéraliser et à égoutter le fromage modèle d'OI en fonction du pH d'emprésurage (6,2; 6,0; 5,8; 5,6). Le lavage du caillé n'a pas facilité l'utilisation des concentrés d'OI, car il n'y a eu aucun effet positif sur les différents paramètres analysés, sauf un effet négatif sur la rétention lipidique uniquement à pH 6,20. L'acidification jusqu'à un pH de 5,80 et 5,60 a quant à elle eu un effet très positif sur la fabrication fromagère à partir des concentrés d'OI. En effet, l'utilisation de ce levier a permis d'augmenter le rendement ajusté en humidité et la rétention lipidique ainsi que de diminuer la teneur en humidité, en cendres, en calcium et le ratio calcium / protéines du fromage. Évidemment, il a occasionné des pertes de rendement brut, causées par la perte d'humidité du caillé.

Les résultats obtenus au premier objectif ont permis de déterminer les leviers les plus prometteurs qui seraient étudiés à l'objectif 2, en plus de compléter l'analyse de leviers technologiques permettant la déminéralisation et l'égouttage du caillé. Le deuxième objectif visait donc à évaluer le potentiel de l'abaissement du pH d'emprésurage (5,8) et de l'utilisation du TSC comme agent chélateur du calcium, sous forme de lavage des grains et de salage à sec, à égoutter le fromage d'OI et à le déminéraliser en comparaison avec l'UF. La deuxième expérience a

permis de valider tous les effets positifs de l'acidification à un pH de 5,80 sur la fabrication fromagère à partir des concentrés d'OI relevés lors de la première expérience. Au contraire, le lavage du caillé avec TSC n'est pas une méthode à préconiser, car des effets négatifs ont été observés sur les bilans fromagers, notamment au niveau du rendement ajusté en humidité, de la rétention protéique et de la rétention lipidique. De plus, ce traitement n'a pas facilité l'utilisation des concentrés d'OI, car il n'y a eu aucun effet sur l'humidité et la minéralisation du fromage. Le salage avec le TSC a eu un effet positif global sur la fabrication fromagère à partir des concentrés d'OI. En effet, il a permis d'augmenter le rendement brut et la rétention lipidique, en plus d'abaisser la teneur en cendre du fromage et sa rigidité. Il a toutefois abaissé le rendement ajusté en humidité, par une diminution de la rétention protéique et l'augmentation de l'humidité du fromage.

Globalement, il a été possible de montrer que l'utilisation des concentrés d'OI pour la fabrication fromagère permet un rendement de production supérieur à ceux obtenus pour l'UF. Les fromages d'OI sont plus humides et plus minéralisés que ceux d'UF, d'où la nécessité de développer des leviers permettant de corriger ces défauts. En revanche, l'utilisation généralisée des concentrés d'OI dans l'industrie fromagère demeure un défi en raison de leur teneur élevée en lactose, qui limite leur spectre d'application. Néanmoins, il est permis de s'attendre à des gains économiques importants avec cette technologie.

Ce projet a contribué à la compréhension de la fabrication fromagère à partir des concentrés d'OI. Il a permis de cibler des leviers permettant l'adaptation du procédé fromager à leurs caractéristiques spécifiques. Ce projet permet de faire un pas vers l'utilisation des concentrés d'OI en industrie, ce qui permettrait d'obtenir des fromages aux fonctionnalités semblables à ceux obtenus traditionnellement, tout en augmentant les rendements et l'efficacité de production et en générant de l'eau de procédé. Plusieurs étapes sont toutefois encore nécessaires avant d'envisager une telle utilisation.

Tableau 6: Synthèse de l'effet de la concentration par OI et des leviers technologiques étudiés sur les paramètres de composition et de propriété fromagère mesurés lors des expériences 1 et 2.

Paramètre	OI comparé à UF <sup>1, 3</sup>	Lever technologique appliqué à la fabrication fromagère d'OI <sup>2</sup>			
		Acidification <sup>3,4</sup>	Lavage <sup>5</sup>	Lavage TSC <sup>6</sup>	Salage TSC <sup>6</sup>
Rendement	↑	↓	∅	∅	↑
Rendement ajusté en humidité	↑	↑	∅	↓	↓
Rétention protéique	∅	∅	∅	↓	↓
Rétention lipidique	∅	↑	↓	↓	↑
Humidité	↑	↓	∅	∅	↑
Autres solides (lactose)	↑	∅	∅	∅	∅
Teneur en cendre	↑	↓	∅	∅	↓
Ratio calcium / protéines	↑	↓	∅	∅	∅
Rigidité	∅	∅	S. O.	∅	↓
Bilan		Très positif	Négatif	Très négatif	Positif

∅ = pas d'effet significatif; ↑ = augmentation significative ( $p < 0,05$ ); ↓ = diminution significative ( $p < 0,05$ ); S. O. = sans objet.

<sup>1</sup> : L'OI à pH 6,20 comparée à l'UF à pH 6,20.

<sup>2</sup> : En comparaison avec l'OI à pH 6,20.

<sup>3</sup> : Acidification à un pH de 5,80 et 5,60.

<sup>4</sup> : Effets observés pour les expériences 1 et 2.

<sup>5</sup> : Effets observés dans l'expérience 1.

<sup>6</sup> : Effets observés dans l'expérience 2.

### c) Perspectives

Dans cette étude, différentes approches favorisant l'égouttage et la déminéralisation des fromages fabriqués à partir du concentré d'OI ont été évaluées en système modèle. L'hypothèse a été validée en partie puisque l'abaissement du pH a permis d'améliorer l'ensemble des performances fromagères des concentrés d'OI, tandis que l'utilisation du TSC sous forme de salage a permis d'améliorer certaines performances, mais a causé une augmentation de l'humidité du fromage, ainsi qu'une diminution de la rétention protéique.

Comme discuté précédemment, le système modèle utilisé permettait une bonne reproductibilité des résultats, mais limite l'application directe des conclusions obtenues au procédé de fabrication fromagère à l'échelle industrielle. Des tests plus complets à l'échelle pilote seraient nécessaires pour supporter la conclusion que l'abaissement du pH d'emprésurage facilite l'utilisation des concentrés d'OI en cuve. Ces tests pourraient inclure une fabrication fromagère avec ferments et des étapes de brassage et de pressage mécanique, ainsi que de salage avec NaCl. Dans le cas du salage avec TSC, l'utilisation d'un pressage mécanique permettrait de rétablir l'écart observé au niveau de l'humidité du fromage, probablement causé par le pressage par centrifugation. Il pourrait d'ailleurs être intéressant de combiner ces deux leviers dans une même fabrication pour évaluer leur potentiel à modifier l'équilibre du calcium entre la phase soluble et colloïdale et à abaisser l'humidité du fromage.

Plusieurs autres paramètres pourraient être modifiés dans le but de favoriser la déminéralisation des micelles de caséines et l'égouttage du fromage. Notamment, des essais d'emprésurage à froid pourraient être effectués, ce qui permettrait la solubilisation d'une partie du CCP [10]. Également, un agent chélateur pourrait être ajouté directement au concentré laitier avant la fabrication fromagère, dans le but de favoriser le passage du calcium sous forme soluble. Dans un contexte canadien où le TSC n'est pas autorisé dans la fabrication de fromages normalisés,

la sélection d'une souche de ferments productrice d'un agent chélateur du calcium, comme le citrate, apparaît comme une option fort intéressante, bien que complexe. En effet, la teneur en calcium soluble augmente avec la teneur en citrate du lait [142, 143].

Plutôt que de développer des leviers permettant de réduire la teneur en lactose des fromages d'OI, ce qui invaliderait son principal avantage qui consiste à améliorer les rendements de production, il serait d'intérêt de cibler des types de fromages qui se prêtent davantage à un contenu élevé en lactose. Par exemple, le filage de la mozzarella à des températures de 75 à 85 °C inactive les ferments lactiques [144], ce qui permet d'éviter la production excessive d'acide lactique lors de l'entreposage. Par contre, un fromage contenant une grande quantité de lactose n'est pas souhaitable pour une utilisation en tant qu'ingrédient à pizza, car le niveau de brunissement est un indicateur de qualité pour cette application [145]. Également, il pourrait être possible de fabriquer une base fromagère à partir du concentré d'OI qui serait utilisée pour la production de fromage fondu. En effet, une base fromagère faite de concentré d'UF peut efficacement remplacer les jeunes fromages dans la fabrication de fromage fondu [73].

Finalement, il serait important d'effectuer une analyse de cycle de vie (ACV) traitant de différents scénarios impliquant la préconcentration du lait de fromagerie par OI, dans laquelle l'augmentation de l'efficacité de production et des rendements serait prise en compte. Plus précisément, il serait possible d'effectuer une ACV qui évaluerait la production d'un concentré d'OI directement à la ferme ou dans un centre de concentration régional et qui serait ensuite acheminé à une usine de transformation. Un scénario pourrait également inclure la concentration du lait directement à l'usine de transformation fromagère, en comparaison avec un procédé plus traditionnel qui inclurait une OI de perméat d'UF de lait ou de lactosérum. Sur la prémisse que les fromages produits seraient comparables, il serait alors possible de conclure si la préconcentration du lait de fromagerie a un impact favorable sur l'environnement par rapport au procédé traditionnel, en plus de générer des gains économiques.

## Bibliographie

1. *L'industrie laitière canadienne en chiffre*. 2016: Agriculture et Agroalimentaire Canada.
2. Henning, D.R., et al., *Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads*. Journal of Dairy Science, 2006. **89**(4): p. 1179-1188.
3. Rosenberg, M., *Current and future applications for membrane processes in the dairy industry*. Trends in Food Science & Technology, 1995. **6**(1): p. 12-19.
4. Dussault-Chouinard, I., M. Britten, and Y. Pouliot, *Improving rennet coagulation and cheesemaking properties of reverse osmosis skim milk concentrates by pH adjustment*. International Dairy Journal, 2019. **95**: p. 6-14.
5. Lauzin, A., et al., *Impact of membrane selectivity on the compositional characteristics and model cheese-making properties of liquid pre-cheese concentrates*. International Dairy Journal, 2018. **83**: p. 34-42.
6. Lauzin, A., et al., *Effect of pH adjustment on the composition and rennet-gelation properties of milk concentrates made from ultrafiltration and reverse osmosis*. Journal of Dairy Science, 2019. **102**(5): p. 3939-3946.
7. Vuilleumard, J.-C., *Composition et propriétés physicochimiques du lait*, in *Science et technologie du lait*. 2018, Presses de l'Université Laval. p. 1-36.
8. Fox, P.F., et al., *Chemistry of milk constituents*, in *Fundamentals of Cheese Science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 71-104.
9. Fox, P.F., et al., *Chemistry and biochemistry of cheese*, in *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 2015, Springer. p. 499-546.
10. Gaucheron, F., *The minerals of milk*. Reproduction Nutrition Development, 2005. **45**(4): p. 473-483.
11. Holt, C., *Structure and stability of bovine casein micelles*, in *Advances in Protein Chemistry*. 1992, Elsevier. p. 63-151.
12. De Kruif, C.G. and C. Holt, *Casein micelle structure, functions and interactions*, in *Advanced Dairy Chemistry - Volume 1: Proteins*. 2003, Springer. p. 233-276.

13. Horne, D.S., *Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products*. International Dairy Journal, 1998. **8**(3): p. 171-177.
14. Horne, D.S., *Casein micelle structure: models and muddles*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2006. **11**(2-3): p. 148-153.
15. Gaucheron, F., *Milk salts: Distribution and analysis*, in *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2011, Academic Press.
16. Slattery, C.W. and R. Evard, *A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1973. **317**(2): p. 529-538.
17. Schmidt, D.G., *Association of caseins and casein micelle structure*, in *Developments in Dairy Chemistry*. 1982, Elsevier Applied Science Publishers.
18. Walstra, P., *On the stability of casein micelles*. Journal of Dairy Science, 1990. **73**(8): p. 1965-1979.
19. Rollema, H.S., *Casein association and micelle formation*, in *Proteins*. 1992, Elsevier Applied Science Publishers.
20. Bylund, G. and S. Tetra Pak Processing, *Dairy Processing Handbook*. 2015: Tetra Pak Processing Systems AB.
21. de la Fuente, M.A., *Changes in the mineral balance of milk submitted to technological treatments*. Trends in Food Science & Technology, 1998. **9**(7): p. 281-288.
22. Fox, P.F., et al., *Heat-induced changes in milk*, in *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 2015, Springer. p. 345-375.
23. Holt, C., *Effect of heating and cooling on the milk salts and their interaction with casein*, in *International Dairy Federation*. 1995, FIL-IDF. p. 105-133.
24. Rose, D. and H. Tessier, *Composition of ultrafiltrates from milk heated at 80 to 230 F. In relation to heat stability*. Journal of Dairy Science, 1959. **42**(6): p. 969-980.
25. Fox, P.F., et al., *Salts of milk*, in *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 2015, Springer. p. 241-270.

26. Pierre, A. and G. Brule, *Mineral and protein equilibria between the colloidal and soluble phases of milk at low temperature*. Journal of Dairy Research, 1981. **48**(3): p. 417-428.
27. St-Gelais, D., *Les fromages*, in *Science et technologie du lait*. 2018, Presses de l'Université Laval.
28. Panthi, R.R., et al., *Selection and treatment of milk for cheesemaking*, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2017, Elsevier. p. 23-50.
29. Leone, Y., et al., *Le refroidissement du lait et son comportement en fromagerie. I. Incidences du refroidissement du lait sur ses caractères physicochimiques et son comportement vis-à-vis de la présure*. Lait. Fr, 1981. **401**: p. 7-18.
30. Lucey, J.A. and P.F. Fox, *Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review*. Journal of Dairy Science, 1993. **76**(6): p. 1714-1724.
31. Dalgleish, D.G. and A.J.R. Law, *pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins*. Journal of Dairy Research, 1988. **55**(4): p. 529-538.
32. Lucey, J.A., et al., *Dissociation of colloidal calcium phosphate-depleted casein particles as influenced by pH and concentration of calcium and phosphate*. Milchwissenschaft, 1997. **52**(11): p. 603-606.
33. Le Graet, Y. and G. Brulé, *Les équilibres minéraux du lait: influence du pH et de la force ionique*. Le Lait, 1993. **73**(1): p. 51-60.
34. Croguennec, T., R. Jeantet, and G. Brulé, *Chapitre 6. Stabilité des micelles de caséines*, in *Fondements physicochimiques de la technologie laitière*. 2008, Lavoisier.
35. Moitzi, C., et al., *The pH induced sol– gel transition in skim milk revisited. A detailed study using time-resolved light and X-ray scattering experiments*. Langmuir, 2010. **27**(6): p. 2195-2203.
36. Casiraghi, E. and M. Lucisano, *Rennet Coagulation of Milk Retentates - Effect of the Addition of Sodium-Chloride and Citrate before Ultrafiltration*. Milchwissenschaft, 1991. **46**(12): p. 775-778.
37. Morr, C.V., *Some effects of pyrophosphate and citrate ions upon the colloidal caseinate-phosphate micelles and ultrafiltrate of raw and heated skim milk*. Journal of Dairy Science, 1967. **50**(7): p. 1038-1044.

38. Odagiri, S. and T.A. Nickerson, *Complexing of calcium by hexametaphosphate, oxalate, citrate, and ethylenediamine-tetraacetate in milk. II. Dialysis of milk containing complexing agents*. Journal of Dairy Science, 1965. **48**(1): p. 19-22.
39. Udabage, P., I.R. McKinnon, and M.-A. Augustin, *Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium-chelating agents*. Journal of Dairy Research, 2000. **67**(3): p. 361-370.
40. Kaliappan, S. and J.A. Lucey, *Influence of mixtures of calcium-chelating salts on the physicochemical properties of casein micelles*. Journal of Dairy Science, 2011. **94**(9): p. 4255-4263.
41. Le Ray, C., et al., *Heat stability of reconstituted casein micelle dispersions: changes induced by salt addition*. Le Lait, 1998. **78**(4): p. 375-390.
42. Philippe, M., Y. Le Graët, and F. Gaucheron, *The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles*. Food Chemistry, 2005. **90**(4): p. 673-683.
43. Philippe, M., et al., *Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk*. Le Lait, 2003. **83**(1): p. 45-59.
44. Fox, P.F., et al., *Overview of cheese manufacture*, in *Fundamentals of Cheese Science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 11-25.
45. Bintsis, T. and P. Papademas, *An overview of the cheesemaking process*, in *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*. 2017, Wiley. p. 120-156.
46. Legg, A.K., et al., *General aspects of cheese technology*, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2017, Academic Press. p. 643-675.
47. Johnson, E.A., J.H. Nelson, and M. Johnson, *Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, Part II. Microbiology*. Journal of Food Protection, 1990. **53**(6): p. 519-540.
48. Fox, P.F., et al., *Enzymatic coagulation of milk*, in *Fundamentals of Cheese Science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 185-229.
49. Harboe, M., M.L. Broe, and K.B. Qvist, *The production, action and application of rennet and coagulants*, in *Technology of Cheesemaking*. 2010, Blackwell Publishing Ltd. p. 98-129.
50. Wolfschoon-Pombo, A.F., *Influence of calcium chloride addition to milk on the cheese yield*. International Dairy Journal, 1997. **7**(4): p. 249-254.

51. Guinee, T.P. and B. O'Brien, *The quality of milk for cheese manufacture*, in *Technology of Cheesemaking*. 2010, Blackwell Publishing Ltd. p. 1-67.
52. Guinee, T.P., B.T. O'Kennedy, and P.M. Kelly, *Effect of Milk Protein Standardization Using Different Methods on the Composition and Yields of Cheddar Cheese*. *Journal of Dairy Science*, 2006. **89**(2): p. 468-482.
53. Ong, L., et al., *Microstructure and composition of full fat Cheddar cheese made with ultrafiltered milk retentate*. *Foods*, 2013. **2**(3): p. 310-331.
54. Guinee, T.P., et al., *The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation properties of milk*. *International Journal of Dairy Technology*, 1997. **50**(3): p. 99-106.
55. Robitaille, G., K.F. Ng-Kwai-Hang, and H.G. Monardes, *Effect of  $\kappa$ -casein glycosylation on cheese yielding capacity and coagulating properties of milk*. *Food Research International*, 1993. **26**(5): p. 365-369.
56. Wedholm, A., et al., *Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows*. *Journal of Dairy Science*, 2006. **89**(9): p. 3296-3305.
57. Guinee, T.P., et al., *Effect of protein-to-fat ratio of milk on the composition, manufacturing efficiency, and yield of Cheddar cheese*. *Journal of Dairy Science*, 2007. **90**(1): p. 110-123.
58. Ford, G.D. and A.S. Grandison, *Effect of size of casein micelles on coagulation properties of skim milk*. *Journal of Dairy Research*, 1986. **53**(1): p. 129-133.
59. Kelly, A.L., *Why must milk be standardised for cheesemaking?*, in *Cheese problems solved*. 2007, Woodhead Publishing Limited. p. 18.
60. Dalgleish, D.G., *Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin*. *Journal of Dairy Research*, 1979. **46**(4): p. 653-661.
61. Dalgleish, D.G., *Effect of milk concentration on the rennet coagulation time*. *Journal of Dairy Research*, 1980. **47**(2): p. 231-235.
62. Johnson, M.E., C.M. Chen, and J.J. Jaeggi, *Effect of rennet coagulation time on composition, yield, and quality of reduced-fat Cheddar cheese*. *Journal of Dairy Science*, 2001. **84**(5): p. 1027-1033.

63. Lucey, J.A., M.E. Johnson, and D.S. Horne, *Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese*. Journal of Dairy Science, 2003. **86**(9): p. 2725-2743.
64. Lawrence, R.C., J. Gilles, and L.K. Creamer, *The relationship between cheese texture and flavour*. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 1983. **18**(3): p. 175-190.
65. Lawrence, R.C., H.A. Heap, and J. Gilles, *A controlled approach to cheese technology*. Journal of Dairy Science, 1984. **67**(8): p. 1632-1645.
66. Fox, P.F., et al., *Salting of cheese curd*, in *Fundamentals of Cheese Science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 251-277.
67. Bintsis, T., *Quality of the brine*, in *Brined Cheeses*. 2006, Blackwell Publishing Ltd. p. 264-301.
68. Fox, P.F., *Significance of salt in cheese ripening*. Dairy Industries International, 1987. **52**: p. 19.
69. Fox, P.F., et al., *Biochemistry of cheese ripening*, in *Fundamentals of Cheese Science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 391-442.
70. Shakeel-Ur-Rehman, P.F. Fox, and P.L. McSweeney, *Methods used to study non-starter microorganisms in cheese: a review*. International Journal of Dairy Technology, 2000. **53**(3): p. 113-119.
71. Prazeres, A.R., F. Carvalho, and J. Rivas, *Cheese whey management: A review*. Journal of Environmental Management, 2012. **110**: p. 48-68.
72. Kumar, P., et al., *Perspective of membrane technology in dairy industry: A review*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2013. **26**(9): p. 1347.
73. Mistry, V.V. and J.-L. Maubois, *Application of membrane separation technology to cheese production*, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2017, Elsevier. p. 677-697.
74. Pierre, A., et al., *Industrie laitière*, in *Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire*. 1998, Lavoisier Tec & Doc: Paris. p. 282-371.
75. Piot, M., et al., *Écrémage et épuration bactérienne du lait entier cru par microfiltration sur membrane en flux tangentiel*. Tech Lait Market, 1987. **1016**: p. 42-46.

76. Saboya, L.V. and J.L. Maubois, *Current developments of microfiltration technology in the dairy industry*. Le Lait, 2000. **80**(6): p. 541-553.
77. Maubois, J.L., et al. *Industrial fractionation of main whey proteins*. in *International Dairy Federation*. 1987. FIL-IDF.
78. Maubois, J.L., G. Mocquot, and L. Vassal, *A method for processing milk and dairy products*. 1969, 2052.121: France.
79. Horton, B.S., *Water, chemical and brine recycle or reuse - Applying membrane processes*. Australian Journal of Dairy Technology, 1997. **52**(1): p. 68.
80. Van der Horst, H.C., et al., *Use of nanofiltration for concentration and demineralization in the dairy industry: Model for mass transport*. Journal of Membrane Science, 1995. **104**(3): p. 205-218.
81. Kelly, P.M., *Partial demineralization of whey by nanofiltration*, in *New Application of Membrane Processes*. 1992, IDF-FIL. p. 130-140.
82. Agbevavi, T., D. Rouleau, and R. Mayer, *Production and quality of Cheddar cheese manufactured from whole milk concentrated by reverse osmosis*. Journal of Food Science, 1983. **48**(2): p. 642-643.
83. Bazinet, L., et al., *Opérations unitaires et notions de génie industriel laitier appliquées*, in *Science et technologie du lait*. 2018, Presses de l'Université Laval.
84. Brulé, G., J.L. Maubois, and J. Fauquant, *Étude de la teneur en éléments minéraux des produits obtenus lors de l'ultrafiltration du lait sur membrane*. Le Lait, 1974. **54**(539-540): p. 600-615.
85. Barbano, D.M. and D.G. Bynum, *Whole milk reverse osmosis retentates for Cheddar cheese manufacture: cheese composition and yield*. Journal of Dairy Science, 1984. **67**(12): p. 2839-2849.
86. Maubois, J.L., et al., *Préparation de fromage à partir de "pré-fromage liquide" obtenu par ultrafiltration du lait*. Le Lait, 1971. **51**(508): p. 495-533.
87. Garnot, P., T.C. Rank, and N.F. Olson, *Influence of Protein and Fat Contents of Ultrafiltered Milk on Rheological Properties of Gels Formed by Chymosin1*. Journal of Dairy Science, 1982. **65**(12): p. 2267-2273.
88. Barbano, D.M., D.G. Bynum, and G.F. Senyk, *Influence of reverse osmosis on milk lipolysis*. Journal of Dairy Science, 1983. **66**(12): p. 2447-2451.

89. Barbano, D.M. *Reverse osmosis prior to cheese making*. in *International Dairy Federation*. 1986. FIL-IDF.
90. Maubois, J.L., *Application des techniques à membrane dans l'industrie fromagère*. *Génie Rural*, 1979(3): p. 15-19.
91. Brule, G., et al., *Utilisation de l'ultrafiltration sur membrane pour la fabrication de fromages de type pâtes fraîches*. *Rev Lait Fr*, 1975. **328**: p. 117-122.
92. Green, M.L., *Effect of manipulation of milk composition and curd-forming conditions on the formation, structure and properties of milk curd*. *Journal of Dairy Research*, 1987. **54**(2): p. 303-313.
93. Sørensen, I., et al., *Rennet coagulation and calcium distribution of raw milk reverse osmosis retentate*. *International Dairy Journal*, 2019. **95**: p. 71-77.
94. Fox, P.F., et al., *Microbiology of cheese ripening*, in *Fundamentals of cheese science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 333-390.
95. Lelievre, J. and R.C. Lawrence, *Manufacture of cheese from milk concentrated by ultrafiltration*. *Journal of Dairy Research*, 1988. **55**(3): p. 465-478.
96. De Koning, P.J., et al., *Comparison of proteolysis in a low-fat semi-hard type of cheese manufactured by standard and by ultrafiltration techniques*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 1981. **35**(1): p. 35-46.
97. Furtado, M.M. and J.A. Partridge, *Characterization of nitrogen fractions during ripening of a soft cheese made from ultrafiltration retentates*. *Journal of Dairy Science*, 1988. **71**(11): p. 2877-2884.
98. Harper, J., et al., *Effects of whey proteins on the proteolysis of Cheddar cheese slurries (a model for the maturation of cheeses made from ultrafiltered milk)*. *Journal of Dairy Science*, 1989. **72**(2): p. 333-341.
99. Broome, M.C., et al., *Low-concentration-ratio ultrafiltration for Cheddar cheese manufacture: 2. Effect on maturation*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 1998. **53**(1): p. 11.
100. Guinee, T.P., P.D. Pudja, and E.O. Mulholland, *Effect of milk protein standardization, by ultrafiltration, on the manufacture, composition and maturation of Cheddar cheese*. *Journal of Dairy Research*, 1994. **61**(1): p. 117-131.

101. Saboya, L.V., et al., *Impact of broken cells of lactococci or propionibacteria on the ripening of Saint-Paulin UF-cheeses: extent of proteolysis and GC-MS profiles*. *Le Lait*, 2001. **81**(6): p. 699-713.
102. Marshall, R.J., *An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk*. *Journal of Dairy Research*, 1982. **49**(2): p. 329-336.
103. Lucey, J.A., *The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels*. *Food Hydrocolloids*, 2001. **15**(4-6): p. 603-608.
104. Walstra, P., H.J.M. Van Dijk, and T.J. Geurts, *The syneresis of curd. 1. General considerations and literature review*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 1985. **39**: p. 209-246.
105. Castillo, M., et al., *Effect of temperature and inoculum concentration on gel microstructure, permeability and syneresis kinetics. Cottage cheese-type gels*. *International Dairy Journal*, 2006. **16**(2): p. 153-163.
106. Hussain, I., A.S. Grandison, and A.E. Bell, *Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk. 1: Rheology and microstructure*. *Food Chemistry*, 2012. **134**(3): p. 1500-1508.
107. Upreti, P., L.L. McKay, and L.E. Metzger, *Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: Changes in residual sugars and water-soluble organic acids during ripening*. *Journal of Dairy Science*, 2006. **89**(2): p. 429-443.
108. Lee, M.R., et al., *Effect of different curd-washing methods on the insoluble Ca content and rheological properties of Colby cheese during ripening*. *Journal of Dairy Science*, 2011. **94**(6): p. 2692-2700.
109. Hou, J., et al., *Effect of curd washing on composition, lactose metabolism, pH, and the growth of non-starter lactic acid bacteria in full-fat Cheddar cheese*. *International Dairy Journal*, 2012. **25**(1): p. 21-28.
110. Brickley, C.A., J.A. Lucey, and P.L. McSweeney, *Effect of the addition of trisodium citrate and calcium chloride during salting on the rheological and textural properties of Cheddar-style cheese during ripening*. *International Journal of Dairy Technology*, 2009. **62**(4): p. 527-534.
111. Mizuno, R. and J.A. Lucey, *Effects of two types of emulsifying salts on the functionality of nonfat pasta filata cheese*. *Journal of Dairy Science*, 2005. **88**(10): p. 3411-3425.

112. Pastorino, A.J., et al., *Effect of calcium and water injection on structure-function relationships of cheese*. Journal of Dairy Science, 2003. **86**(1): p. 105-113.
113. Caric, M., et al., *Technology of evaporators, membrane processing and dryers*, in *Dairy Powders & Concentrated Products*. 2009, Wiley-Blackwell. p. 99-148.
114. Hansen, R., *A complete plant for automatic large-scale production of Feta-cheese from an ultrafiltration concentrate*. Nordeuropaeisk Mejeri-Tidsskrift, 1980. **46**(6): p. 149-151.
115. Mistry, V.V., *Low fat cheese technology*. International Dairy Journal, 2001. **11**(4-7): p. 413-422.
116. Banks, J.M., *The technology of low-fat cheese manufacture*. International Journal of Dairy Technology, 2004. **57**(4): p. 199-207.
117. Perreault, V., et al., *Combined effect of denatured whey protein concentrate level and fat level in milk on rennet gel properties*. International Dairy Journal, 2016. **55**: p. 1-9.
118. Morin, P., Y. Pouliot, and M. Britten, *Effect of buttermilk made from creams with different heat treatment histories on properties of rennet gels and model cheeses*. Journal of Dairy Science, 2008. **91**(3): p. 871-882.
119. AOAC, *Nitrogen (total) in milk, method no. 991.20*, in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, W. Horowitz, Editor. 2005, AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.
120. Perreault, V., et al., *Effect of denatured whey protein concentrate and its fractions on cheese composition and rheological properties*. Journal of Dairy Science, 2017. **100**(7): p. 5139-5152.
121. Glover, F.A., *Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry*. 1985, Reading, England: National Institute for research in Dairying.
122. Soodam, K. and T.P. Guinee, *The case for milk protein standardisation using membrane filtration for improving cheese consistency and quality*. International Journal of Dairy Technology, 2018. **71**(2): p. 277-291.
123. Fox, P.F., et al., *Cheese yield*, in *Fundamentals of Cheese Science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 279-331.
124. Fagan, C.C., et al., *The syneresis of rennet-coagulated curd*, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2017, Elsevier. p. 145-177.

125. Fox, P.F., et al., *Principal Families of Cheese*, in *Fundamentals of Cheese Science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 27-69.
126. Daviau, C., et al., *Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment*. *Le Lait*, 2000. **80**(4): p. 397-415.
127. Guinee, T.P., et al., *The compositional and functional properties of commercial Mozzarella, Cheddar and analogue pizza cheeses*. *International Journal of Dairy Technology*, 2000. **53**(2): p. 51-56.
128. Kindstedt, P.S., et al., *A post-manufacture method to evaluate the effect of pH on Mozzarella cheese characteristics*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2001. **56**(3): p. 202-207.
129. Ge, Q., M. Almena-Aliste, and P.S. Kindstedt, *Reversibility of pH-induced changes in the calcium distribution and melting*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2002. **57**: p. 3-9.
130. Metzger, L.E., et al., *Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella cheese. I. Composition and yield*. *Journal of Dairy Science*, 2000. **83**(4): p. 648-658.
131. Fox, P.F., et al., *Processed cheese and substitute/imitation cheese products*, in *Fundamentals of Cheese Science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 589-627.
132. Dickinson, E., *Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions*. *International Dairy Journal*, 1999. **9**(3-6): p. 305-312.
133. Banville, V., et al., *Shreddability of pizza Mozzarella cheese predicted using physicochemical properties*. *Journal of Dairy Science*, 2014. **97**(7): p. 4097-4110.
134. Creamer, L.K. and N.F. Olson, *Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese*. *Journal of Food Science*, 1982. **47**(2): p. 631-636.
135. Luyten, H., *The rheological and fracture properties of Gouda cheese*, in *Department of Food Science*. 1988, Wageningen Agricultural University: The Netherlands.
136. Fox, P.F., et al., *Cheese: Structure, rheology and texture*, in *Fundamentals of Cheese Science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 475-532.

137. Guinee, T.P., M.A.E. Auty, and M.A. Fenelon, *The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese*. International Dairy Journal, 2000. **10**(4): p. 277-288.
138. Guinee, T.P., *Protein in cheese and cheese products: Structure-function relationships*, in *Advanced Dairy Chemistry - Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*. 2016, Springer. p. 347-415.
139. Upreti, P. and L.E. Metzger, *Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: Manufacture and composition*. Journal of Dairy Science, 2006. **89**(2): p. 420-428.
140. Fox, P.F., et al., *Starter cultures*, in *Fundamentals of cheese science*. 2017, Springer: New York, NY, USA. p. 121-183.
141. Letki, A. and N. Corner-Walker, *Centrifugal Separation*. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 2004.
142. Holt, C. and D.D. Muir, *Inorganic constituents of milk: I. Correlation of soluble calcium with citrate in bovine milk*. Journal of Dairy Research, 1979. **46**(3): p. 433-439.
143. Tsioulpas, A., A.S. Grandison, and M.J. Lewis, *Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation*. Journal of Dairy Science, 2007. **90**(11): p. 5012-5017.
144. Gonçalves, M.C. and H.R. Cardarelli, *Changes in water mobility and protein stabilization of Mozzarella cheese made under different stretching temperatures*. LWT, 2019. **104**: p. 16-23.
145. Jana, A.H. and G.P. Tagalpallewar, *Functional properties of Mozzarella cheese for its end use application*. Journal of Food Science and Technology, 2017. **54**(12): p. 3766-3778.