

Thèse de Doctorat

Thibault LOISELEUX

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : EGAAL

Discipline : Sciences de l'aliment

Unité de recherche : INRA UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages

Soutenue le 10 Novembre 2017

Compétition interfaciale entre protéines solubles et agrégées : connectivité des gouttelettes et texture des émulsions laitières

JURY

Président du jury	Jack Legrand , Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs :	Fernando Leal Calderon , Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, de Biologie et de Physique, Bordeaux Sylvie Marchesseau , Professeur, Université Montpellier
Examineurs :	Frédéric Violleau , Professeur, PURPAN, Toulouse
Invité(s) :	Thomas Croguennec , Professeur, Agrocampus-ouest, Rennes Catherine Garnier , Chargée de recherche, Institut National de Recherche Agronomique, Nantes Annabelle Zgoda , Directrice de recherche, Lactalis, Retiers
Directeur de Thèse :	Marc Anton , Directeur de recherche, Institut National de Recherche Agronomique, Nantes
Co-directeur de Thèse :	Alain Riaublanc , Chargé de recherche, Institut National de Recherche Agronomique, Nantes

Remerciements

Bon, je vais essayer de n'oublier personne (ce n'est pas gagné...)

Ces trois ans de thèse ont été une vraie partie de plaisir rendu possible grâce à toutes les personnes qui m'entourent de manière directe ou indirecte.

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury : Mme Sylvie Marchesseau, M. Fernando Leal Calderon, M. Jack Legrand et M. Frédéric Violleau d'avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Je remercie également mon directeur de thèse, Marc (même si ce dernier est fan de foot), de m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse ainsi que mes encadrants : Catherine, Alain et Thomas pour leur disponibilité et leur soutien durant ce doctorat. Merci à vous pour votre sympathie, j'ai vraiment apprécié travailler avec vous et j'espère avoir encore l'occasion de participer à des projets en votre compagnie. Merci à Annabelle Zgoda de m'avoir consacré du temps au cours de ces trois années. J'ai beaucoup appris grâce à vous et je n'aurai jamais eu autant de résultats sans votre aide, MERCI à vous cinq. Je remercie également tous les membres du comité de thèse.

Merci aux régions Bretagne et Pays de la Loire pour le financement de ce merveilleux projet PROFIL dont cette thèse fait partie. Merci à Joëlle Léonil pour la coordination scientifique et à BBA pour la gestion du projet. Un grand merci à Morgane Raison et Stéphan Rouverand pour leur accompagnement et leur implication dans PROFIL. Je remercie également tous les industriels et les partenaires académiques ayant participé à ce projet.

Je tiens à remercier l'INRA et plus particulièrement BIA et le STLO pour leur accueil et tous les moyens mis en œuvre pour mener à bien cette thèse. Je remercie Valérie, Elisabeth, Brigitte, Agnès, Sophie, Geneviève, Véronique, Camille, Bérénice et Michel pour leur aide et leur disponibilité durant mon doctorat. Je n'aurais pas pu faire toutes ces manip sans vous. Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe Interface et Systèmes Dispersés pour leur collaboration, leur présence et leur sympathie.

J'ajouterai un grand merci aux doctorants PROFIL pour leur aide et les conseils qu'ils ont su prodiguer. Merci Marie C. pour tous les échanges constructifs que l'on a pu avoir ensemble. Je remercie également les anciens doctorants de l'INRA de Nantes notamment Glenn, Mathieu, Audrey et William pour leurs tuyaux lors de la période de rédaction. Merci à tous les copains de l'INRA et plus particulièrement à ceux du bureau des fous : Alice, Line et Michelle qui m'ont supporté dans la dernière ligne droite. Merci Marie H. pour les petites soirées improvisées mais toujours sérieuses. Merci Yves pour ton aide concernant la rédaction des publis.

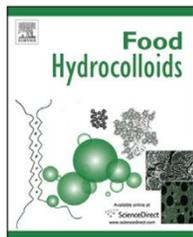
Je remercie tous mes proches présents ou non à la soutenance : les copains d'enfance, qui ont fait le déplacement depuis Bordeaux, les ONIRISIENS et les coéquipiers du handball.

Enfin, je conclurai ces remerciements par toute ma famille qui a été présente tout au long de ces trois ans. Merci à ma copine, Maude, qui a été présente durant la période de rédaction et qui a été patiente alors que de mon côté je pouvais me montrer légèrement tendu voir agaçant (surtout quand j'avais faim). Merci papa et maman pour vos conseils de professeur aguerris et votre soutien. Merci à ma petite sœur Camille qui me supporte depuis son plus jeune âge. Merci à mes grands-parents de Bourgnac (papi et mamie canard) et à ma mamie de Tours (mamie tortue) de votre présence à la soutenance et tout au long de ce travail. Merci à vous, je vous aime.

Merci à tous...

Communications

Publication



T. Loiseleux, A. Rolland-Sabaté, C. Garnier, T. Croguennec, S. Guilois, M. Anton, and A. Riaublanc, “Determination of hydro-colloidal characteristics of milk protein aggregates using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled with Multiangle Laser Light Scattering and Differential Refractometer (AF4-MALLS-DRi)”, *Food Hydrocoll.*, vol. 74, pp. 197–206, 2018.

Poster



T. Loiseleux, A. Rolland-Sabaté, C. Garnier, T. Croguennec, S. Guilois, M. Anton, and A. Riaublanc, “Characterization of milk protein aggregates as a function of casein micelles/whey proteins ratio by Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AF4) coupled with Multiangle Laser Light Scattering (MALLS)”, colloque Groupe Francophone de Fractionnement Flux-Force (G4F), Nantes, France, 10 juin 2016.

Communications orales



T. Loiseleux, C. Garnier, T. Croguennec, V. Beaumal, C. Jonchere, M. Anton and A. Riaublanc, “Creation of textured dairy emulsions by connecting oil droplets through whey protein aggregates”, Food Colloids, Wageningen, Pays-bas, 10-13 avril 2016.



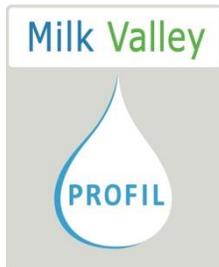
T. Loiseleux, C. Garnier, T. Croguennec, A. Riaublanc and M. Anton, “Innovative texturing of dairy emulsions: from whey protein aggregates to emulsion texture through the oil-water interface”, Conferencia Internacional de Proteinas y Coloides Alimentarios (CIPCA), Buenos Aires, Argentine, 29-31 mai 2017.



T. Loiseleux, C. Garnier, T. Croguennec, M. Anton and A. Riaublanc, “Control of the texture of oil-in-water emulsions by modulating interfacial composition in complex systems containing whey protein aggregates, non-micellar caseins and native whey proteins”, 10th NIZO Dairy Conference, Papendal, Pays-bas, 1-3 octobre 2017.



T. Loiseleux, A. Rolland-Sabaté, C. Garnier, T. Croguennec, S. Guilois, M. Anton and A. Riaublanc, “Caractérisation de différents agrégats de protéines laitières par A4F-MALLS”, Journée Scientifique du Groupe Francophone de Fractionnement Flux-Force (G4F), Paris, France, 31 mars 2017.



T. Loiseleux, C. Garnier, T. Croguennec, M. Anton and A. Riaublanc, “Capacité des agrégats de protéines laitières à texturer les émulsions en contrôlant la connectivité des gouttelettes de matière grasse”, Colloque PROFIL : La plasticité des protéines du lait, Rennes, France, 21 septembre 2017.

Table des matières

Liste des abréviations.....	xiv
Introduction générale.....	1
1 Chapitre 1 : Etat de l'art	9
1.1 Le Lait.....	11
1.2 La matière grasse laitière	12
1.2.1 Composition lipidique.....	12
1.2.2 Propriétés physiques de la matière grasse.....	12
1.3 La phase continue du lait.....	13
1.3.1 Les composants de la phase continue.....	13
1.3.2 Les protéines laitières.....	13
1.3.2.1 Les micelles de caséines	13
1.3.2.1.1 Généralité.....	13
1.3.2.1.2 Structure de la micelle.....	14
1.3.2.1.3 Stabilité aux traitements technologiques	14
1.3.2.2 Les protéines du lactosérum	15
1.3.2.3 Agrégations des protéines laitières.....	16
1.3.2.3.1 Les fractals.....	17
1.3.2.3.2 Les microgels	20
1.3.2.3.3 Les fibrilles.....	21
1.3.2.3.4 Les agrégats mixtes	22
1.4 Stabilité des agrégats de protéines laitières en solution	25
1.4.1 Stabilité au chauffage.....	25
1.4.2 Gélification à froid	25
1.4.2.1 Variation du pH.....	26
1.4.2.2 Force ionique.....	27
1.5 Stabilité des protéines aux interfaces	28
1.5.1 Interface modèle	28
1.5.1.1 Les protéines non agrégées.....	28

1.5.1.1.1	Les protéines sériques natives	28
1.5.1.1.2	Les micelles de caséines	28
1.5.1.2	Les agrégats	29
1.5.1.2.1	Les fibrilles	29
1.5.1.2.2	Les agrégats fractals	29
1.5.1.2.3	Les microgels	30
1.5.2	Interfaces <i>in situ</i>	31
1.5.2.1	Gélification par chauffage d'une émulsion stabilisée par des protéines sérique native	31
1.5.2.2	Gélification d'une émulsion par l'intermédiaire d'agrégats de protéines adsorbés à l'interface	31
1.6	Les émulsions	32
1.6.1	Formation des émulsions	33
1.6.1.1	L'émulsification	33
1.6.1.2	Stabilisation des émulsions	34
1.6.1.3	Déstabilisation des émulsions	34
1.6.1.3.1	Le crémage	34
1.6.1.3.2	La floculation	35
1.6.1.3.3	La coalescence	37
1.6.2	Rhéologie des émulsions	37
1.6.2.1	Fraction volumique de la phase dispersée	37
1.6.2.2	Taille des gouttelettes	38
1.6.2.3	Rhéologie de la phase continue (agent gélifiant, épaississant)	39
1.6.2.4	Les agents de textures :	39
1.6.2.4.1	Les agents épaississants	39
1.6.2.4.2	Les agents gélifiants	40
1.6.2.5	Cristallisation de la MG	44
1.6.3	Hypothèse concernant la texturation des émulsions en fonction de la géométrie du système et de la structure des agrégats	44
1.6.4	Compétition agrégats/protéines sériques natives/caséines	46
1.7	Conclusion	48
2	Chapitre 2 : Stratégie de l'étude	49

3	Chapitre 3 : Matériels et méthodes	53
3.1	Matières premières	55
3.1.1	Protéines sériques	55
3.1.2	Caséines micellaires.....	55
3.1.3	Perméat de lait Ultrafiltré (PUF).....	55
3.1.4	La Matière Grasse Laitière Anhydre (MGLA).....	56
3.2	Préparation des solutions de protéines	56
3.2.1	Solution de protéines sériques natives (Lot A ou B)	56
3.2.2	Élimination des caséines non micellaires d'une solution de protéines sériques natives (pour le chapitre 7).....	57
3.2.3	Production des agrégats.....	57
3.2.3.1	Les agrégats fractals	57
3.2.3.2	Les microgels	58
3.2.3.3	Fibrilles	58
3.2.3.4	Les agrégats mixtes	59
3.3	Méthodes de caractérisation des agrégats de protéines.....	61
3.3.1	En solution	61
3.3.1.1	État d'agrégation	61
3.3.1.2	Structure des agrégats de protéines	62
3.3.1.3	Stabilité aux cisaillements lors de l'homogénéisation haute pression (HP).....	68
3.3.2	Propriétés d'étalement des agrégats fractals à l'interface air-eau.....	69
3.3.2.1	Propriétés d'étalement sur balance de Langmuir	69
3.3.2.2	Prélèvement de films interfaciaux selon la technique de Langmuir-Blodgett	72
3.3.2.3	Microscopie à force atomique (AFM).....	72
3.4	Préparation des émulsions.....	73
3.4.1	Préparation des émulsions en mettant les agrégats avant homogénéisation.....	73
3.4.2	Ajout des agrégats après homogénéisation.....	75
3.4.3	Utilisation d'un agent bloquant la formation de pont disulfure	75

3.5	Méthodes de caractérisation des émulsions	75
3.5.1	Texture des émulsions.....	75
3.5.1.1	Observation visuelle	75
3.5.1.2	Propriétés rhéologiques des émulsions	76
3.5.1.3	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	80
3.5.2	Microstructure.....	81
3.5.2.1	Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL).....	81
3.5.2.2	Microscopie Electronique à Transmission (MET)	82
3.5.2.3	Taille des gouttelettes de matière grasse	83
3.5.3	Composition de l'interface	84
3.5.3.1	Concentration interfaciale.....	84
3.5.3.2	Composition de l'interface	85
4	Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats de protéines laitières	89
4.1	Etat d'agrégation.....	93
4.1.1	La solution de protéines sériques avant traitement thermique:	94
4.1.2	Les agrégats fractals	94
4.1.3	Les microgels	94
4.1.4	Les fibrilles	95
4.1.5	Les agrégats mixtes	95
4.2	Structure des agrégats de protéines	96
4.2.1	La solution de protéines sériques avant traitement thermique	96
4.2.2	Les agrégats fractals	97
4.2.3	Les microgels après 15 minutes de traitement thermique	98
4.2.4	Les micelles de caséines	99
4.2.5	Les agrégats mixtes produits avec le ratio MCas/PS 82/18 (AM 82/18).....	100
4.2.6	Les agrégats mixtes produits avec le ratio MCas/PS 56/44 (AM 56/44)	102
4.2.7	Les agrégats mixtes produits avec le ratio MCas/PS 30/70 (AM 30/70)	104
4.2.8	Effet du pH sur la stabilité des AM 82/18	105

4.2.9	Comparaison des agrégats fractals, microgels et AM 82/18: densité apparente et dimension fractale.....	106
4.2.10	Les fibrilles.....	108
4.3	Stabilité aux cisaillements	109
4.3.1	Les agrégats fractals	109
4.3.2	Les fibrilles.....	110
4.3.3	Microgels	111
4.3.4	Les agrégats mixtes	111
4.4	Conclusion	112
5	Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières.....	115
5.1	Concentration limitante en protéines solubles (Protéines sériques natives (PSN) + Caséines non micellaires (CNM)).....	119
5.2	Capacité de connexion des gouttelettes de matière grasse par les agrégats de protéines.....	122
5.2.1	Les agrégats fractals	123
5.2.1.1	Emulsions à 30% de MGLA homogénéisées à 500 bars	123
5.2.1.2	Emulsions à 30% de MGLA homogénéisées à 100 bars	125
5.2.1.3	Emulsions à 5 % de MGLA homogénéisées à 500 bars	127
5.2.2	Les microgels	129
5.2.2.1	Emulsions à 30% de MGLA homogénéisées à 500bars	129
5.2.3	Les agrégats Mixtes	130
5.2.3.1	Emulsions à 30% de MGLA homogénéisées à 500bars	131
5.2.3.2	Emulsions à 30% de MGLA homogénéisées 100 bars	132
5.2.3.1	Emulsions à 5% de MGLA homogénéisées à 500 bars	135
5.3	Conclusion	136
6	Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse	141
6.1	Les mécanismes de texturation des émulsions gel différées à 5% de matière grasse.....	145

6.1.1	Floculation au cours du stockage	145
6.1.2	Texturation au cours du refroidissement.....	146
6.1.3	Texturation au cours du stockage	147
6.1.4	Microstructure des émulsions.....	149
6.2	Moduler la composition interfaciale afin de contrôler la texture des émulsions.....	151
6.2.1	Observations macroscopique et microscopique des émulsions	152
6.2.2	Etude de l'interface	155
6.2.2.1	Concentration interfaciale.....	155
6.2.2.2	Propriétés d'étalement sur interface modèle air-eau.....	158
6.2.2.3	Propriétés d'étalement sur interface huile-eau in situ	162
6.2.3	Composition interfaciale	163
6.3	Conclusion	166
7	Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides.....	169
7.1	Les interactions moléculaires inter-gouttelettes	173
7.1.1	Interactions générées pendant l'homogénéisation	173
7.1.2	Emulsions gels instantanées.....	174
7.1.3	Emulsions gel différées.....	175
7.2	Interactions développées pendant le stockage.....	178
7.2.1	Stockage à 60°C (❶).....	181
7.2.2	Refroidissement (❷ et ❸)	182
7.2.2.1	Zone (❷)	182
7.2.2.2	Zone (❸)	183
7.2.3	Stockage à 4°C (❹).....	184
7.2.4	Chauffage de 4 à 60°C (❺).....	185
7.2.4.1	Fonte de la matière grasse	185
7.2.4.2	Rupture des liaisons réversibles formées lors du refroidissement	186
7.2.4.3	Intérêt fonctionnel des liaisons réversibles dans le réseau protéines-lipides	187

7.3	Rôle des ponts disulfures sur la microstructure des émulsions	188
7.4	Les protéines impliquées dans le réseau protéines-lipides	193
7.4.1	Etat de floculation des émulsions après homogénéisation	195
7.4.1.1	Interface composée de protéines sériques partiellement dénaturées et de caséines non micellaires.....	195
7.4.1.2	Interface composée uniquement de protéines sériques partiellement dénaturées	196
7.4.2	Evolution de la texture des émulsions en fonction de la composition interfaciale	197
7.4.3	Evolution de la microstructure des émulsions en fonction de la composition interfaciale.....	198
7.4.4	Rôle des protéines présentes dans la phase continue sur la texturation des émulsions..	199
7.5	Conclusion	201
8	Chapitre 8 : Discussion générale	205
8.1	Floculation durant l'étape d'homogénéisation.....	207
8.2	La floculation pendant l'étape de stockage	209
8.2.1	Protéines adsorbées à l'interface.....	210
8.2.1.1	Stockage à 60°C	210
8.2.1.2	Refroidissement 60 – 4°C	211
8.2.1.3	Chauffage 4 – 60°C	211
8.2.2	Protéines de la phase continue	212
8.2.2.1	Les protéines sériques natives :	212
8.2.2.2	Les agrégats.....	212
8.2.2.3	Les caséines non micellaires.....	212
	Conclusion	215
	Perspectives.....	223
	Bibliographie.....	227

Liste des abréviations

Ag : Agrégat

AGL : Acides gras libres

AM : Agrégats mixtes

A4F-MALLS-DRI : Fractionnement asymétrique flux-force couplé à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angle et un réfractomètre

BPF : Bas point de fusion

BSA : Albumine sérique bovine

CES-MALLS : Chromatographie d'exclusion stériques couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angle

CES-UV : Chromatographie d'exclusion stériques couplée à un détecteur ultraviolet

CNM : Caséines non micellaires

d_{fapp} : Dimension fractale apparente

DG : Diacylglycérols

d_{Gapp} : Densité fractale apparente DLVO : Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

E-H : Eau-Huile

G' : Module conservatif

G'' : Module dissipatif

H-E : Huile-Eau

HPF : Haut point de fusion

ICP-OES : Inductively coupled plasma - optical emission spectroscopy

MCas/PS : Micelle de caséines/protéines sériques

MCBL : Microscope confocal à balayage laser

MET : Microscope électronique à transmission

MG : Monoacylglycérols

MGLA : Matière grasse laitière anhydre

MPF : Moyen point de fusion

M_w : Masse molaire

\overline{M}_w : Masse molaire moyenne

NaCl : Chlorure de sodium

NEM : N-éthylmaléimide

PMMA : Polyméthacrylate de méthyle

PS : Protéines sériques

PSN : Protéines sériques natives

PSN-CNM : Protéines sériques natives – caséines non micellaires

PSPD : Protéines partiellement dénaturées

R_G : Rayon de giration

\overline{R}_{Gz} : Rayon de giration moyen

SDS : Sodium dodecyl sulfate

Ssp : Surface spécifique

TAG : Triacylglycérols

UHT : Ultra haute température

α -**LG** : α -lactalbumine

β -**LG** : β -lactoglobuline

Introduction générale

Introduction générale

Les aliments formulés sont des produits complexes présentant des propriétés organoleptiques bien définies sur lesquelles les industriels travaillent continuellement afin de satisfaire les nouvelles attentes des consommateurs. Afin de répondre à cet enjeu, les professionnels de l'agroalimentaire sont souvent amenés à inclure des additifs dans la formulation de leurs produits. L'objectif fonctionnel de tels molécules est d'améliorer les qualités organoleptiques de l'aliment (couleur, goût, texture) mais également sa conservation. Ainsi, parmi les additifs, nous retrouvons des gélifiants et/ou des épaississants (par exemple : xanthane ou carraghénane) dans de nombreux produits laitiers comme les crèmes desserts ou les crèmes UHT (Ultra Haute Température). Ces derniers vont permettre d'obtenir une texture bien spécifique et propre à chaque aliment tout en améliorant sa stabilité physique.

Même si les additifs sont utilisés en petites quantités, ces substances sont évaluées et surveillées pour prévenir leur éventuel effet néfaste sur la santé. Leur emploi est donc réglementé et leur présence doit obligatoirement être mentionnée sur les étiquettes des produits concernés. Cependant, ces substances inquiètent de plus en plus le consommateur qui aimerait disposer de produits plus « sains » et « naturels ». Actuellement, de nouveaux labels, comme le « clean label », encouragent la réduction ou la suppression des additifs dans les produits alimentaires. Cette problématique est donc primordiale pour les industriels qui travaillent pour substituer ces molécules très controversées et devient un enjeu majeur à l'heure actuelle dans les industries agroalimentaires.

C'est dans ce contexte que le projet PROFIL (« Assemblages **PRO**téiques multi-**F**onctionnels pour l'Innovation en industrie Laitière »), qui regroupe un consortium d'industriels laitiers (Sill, La Laiterie de Montaigu, Sodiaal, Laita, Isigny S^{te} Mère, Bel, Eurial, Compagnie des Fromages & Richesmonts, Savencia et Lactalis) et des équipes de recherche académique (INRA, Agro Campus Ouest, UBO, ONIRIS, IMMM, IPR) s'est mis en place. Il a pour objectif de renforcer l'innovation et la compétitivité de la filière laitière dans un marché mondial grandissant mais fortement concurrentiel.

Les recherches menées dans le cadre du projet PROFIL visent à innover au sein de 4 thématiques :

- Axe 1 - propriétés antifongiques : Le principal objectif est de sélectionner des souches bactériennes ou de développer, par fermentation, des molécules antifongiques à partir des composants du lait.
- Axe 2 - Propriétés émulsifiantes et foisonnantes : Le but est d'utiliser des assemblages de protéines pour obtenir de nouvelles propriétés émulsifiantes et moussantes.

Introduction générale

- Axe 3 - propriétés texturantes : cette partie du projet vise à obtenir des produits gélifiés avec des comportements technologiques et culinaires spécifiques apportés par les protéines laitières.
- Axe 4 - Propriétés vectorisantes : L'objectif de cet axe est de développer des vecteurs protéiques afin de protéger et véhiculer des molécules d'intérêt nutritionnel.

Cette thèse, qui s'inscrit dans l'axe 2, vise à développer de nouvelles approches pour maîtriser la texture des produits laitiers gras, non acidifiés, comme les crèmes desserts ou les crèmes UHT. Ces dernières sont des émulsions de type huile dans eau (H-E). En d'autres termes, il s'agit de systèmes métastables où des gouttelettes de matière grasse sont dispersées dans une phase continue aqueuse. Ces produits doivent être épaissis ou gélifiés pour améliorer leur stabilité. Pour cela, les industriels ont recours à deux techniques pour texturer ce type de produit :

- Acidifier l'émulsion afin de permettre aux caséines de former un réseau,
- Ajouter des additifs (épaississants, gélifiants) sans abaisser le pH et donc sans impliquer les caséines et les protéines sériques dans la texturation des systèmes. En effet, dans ce cas, les additifs alimentaires texturent la phase continue et piègent les gouttelettes de matière grasse pour stabiliser l'émulsion.

L'**enjeu industriel** de cette thèse est de trouver un moyen de texturer des émulsions laitières à pH neutre sans avoir recours à l'utilisation d'additifs alimentaires mais en utilisant des protéines laitières. Pour cela, nous avons émis l'hypothèse qu'il serait possible de connecter directement les gouttelettes de matière grasse via les protéines pour former un réseau au lieu de gélifier uniquement la phase continue pour texturer ces systèmes. L'objectif final étant d'obtenir des textures similaires aux produits actuels sans utilisation d'additif mais en utilisant des mélanges fonctionnels de protéines laitières.

Les protéines laitières, aussi bien les caséines que les protéines sériques, sont déjà extrêmement utilisées en industrie agroalimentaire pour leurs valeurs nutritionnelles ainsi que pour leurs propriétés fonctionnelles (gélifiantes, émulsifiantes, foisonnantes) (Morr & Ha, 1993; Nicolai & Durand, 2013). Les caséines, sous forme micellaires ou non micellaires, gélifient lors de l'abaissement du pH mais sont réputées stables au chauffage. A l'inverse, les protéines sériques sont stables à l'acidification mais vont se dénaturer puis s'agréger sous l'action d'un traitement thermique pour former des agrégats supramoléculaires voire des gels lorsque la concentration est supérieure à la concentration de gélification. Ces propriétés d'agrégation favorisent l'utilisation des protéines sériques en tant qu'agent gélifiant dans des produits alimentaires à pH neutre (de Wit, 1998).

Introduction générale

En raison de leur capacité à s'adsorber à l'interface huile-eau, les protéines sériques sont également largement utilisées pour stabiliser les émulsions contre la floculation et la coalescence. Cependant, le chauffage d'une émulsion stabilisée par des protéines sériques engendre des phénomènes de déstabilisation et, dans certains cas, la gélification de l'émulsion (Dickinson, 2010). De nombreuses recherches ont montré que ce processus de gélification est gouverné par des interactions hydrophobes et la formation de ponts disulfures entre les protéines (Demetriades, Coupland, & McClements, 1997; Monahan, McClements, & German, 1996). En revanche, ce procédé de texturation par chauffage des émulsions est difficilement contrôlable et dépend de nombreux paramètres comme la fraction volumique de matière grasse, la concentration en protéines et la pression d'homogénéisation. Par conséquent, ce phénomène est actuellement considéré comme une étape de déstabilisation de l'émulsion plutôt que comme un procédé de texturation.

De récentes études ont cependant démontré que les agrégats de protéines laitières, obtenus après chauffage et ajoutés avant homogénéisation, sont capables de connecter les gouttelettes d'une émulsion provoquant la gélification du système lui amenant une certaine texture. Cette texturation peut se produire aussi bien pendant l'étape d'homogénéisation (Surel et al., 2014) qu'au cours du stockage des émulsions (Mantovani, Cavallieri, & Cunha, 2015). Les travaux de Surel et al. (2014) ont également prouvé que les propriétés rhéologiques des émulsions dépendaient fortement de la taille des gouttelettes et de la concentration en protéines.

En nous appuyant sur ces résultats, nous avons défini l'objectif de cette thèse qui est d'arriver à moduler la connexion des gouttelettes de matière grasse via les agrégats de protéines laitières afin d'obtenir une large gamme de textures et de contrôler les cinétiques de texturation. Pour cela, nous avons fait l'hypothèse que la capacité des agrégats de protéines à connecter les gouttelettes dépend principalement de la distance inter-gouttelettes, de la concentration en agrégats ainsi que de leur taille :

- **Distance inter-gouttelettes** : Plus la distance inter-gouttelettes sera importante, plus les connexions seront difficiles à mettre en place et plus les émulsions resteront liquides. A l'inverse, réduire la distance inter-gouttelettes augmente la probabilité de connexion par les agrégats et par conséquent la force du gel (Dickinson, 2010; Jafari, Assadpoor, He, & Bhandari, 2008; Jost, Baechler, & Masson, 1986; McClements, Monahan, & Kinsella, 1993). Dans notre cas, ce paramètre va dépendre du nombre de gouttelettes qui varie avec la fraction volumique de Matière Grasse Laitière Anhydre (MGLA) utilisée et la taille des gouttelettes :

Introduction générale

- Fraction volumique de MGLA : A taille de gouttelette constante, lorsque la fraction volumique de MGLA augmente, le nombre de gouttelettes croît et la distance inter-gouttelettes diminue.
- Taille des gouttelettes : Cette variable va dépendre à la fois de l'énergie utilisée pour fabriquer l'émulsion (pression d'homogénéisation) et de la concentration en émulsifiant :
 - *Pression d'homogénéisation* : A teneur en matière grasse constante, plus la pression d'homogénéisation est importante, plus les gouttelettes de matière grasse seront petites et nombreuses et plus la distance inter-gouttelettes sera faible favorisant le pontage et la texturation de l'émulsion (Jost et al., 1986).
 - *Concentration en émulsifiant* : Au cours de cette étude, ce sont les différentes protéines lactiques qui vont jouer le rôle d'émulsifiants. Les protéines solubles (caséines non micellaires et protéines sériques natives) sont de meilleurs émulsifiants que les agrégats ou les micelles. En effet, elles sont capables de couvrir davantage d'interface et permettent la formation de gouttelettes plus petites qu'en utilisant les agrégats (Kiokias & Bot, 2006). Ainsi, en mélange avec les agrégats, ce sont ces protéines solubles qui vont couvrir la plus grande surface et par conséquent contrôler la taille des gouttelettes (Dickinson, 2003).
- **Concentration en agrégats** : Euston et al. (2000) ont montré que la floculation des gouttelettes de matière grasse a lieu d'autant plus rapidement que la concentration en agrégats augmente. En d'autres termes, plus la quantité d'agrégats est importante, plus le système sera texturé.
- **Taille des agrégats** : Plus la taille des agrégats est importante, plus la distance de connexion possible sera élevée et plus la texturation des émulsions pourra se faire malgré des distances inter-gouttelettes importantes.

Nous avons donc choisi de travailler avec un mélange de protéines sériques natives, de caséines non-micellaires et d'agrégats protéiques afin de créer une compétition pour l'interface dans l'idée de maîtriser à la fois la taille des gouttelettes grâce aux protéines solubles et les connexions inter-gouttelettes par l'intermédiaire des agrégats afin de moduler la texture de l'émulsion.

Par conséquent, l'**enjeu scientifique** de cette thèse est non pas de jouer sur la texture de la phase continue comme le font les texturants de type polysaccharidique (additifs), mais d'arriver à maîtriser la connectivité des gouttelettes en contrôlant la composition en protéines à l'interface Huile-Eau (H-E) afin d'obtenir la texture souhaitée au moment désiré (pendant l'homogénéisation ou pendant le stockage).

Introduction générale

La problématique centrale de la thèse est donc de comprendre **comment et par quels mécanismes la composition interfaciale en protéines influence la connectivité des gouttelettes et la texture des émulsions laitières à pH neutre ?**

Afin de présenter au mieux les résultats permettant de répondre à cette problématique, ce manuscrit sera divisé en 8 chapitres. Le chapitre 1 sera exclusivement consacré à l'état de l'art concernant les agrégats de protéines laitières : de leur production à leur utilisation. Le chapitre 2 décrit la démarche de l'étude adoptée tout au long de cette thèse. Le chapitre 3 présente le matériel ainsi que les méthodes utilisées pour répondre à la problématique. Les chapitres 4 à 7 sont consacrés à la présentation des résultats. Le chapitre 4 aborde la caractérisation des agrégats de protéines laitières alors que le chapitre suivant montre les capacités de ces derniers à texturer les émulsions. Les chapitres 6 et 7 permettent de comprendre les mécanismes de texturation des émulsions en utilisant des agrégats de protéines laitières. Pour finir, le chapitre 8 consiste en une discussion générale des résultats en s'appuyant sur la bibliographie existante. Le manuscrit se terminera par une conclusion générale ainsi que par les perspectives de travail.

Chapitre 1 : Etat de l'art

1.1 Le Lait

Le lait est un aliment largement utilisé mais néanmoins très complexe faisant de lui un produit très étudié. Le lait est composé d'eau, de protéines, de lipides, de glucides, de minéraux et de vitamines (Figure 1). Il est considéré comme une suspension colloïdale stable contenant de la matière grasse dispersée sous forme de gouttelettes dans une phase aqueuse : il s'agit d'une émulsion. La transformation du lait permet d'obtenir une très large gamme de produits allant du simple lait de consommation à des fromages en passant par des crèmes desserts. Le lait est un produit d'autant plus complexe que sa composition et ses caractéristiques physico-chimiques peuvent varier en fonction de l'origine génétique (espèce, individu), dans le cas le plus courant, des critères physiologiques de la vache (âge, stade de lactation, état de l'animal), des facteurs environnementaux (saison, région, climat...) mais également des conditions d'élevage (technique de traite, espace disponible, alimentation,...).

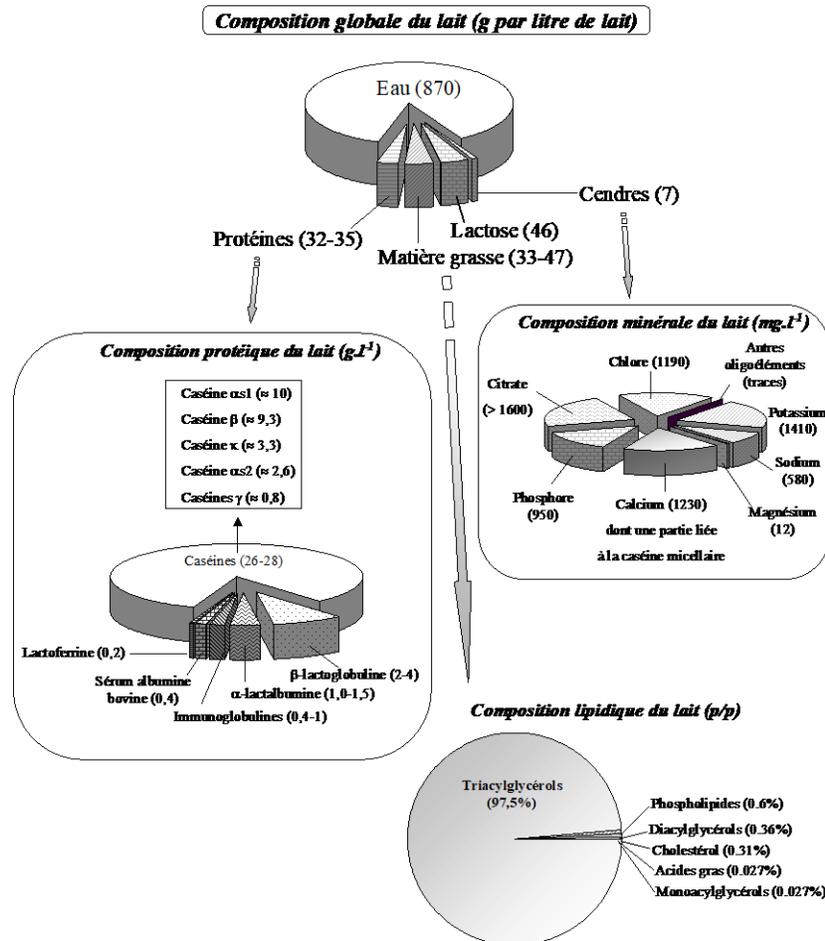


Figure 1: Composition globale, protéique, minérale et lipidique du lait de vache (B. Ribadeau-Dumas, 1989; Christie, & Clapperton, 1982).

1.2 La matière grasse laitière

1.2.1 Composition lipidique

La matière grasse laitière est émulsionnée dans une phase aqueuse sous forme de globule gras de diamètre compris entre 2 et 12 μm (Ribadeau-Dumas, 1989). Elle est essentiellement composée de triacylglycérols (TAG) alors que les glycérides partiels (diacylglycérols (DG), monoacylglycérols (MG)) et les acides gras libres (AGL), sont considérés comme des constituants mineurs. D'autres composés comme les phospholipides et les stérols sont également présents en faible quantité (Figure 1).

1.2.2 Propriétés physiques de la matière grasse

La composition en acide gras ainsi que leur position sur le glycérol influent sur les propriétés physiques des triacylglycérols (TAG). Deux paramètres ont un impact sur leur point de fusion: la longueur des chaînes des acides gras et le nombre d'insaturation. Ainsi, les triacylglycérols composés d'acides gras saturés à longue chaîne ont un point de fusion élevé (Haut Point de Fusion : HPF) alors que ceux en contenant seulement un couplé à des acides gras insaturés ou à chaîne courte fondent à des températures plus basses (Bas Point de Fusion : BPF). Un point de fusion intermédiaire est obtenu pour des triacylglycérols composés de deux acides gras saturés à longue chaîne et d'un acide gras insaturé (cis) ou à chaîne courte (Moyen Point de Fusion : MPF) (Drelon, 2006; Timms, 1980) (Figure 2). De par la grande variété de triacylglycérols, la plage de fusion de la matière grasse laitière est comprise entre -40°C et $+40^{\circ}\text{C}$ et engendre, dans cette gamme de température, la présence à la fois de triacylglycérols sous forme cristallisée et liquide (Drelon, 2006).

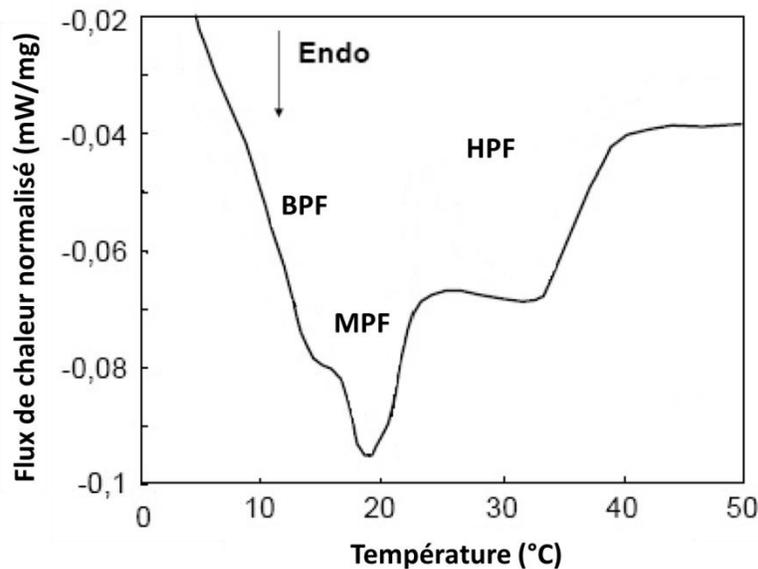


Figure 2: Thermogramme de fusion de la Matière Grasse Laitière Anhydre (Drelon, 2006).

1.3 La phase continue du lait

1.3.1 Les composants de la phase continue

La phase continue du lait, appelée le lait écrémé, est constituée d'eau et contient des minéraux, des glucides et des protéines. Les principaux minéraux présents dans le lait sont le citrate, le chlore, le phosphore, le potassium et le calcium qui peut être libre ou lié à la micelle de caséines afin de maintenir son intégrité (Ribadeau-Dumas, 1989; Christie, & Clapperton, 1982). Concernant les glucides, le lactose est le sucre majoritaire. C'est un sucre réducteur qui peut réagir avec les protéines entraînant leur lactosylation ce qui modifie leur réactivité chimique et donc impacte la taille ainsi que la forme des agrégats protéiques obtenus après traitement thermique (Norwood et al., 2016). Les protéines, quant à elles, vont constituer la partie centrale de notre étude et feront l'objet d'une description plus détaillée.

1.3.2 Les protéines laitières

Les protéines du lait sont largement utilisées dans la formulation de produits alimentaires aussi bien pour leurs apports nutritionnels que pour leurs propriétés fonctionnelles (agent gélifiant, moussant et émulsifiant). Ces protéines présentent une concentration aux alentours de 32 à 35 g/L et sont classés, dans le lait cru, en deux fractions sur la base de leur solubilité à pH 4.6. Nous retrouvons ainsi les caséines, insolubles, qui précipitent à pH 4,6, et les protéines du lactosérum qui restent solubles quel que soit le pH du milieu.

1.3.2.1 Les micelles de caséines

1.3.2.1.1 Généralité

Les caséines représentent environ 80% des protéines totales du lait. La plupart des caséines (95%) sont présentes sous forme d'un ensemble supramoléculaire sphérique appelé micelle composée de quatre types de protéines (Figure 1) : caséines- α S1, α S2, β et κ (Gaucher, 2007). Les micelles de caséines sont composées à 94 p/p% (poids sec) de protéines et à 6 p/p% de minéraux, essentiellement du phosphate de calcium (90%) mais également des ions citrates et magnésium (10%) (Cheeseman & Manson, 1982). La stabilité des micelles de caséines en suspension est assurée par des répulsions électrostatiques et stériques engendrées par une couche externe constituée de la partie C-terminale hydrophile des caséines- κ . De ce fait, les micelles de caséines constituent une suspension colloïdale remarquablement stable à pH neutre (Bouchoux et al., 2009; Bouchoux, Gésan-Guiziou, Pérez, & Cabane, 2010a; Eigel et al., 1984; McMahan & Brown, 1984; Payens, 1966).

1.3.2.1.2 Structure de la micelle

Durant ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur la structure des micelles de caséines. Cependant, l'organisation de la micelle reste incertaine et de nombreux modèles ont été proposés. Il semblerait toutefois que les micelles soient considérées comme étant des systèmes poreux et dynamiques. Les micelles de caséines sont entourées d'une couche de caséines- κ répartie de manière hétérogène à leur surface. Les micelles seraient en outre divisées en sub-micelles connectées entre elles par du phosphate de calcium (Bouchoux, Gésan-Guiziou, Pérez, & Cabane, 2010b; Carl Holt & Horne, 1996; Walstra, 1999). La cohésion des micelles est assurée à la fois par la présence de nanoclusters de phosphate de calcium mais également par des interactions hydrophobes, électrostatiques et des liaisons hydrogènes (Thompson and Farrell, 1973). Les régions hydrophobes et hydrophiles des micelles étant positionnées de manière inhomogène le long de la séquence polypeptidique, ces protéines possèdent un caractère amphiphile marqué ce qui leur confère une certaine affinité pour l'interface huile-eau.

1.3.2.1.3 Stabilité aux traitements technologiques

Les micelles de caséines ont une distribution de taille polydisperse avec des rayons pouvant aller de 25 à 250 nm sachant que la majorité des micelles de caséines sont de petite taille (Fox & Brodtkorb, 2008; Glantz, Håkansson, Lindmark Månsson, Paulsson, & Nilsson, 2010; Lin, Dewan, Bloomfield, & Morr, 1971). Cependant, la taille des micelles de caséines peut dépendre des traitements technologiques, particulièrement thermiques, appliqués à la suspension.

- Effet de la température :

L'effet de la température sur la stabilité des micelles de caséines va dépendre du pH de la suspension. Ainsi, plusieurs études ont montré que les micelles de caséines peuvent se dissocier partiellement suite à un chauffage aux alentours de 80°C pour des pH supérieurs à 6,7 (Anema, 2007; Anema & Klostermeyer, 1997). En revanche, pour des pH inférieures à 6,7, l'intégrité des micelles est maintenue et aucune dissociation n'est observée (Anema & Li, 2000).

Outre les nanoclusters de phosphate de calcium, des interactions hydrophobes sont également responsable du maintien de l'intégrité de la micelle de caséine. De ce fait, un abaissement de la température du milieu diminue ces interactions hydrophobes induisant des variations de structure et de taille des micelles. En effet, à basse température, la caséine- β , la plus hydrophobe, peut se solubiliser et quitter la micelle (Bingham, 1971).

- Effet du pH :

L'effet du pH sur la stabilité des micelles de caséines est très utilisé dans l'industrie. L'acidification d'une suspension de micelles de caséines conduit à la diminution de leur potentiel Zeta lorsque le pH approche le point isoélectrique (Darling & Dickson, 1979). L'agrégation est donc due à une diminution des répulsions électrostatique ce qui va provoquer la formation du caillé par coagulation. Les micelles de caséines peuvent être redispersées en remontant le pH au pH initial du lait. En revanche, la structure de la micelle n'est pas conservée lors de la redispersion. En effet, lors de la diminution du pH, le phosphate de calcium colloïdal se solubilise entraînant une dissolution partielle des différentes fractions de caséines (Dalglish & Law, 1988, 1989). Le système est donc composé d'un mélange de fraction de caséines plus ou moins agrégées.

Une instabilité de la micelle peut également être observée lorsqu'elles sont adsorbées à l'interface air-eau ou en présence d'enzyme comme la présure. Cette dernière va provoquer l'hydrolyse des caséines- κ entraînant une diminution des répulsions électrostatiques et engendrant la déstabilisation de la suspension de micelles de caséines (Anema & Li, 2000; Anema & Klostermeyer, 1997; Holt, 1992; Holt & Horne, 1996; Walstra, 1990).

1.3.2.2 Les protéines du lactosérum

Les protéines sériques représentent la fraction soluble des protéines du lait. Ces protéines globulaires, dont la structure secondaire est essentiellement composée d'hélices α et de feuillets β , sont extraites du lactosérum. Elles sont constituées principalement de β -lactoglobuline (β -LG ; 60 %), d' α -lactalbumine (α -LG ; 22 %), d'albumine sérique bovine (BSA ; 5,5 %), des immunoglobulines (9,1 %) et de lactoferrine (Bryant & McClements, 1998; Farrell et al., 2004) (Figure 1). Quand elles ne sont pas dénaturées, ces protéines présentent un cœur hydrophobe et une surface hydrophile. La β -lactoglobuline est la protéine majoritaire du lactosérum et peut se retrouver sous forme de monomère, de dimère ou d'octamère en fonction du pH, de la concentration, de la force ionique et de la température. Cependant, dans des conditions de pH (entre 6,5 et 7) et de concentration du lait, la β -lactoglobuline est sous forme de dimère (Gaucheron, 2004). Cette protéine est constituée de 162 acides aminés pour une masse moléculaire de 18300 g/mol. Cette protéine contient deux ponts disulfures et un groupement thiol libre. L' α -lactalbumine, quant à elle, est la deuxième protéine du lactosérum. Elle est composée de 123 acides aminés pour une masse moléculaire de 14200 g/mol. Elle ne possède pas de thiol libre mais sa structure comporte 4 ponts disulfures. L'albumine sérique bovine (BSA) présente un enchainement de 582 acides aminés et possède une masse molaire égale à 66000 g/mol. Elle contient un groupement thiol libre et 17

Chapitre 1 : Etat de l'art

ponts disulfures. Le point isoélectrique de ces trois protéines est proche de 5 même si de petites variations peuvent être observées en fonction de la protéine concernée (Tableau 1). De plus, concernant l' α -lactalbumine, certaines données bibliographiques place son point isoélectrique entre 4,8 et 5,1 (Bryant & McClements, 1998) alors que d'autres le place entre 4,2 et 4,5 (Farrell et al., 2004).

La température de dénaturation des protéines va varier en fonction du type de protéine sérique étudié (Tableau 1). Concernant la β -lactoglobuline, la température de dénaturation, déterminée par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), est de 78°C (Bryant & McClements, 1998; deWit & Klarenbeek, 1984). Cependant, les protéines commencent à se dénaturer progressivement à partir de 60°C (Chen & Dickinson, 1998; deWit & Klarenbeek, 1984; Kinsella & Whitehead, 1989; Paulsson & Dejmek, 1990). Les groupements thiols présents sur la β -lactoglobuline et la BSA sont les précurseurs du phénomène d'agrégation.

Tableau 1: Caractéristiques générales des principales protéines du lactosérum (Bryant & McClements, 1998; Farrell et al., 2004; Papiz, Sawyer, Eliopoulos, 1986).

	β -lactoglobuline	α -lactalbumine	BSA
Poids moléculaire (kDa)	18,3	14,2	66,3
Nombre d'acides aminés	162	123	582
Nombre de thiol libre	1	0	1
Ponts disulfures	2	4	17
Point isoléctrique	5,2	4,2 – 5,1	4,7 – 5,1
Concentration dans le lait (g/L)	2 - 4	1 - 1,5	0,4
Température de dénaturation (°C)	78	62	64

1.3.2.3 Agrégations des protéines laitières

Sous l'effet d'un traitement thermique et dans des conditions physico-chimiques particulières, les protéines sériques vont s'agréger. En fonction de la concentration en protéines, en sels, du pH et des conditions de chauffage (temps/température/cisaillement), des agrégats de différentes tailles et formes peuvent être produits. Ainsi, il est possible d'obtenir des agrégats fibrillaires (fibrilles), sphériques (microgels) ou encore fractals (Figure 3) (Jung, Savin, Pouzot, Schmitt, & Mezzenga, 2008b).

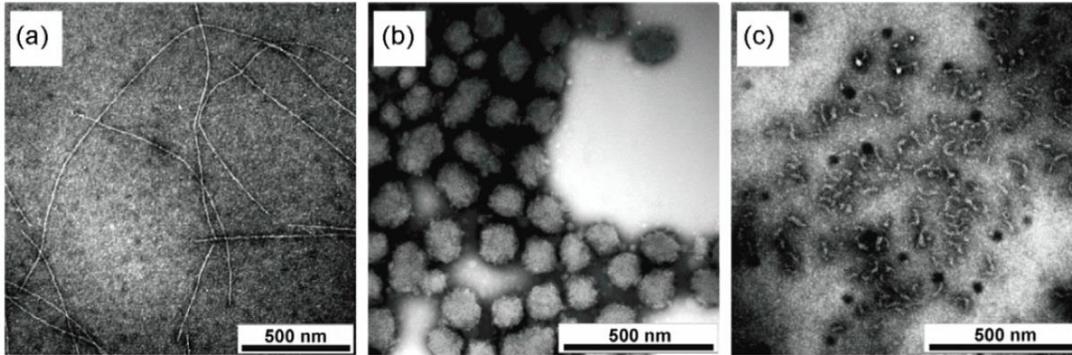


Figure 3: Observation en TEM de différents agrégats de β -lactoglobuline (β -LG) obtenus à une concentration de 1% et à différents pH : (a) fibrilles obtenues à pH 2 ; (b) agrégats sphériques à pH 5,8 (microgels) ; (c) agrégats fractals ou branchés à pH 7 (Jung et al., 2008b).

La structure des agrégats est fortement influencée par le pH et la force ionique (Nicolai, Britten, & Schmitt, 2011b). Ainsi, lorsque le pH est en dessous du point isoélectrique, les protéines sériques sont chargées positivement. De ce fait, à pH 2, il existe de fortes répulsions électrostatiques entre les protéines qui vont s'assembler sous forme de longs bâtonnets fins appelés fibrilles (Aymard, Nicolai, Durand, & Clark, 1999; Kavanagh, Clark, & Ross-Murphy, 2000). A l'inverse, pour un pH proche du point isoélectrique, les protéines sont faiblement chargées et vont facilement s'agréger pour former des agrégats denses et sphériques appelés microgels. L'ajout de calcium peut également conduire à la formation de microgels en formant des ponts calciques entre les groupements carboxyliques chargés négativement (Bryant & McClements, 1998). Pour finir, lorsque le pH est proche de 7, les protéines sont chargées négativement et des agrégats fractals sont obtenus. Dans ces conditions de pH, l'addition de NaCl va écranter les charges des protéines et engendrer la formation d'agrégats fractals de taille supérieure. Un dernier type d'agrégats est obtenu lors du chauffage d'une solution de protéines sériques en présence de micelles de caséines. Dans ce cas, les protéines sériques vont se fixer sur les micelles pour former des agrégats appelés agrégats mixtes.

1.3.2.3.1 Les fractals

Les agrégats fractals sont produits dans des conditions de répulsion électrostatique relativement élevées à un pH supérieur au point isoélectrique et proche de la neutralité. Le mécanisme de formation des agrégats fractals a longuement été étudié. Ainsi, Nicolai et al (2011) propose un mécanisme d'agrégation de la β -lactoglobuline en quatre étapes (Figure 4):

- Etape 1 : En solution, les protéines de β -lactoglobuline sont présentes sous forme de monomères et de dimères. Pour des températures avoisinant les 80°C, la β -lactoglobuline se dénature et l'équilibre est déplacé vers le monomère dont la structure est modifiée. En effet, suite au

traitement thermique, les protéines se déplient partiellement et exposent leurs résidus hydrophobes (Cairoli, lametti, and Bonomi 1994, Relkin 1998) ainsi que leurs groupements thiol initialement isolés dans la partie interne de la protéine (Lametti, De Gregori, Vecchio, & Bonomi, 1996).

- Etape 2 : Les monomères dénaturés s'associent de manière irréversible pour former des oligomères (essentiellement des dimères et trimères) par l'intermédiaire de ponts disulfures (Figure 4).
- Etape 3 : Au-delà d'une concentration critique en oligomères, des agrégats de petite taille dit « primaires » sont formés. Cette concentration est d'autant plus basse que la force ionique de la solution est élevée ou que le pH est proche du point isoélectrique. A un pH proche de la neutralité, les agrégats primaires ont une forme incurvée avec une longueur de 50nm et un diamètre de 10nm.
- Etape 4 : Si la concentration en protéines et/ou la force ionique sont suffisamment élevées, ces agrégats primaires s'assemblent pour former des agrégats ramifiés polydisperses dont la taille augmente avec le temps de chauffage. Outre les ponts disulfures, des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène et des forces électrostatiques participent également au maintien de la structure des agrégats. Dans un premier temps, les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes sont formées puis, dans un second temps, les ponts disulfures viennent renforcer la cohésion de l'agrégat.

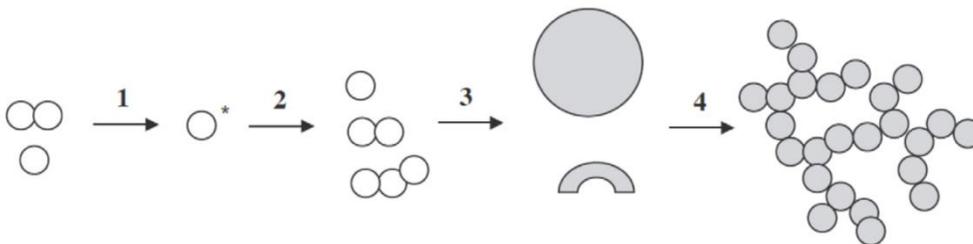


Figure 4: Procédé d'agrégation de la β -LG pour des pH supérieurs à 7.

Roefs and De Kruif (1994) décrivent de manière précise le mécanisme de formation des ponts disulfures durant ces phases d'agrégations (Figure 5). Dans un premier temps, les protéines vont se dénaturer et exposer en surface leur groupement thiol (initiation). Ces protéines dénaturées vont ensuite réagir avec un monomère natif en échangeant leur groupement thiol activé lors de l'initiation avec un pont disulfure d'une protéine non dénaturée. Ainsi, un SH va s'activer sur le dimère nouvellement formé et la réaction

peut continuer avec d'autres oligomères (propagation). La terminaison consiste en la formation de ponts disulfures par oxydation de deux thiols libres situés sur des oligomères différents.

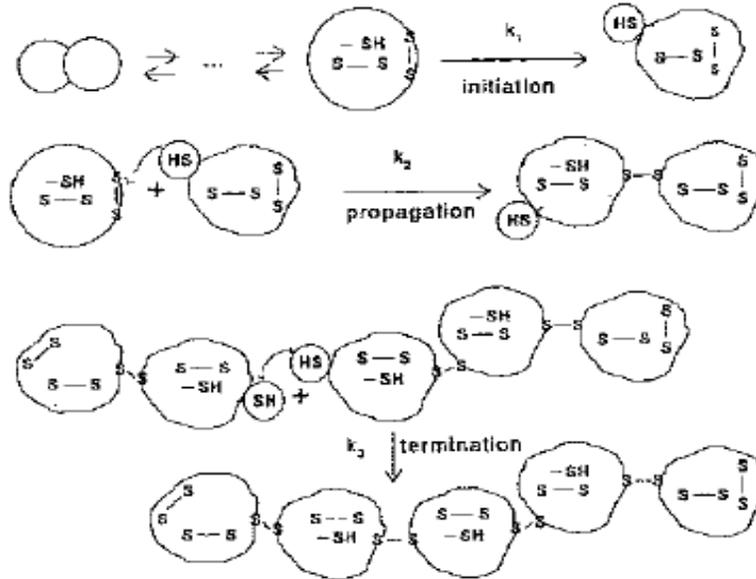


Figure 5: Modèle d'agrégation thermique par polymérisation de la β -lactoglobuline.

Le mécanisme de formation des agrégats est identique dans le cas d'un mélange de protéines sériques où des agrégats sont formés par co-agrégation des différentes protéines sériques présentes. Ainsi, lorsque la β -lactoglobuline (β -LG) est en mélange avec l' α -lactalbumine (α -LG) et l'albumine sérique bovine (BSA), le processus d'agrégation des protéines sériques est gouverné par la β -LG, la protéine majoritaire. Cependant, l' α -LG et la BSA jouent un rôle non négligeable car elles vont former des co-agrégats avec la β -LG. De ce fait, dans le cas d'un mélange α -LG/BSA/ β -LG, des homopolymères de chaque protéine peuvent se former tout comme des copolymères d' α -LG/BSA et d' α -LG/ β -LG (Havea, Singh, & Creamer, 2000).

Les cinétiques d'agrégation peuvent être modulées entre autre par la concentration en sel présent dans la solution. Ainsi, Mahmoudi et al. (2007) ont montré que pour une concentration en protéine donnée, les agrégats ont une masse molaire largement supérieure en présence de sel (Figure 6). De ce fait, la concentration limite de gélification en présence de sel est réduite.

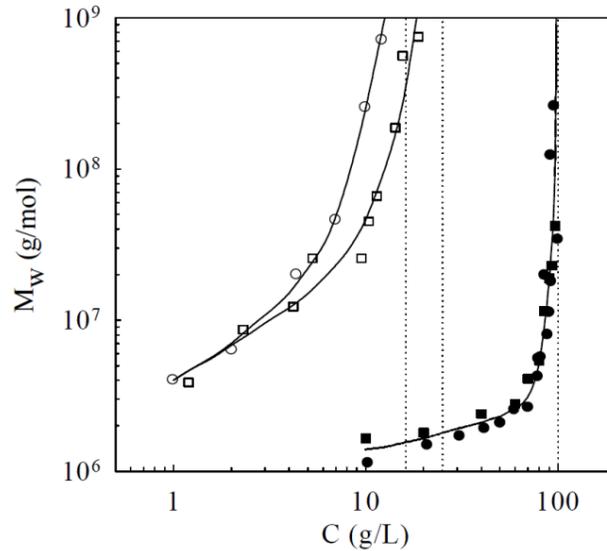


Figure 6: Masse molaire des agrégats de protéines sériques (carrés) et de β -lactoglobuline (cercles) formés en présence de 0,1M NaCl (symboles vides) ou en absence de sel (symboles pleins). Les lignes verticales en pointillés correspondent aux concentrations de gélification de la solution.

1.3.2.3.2 Les microgels

Contrairement aux agrégats fractals, les microgels sont formés dans des conditions de répulsions électrostatiques faibles. De ce fait, ils peuvent être produits à un pH proche du point isoélectrique des protéines sériques (Donato, Schmitt, Bovetto, & Rouvet, 2009) ou en présence de calcium mais à un pH proche de la neutralité (Phan Xuan, 2013):

- En se rapprochant du point isoélectrique, les répulsions électrostatiques sont diminuées et les protéines peuvent s'assembler pour former des agrégats denses et sphériques.
- La formation de microgels à un pH proche de la neutralité est possible uniquement en présence d'ions au minimum bivalent. Ainsi, il est essentiel d'ajouter du calcium à la solution afin de réduire la densité de charge des protéines. En revanche, aucun microgel n'est formé en présence d'ions monovalents comme le NaCl.

Les agrégats formés présentent une polydispersité relativement faible avec un rayon hydrodynamique proche de 150 nm. Cependant, plusieurs paramètres comme la température, le pH, la concentration en sels et la concentration en protéines ont un impact sur l'agrégation des protéines et donc sur la cinétique de formation des microgels ainsi que sur leur forme (De Wit & Swinkels, 1980; Jung et al., 2008b; Mehalebi, Nicolai, & Durand, 2008). Tout comme avec les agrégats fractals, le mécanisme de formation des microgels peut se diviser en plusieurs étapes. Une première étape de dénaturation des protéines sériques va s'opérer puis ces dernières vont s'assembler pour former de petits agrégats primaires qui

serviront d'unité de base pour la formation de microgels. Les agrégats primaires concernant la formation de microgels correspondent à des objets denses et sphériques (Nicolai et al., 2011a; Schmitt et al., 2010). Ces agrégats primaires vont ensuite s'associer via des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes puis des ponts disulfures vont stabiliser la structure interne du microgel. Ainsi, la présence de ponts disulfures confère à ces agrégats une bonne stabilité en solution sur une large gamme de pH. Cependant, pour des valeurs de pH supérieures à 10, les ponts disulfures sont rompus et une dissociation des microgels est observée (Schmitt et al., 2010).

1.3.2.3.3 Les fibrilles

Les fibrilles sont considérées comme de longs filaments insolubles composés de protéines et/ou de peptides et ont une longueur comprise entre 1 et 10 μ m pour une largeur d'environ 4nm (Adamcik & Mezzenga, 2012; Gosal, Clark, Pudney, & Ross-Murphy, 2002; Veerman, Ruis, Sagis, & van der Linden, 2002b). Elles sont produites à la suite d'un traitement thermique de longue durée réalisé à faible force ionique et à un pH proche de 2 (Aymard et al., 1999; Kavanagh et al., 2000).

Le procédé d'agrégation des fibrilles est différent de celui présenté dans la Figure 4. En effet, Akkermans et al (2008) ont montré que la première étape de formation des fibrilles consiste en une dénaturation des protéines suivie d'une hydrolyse chimique au niveau d'un acide aspartique pour former des peptides de masse molaire entre 2 et 8 kDa. La seconde étape consiste en une agrégation de certains des peptides formés précédemment. Seuls les peptides faiblement chargés, les plus hydrophobes et capable de former des feuillet β intermoléculaires vont s'assembler en protofilament (Akkermans et al., 2008). En effet, les peptides vont s'associer par l'intermédiaire de feuillets β intermoléculaires positionnés de manière perpendiculaire à l'axe longitudinale du protofilament (van der Linden & Venema, 2007). Ces protofilaments vont à leur tour s'assembler pour donner naissance à des fibrilles dites matures (Adamcik & Mezzenga, 2012) (Figure 7).

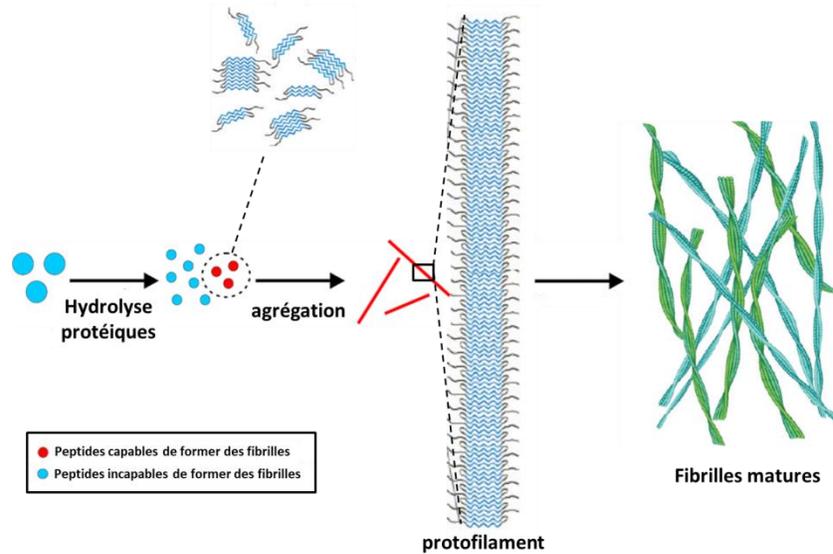


Figure 7: Mécanisme de formation des fibrilles à pH2 (adapté de Adamcik & Mezzenga, (2012).

La répartition hétérogène des charges à la surface des peptides est en partie responsable de la structure en bâtonnet des fibrilles. En effet, elles vont permettre d'éviter le repliement des fibrilles sur elles-mêmes (Akkermans et al., 2008).

L'étape d'hydrolyse explique les faibles taux de conversion obtenus car seulement une partie des peptides s'assemble pour la production des fibrilles. Dans le cas d'un mélange de protéines sériques, Bolder *et al* (2007) confirment que l' α -LG, la BSA et la β -LG sont hydrolysées après traitement thermique à pH2. En revanche, leurs travaux ont également montré que des solutions d' α -LG et de BSA chauffées indépendamment à pH2 ne forment pas de fibrilles alors que ces agrégats sont observés pour des solutions de protéines sériques et de β -LG ayant subi un traitement thermique identique (Bolder, Vasbinder, Sagis, & van der Linden, 2007). Ainsi, il n'est pas clairement établi que dans le cas d'un mélange type protéines sériques contenant α -LG/BSA/ β -LG, des copolymères d' α -LG/BSA et d' α -LG/ β -LG soient incapables de rentrer dans la composition des fibrilles.

1.3.2.3.4 Les agrégats mixtes

Les agrégats mixtes correspondent à une micelle de caséines sur laquelle des agrégats de protéines sériques se sont greffés. En effet, pendant le traitement thermique du lait, les protéines du lactosérum sont dénaturées et peuvent interagir avec les micelles de caséines pour former des agrégats mixtes. Sous l'action du chauffage, les caséines- κ , qui sont positionnées à la surface de la micelle de caséine, et les protéines sériques dénaturées vont s'associer via des interactions hydrophobes et des ponts disulfures (Haque & Kinsella, 1988; Jang & Swaisgood, 1990; Sawyer, 1969). Cependant, la formation d'interactions

hydrophobes entre la caséine- κ et les protéines sériques a été prouvée sur des mélanges β -LG/caséines- κ mais pas nécessairement sur des systèmes contenant les micelles de caséines dans leur intégralité. Ainsi, il est difficile d'affirmer le rôle des interactions hydrophobes dans la formation des agrégats mixtes. De plus, la partie hydrophobe de la caséine- κ est orientée vers l'intérieur de la micelle et est beaucoup moins exposée pour la formation d'interactions hydrophobes (Donato & Guyomarc'h, 2009b). La structure des agrégats mixtes dépend d'une part du ratio micelles de caséines/protéines sériques (MCas/PS) choisi mais également des conditions expérimentales utilisées (Anema & Li, 2003; Long, Van Winkle, & Gould, 1963). Ainsi, la valeur du pH ainsi que la température utilisée pour la fabrication des agrégats mixtes sont primordiales (Anema & Li, 2000) (Figure 8).

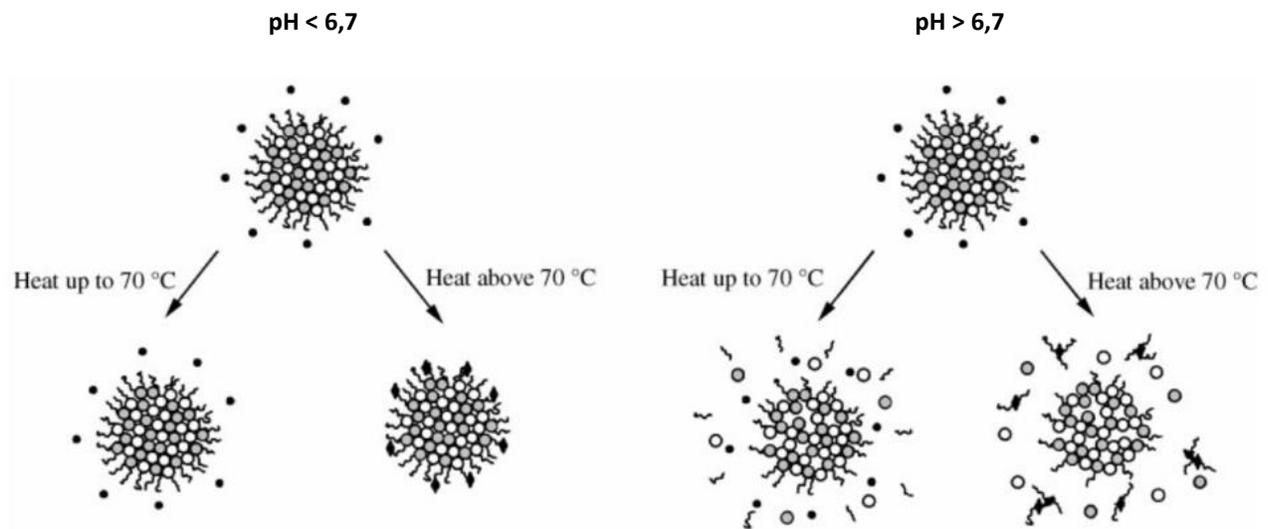


Figure 8: Effet du pH et de la température sur la formation des agrégats mixtes (Anema & Li, 2000).

Afin de former des agrégats mixtes, la température de chauffage doit être supérieure à la température de dénaturation des protéines sériques. En effet, si le traitement thermique est inférieur à 70°C, les protéines sériques restent principalement dans leur état natif et aucun agrégat mixte n'est formé (Figure 8).

A l'inverse, le pH de production des agrégats mixtes va quant à lui impacter l'intégrité de la micelle. De ce fait, pour un pH supérieur à 6,7, la micelle se dissocierait partiellement en monomère de caséines- α_{s1} , α et β et en oligomères de caséines- κ . Par conséquent, les agrégats de protéines sériques formés pour des températures supérieures à 70°C resteraient en solution et ne s'adsorbent pas à la surface de la micelle (Anema & Li, 2000). Ainsi, afin de favoriser la formation de ce type d'agrégat, il est essentiel de se placer à la fois à un pH inférieur à 6,7 pour éviter la dissociation de la micelle et à une température

supérieure à 70°C pour former des agrégats de protéines sériques capables d'interagir avec les caséines- κ présentes à la surface de la micelle (Figure 8).

Plusieurs mécanismes sont abordés dans la littérature pour expliquer le mécanisme de formation des agrégats mixtes (Donato & Guyomarc'h, 2009b). Une première hypothèse est la formation d'agrégats de protéines sériques dans le sérum avant d'interagir avec les caséines- κ (Dalglish, van Mourik, & Corredig, 1997; Elfagm & Wheelock, 1978, 1977) (Figure 9 I.A.).

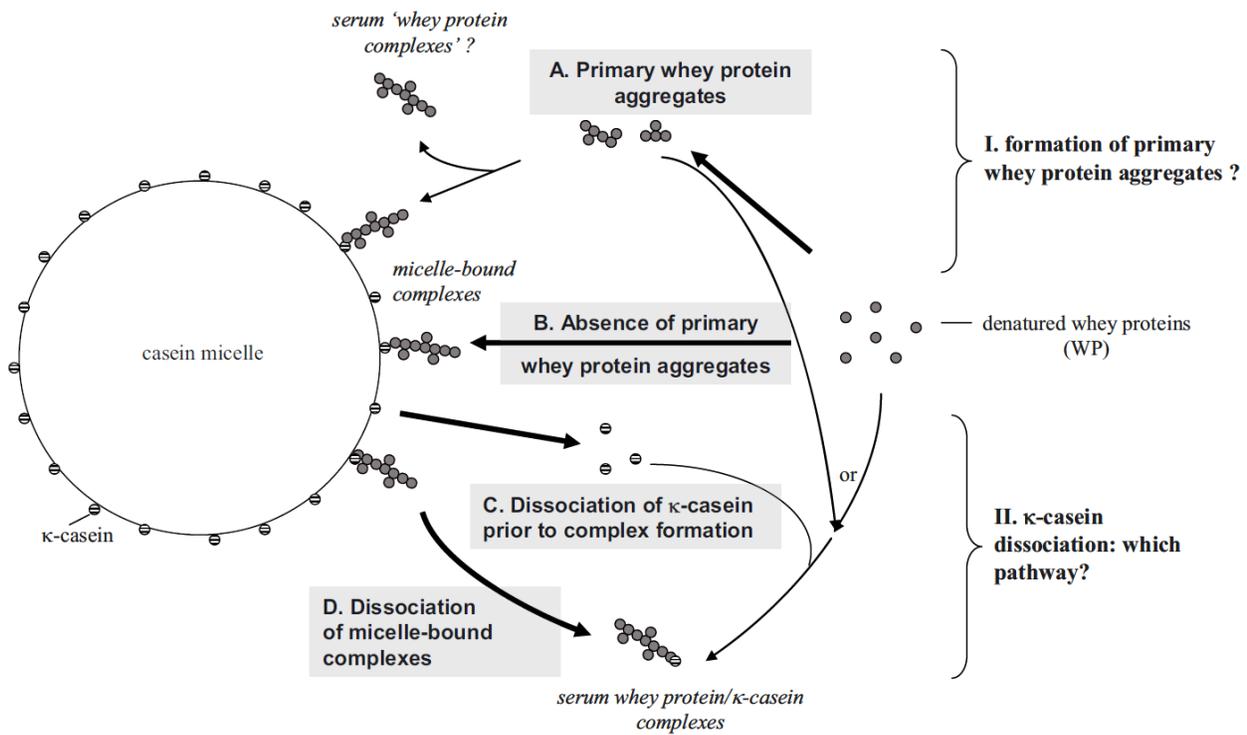


Figure 9: Mécanismes de formation des agrégats mixtes (Donato & Guyomarc'h, 2009b).

Cependant, Euber and Brunner (1982) ont montré qu'il n'était pas nécessaire que les protéines sériques soient préalablement agrégées avant d'interagir avec les caséines- κ . En effet, ces mêmes auteurs proposent une agrégation des protéines sériques dénaturées directement sur les caséines- κ des micelles de caséines et non dans le sérum (Figure 9 I.B.). D'autres études ont mis en relation la quantité de protéines sériques dénaturées et la proportion de caséines- κ dissociées dans le sérum (Menard, Camier, & Guyomarch, 2005; Singh & Creamer, 1991; Singh & Fox, 1986, 1987). Ces résultats amènent à penser que les caséines- κ sont susceptibles de se dissocier avant (Figure 9 II.C.) ou après (Figure 9 II.D.) interaction avec les protéines sériques pour se retrouver dans la fraction

soluble du lait. A ce jour, aucune piste n'est écartée et il est également probable que plusieurs de ces hypothèses soient justes et se déroulent de manière simultanée (Donato & Guyomarc'h, 2009a).

Ces types d'agrégats ont montré des propriétés interfaciales différentes des micelles natives et peuvent présenter un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire notamment pour la stabilisation d'émulsion ou le remplacement d'additifs dans certaines matrices alimentaires (Nicolai et al., 2011b; Surel et al., 2014).

1.4 Stabilité des agrégats de protéines lactières en solution

1.4.1 Stabilité au chauffage

L'instabilité macroscopique des agrégats est directement corrélée à des changements de fluidité ou à la gélification de la solution. De récents travaux ont montré que les agrégats de protéines sériques, qu'ils soient de structure dense (microgels) ou fractale, présentent une stabilité au chauffage supérieure aux protéines sériques natives (Chevallier, 2017). Ainsi, la stabilité à 120°C d'une solution de protéines sériques natives va diminuer à partir d'une concentration en protéines de 30 g/L contre 45 g/L pour les agrégats fractals. Les microgels, quant à eux, sont les agrégats les plus stables au chauffage même à des concentrations proches de 65 g/L (Figure 10).

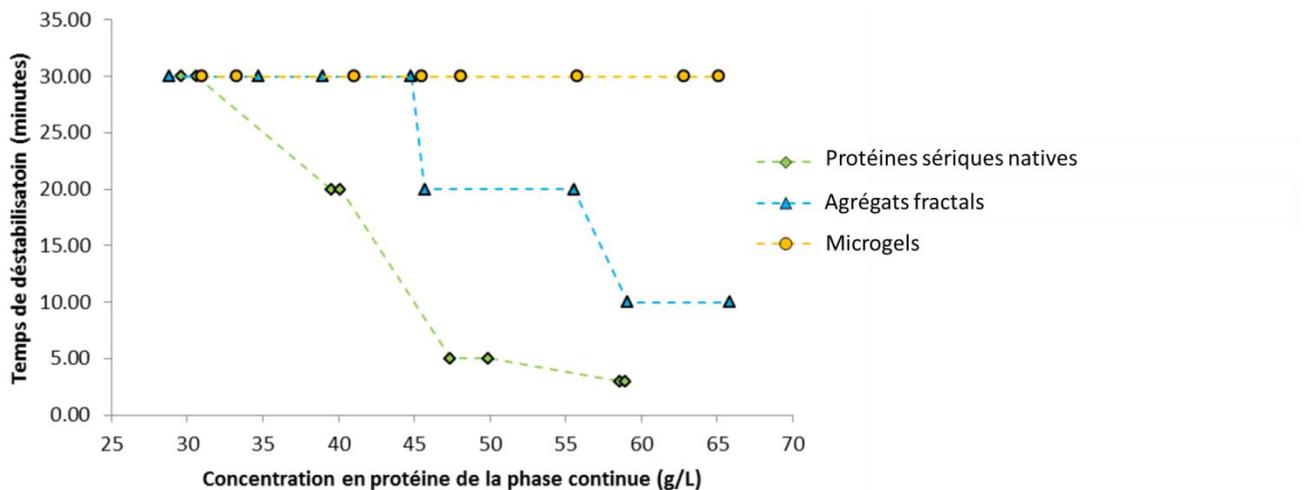


Figure 10: Stabilité des agrégats en solution au cours d'un traitement thermique à 120°C (Chevallier, 2017).

1.4.2 Gélification à froid

La gélification à froid est une technique en deux étapes qui consiste dans un premier temps à produire des agrégats de protéines par chauffage puis, après refroidissement, à modifier les répulsions

électrostatiques des agrégats en écrantant leurs charges de surface via l'addition de sels ou par modification du pH de la solution.

1.4.2.1 Variation du pH

Un ajustement du pH proche du point isoélectrique entraîne une diminution des répulsions électrostatiques favorisant l'agrégation des protéines. Ainsi, Alting et al. (2000) ont montré que des interactions électrostatiques réversibles vont dans un premier temps se former entre les protéines (Alting, De Jongh, Visschers, & Simons, 2002) puis, dans un deuxième temps, des ponts disulfures vont stabiliser le système et augmenter la force du gel (Figure 11 I.). En effet, en présence d'un agent bloquant la formation des ponts disulfures, la fermeté du gel diminue malgré un maintien de la microstructure du réseau qui reste inchangée grâce aux interactions électrostatiques (Figure 11 II.)(Alting et al., 2000). Par conséquent, en conditions normales, une augmentation du pH de la solution engendre une rupture des interactions électrostatiques alors que les ponts disulfures, covalents, persistent (Figure 11).

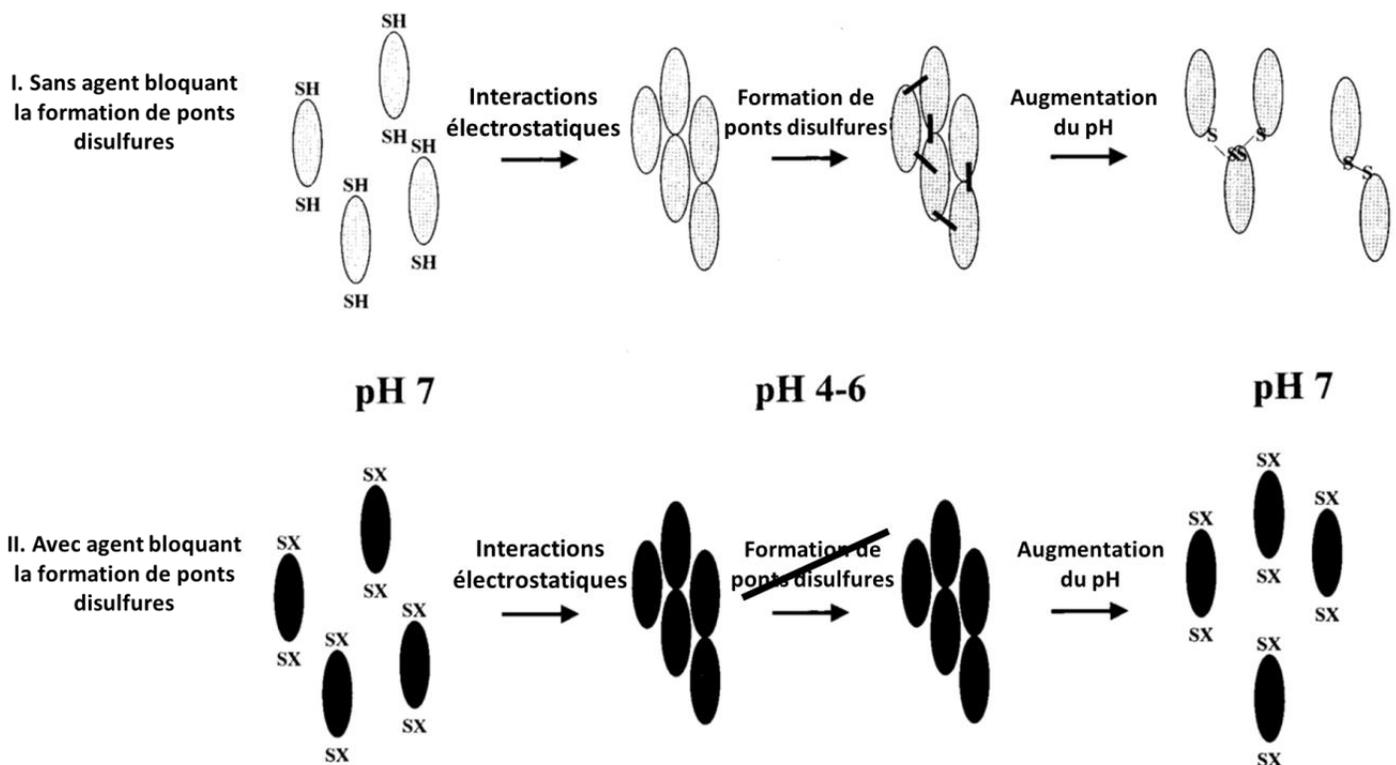


Figure 11: Mécanismes d'agrégation des protéines par gélification à froid en jouant sur le pH de la solution (Alting et al., 2000).

La cinétique de diminution du pH, le nombre de groupements thiols à la surface des agrégats ainsi que la taille de ces derniers sont des paramètres qui impactent la fermeté du gel. En effet, plus le pH de la

solution diminue lentement, plus les protéines restent longtemps proches du point isoélectrique favorisant la formation de ponts disulfures et augmentant la fermeté du gel (Cavallieri & da Cunha, 2008). De plus, Alting et al. (2003), ont montré que la fermeté du gel était plutôt régie par le nombre de groupements thiols disponibles pour la formation des ponts disulfures que par la taille des agrégats.

1.4.2.2 Force ionique

En fonction de la force ionique, deux types de gels peuvent être obtenus par gélification à froid : un gel opaque appelé « particulate gel » et un gel plus transparent nommé « fine strand gel ». Lorsque les agrégats ont une forme sphérique, la gélification conduit à un gel de type « particulate gel » alors que les systèmes de type « fine strand gels » sont obtenus avec des agrégats plus branchés. Cependant, pour des concentrations en sel monovalent importantes, des gels de type « particulate gels » peuvent être formés même à partir d'agrégats branchés (Nicolai & Durand, 2013).

L'ajout de chlorure de sodium peut donc provoquer la gélification d'une solution d'agrégats. Le temps de gélification va être inversement proportionnel à la concentration en protéines, en sels et à la taille des agrégats en solutions. En effet, plus la concentration en protéines et en sels augmente, plus le temps de gélification sera faible. De la même manière, le temps de gélification va diminuer avec l'augmentation de taille des agrégats. Concernant la structure du gel, réduire la concentration en protéines ou augmenter celle en sels conduit à des structures plus hétérogènes. A l'inverse, la taille des agrégats ne va pas nécessairement impacter la structure du gel (Ako, Nicolai, & Durand, 2010).

Le chlorure de calcium peut également être utilisé pour gélifier des solutions d'agrégats. Contrairement au NaCl qui va provoquer simultanément l'agrégation des agrégats de grande et de petite taille, le CaCl₂ engendre dans un premier temps l'agrégation des agrégats de taille importante avant d'agréger les plus petits (Marangoni, Barbut, McGauley, Marcone, & Narine, 2000). De plus, le CaCl₂ entraîne à la fois un écrantage des charges mais également la formation de ponts calciques entre les protéines. De ce fait, le CaCl₂ va provoquer la gélification des solutions d'agrégats à des concentrations beaucoup plus faible que le NaCl (Ako et al., 2010). Concernant la structure des gels obtenus, certaines études montrent une différence notable en fonction de la nature du sel utilisé alors que d'autres affirment l'inverse. Ces désaccords sont essentiellement dus à des notions d'échelle. En effet, des différences sont observées d'un point de vu rhéologique et plus spécifiquement au niveau de la fermeté de gel (Ju & Kilara, 1998; Marangoni et al., 2000) alors que Ako et al. (2010) affirme que la structure générale reste inchangée même si localement, le gel semble plus dense. Cette faible différence de densité peut éventuellement être à l'origine des variations de fermeté sans pour autant impacter la structure générale du système (Ako et al., 2010).

1.5 Stabilité des protéines aux interfaces

1.5.1 Interface modèle

1.5.1.1 Les protéines non agrégées

1.5.1.1.1 Les protéines sériques natives

Les protéines sériques natives sont de très bons émulsifiants. Lors de leur adsorption à l'interface, les protéines vont partiellement se dénaturer. Leur structure tertiaire est alors modifiée alors que la structure secondaire reste identique. Ce niveau de dénaturation est couramment appelé « molten globule » (Dickinson & Matsumura, 1994). Cette dénaturation de surface peut provoquer des phénomènes de floculation déclenchés par la formation de ponts disulfures et/ou d'interactions hydrophobes entre protéines interfaciales de gouttelettes adjacentes, si la distance inter-gouttelettes est assez faible (McClements, 2004). Lors d'un traitement thermique supérieur à la température de dénaturation des protéines, les phénomènes de dénaturation et d'agréations sont accélérés induisant une floculation plus importante des gouttelettes (Bos & Van Vliet, 2001). Cependant, dans le cas d'une distance inter-gouttelettes importante, les protéines adsorbées à l'interface vont interagir entre elles via des ponts disulfures pour former un film interfacial plus rigide (Bos & Van Vliet, 2001). La β -LG a une structure plus agrégée à l'interface eau/air et met plus de temps à se déplier qu'à l'interface huile-eau. Ceci est due à une plus grande affinité des composés hydrophobes pour l'huile que pour l'air (Roth et al., 2000).

1.5.1.1.2 Les micelles de caséines

L'épaisseur du film interfacial va dépendre de la surface de matière grasse créée lors de l'homogénéisation. En effet, lorsque la concentration en protéine est faible par rapport à la surface de matière grasse développée ($< 1 \text{ mg.m}^{-2}$), les micelles caséines vont avoir tendance à s'étaler pour former un film aux alentours de 5 nm d'épaisseur. A l'inverse, lorsque la concentration en micelles de caséines est en excès ($> 2 \text{ mg.m}^{-2}$), les caséines micellaires présentent à l'interface conservent une certaine structure et peuvent atteindre une épaisseur moyenne de 10 nm. Outre le ratio concentration en protéines par rapport à la surface des gouttelettes, l'épaisseur du film interfacial peut également être contrôlée par l'ajout de calcium. En effet, la présence de calcium entraîne une diminution des répulsions électrostatiques du fait de la plus faible densité de charge des micelles de caséines. De ce fait, les caséines micellaires vont s'étaler à l'interface diminuant l'épaisseur de film interfacial (Dalglish, 1996). Murray (1998), explique que plus la cohésion interne et la structure des protéines est importante,

plus la viscosité du film interfaciale sera élevée. Ainsi, les protéines désordonnées ayant une cohésion interne faible comme la caséine- β forme un film interfacial avec une viscosité plus faible que dans le cas de la β -lactoglobuline qui est une protéine plus structurée. Darling & Butcher (1978) ont montré que les micelles de caséines semblent plus difficiles à dessorber de l'interface que les protéines sériques présageant une plus forte affinité de celles-ci pour l'interface. Pour aller plus loin, Robson & Dalgleish (1987) ont démontré que la caséine- β ne présentait que peu voir pas de préférence pour l'interface vis-à-vis des autres caséines. Cependant, durant le stockage, la caséine- β peut remplacer une partie (pas la totalité) des caséines- α_{s1} présentent à l'interface.

1.5.1.2 Les agrégats

1.5.1.2.1 Les fibrilles

Jung et al. (2010) ont montré que les fibrilles s'adsorbent plus rapidement à l'interface que les protéines sériques natives entraînant une diminution de la tension interfaciale. Cependant, ce résultat a été obtenu dans le cas d'un mélange de fibrilles et de peptides résiduels non agrégés. Lorsque les fibrilles sont purifiées, leurs propriétés interfaciales sont très proches de celles obtenues pour les protéines sériques natives. Les auteurs ont également conclu que la longueur et la flexibilité des fibrilles n'avaient aucun impact sur la tension interfaciale. Un mélange de fibrilles et de peptides non agrégés engendre la formation d'un film interfacial plus rigide et plus fragile que dans le cas de protéines sériques natives. Ainsi, la rigidité du film va dépendre de la présence ou non de ces peptides à l'interface. Ces études ont été réalisées sur une interface air-eau. En revanche, Roth et al. (2000) ont prouvé que les fibrilles vont s'adsorber plus rapidement sur une interface huile-eau du fait de la meilleure affinité des résidus hydrophobes pour l'huile que pour l'air.

1.5.1.2.2 Les agrégats fractals

Les protéines sériques natives et les agrégats fractals sont capables de former une interface viscoélastique autour des gouttelettes de matière grasse et ainsi diminuer la tension interfaciale. En absence de sel, le comportement interfacial des agrégats est dominé par les répulsions électrostatiques et aucun effet, ni de la taille, ni de la structure n'est observé. A l'inverse, en présence de sel, l'étalement des protéines à l'interface est favorisé en raison de la diminution des répulsions électrostatiques. En effet, après écrantage des charges, un important effet de la structure des agrégats est constaté. Ainsi, des agrégats ayant une dimension fractale de 1,7 vont s'étaler indépendamment de leur taille à l'interface air-eau provoquant l'exposition de sous-unités protéiques et induisant une diminution de la

tension interfaciale (Mahmoudi et al. 2010). A l'inverse, les agrégats ayant une dimension fractale de 2 sont plus denses et plus rigides ce qui réduit leur capacité d'étalement à l'interface. Les propriétés d'étalement vont dépendre du degré d'association et de cohésion des agrégats. Ainsi, plus le temps de chauffage est important, plus les agrégats seront stabilisés par des ponts disulfures et moins ils s'étaleront à l'interface (Mahmoudi, Axelos, & Riaublanc, 2011). Cependant, une interface composée d'agrégats sera plus compacte qu'un film interfacial constitué uniquement de protéines sériques natives. Dans le cas d'un mélange de protéines sériques natives et d'agrégats, ce sont les protéines sériques natives qui vont aller en priorité à l'interface car elles ont un coefficient de diffusion supérieur à celui des agrégats qui vont, quant à eux, diffuser plus lentement à cause de leur taille (Mahmoudi et al., 2011).

1.5.1.2.3 Les microgels

Les propriétés d'adsorption et d'étalement des microgels à l'interface huile-eau vont dépendre à la fois de la taille des agrégats, de leur concentration et de leur fermeté (Li, Geisel, Richtering, & Ngai, 2013; Murphy, Farkas, & Jones, 2016b). En effet, plus les microgels sont petits, plus ils vont s'adsorber rapidement à l'interface puis se déformer pour former un film interfacial élastique. Tout comme les agrégats fractals, les interactions non-covalentes vont être partiellement rompues une fois le microgel adsorbé à la surface d'une goutte. De ce fait, plus la structure des agrégats est rigidifiée par des ponts disulfures, moins ils vont s'étaler à l'interface. L'étalement des microgels à l'interface est inversement proportionnel à la concentration en agrégats. Ainsi, à faible concentration, les agrégats s'étaleront davantage qu'à forte concentration (Figure 12). Cependant, une fois à l'interface, les microgels se réarrangent pour exposer leurs régions hydrophobes dans la phase grasse et diminuer ainsi la tension interfaciale.

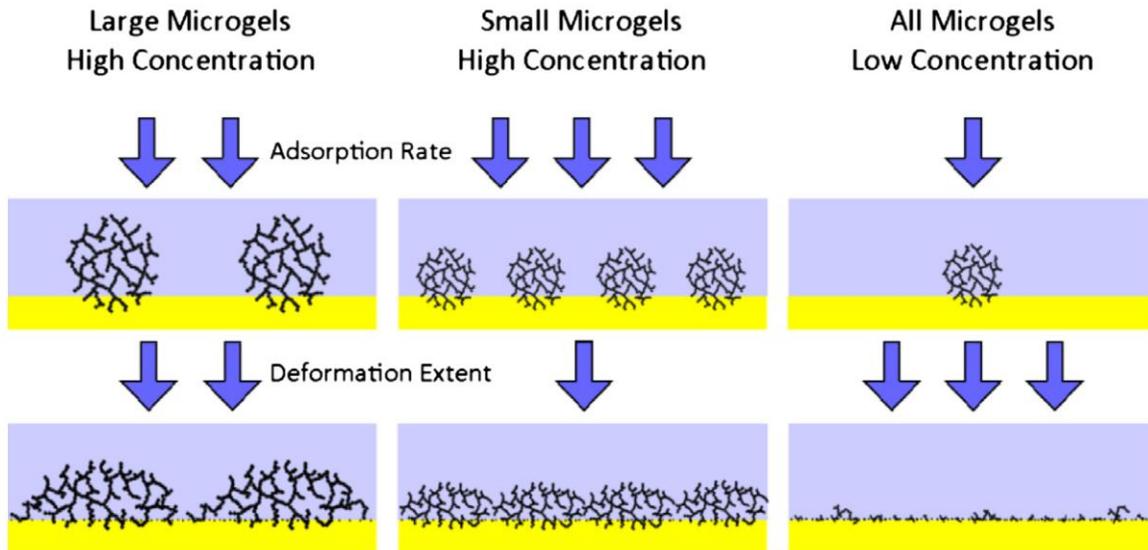


Figure 12: Effets de la taille des agrégats et de leur concentration sur les propriétés d'étalement des agrégats (Murphy, Farkas, & Jones, 2016a).

1.5.2 Interfaces *in situ*

1.5.2.1 Gélification par chauffage d'une émulsion stabilisée par des protéines sérique native

Chen et al. (1998) ont étudié les propriétés viscoélastiques d'une émulsion stabilisée par des protéines sériques natives en fonction de la concentration en protéines et en matière grasse lors de différents traitements thermiques. Au cours d'un chauffage à 85°C, les phénomènes de dénaturation et d'agrégation des protéines conduisent à une augmentation de la texture des émulsions. Lors du refroidissement, une augmentation de la fermeté du système est également observée due à la formation de liaisons hydrogènes entre les protéines. Plus la concentration en protéines est importante, plus la fermeté du gel est forte. Concernant la concentration en matière grasse, Chen et al. (1998) expliquent que les gouttelettes de l'émulsion vont faire partie intégrante du réseau. De ce fait, plus la fraction volumique de matière grasse est importante, plus l'émulsion sera texturée (Dickinson & Chen, 1999). Ce principe de gélification d'émulsion laitière est efficace mais difficilement contrôlable. En effet, lors du chauffage, les protéines présentes dans la phase continue et à l'interface vont se dénaturées et interagir entre elles. De ce fait, la composition de l'interface et de la phase continue n'est plus maîtrisée.

1.5.2.2 Gélification d'une émulsion par l'intermédiaire d'agrégats de protéines adsorbés à l'interface

Surel et al. (2014) ont montré que les agrégats mixtes et fractals étaient capables de connecter les gouttelettes et de texturer une émulsion à 30% de matière grasse. Le mécanisme présenté dans les

travaux de Surel et al. (2014) consiste en l'adsorption d'un agrégat sur les interfaces de deux gouttelettes provoquant le pontage de ces dernières. Ainsi, en modulant la concentration en agrégats à l'interface, il est possible d'obtenir des émulsions liquides lorsque la quantité d'agrégats adsorbée est faible ou des gels dans le cas où la concentration interfaciale en agrégats est élevée. Cependant, les émulsions se texturent pendant la phase d'homogénéisation ce qui peut provoquer le colmatage de l'appareil et être problématique dans le milieu industriel. A l'inverse, une interface composée uniquement de protéines sériques non agrégées ou de micelle de caséines n'entraîne ni de floculation ni de texturation du système. Les protéines sériques natives étant de meilleurs émulsifiants que les agrégats, il devrait être possible de moduler la concentration interfaciale en agrégats en jouant sur le ratio protéines solubles/agrégats. De ce fait, l'objectif de cette thèse est de contrôler la composition interfaciale en agrégats en utilisant des protéines solubles (caséines non micellaires et protéines sériques natives) afin de retarder la texturation des émulsions pour ne pas colmater l'homogénéisateur. De plus, ce principe de texturation pourrait être appliqué à des émulsions allégées contenant un faible taux de matière grasse (5%). Récemment, Mantovani et al. (2015), ont démontré qu'il était possible de faire gélifier une émulsion à 30% au cours d'un stockage à 25°C en utilisant des agrégats de protéines sériques. Ceci est rendu possible par l'intermédiaire d'interactions moléculaires entre les protéines. Cependant aucune précision sur les types d'interaction présents et sur les protéines impliquées dans la texturation de l'émulsion n'a été détaillée.

1.6 Les émulsions

Une émulsion consiste à mélanger deux liquides non miscibles, en général, l'huile et l'eau, avec un des deux constituants dispersé sous forme de gouttelettes dans le deuxième. Lorsqu'il s'agit de gouttelettes de matière grasse dispersée dans une phase aqueuse, l'émulsion est de type huile dans eau (H-E) alors qu'un système comprenant des gouttelettes d'eau dispersées dans une phase grasse est de type eau dans huile (E-H). Ainsi, le lait, la crème ou encore la mayonnaise sont des exemples d'émulsions H-E tandis que le beurre ou la margarine sont des émulsions E-H. Dans cette thèse, nous nous intéresserons exclusivement aux émulsions de type H-E. Ces émulsions peuvent être divisées en trois zones ayant des propriétés physico-chimiques différentes :

- La phase dispersée correspondant aux gouttelettes de matière grasse dispersées dans la phase continue. La concentration en matière grasse, la taille des gouttelettes, l'état de cristallisation, la distance inter-gouttelette ainsi que les interactions entre gouttelettes sont des paramètres essentiels pour contrôler la stabilité des émulsions.

- La phase continue correspondant à la partie aqueuse de l'émulsion dont les caractéristiques physico-chimiques ainsi que sa composition peuvent varier. Ainsi, le pH, la force ionique, la viscosité et la composition/concentration moléculaire (protéines, sucres, fibres...) de la phase dispersée vont avoir un rôle sur la stabilité du système.
- L'interface correspondant à la surface des gouttelettes couverte par des molécules amphiphiles jouant le rôle d'émulsifiant. La nature et la concentration des émulsifiants utilisés va impacter les propriétés interfaciales et la stabilité des émulsions. Elle n'est pas qu'une simple surface avec une composition homogène mais possède une épaisseur et une composition localement variable.

1.6.1 Formation des émulsions

Une émulsion est un système thermodynamiquement instable. Cependant, d'un point de vue cinétique, il est possible d'obtenir des émulsions stables pendant plusieurs mois. Pour cela, il est primordial de fournir une énergie suffisante pour permettre aux deux phases de se mélanger et de former une interface : c'est l'étape d'émulsification. Dans le même temps, il est nécessaire que les molécules tensioactives s'adsorbent rapidement et durablement à l'interface pour abaisser la tension interfaciale et stabiliser le système.

1.6.1.1 L'émulsification

Le procédé permettant d'émulsifier deux liquides non miscibles est appelé homogénéisation. Cette étape peut se faire avec différents types d'appareils capables d'appliquer des cisaillements forts. Dans les industries agroalimentaires, les systèmes rotor-stator et homogénéisateur haute pression sont les plus utilisés. L'homogénéisation est généralement divisée en deux étapes :

- L'homogénéisation primaire correspondant à la fabrication d'une pré-émulsion grossière à partir des deux liquides non miscibles.
- L'homogénéisation secondaire permettant de réduire la taille des gouttelettes de l'émulsion primaire.

Les forces interfaciales, responsables de la forme sphérique des gouttelettes, exercent une pression sur le liquide à l'intérieur des gouttelettes qui dépend aussi de la courbure de l'interface. Cette pression de Laplace (ΔP_L en Pa) est régie par l'équation suivante :

$$\Delta P_L = \frac{4\gamma}{d}$$

γ : Tension interfaciale (N/m)

d : Diamètre (m)

Ainsi, d'après l'équation précédente, la pression nécessaire pour former des gouttelettes augmente lorsque le diamètre des gouttelettes diminue ou lorsque la tension interfaciale augmente.

1.6.1.2 Stabilisation des émulsions

Une émulsion est un système thermodynamiquement instable car l'augmentation de surface entre les deux phases non miscibles liée à la formation de gouttelettes entraîne un accroissement de l'énergie libre du système (ΔG en J) défini par l'équation suivante :

$$\Delta G = \gamma \Delta A$$

γ : Tension interfaciale (N/m)
 ΔA : Aire interfaciale (m²)

Cette augmentation d'énergie libre n'est pas favorable pour le système et l'émulsion va évoluer afin de diminuer cette énergie libre. Il existe deux possibilités pour réduire l'énergie libre du système :

- Diminuer la tension interfaciale par l'utilisation d'émulsifiants. Ces derniers sont des molécules amphiphiles composées d'un segment hydrophile et d'une partie hydrophobe. Ainsi, ces molécules vont se placer à l'interface huile-eau pour diminuer la tension interfaciale et réduire l'énergie libre de l'émulsion.
- Diminuer l'aire interfaciale : c'est la raison pour laquelle les émulsions ont tendance à se déstabiliser par coalescence (fusion de deux gouttelettes en une plus grosse). En effet, à volume constant, la surface développée par deux gouttelettes de petite taille va être supérieure à celle développée par une gouttelette de taille supérieure.

1.6.1.3 Déstabilisation des émulsions

Les phénomènes de déstabilisation des émulsions peuvent être d'origine physique ou chimique. Les déstabilisations physiques vont correspondre à une réorganisation spatiale du système alors que les phénomènes chimiques sont assimilés à des modifications de structure des molécules. De ce fait, le crémage, la floculation, la coalescence, le murissement d'Ostwald et la coalescence partielle sont des exemples d'instabilités physiques alors que l'oxydation et l'hydrolyse sont assimilées à des instabilités chimiques.

1.6.1.3.1 Le crémage

Dans la plupart des émulsions huile dans eau, il existe une différence de densité entre la phase continue et la phase dispersée. Par conséquent, des forces gravitationnelles vont s'exercer sur les gouttelettes de matière grasse (Robins & Hibberd, 1998). Ainsi, si la phase dispersée a une densité plus faible que la

phase continue, les gouttelettes vont remonter pour former une couche concentrée en matière grasse à la surface du système. Cependant, le crémage en lui-même n'engendre pas de changement de taille des gouttelettes et reste un phénomène réversible par agitation de l'émulsion. Durant le crémage, deux forces vont s'opposer sur les gouttelettes. La première est la force gravitationnelle qui va entraîner les gouttelettes vers la partie supérieure de l'émulsion alors que la deuxième correspond à la force de friction qui va ralentir le crémage des gouttelettes. A partir de ces deux forces, il est possible de calculer une vitesse de crémage (v_{Stokes} en m/s) exprimée par la loi de Stokes :

$$v_{\text{Stokes}} = -\frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{9\eta_1}$$

g : Accélération gravitationnelle (m/s^2)

r : Rayon des gouttes (m)

ρ_1 : Masse volumique de la phase continue (kg/m^3)

ρ_2 : Masse volumique de la phase dispersée (kg/m^3)

η_1 : Viscosité de la phase continue (Pa/s)

La loi de Stokes montre que la vitesse de crémage est impactée par la taille des gouttelettes, la différence de masse volumique entre les deux phases et la viscosité de la phase continue. De plus, l'état de floculation peut augmenter la vitesse de crémage. Le mécanisme de crémage entraîne une diminution de la distance inter-gouttelettes par concentration des gouttelettes dans la partie supérieure de l'émulsion ce qui favorise leur floculation, leur coalescence ou le relargage de matière grasse (formation d'une couche de matière grasse pure à la surface du système) (McClements, 2005).

1.6.1.3.2 La floculation

La floculation correspond à l'agrégation de deux ou plusieurs gouttelettes de matière grasse sans dégrader l'intégrité individuelle de chacune d'elles. Ainsi, la floculation entraîne une augmentation de la taille des particules en suspension favorisant le crémage de l'émulsion. Cependant, la floculation ne provoque pas de rupture du film interfacial. En fonction du type d'interaction et de l'énergie de liaison entre les gouttelettes, le phénomène de floculation peut s'avérer réversible par dilution, changement de pH ou agitation. La structure des amas de gouttelettes va dépendre à la fois des liaisons chimiques impliquées dans leur formation et également des mécanismes responsables de la collisions des gouttelettes (McClements, 2005). La floculation peut être un avantage ou un inconvénient en fonction du type de produit visé. A titre d'exemple, la floculation provoque une augmentation de la viscosité du système et peut, dans certaines conditions conduire à la formation d'un gel ce qui peut être intéressant pour la texturation et la stabilité de certains produits alimentaires (Demetriades, Coupland, & McClements, 1997a; Demetriades et al., 1997b). En effet, dans certaines conditions, les gouttelettes de

matière grasse peuvent flocculer jusqu'à former un réseau tridimensionnel ce qui empêche le crémage des gouttelettes.

La stabilité des émulsions peut s'expliquer par la théorie DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek). D'après cette dernière, les gouttelettes sont soumises à la fois à des interactions électrostatiques répulsives et des interactions de van der Waals qui elles, sont attractives. Le bilan des forces attractives et répulsives permet de définir si les gouttelettes vont plutôt avoir tendance à s'agréger ou à se repousser. De ce fait, si les forces d'interactions de van der Waals sont supérieures aux forces d'interactions électrostatiques, les gouttelettes de l'émulsion auront tendance à s'agréger. Cependant, dans le domaine alimentaire, les produits contiennent souvent du sel et la stabilité repose plus sur de la répulsion stérique que électrostatique.

Selon la structure et la concentration en tensioactifs, deux types de floculation sont à prendre en considération :

- La floculation par pontage consiste en la connexion de deux ou plusieurs gouttelettes d'une émulsion par l'intermédiaire d'une molécule tensioactive (Dalglish, 1997; Dickinson, 1991). Pour cela, il est nécessaire d'être en concentration limitante en tensioactif, développer une aire interfaciale importante et choisir un procédé de fabrication avec lequel les gouttelettes de matière grasse sont formées rapidement par rapport au temps d'adsorption des molécules tensioactives (McClements, 2005). Etant en concentration limitante en émulsifiant, certaines molécules vont être partagées entre deux ou plusieurs gouttelettes entraînant la floculation du système. Ce phénomène de connexion est également observé lorsque les émulsifiants sont sous forme agrégés.
- La floculation par déplétion est provoquée par la présence de macromolécules non adsorbées présentes dans la phase continue lorsque leur volume hydrodynamique est supérieur au volume compris entre deux gouttelettes. Cette condition induit l'exclusion des macromolécules non adsorbées de l'espace inter-goutte et la création d'un gradient de pression osmotique à l'origine du déplacement des molécules d'eau de l'espace inter-gouttelettes qui provoque le rapprochement des gouttelettes de matière grasse puis leur floculation (Asakura & Oosawa, 1958). Cependant, une concentration élevée en macromolécules non adsorbées augmente la viscosité de la phase continue et réduit les mouvements des gouttelettes. Par conséquent, la fréquence des collisions est diminuée et les phénomènes de déplétion sont limités (McClements, 2005).

1.6.1.3.3 La coalescence

La coalescence est assignée à la fusion de deux ou plusieurs gouttelettes de matière grasse pour en former une unique de taille supérieure afin de diminuer l'aire interfaciale et réduire l'énergie libre de l'émulsion. La coalescence va dépendre de la stabilité du film mince de phase continue qui sépare deux gouttelettes (film interstitiel). Ce phénomène est relativement long à se mettre en place et il est essentiel que les gouttelettes restent un certain temps en contact afin de laisser le film interstitiel s'amincir pour observer au final de la coalescence (Dickinson, 1992). La composition du film interfacial est un paramètre clé pour moduler la coalescence. Ainsi, les protéines sont de très bons émulsifiants pour lutter contre la coalescence du fait de la formation d'un film interfacial très viscoélastique où règnent des forces répulsives relativement importantes (interactions électrostatiques et encombrement stérique) (McClements, 2005).

1.6.2 Rhéologie des émulsions

Les émulsions alimentaires couvrent une gamme de propriété rhéologique très variée allant de systèmes liquides à des produits texturés voir gélifiés. Le comportement rhéologique des émulsions dépend du procédé de fabrication, des conditions de stockage mais également du type et de la concentration des ingrédients qui les composent. Ainsi, plusieurs facteurs influent sur les propriétés rhéologiques des émulsions (McClements, 2005):

- Fraction volumique de la phase dispersée
- Taille des gouttelettes
- Rhéologie de la phase continue
- Cristallisation de la matière grasse
- Charge des gouttelettes
- Interactions colloïdales

1.6.2.1 Fraction volumique de la phase dispersée

La viscosité des émulsions non floclées est proportionnelle à la fraction volumique de matière grasse utilisée. En effet, plus la teneur en matière grasse est importante, plus l'émulsion sera visqueuse. Un des paramètres essentiel responsable de la rhéologie des émulsions est l'état de flocculation des gouttelettes de matière grasse. Ainsi, McClements (2005) fait le lien entre la répartition des gouttelettes dans l'émulsion et la rhéologie du système le tout corrélé à la fraction volumique de matière grasse (ϕ) (Quemada & Berli, 2002):

- $\Phi < 0,05$: Les gouttelettes sont à une distance les unes des autres suffisamment importante pour ne pas interagir les unes avec les autres. Par conséquent, leur mobilité est uniquement due aux mouvements Browniens. Dans ces conditions, l'émulsion est un fluide de faible viscosité et dont les propriétés rhéologiques sont gouvernées par la viscosité de la phase continue.
- $0,05 < \Phi < 0,49$: Pour cette gamme de concentration, les interactions hydrodynamiques ainsi que la probabilité de collision entre les gouttelettes sont importantes limitant ainsi l'effet des mouvements Browniens sur les particules dans le système. L'émulsion reste tout de même un fluide dont la viscosité augmente avec la concentration en matière grasse.
- $0,49 < \Phi < 0,54$: Dans ces conditions, une séparation de phase est généralement observée. Une première phase correspondant à des gouttelettes de matière grasse floculées alors que la deuxième est une phase liquide dans laquelle sont dispersés des amas de gouttelettes.
- $0,54 < \Phi < 0,64$: La mobilité des gouttelettes est extrêmement limitée sur cette gamme de concentration car la distance inter-gouttelette est très faible. En effet, les gouttelettes se retrouvent dans des espaces confinés où elles peuvent vibrer mais en aucun cas se déplacer. La rhéologie de ce type de système est relativement variée et peut à la fois être assimilé à un fluide ou un solide en fonction du taux de cisaillement appliqué.
- $0,64 < \Phi$: Les gouttelettes sont totalement concentrées les unes contre les autres engendrant une mobilité quasi nulle des particules. La densité du système augmente lorsque la fraction volumique en matière grasse croît. Ce type d'émulsion est considéré comme un solide élastique.

1.6.2.2 Taille des gouttelettes

Les effets de la taille des gouttelettes sur la rhéologie des émulsions vont dépendre à la fois de la fraction volumique de matière grasse et de la nature des interactions colloïdales mises en jeu. En absence d'interaction colloïdale, la taille des gouttelettes influe sur la rhéologie des émulsions en raison de l'influence sur les mouvements Browniens et sur les cisaillements appliqués (Macosko & Mewis, 1994). Cependant, ces effets sont vrais uniquement pour des concentrations en matière grasse élevées ($\Phi > 0,45$) (Dickinson, 1998). En revanche, en présence d'interactions répulsives entre les gouttelettes, les effets de la taille des gouttelettes sur la rhéologie des émulsions peuvent être observés à des fractions volumiques de matière grasse plus basses.

1.6.2.3 Rhéologie de la phase continue (agent gélifiant, épaississant)

Pour des fractions volumiques faibles (< 30%), la rhéologie de la phase continue est le principal facteur qui influe sur la rhéologie de l'émulsion. De ce fait, afin de contrôler la rhéologie de la phase continue, des agents gélifiants et épaississants sont ajoutés au système. C'est la raison pour laquelle des protéines et des polysaccharides sont incorporés dans la phase aqueuse de l'émulsion afin de maîtriser la texture et améliorer la stabilité au crémage (Pettitt, Wayne, Nantz, & Shoemaker, 1995).

La matière grasse va quand même avoir un impact sur la rhéologie de ces systèmes selon les interactions attractives ou répulsives qui se produisent entre l'interface des gouttelettes et le réseau qui se développe dans la phase aqueuse. Si l'interface se connecte par des interactions attractives avec le réseau, les gouttelettes de matière grasse vont participer au renforcement de celui-ci car elles se comportent comme des jonctions solides en son sein. A l'opposé, si les gouttelettes n'interagissent pas ou si elles sont exclues du réseau, elles vont constituer des trous dans celui-ci ce qui va l'affaiblir. Lorsque les gouttelettes ne participent pas au réseau, on les qualifie de remplisseurs inactifs alors que ce sont des remplisseurs actifs en cas inverse.

1.6.2.4 Les agents de textures :

Les agents de textures peuvent être divisés en deux catégories : les épaississants et les gélifiants. Ces derniers vont essentiellement agir sur la phase continue de l'émulsion. Les épaississants ont pour rôle d'augmenter la viscosité de la phase continue (Imeson, 1997). Ceci est rendu possible grâce à leur structure moléculaire très étendue. En revanche, les agents gélifiants sont des molécules capables d'interagir entre elles via des liaisons intermoléculaires conduisant à la formation d'un gel (McClements, 2005). Cependant, en pratique, la différence entre les deux types d'agent technologique n'est pas clairement établie. En effet, les agents épaississants peuvent former des gels à des concentrations élevées alors que les gélifiants sont capables d'augmenter la viscosité de la solution si la concentration utilisée est assez faible. De plus, certains biopolymères peuvent agir à la fois comme gélifiant et comme épaississant en fonction des conditions physico-chimique du milieu (température, pH et force ionique). L'objectif de ces agents technologiques est double. D'une part, texturer le produit pour obtenir de bonnes caractéristiques gustatives et d'autre part, stabiliser le système en empêchant les particules de sédimenter ou de crémer.

1.6.2.4.1 Les agents épaississants

Les agents épaississants sont vendus sous forme de poudre composée soit d'un biopolymère unique ou, dans certain cas, d'un mélange de biopolymère. La capacité de ces polymères à augmenter la viscosité de

la phase continue dépend à la fois de leur masse molaire, du degré de branchement et de leur flexibilité (Cesàro, 1994).

1.6.2.4.2 Les agents gélifiants

Les agents gélifiants sont utilisés pour leur capacité à gélifier la phase continue de l'émulsion et limiter les phénomènes de crémage. Le gel obtenu correspond à un réseau tridimensionnel composé d'agrégats de polymères qui vont piéger l'eau dans des poches de sérum. Les propriétés des gels de biopolymères vont dépendre des interactions moléculaires ainsi que du type et de la structure des molécules mises en jeu (Oakenfull, Pearce, & Bruley, 1997; Walstra, 2003). Les gels obtenus peuvent être opaques, transparents, plus ou moins texturés, homogènes, hétérogènes... Dans certaines conditions, des phénomènes de synérèse sont également observés. La gélification peut être induite par des variations de température, de pH, de force ionique mais également par ajout d'enzymes ou d'agents favorisant la formation des interactions moléculaires. La nature des interactions moléculaires présentes dans un gel va dépendre des molécules impliquées et des conditions physico chimiques de formation de ces interactions (McClements, 2005). Ainsi, la structure d'un gel de biopolymères peut être maintenue par plusieurs types d'interactions moléculaires (Figure 13) :

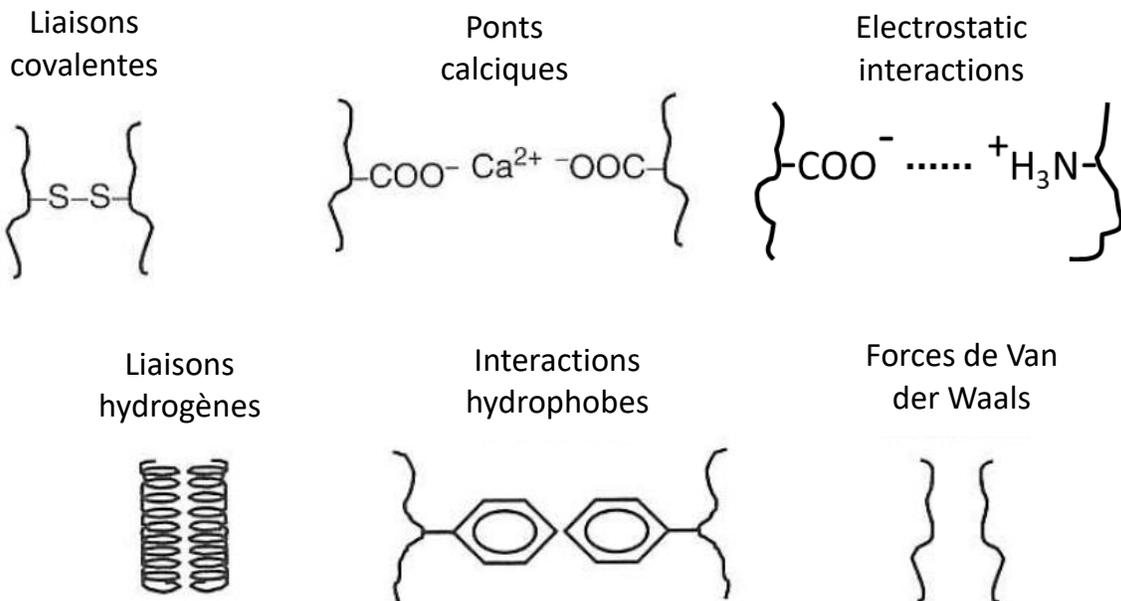
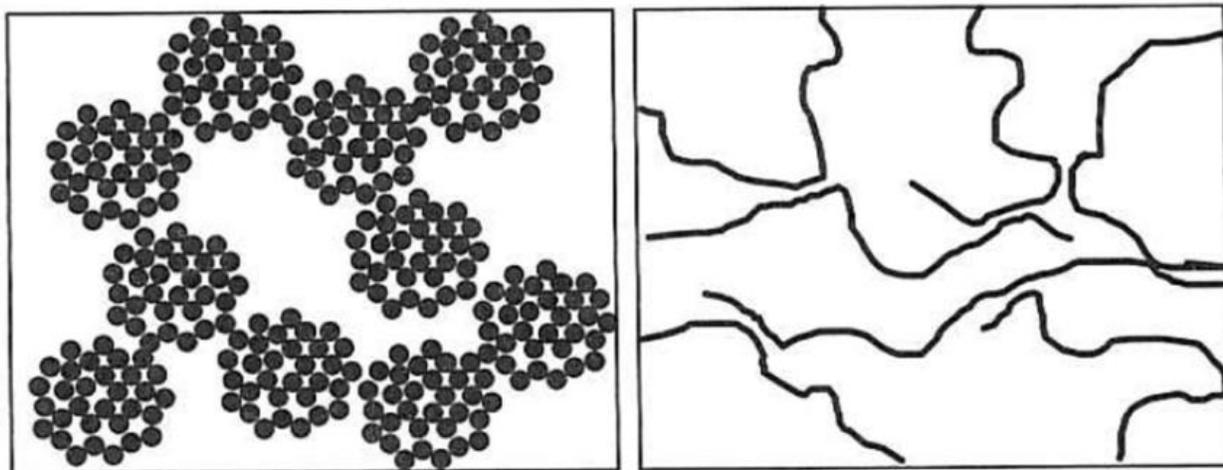


Figure 13: Interactions moléculaires impliquées dans la structure des gels de biopolymères.

Les gels de biopolymères sont généralement classés en deux catégories (les « gels particulaires » et les « gels filamenteux ») en fonction de leurs propriétés rhéologiques et de leurs microstructures (Foegeding & McGuffey, 2002; Oakenfull, Pearce, Bruley, & 1997). Les « gels particulaires » correspondent à un réseau tridimensionnel composé de particules larges et compactes (Figure 14). Ce type de gel se forme lorsque les molécules individuelles sont capables d'interagir entre elles en tout point de leur surface. D'un point de vue macroscopique, ces systèmes ont tendance à être opaques avec de la synérèse due à la présence de larges poches de sérum au sein du réseau. Un des exemples de « gel particulaire » sont ceux formés à partir de protéines globulaire (œuf ou protéines sériques) dans des conditions proches du point isoélectrique ou pour des concentrations élevées en sel. A l'inverse, les « gels filamenteux », sont constitués de filaments fins correspondant à des molécules individuelles ou agrégées (Figure 14). Macroscopiquement, les gels sont transparents avec une capacité de rétention d'eau supérieure aux systèmes précédents. Les « gels filamenteux » peuvent être obtenus grâce à divers hydrocolloïdes (par exemple : gélatine, pectine, agar ou alginates) ou en ajoutant des protéines globulaires préalablement chauffées à des pH loin du point isoélectrique ou en présence d'une forte concentration en sel (Doi, 1993; McClements, 2005). Avec les hydrocolloïdes, les filaments correspondent à des molécules individuelles alors que dans le cadre des protéines globulaires, les filaments sont constitués de plusieurs protéines agrégées.



Gel particulaire

Gel fibrillaire

Figure 14: Structure des "Gel particulaire" et des "Gel fibrillaire".

Dans le secteur de l'alimentaire, les gels peuvent être formés soit par gélification à froid ou à chaud (Chen & Dickinson, 1998; Sok Line, Remondetto, & Subirade, 2005; Ziegler & Foegeding, 1990). De plus,

en fonction du type d'interactions impliquées dans la formation du système, les gels peuvent être réversibles ou irréversibles (Figure 15). Ainsi, les gels impliquant des liaisons non-covalentes et dont le procédé de gélification ne modifie pas définitivement la structure des molécules seront plutôt réversibles alors que les gels comportant des liaisons covalentes ou dont la gélification engendre des modifications structurales permanentes des molécules ont tendance à être irréversibles. Les gels de gélatine sont un exemple de gels thermoréversibles se formant au refroidissement (Djabourov, 1988) alors que les protéines du blanc d'œuf forment des gels thermo irréversibles suite à un chauffage (Mine, 1995).

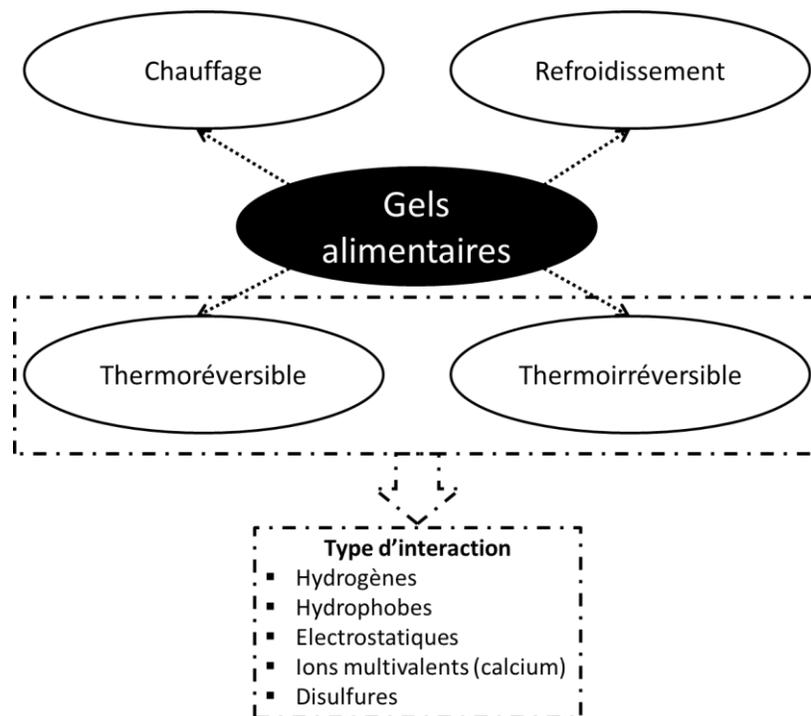


Figure 15: Les différents types de gels alimentaires.

Le type d'interaction impliqué dans la formation des gels va déterminer le comportement de ces derniers vis à vis d'éventuels changements concernant les conditions physico-chimique de stockage. Les liaisons hydrogènes, par exemple, se forment durant le refroidissement mais se dissocient lors du chauffage. Certains biopolymères, comme les carraghénanes ou l'agar, sont capables de former des liaisons hydrogènes entre des hélices alpha présentes sur deux molécules différentes et ainsi favoriser la formation du gel. Les interactions électrostatiques vont également avoir un rôle majeur dans la formation de gels de biopolymères d'autant plus que ce type d'interaction est sensible aux variations de pH et à la concentration en sel. En effet, pour des pH éloignés du point isoélectrique, les répulsions

Chapitre 1 : Etat de l'art

électrostatiques vont limiter la gélification du système. En revanche, pour des pH proches du point isoélectrique ou en présence de sels, les protéines vont avoir tendance à s'agréger et former un gel. L'ajout d'ions multivalent comme le calcium permet la gélification de certains systèmes en formant des ponts calciques entre les groupements des biopolymères chargés négativement. Les biopolymères comportant des groupements non-polaires vont quant à eux avoir tendance à s'associer via des interactions hydrophobes comme dans le cas des gels d'agrégats de protéines sériques. Les protéines comportant un ou plusieurs groupements thiols vont être capables de former des ponts disulfures irréversibles augmentant la fermeté et la stabilité des gels. Pour conclure, la capacité d'un biopolymère à former un gel sous certaines conditions ainsi que ses propriétés physiques vont dépendre de la proportion de chaque interaction impliquée dans la structuration du gel (McClements, 2005).

Le Tableau 2 décrit les propriétés structurales et fonctionnelles de certains biopolymères utilisés dans les produits alimentaires.

Tableau 2: Propriétés structurales et fonctionnelles des biopolymères fréquemment utilisés dans les produits alimentaires (extrait de McClements, 2005).

Nom	Structure	Fonction	Mécanismes d'agrégation	Informations complémentaires
Carraghénanes	Linéaire Anionique 200-400 kDa	Epaississant Gélifiant	Association d'hélice α Gélification à froid Thermoreversible	Instable à l'acidification
Agar	Linéaire Nonionique 80-140 kDa	Epaississant Gélifiant	Association d'hélice α Gélification à froid Thermoreversible	
Alginate	Linéaire Anionique 32-200 kDa	Epaississant Gélifiant	Ca^{2+} Gélification à froid Thermoreversible	Relativement stable à l'acidification D'autres ions peuvent être ajoutés
Xanthan	Linéaire Anionique ~ 2500 kDa	Epaississant Gélifiant	Association d'hélice α Gélification à froid Thermoreversible	Stable à pH acide et basique, au chauffage et à la congélation /décongélation
Amidon natif	Grains Nonionique	Epaississant Gélifiant	Gonflement des grains Gélification à chaud Irreversible	Gel opaque
Gelatine	Linéaire Amphiphile	Epaississant Gélifiant	Association d'hélice α Gélification à froid Thermoreversible	Gel transparent
Protéines globulaires	Linéaire Amphiphile	Epaississant Gélifiant	Hydrophobique Gélification à chaud Irreversible	Gel transparent ou opaque (dépend du pH)

La plupart des biopolymères s'agrègent au cours du refroidissement via la formation de liaisons hydrogènes favorisant l'obtention d'un système thermoréversible. Cependant, l'amidon natif s'agrège suite à un chauffage et permet l'obtention de gels thermoréversibles.

La texture des émulsions va dépendre de la nature des interactions susceptibles de se former entre les protéines présentes dans la phase continue et celles adsorbées à l'interface des gouttelettes de matière grasse (McClements, Monahan, & Kinsella, 1993b). Ainsi, en présence d'interaction entre les protéines de la phase continue et l'interface des particules, le réseau formé est renforcé et la fermeté du gel est augmentée.

1.6.2.5 Cristallisation de la MG

La cristallisation de la matière grasse influe directement sur les propriétés rhéologiques des émulsions uniquement si elles sont concentrées en matière grasse. En effet, Gliguem et al. (2009), ont montré que la cristallisation des gouttelettes au sein d'une émulsion engendre une augmentation des modules conservatifs et dissipatifs. A l'inverse, lors de la fonte de la matière grasse, la valeur des modules rhéologiques diminue. Par ailleurs, la température de cristallisation de la matière grasse dépend de la vitesse de refroidissement et de la taille des gouttelettes présentes dans l'émulsion (Lopez et al., 2002). Ainsi, plus la vitesse de refroidissement est importante, plus la matière grasse cristallise à de faibles températures. Concernant la taille des gouttelettes, plus le diamètre de ces dernières est faible, plus la température de cristallisation est réduite. Ainsi, d'après Lopez et al., (2002), la température initiale de cristallisation est de 10,9°C pour une taille de gouttelette de 0,38µm contre 14,1 °C pour un diamètre de 1,25µm. Par conséquent, il est primordial de prendre en compte les phénomènes de cristallisation et de fonte de la matière grasse dans l'étude de la texture des émulsions au cours du stockage.

1.6.3 Hypothèse concernant la texturation des émulsions en fonction de la géométrie du système et de la structure des agrégats

La floculation et la texturation des émulsions sont directement liées à la distance inter-gouttelettes et aux agrégats utilisés (Figure 16). En effet, si la distance inter-gouttelettes est trop importante, les connexions entre ces dernières sont fortement compromises et le système reste liquide (Dickinson, 2010). A l'inverse, la réduction de la distance inter-gouttelettes augmente les probabilités de pontage et par conséquent la force du gel (Jafari et al., 2008; Jost et al., 1986; McClements et al., 1993a).

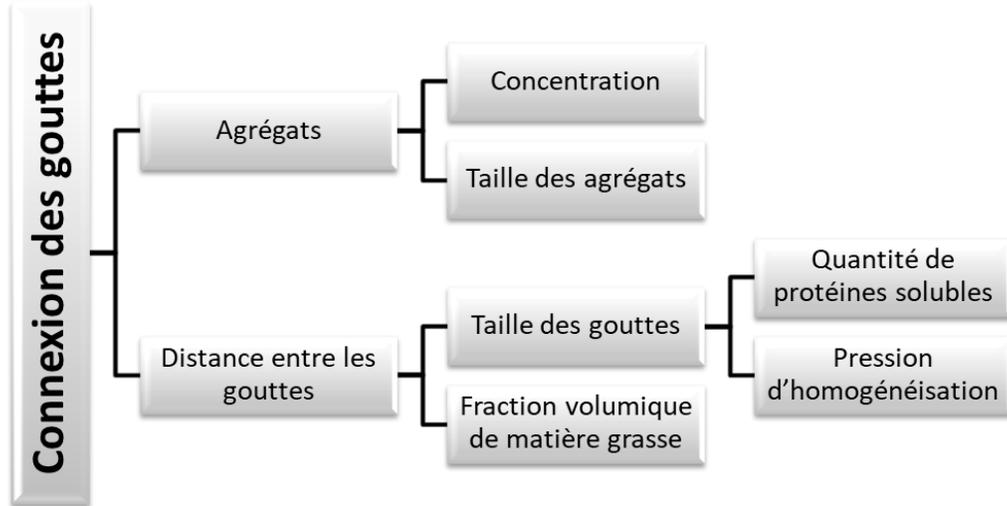


Figure 16: Hypothèses de départ concernant les paramètres influant sur la connexion des gouttelettes de matière grasse.

Afin de contrôler la distance entre les gouttelettes, la fraction volumique de matière grasse ainsi que la taille des gouttelettes sont des paramètres majeurs. De ce fait, réduire la fraction volumique de matière grasse induit une augmentation de la distance inter-gouttelette (Figure 17). Concernant la taille des gouttelettes, elle est régie d'une part par la pression d'homogénéisation appliquée durant la fabrication de l'émulsion (Jost et al., 1986) mais également par la concentration en émulsifiant (Dickinson, 2003). En effet, plus la pression d'homogénéisation est importante, plus la taille des gouttelettes sera faible et plus les particules seront proches (Figure 17). Concernant la concentration en émulsifiant, Kiokias et al. (2006) ont démontré que les protéines sériques natives ont de meilleures propriétés émulsifiantes que les agrégats. En effet, à même concentration, les protéines sériques natives couvrent davantage de surface et forment des gouttelettes de matière grasse plus petites que les agrégats. Ainsi, à fraction volumique de matière grasse et à concentration en protéine constante, la distance inter-gouttelette sera plus faible avec des protéines sériques natives que des agrégats.

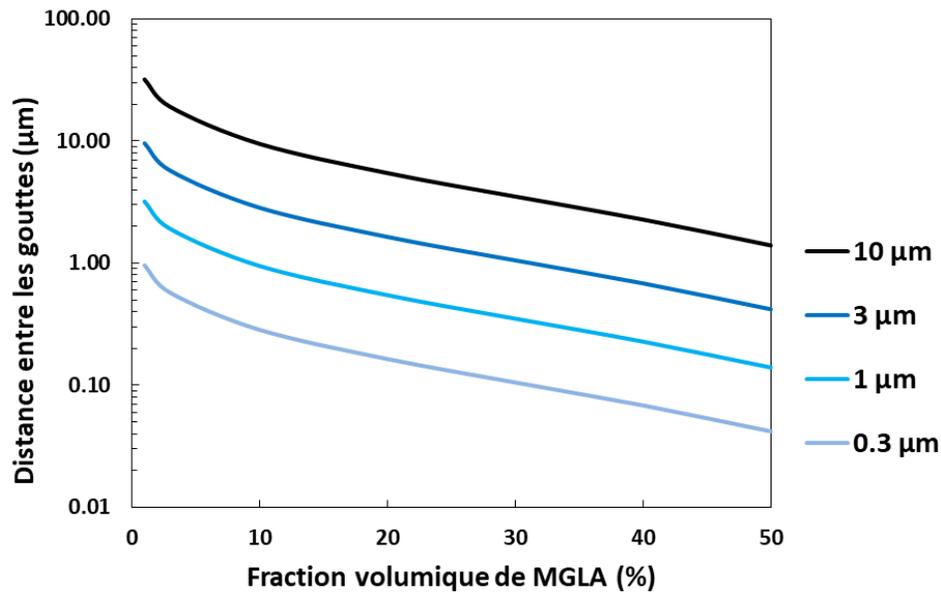


Figure 17: Simulation de l'influence de la fraction volumique de MGLA et de la taille des gouttelettes sur la distance moyenne inter-gouttelette.

Les agrégats utilisés pour le pontage vont également influencer sur la capacité de connexion et la texture des émulsions (Figure 16). En effet, la taille et la concentration en agrégats sont des paramètres à prendre en considération pour contrôler la texture des émulsions. Ainsi, plus la taille des agrégats est importante et plus les connexions inter-gouttelettes pourront se faire sur de longues distances. De la même manière, plus la concentration en agrégats est élevée, plus le nombre de connexions est important et plus le système sera texturé.

1.6.4 Compétition agrégats/protéines sériques natives/caséines

De nos jours, il est extrêmement difficile de trouver un produit laitier sans caséine (sous forme micellaire ou non). Par conséquent, réaliser des émulsions uniquement avec des protéines sériques natives et des agrégats ne serait pas réaliste. De ce fait, nous avons travaillé avec des poudres de protéines sériques industrielles contenant une fraction de caséines non micellaires. Ainsi, lors de la fabrication de l'émulsion, les protéines sériques natives, les agrégats et les caséines non micellaires vont être en compétition pour l'interface huile-eau. Plusieurs études ont mis en évidence la notion de compétition pour l'interface entre les caséines et les protéines sériques (Darling & Butcher, 1978; Dickinson, Mauffret, Rolfe, & Woskett, 1989; Robson & Dalgleish, 1987). Cependant, peu de travaux ont été menés sur la compétition entre les caséines non micellaires, les protéines sériques natives et les agrégats. Généralement, il n'existe pas de dominance exclusive d'une protéine en particulier. En effet, la

Chapitre 1 : Etat de l'art

composition interfaciale va dépendre d'un grand nombre de facteur : la composition du système en protéine, la concentration totale en protéine, l'état d'agrégation des protéines, la concentration en molécules de faible masse moléculaire, le procédé de formation des émulsions (effet de la diffusion des molécules plus ou moins important en fonction du protocole de fabrication) et le temps de stockage de ces dernières. En outre, il est très compliqué de prédire la composition interfaciale d'un système laitier contenant un mélange de protéines.

1.7 Conclusion

La composition du lait et la structure des protéines laitières sont très étudiées depuis de nombreuses années même si des incertitudes persistent concernant la structure de certaines protéines. Suite à un traitement thermique, les protéines du lactosérum se dénaturent et s'agrègent (seules ou sur les micelles de caséines) pour former différents types d'agrégats en fonction des conditions physico chimiques du milieu (microgels, fractals, fibrilles et des agrégats mixtes avec les micelles de caséines). Les mécanismes de formation et la structure des agrégats ont fait l'objet de nombreux travaux.

En revanche, les propriétés interfaciales des agrégats de protéines laitières sont moins décrites dans la littérature. La capacité d'adsorption et d'étalement sur interface H-E vont dépendre de la forme des agrégats et des interactions responsables de la cohésion de ces derniers. En émulsion, de récentes publications ont mis en évidence la capacité de ces agrégats à connecter les gouttelettes de matière grasse et à texturer le système. Cependant, peu d'études ont fait le lien entre la structure des agrégats et leur capacité à connecter les gouttelettes. Dans les émulsions laitières, les agrégats de protéines, les protéines sériques natives et les caséines sont en compétition pour couvrir l'interface H-E. Surel et al. (2014) ont montré que moduler cette compétition interfaciale permet à la fois de maîtriser la composition de l'interface et de contrôler la texture des émulsions. Cependant, les émulsions obtenues par Surel et al. (2014) sont liquides ou se texturent pendant l'étape d'homogénéisation ce qui peut être problématique dans le monde industriel. Actuellement, afin d'obtenir la texture souhaitée, les industriels de l'agroalimentaires ont recours à différents additifs comme les épaississants et les gélifiants. Ces derniers vont principalement texturer la phase continue ou augmenter la viscosité du système par floculation par déplétion. Les agrégats de protéines, quant à eux, vont donc permettre de texturer les émulsions en utilisant un tout autre mécanisme : contrôler la connexion des gouttelettes de matière grasse en modulant la composition interfaciale.

Chapitre 2 : Stratégie de l'étude

L'objectif de ces travaux est de comprendre le rôle de la composition interfaciale en protéines sur les mécanismes de connexion des gouttelettes et de les corrélés à la texture des émulsions laitières. Pour cela, nous allons fabriquer des émulsions contenant 5 à 30 p/p% de matière grasse dispersée dans une phase continue composée d'agrégats, de protéines sériques natives et de caséines non micellaires. Notre challenge est de créer une compétition pour l'interface huile-eau afin de contrôler aussi bien la distance entre les gouttelettes que les connexions entre ces dernières pour finalement maîtriser la texture de l'émulsion. Ainsi, en faisant varier la concentration de chaque composant, la composition interfaciale devrait être modifiée et impacter la texture macroscopique des émulsions. Cependant, Dickinson et al. (1989) expliquent qu'il n'existe pas de domination complète d'une des protéines pour l'interface. En effet, la concentration à l'interface de chaque protéine va dépendre d'un grand nombre de facteurs : concentration en protéines, surface interfaciale, état d'agrégation, protocole de fabrication et le temps écoulé depuis la formation de l'émulsion. Ainsi, il est très difficile de prédire la composition interfaciale dans des systèmes laitiers complexes. La problématique principale de cette thèse est donc de comprendre **comment et par quels mécanismes la composition interfaciale en protéines influence la connectivité des gouttelettes et la texture des émulsions laitières à pH neutre ?**

Pour résoudre cette problématique, cette thèse a été divisée en quatre parties :

- **Produire et caractériser les différents types d'agrégats** (*Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats de protéines laitières*). En faisant varier les conditions physico-chimiques du chauffage des protéines sériques, nous allons obtenir trois types d'agrégats : les agrégats fractals (branchés et peu denses), les microgels (sphériques et denses) et les fibrilles (longs et fins). Un dernier type d'agrégats, appelé agrégat mixte, est obtenu en chauffant un mélange de protéines sériques et de micelles de caséines. Ces quatre agrégats ont ensuite été caractérisés par Fractionnement Asymétrique Flux-Force couplé à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angle et un réfractomètre (A4F-MALLS-DRi).
- **Comparer la capacité des différents agrégats à connecter les gouttelettes de matière grasse et à texturer les émulsions à pH neutre** (*Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières*). Les agrégats fabriqués précédemment sont introduits dans des émulsions en mélange avec des caséines non-micellaires et des protéines sériques natives. La concentration de chaque ingrédient va être modifiée afin de moduler la compétition et la composition interfaciale. Les émulsions obtenues sont ensuite caractérisées

par observation macroscopique, granulométrie laser et rhéologie.

- **Comprendre les mécanismes de formation des émulsions gel différées et établir une relation entre la composition interfaciale et la texture des émulsions** (*Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse*). Les résultats de la partie précédente montrent que les émulsions ont des comportements totalement différents en fonction de la concentration en agrégats, en caséines non micellaires et en protéines sériques natives. Afin d'expliquer ces différences, une étude approfondie de la composition interfaciale et des propriétés d'étalement des agrégats à l'interface a été menée. Cette partie va également permettre de comparer l'affinité des agrégats, des caséines non micellaires et des protéines sériques natives pour l'interface.
- **Etudier les types d'interactions moléculaires ainsi que les protéines (agrégats, protéines sériques natives et/ou caséines non micellaires) impliquées dans les mécanismes de texturation des émulsions** (*Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides*). Ceci va permettre de comprendre de manière plus précise les mécanismes responsables de la connexion des gouttelettes aussi bien pendant l'étape d'homogénéisation que durant le stockage aux différentes températures. L'interface des gouttelettes est composée d'agrégats, de caséines non micellaires et de protéines sériques natives en proportion variable. Ce chapitre va également permettre de mettre en lumière quelles sont réellement les protéines impliquées dans la formation des interactions moléculaires et plus généralement, dans la texturation des émulsions.

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

3.1 Matières premières

3.1.1 Protéines sériques

Pour cette étude, nous avons utilisé deux lots de poudre de protéines du lactosérum produites par un industriel laitier (origine confidentielle). Le premier (poudre de protéines sériques (Lot A)) contient 88,8 p/p% de protéines, principalement des protéines sériques telles que la β -lactoglobuline (β -LG), l' α -lactalbumine (α -lac), l'albumine sérique bovine (BSA) et les immunoglobulines mais également 21 p/p% de caséines non micellaire. Le deuxième lot (poudre de protéines sériques (Lot B)) contient 91,1 p/p% de protéines dont seulement 12 p/p% de caséines non micellaires (Tableau 3). Afin de ne pas subir cette variabilité inter lots, tous les agrégats ne contenant que des protéines sériques ont été produits avec le lot A alors que les agrégats mixtes sont fabriqués à partir d'un mélange entre le lot B plus « pur » et la poudre de micelles de caséines.

3.1.2 Caséines micellaires

La poudre de micelles de caséines a également été fournie par un industriel laitier dont les coordonnées restent confidentielles. Elle contient 81,7 p/p% de protéines qui sont en grande majorité des caséines micellaires même si une faible fraction de protéines sériques est également présente (6,6 p/p%) (Tableau 3). Un second échantillon de micelles de caséines purifiées a quant à lui été produit au sein du laboratoire en dia-filtrant une dispersion de micelles de caséines contre une solution saline à 80 mM sur une membrane d'ultrafiltration de seuil de coupure 150 kDa afin d'éliminer les protéines sériques résiduelles. La solution concentrée est ensuite lyophilisée et la poudre de caséines micellaires purifiées obtenue est stockée à 4°C. Nous avons vérifié par électrophorèse que cette poudre ne contenait plus de protéines sériques en quantité notable.

3.1.3 Perméat de lait Ultrafiltré (PUF)

La poudre de perméat de lait (PUF) a été produite par ultrafiltration de lait écrémé sur une membrane de seuil de coupure 10 kDa. Le PUF est utilisé comme source de minéraux et de lactose. Il apportera en particulier le calcium nécessaire pour maintenir l'intégrité des micelles de caséines. Le taux de calcium présent dans le PUF a été déterminé par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy) et s'élève à 0,32 p/p% (Tableau 3).

3.1.4 La Matière Grasse Laitière Anhydre (MGLA)

La matière grasse laitière anhydre (MGLA) utilisée pour la préparation des émulsions a été fournie par l'entreprise Corman (Corman, Limbourg, Belgique). Il s'agit d'un lot de MGLA TREX 32C qui présente un point de fusion de 32°C (donnée fournisseur). La matière grasse est composée d'acides gras saturés (environ 70%), d'acides gras insaturés (environ 28%) et d'acides gras polyinsaturés (environ 2%).

Tableau 3 : Les différentes poudres utilisées au cours de la thèse.

	Poudre de protéines sériques (Lot A)	Poudre de protéines sériques (Lot B)	Poudre de micelles de caséines	Poudre de micelles de caséines purifiées	Perméat d'ultrafiltration (PUF)
Protéine totale (w/w %)	88.8	91.11	81,73	100	-
Taux de caséines (w/w %)	21	12	93,4	100	-
Ca²⁺ (w/w %)	-	-	-	-	0.32

3.2 Préparation des solutions de protéines

3.2.1 Solution de protéines sériques natives (Lot A ou B)

Les solutions de protéines sériques natives correspondent à des poudres de protéines réhydratées non traitées thermiquement. Ainsi, les poudres de protéines sériques (Lot A ou B) sont hydratées dans de l'eau ultra-pure une nuit à 4°C sous agitation magnétique pour atteindre une concentration en protéines de 80 g/L. Cette dernière est ensuite vérifiée en mesurant l'absorbance à 280nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-1800 Spectrophotometer, Shimadzu, Japon) et en considérant un coefficient d'extinction massique de 1,046 L.g⁻¹.cm⁻¹ (Mahmoudi, Mehalebi, Nicolai, Durand, & Riaublanc, 2007b). Ce coefficient a été tout de même vérifié par nos soins au sein du laboratoire. Afin d'éviter le développement bactérien, 0,02 p/p% d'azoture de sodium sont ajoutés aux solutions de protéines qui sont ensuite stockées à 4°C.

3.2.2 Elimination des caséines non micellaires d'une solution de protéines sériques natives (pour le chapitre 7)

Afin d'éliminer les caséines non micellaires présentes dans la solution de protéines sériques natives (Lot A), cette dernière est acidifiée à pH 4,6 à l'aide d'acide chlorhydrique 6M puis centrifugée pendant 30 minutes à 4000 g. Le surnageant, contenant les protéines sériques, est ensuite récupéré et le pH est ajusté à 7 afin d'obtenir une solution de protéines sériques dite « pure » sans caséine.

3.2.3 Production des agrégats

En fonction des conditions physico-chimiques appliquées durant le traitement thermique, des agrégats de différentes formes peuvent être produits (Figure 18). Ainsi, les agrégats fractals ont une structure ouverte branchée, les microgels sont compacts et sphériques et les fibrilles sont de longs bâtonnets fins. Un dernier type d'agrégats, nommé agrégats mixtes, sera également étudié et correspond à une micelle de caséines avec des protéines sériques adsorbées à sa surface (Figure 18):

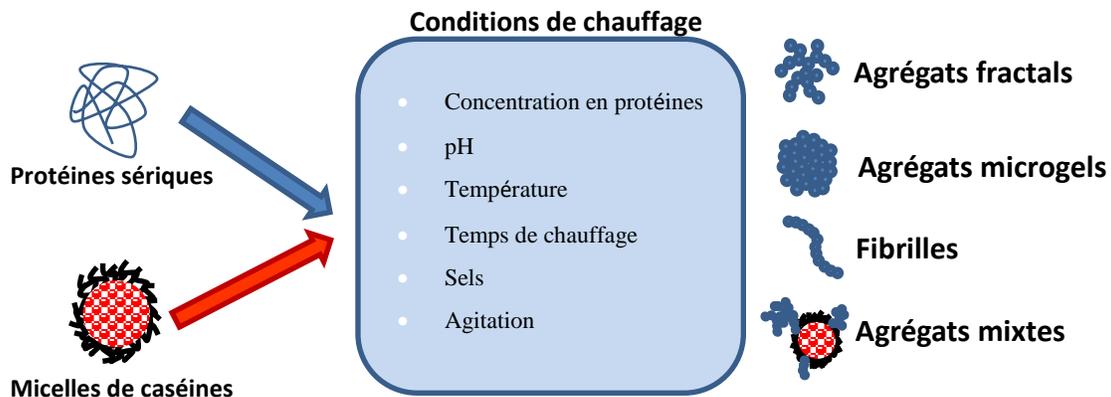


Figure 18: Les agrégats de protéines lactiques.

- Les agrégats fractals, les microgels et les fibrilles sont obtenus uniquement à partir d'une solution de protéines sériques traitée thermiquement.
- Les agrégats mixtes, quant à eux, sont obtenus par traitement thermique d'un mélange de protéines sériques et de micelles de caséines.

3.2.3.1 Les agrégats fractals

Le protocole de fabrication des agrégats fractals a été mis au point à partir des résultats obtenus par Mahmoudi et al. (2007). Pour produire des agrégats fractals, la concentration de la solution de protéines sériques natives (Lot A) est ajustée à 50g/L. Afin d'écranter les charges des protéines et ainsi faciliter leur agrégation, 45mM de NaCl sont ajoutés à la solution de protéines et le pH est ajusté à 7 à l'aide de soude

6M. Les protéines sont ensuite chauffées en condition statique dans des bouteilles de 200 mL au bain-marie pendant 2h à 80°C puis refroidies à température ambiante et finalement stockées à 4°C en présence de 0,02% d'azote de sodium (Tableau 4).

3.2.3.2 Les microgels

Pour la fabrication des microgels, nous avons été contraints d'adapter le protocole de fabrication décrit par Schmitt et al. (2010) en fonction des applications pour lesquelles ils vont être utilisés. Ainsi, le protocole 1 a été utilisé pour la quasi-totalité de la thèse à l'exception de la partie structure des agrégats où le protocole 2 était plus approprié.

Protocole 1 : Pour la fabrication des microgels, la concentration de la solution de protéines (Lot A) est ajustée à 50g/L et le pH est abaissé à 5,8 avec une solution d'acide chlorhydrique 6M. La solution est ensuite chauffée 1h à 85°C au bain-marie dans des bouteilles de 200 mL puis refroidie à température ambiante et stockée à 4°C en présence de 0,02% d'azote de sodium (Tableau 4). Le protocole 1 engendre la production de microgels de grande taille qui ne peuvent pas être caractérisés par Fractionnement Asymétrique Flux-Force couplé à un détecteur multi-angle (A4F-MALLS). En effet, le risque d'obturation du canal étant trop élevé, nous avons mis en place un protocole qui permet la production de microgels de plus petite taille (protocole 2).

Protocole 2 (uniquement pour la partie structure des agrégats): Le protocole 2 consiste simplement à diminuer la concentration en protéines à 40 g/L et à réduire le temps de chauffage à 15min de manière à produire des microgels de taille légèrement inférieure à ceux obtenue avec le protocole 1 (Phan Xuan, 2013). Les agrégats sont ensuite refroidis et stockés à 4°C en présence de 0,02% d'azote de sodium.

3.2.3.3 Fibrilles

Les fibrilles sont fabriquées à partir d'une solution de protéines sériques natives (Lot A) dont la concentration a été ajustée à 40g/L et le pH à 2 à l'aide d'acide chlorhydrique 6M. La solution est ensuite soumise à un traitement thermique de 7h à 90°C (Tableau 4). Contrairement à la fabrication des agrégats fractals et microgels, l'étape de chauffage se fait sous agitation à un taux de cisaillement de 300 s^{-1} (400 rpm) rendu possible grâce à l'utilisation d'un système couette. Ce dernier est composé d'un cylindre en polyméthacrylate de méthyle (PMMA, nom commercial : Plexiglas) contenant un barreau aimanté inclus dans le cylindre. Ce dernier est placé dans un récipient en verre sous agitation magnétique (Figure 19). Après traitement thermique, la solution est refroidie à température ambiante et les fibrilles sont

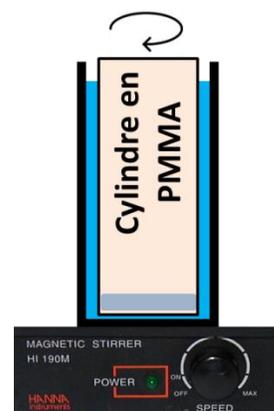


Figure 19: Système couette (Entrefer: 5mm ; hauteur: 6,5cm).

stockées à 4°C en présence de 0,02% d'azoture de sodium.

3.2.3.4 Les agrégats mixtes

Les agrégats mixtes correspondent à des micelles de caséines sur lesquelles des protéines sériques se sont adsorbées à leur surface suite à une dénaturation. Afin de maintenir l'intégrité des micelles de caséines et de se rapprocher de la composition minérale du lait, nous avons dispersé les micelles dans la phase aqueuse du lait. Pour cela, une solution de perméat (PUF) est préparée en hydratant la poudre de perméat à 56g/L dans de l'eau ultra pure pendant une nuit à 4°C sous agitation magnétique.

La poudre de micelles de caséines est ensuite dispersée dans la solution de PUF pour atteindre une concentration en caséines micellaires de 50 g.L⁻¹. Les micelles sont laissées sous agitation à 20 °C pendant 30 minutes puis le pH est ajusté à 6,3 avec de l'acide chlorhydrique 6 M. Dans un premier temps, la dispersion est maintenue sous agitation magnétique dynamique pendant 45 minutes à 60 °C puis, dans un second temps, sous agitation modérée pendant une nuit à 20 °C afin de laisser s'hydrater complètement la poudre.

En parallèle, la poudre de protéines sériques (Lot B) est également solubilisée dans une solution de PUF à 56g/L pour atteindre une concentration de 50g/L. La solution est ensuite laissée sous agitation pendant une nuit à 4°C pour finaliser l'hydratation de la poudre.

Tout comme pour les microgels, nous avons dû utiliser deux protocoles de préparation. Le protocole 1 a été utilisé pour la quasi-totalité de cette étude à l'exception de la partie structure des agrégats où le protocole 2 a été préféré.

Protocole 1 : Les agrégats mixtes sont fabriqués à partir d'un mélange des solutions de micelles de caséines et de protéines sérique natives (Lot B), toutes deux préparées à 50g/L dans du PUF. Afin de déterminer les meilleures conditions de fabrication des agrégats mixtes, trois ratios micelles de caséines/protéines sériques (MCas/PS 82/18 ; MCas/PS 56/44 ; MCas/PS 30/70) ont été testés pour produire trois types d'agrégats mixtes (AM): AM82/18 ; AM56/44 et AM 30/70. Les ratios 82/18 et 56/44 ont été préparés à une concentration totale en protéines de 50g/L. En revanche, en raison de la présence d'une trop grande quantité de protéines sériques avec le ratio 30/70, la concentration totale en protéines a été réduite à 30 g/L afin d'éviter la gélification du mélange pendant le chauffage. Avant le traitement thermique, le pH est ajusté à 6,3 puis la solution est chauffée au bain marie 1h à 80°C en condition statique dans des bouteilles de 200 mL avant d'être refroidie à température ambiante puis stockée à 4°C en présence de 0,02% d'azoture de sodium (Tableau 4).

Afin de distinguer les agrégats mixtes des agrégats de protéines sériques formés au cours du traitement thermique, nous avons également produit des agrégats fractals en chauffant dans les mêmes conditions

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

que les agrégats mixtes mais en absence de micelles de caséines, des solutions de protéines sériques préparées dans le PUF aux mêmes concentrations que dans les mélanges.

Protocole 2 (uniquement pour la partie structure des agrégats) : Afin de faciliter le fractionnement des agrégats mixtes en A4F et améliorer la résolution de l'élugramme, nous avons utilisé dans le protocole 2 une dispersion de micelles de caséines purifiées. Pour tous les autres paramètres, le protocole 2 est identique au protocole 1.

Du fait de la présence de caséines non micellaires (CNM) dans les poudres de protéines sériques, nous parlerons pour la suite de l'étude, de protéines solubles (protéines sériques natives (PSN) + caséines non micellaires (CNM)) et de mélange Agrégats-caséines non micellaires (Ag-CNM). Ainsi, à chaque fois que nous utilisons des agrégats, des CNM sont également ajoutées.

Tableau 4 : Protocole de fabrication des différents agrégats utilisés pour la texturation des émulsions.

	Fractals	Microgels	Fibrilles	Mixtes
Poudres utilisées	Poudre de protéines sériques (Lot A)	Poudre de protéines sériques (Lot A)	Poudre de protéines sériques (Lot A)	Poudre de protéines sériques (Lot B) + Perméat + Poudre de micelles de caséines
Concentration en protéine (g/L)	50	50	40	50 (ratios 32/68 et 49/51) ou 30 (ratio 70/30)
Concentration en perméat (g/L)	0	0	0	51
pH de fabrication	7	5,8	2	6,3
Température de chauffage (°C)	80	85	90	80
Temps de chauffage (h)	2	1	7	1
Concentration en sel (mM)	45	0	0	0
Agitation (s⁻¹)	0	0	300	0

3.3 Méthodes de caractérisation des agrégats de protéines

3.3.1 En solution

3.3.1.1 Etat d'agrégation

Le taux de conversion ou d'agrégation correspond à la quantité de protéines agrégées par rapport à la quantité totale de protéines dans le système. Il a été déterminé pour les agrégats fractals, les microgels et les fibrilles selon différentes méthodes (Tableau 5).

Tableau 5: Méthodes utilisées pour déterminer le taux d'agrégation des agrégats de protéines.

Méthodes utilisées	
Fractals	Chromatographie d'Exclusion Stériques couplée à un détecteur UV (CES - UV)
Microgels	Centrifugation
Fibrilles	Ultrafiltration centrifuge

- ✓ Chromatographie d'Exclusion Stériques couplée à un détecteur UV (CES - UV)

Principe

Le taux d'agrégation des fractals a été déterminé par Chromatographie d'Exclusion Stériques couplée à un détecteur UV (CES-UV). Cette méthode permet de séparer les différentes molécules en fonction de leur rayon hydrodynamique. Ces dernières vont être éluées dans une colonne de gel poreux qui va séparer les petites entités des plus grosses. Les plus petites peuvent pénétrer dans les pores du gel ce qui les maintient plus longtemps dans la colonne alors que les plus grosses sont exclues et traversent rapidement la colonne. Ainsi, plus les molécules auront un rayon hydrodynamique élevé, plus elles auront un temps de rétention faible.

Mesure

L'appareil utilisé (AKTA explorer 100, Amersham, Little Chalfont, Royaume-Uni) est composé d'une colonne TSKG 3000 SWXL de dimension 30 cm x 7,8 mm connectée en sortie d'un détecteur UV afin d'enregistrer l'absorbance à 280 nm (UV-1800 Spectrophotometer, Shimadzu, Japon). L'éluion a été réalisée avec une solution tampon Tris 50 mM à pH 7 contenant 0,1 M de NaCl avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹ et une température de travail de 20°C. 25 µL d'échantillon à 50 g/L sont automatiquement injectés dans la colonne. Les différentes fractions protéiques éluées de la colonne sont quantifiées en utilisant un coefficient d'extinction massique pour les protéines à 280 nm de 1,046 L.g⁻¹.cm⁻¹.

✓ Centrifugation

Le taux de conversion des microgels a été déterminé selon le protocole décrit par Jung et al. 2008. La solution de microgels est centrifugée à 20°C pendant 30 min à 21000 *g*. Du fait des différences de masse entre les agrégats et les protéines non-agrégées, les microgels vont sédimenter alors que le surnageant va contenir les protéines non incluses dans les agrégats. La concentration en protéines dans le surnageant est mesurée par absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre en considérant un coefficient d'extinction massique de 1,046 L.g⁻¹.cm⁻¹ (UV-1800 Spectrophotometer, Shimadzu, Japon). Connaissant la concentration de la solution d'agrégats de départ, nous pouvons déterminer, par différence, le taux d'agrégation des microgels.

✓ Ultrafiltration centrifuge

Le taux d'agrégation des fibrilles est calculé par ultrafiltration centrifuge. La solution de fibrille est diluée à 1 g/L puis 2 mL de cette solution diluée sont introduits dans un tube centrifuge contenant une membrane en cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 10 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne). Les tubes sont ensuite centrifugés à trois reprises à 20°C pendant 30 min à 1000 *g*. Les fibrilles sont retenues sur la membrane alors que les peptides de masse inférieure à 10 kDa seront dans le filtrat. Entre chaque centrifugation, 2 mL de solution de HCl à pH2 sont ajoutés au rétentat afin de rincer et de décrocher les fibrilles adsorbées sur la membrane. La concentration en peptides dans le filtrat est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 280 nm en utilisant un coefficient d'extinction massique de 1,046 L.g⁻¹.cm⁻¹ (UV-1800 Spectrophotometer, Shimadzu, Japon). Connaissant la concentration en protéines de départ, nous calculons le taux de conversion en fibrilles en supposant que le coefficient d'extinction massique des protéines et des peptides est équivalent.

3.3.1.2 Structure des agrégats de protéines

La structure des agrégats a été déterminée à la fois par Fractionnement Asymétrique Flux-Force couplé à un détecteur à diffusion de lumière multi-angle et un réfractomètre (A4F-MALLS-DRi) et par observation en Microscopie Electronique à Transmission (MET). Exception faite pour les fibrilles où seule la caractérisation par MET est réellement adaptée (Tableau 6).

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

Tableau 6: Méthodes utilisées pour déterminer la structure des agrégats de protéines.

Méthodes utilisées	
Fractals	Fractionnement Asymétrique Flux-Force couplé à un détecteur multi-angle (A4F-MALLS) ;
Microgels	
Mixtes	
Fibrilles	Microscopie Electronique à Transmission (MET)

- ✓ Fractionnement Asymétrique Flux-Force couplé à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angle et un réfractomètre (A4F-MALLS-DRi)

Principe

La masse molaire (M_w), le rayon de giration (R_G) et la dimension fractale apparente (d_{fapp}) des agrégats ont été déterminés à l'aide d'un système A4F-MALLS-DRi. L'A4F est une technique de fractionnement mettant en jeu un flux d'élution, un flux perpendiculaire à ce dernier appelé flux croisé (F_c) et des forces de diffusion, le tout dans un canal de forme trapézoïdale (Figure 20). La partie supérieure du canal est une plaque rigide alors que la paroi inférieure correspond à une membrane poreuse. Le flux croisé peut provenir d'un flux d'éluant (dans le cas de l'A4F) mais également d'une force gravitationnelle, d'un champ magnétique ou d'un différentiel thermique. Dans notre cas, il s'agit d'un flux d'éluant qui va exercer une force ayant pour objectif de ramener les molécules vers la partie inférieure du canal, contre la membrane (Figure 20). La diffusion des particules va s'opposer au F_c créant un équilibre entre la force exercée par le F_c et la diffusion des molécules. Les phénomènes de diffusion sont inversement proportionnels à la taille des particules. Ainsi, les petites particules sont plus éloignées de la membrane que les molécules de plus grande taille du fait d'un coefficient de diffusion plus élevé. Le profil parabolique de vitesse engendré par le flux d'élution va permettre de séparer les entités en fonction de leur hauteur dans le canal. De ce fait, les petites particules, positionnées plus haut dans le canal (plus éloignées de la membrane), vont être éluées en premier (Figure 20).

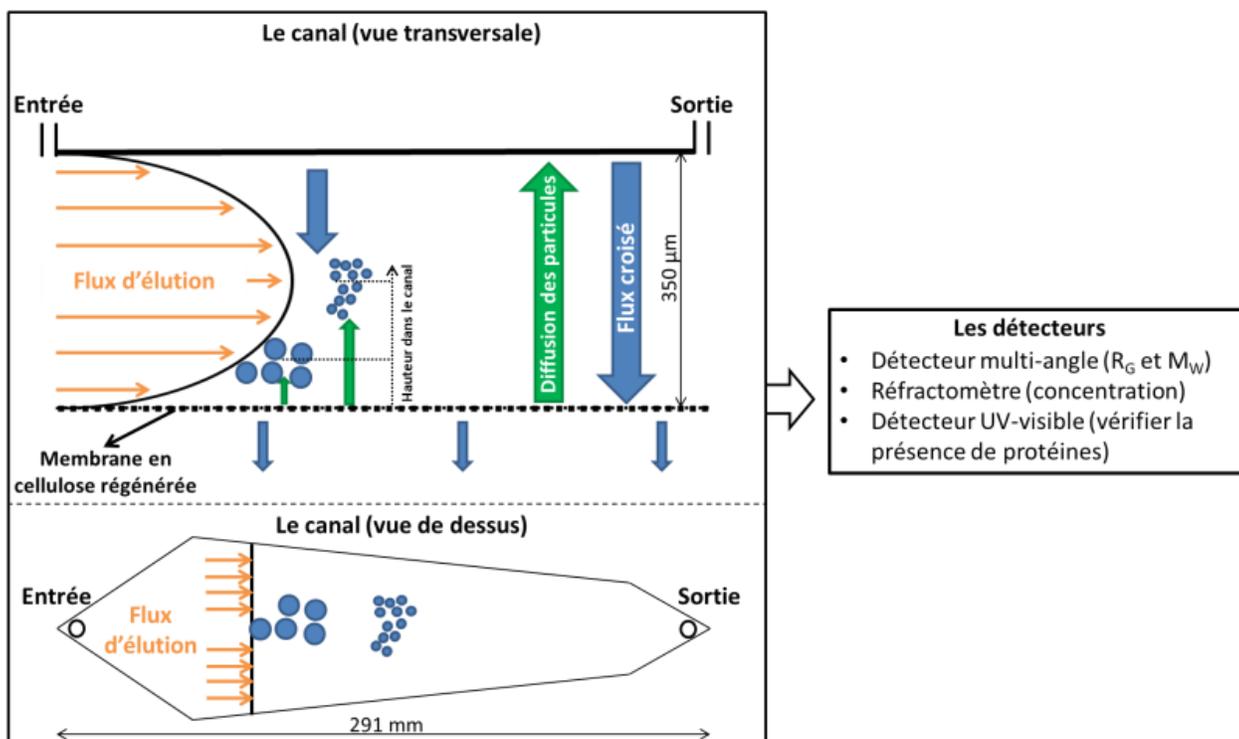


Figure 20: Principe de fonctionnement de l'A4F.

Mesure

L'équipement A4F comprend un long canal, un four ThermoPRO réglé à 25 ° C et un système Eclipse pour contrôler les flux dans le canal (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, États-Unis). Une pompe ISO-3000SD contrôlée par le logiciel Chromeleon version 6.8 SR14 (Thermo Scientific, Waltham, États-Unis) est utilisée pour générer les différents flux. Le canal a une géométrie trapézoïdale et une longueur de 291 mm. Un espaceur en polyester d'une épaisseur de 350 μm est positionné entre une membrane en cellulose régénérée ayant un seuil de coupure de 10 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) et une plaque supérieure. L'éluant, adapté aux échantillons injectés (Tableau 7), a été filtré sur une membrane Durapore 0,1 μm (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) et dégazé. Les échantillons ont été dilués dans l'éluant correspondant (Tableau 7) et introduits automatiquement dans le canal à l'aide d'un passeur d'échantillon WPS-3000SL (Thermo Scientific, Waltham, États-Unis).

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

Tableau 7: Conditions de fractionnement par A4F.

	Agréats Fractals	Microgels	Agréats Mixtes
Eluant (pH)	Eau milli-Q contenant 0.02 p/v% NaN ₃ et 45 mM NaCl (pH 7)	Eau milli-Q contenant 0.02 p/v% NaN ₃ et 45 mM NaCl (pH 7)	Eau milli-Q contenant 0.02 p/v% NaN ₃ , 45 mM NaCl et 10 mM CaCl ₂ (pH 6.3 ou 7)
Concentration de l'échantillon (g.L⁻¹)	0.25	0.0625	0.25
Méthode A4F de fractionnement utilisée	2	1	2

Trois détecteurs en ligne ont été utilisés: un détecteur à diffusion de lumière multi-angle (MALLS) à 18 angles (Dawn® HELEOS™, Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, États-Unis) équipé d'une cellule (modèle K5) ainsi qu'un laser à gaz Hélium-néon qui produit un rayon incident à 658 nm, un réfractomètre Optilab utilisant la même longueur d'onde afin de déterminer la concentration (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, États-Unis) et un détecteur UV-Visible (VWD-3400RS, Thermo Scientific, Waltham, États-Unis) pour confirmer la présence de protéines. Du fait de la diffusion engendrée par la présence d'agrégats de protéines de grande taille, le détecteur UV n'a pas été retenu pour déterminer la concentration en protéines. En effet, les agrégats de grande taille vont diffracter la lumière et par conséquent, surestimer l'absorbance et la concentration en protéines. Nous avons donc préféré utiliser le réfractomètre pour calculer la concentration, alors que la masse molaire et le rayon de giration ont été déterminés à partir des données du détecteur MALLS.

Deux méthodes de fractionnement ont été optimisées pour caractériser les microgels d'une part (Méthode 1) et les agrégats fractals et mixtes d'autre part (Méthode 2). Les solutions de protéines sériques chauffées (PS82/18 ; PS56/44 et PS30/70) et la dispersion de micelles de caséines ont été analysées avec la méthode 2 (Tableau 7). Les deux méthodes comprennent une étape de focalisation avec un flux croisé (Fc) de 2 mL.min⁻¹, 100 µL d'échantillon sont ensuite introduits dans le canal avec un débit de 0,20 mL.min⁻¹ suivie de 60 secondes de relaxation. Cette étape permet aux particules de s'équilibrer entre la force exercée par le Fc et celle provoquée par la diffusion. Pour finir, l'échantillon est élué avec un flux d'élué constant de 0,84 mL.min⁻¹. Pendant l'élué, le flux croisé va diminuer de 2 à 0 mL.min⁻¹ en 83 min en ce qui concerne la méthode 1 et de 1,5 à 0 mL.min⁻¹ en 47 minutes pour la méthode 2 (Tableau 8 et Tableau 9).

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

Tableau 8 : Méthode 1 utilisée pour la caractérisation des Microgels.

Start time (min)	End time (min)	Duration (min)	Mode	Fc start (ml.min ⁻¹)	Fc end (ml/min ⁻¹)
0	2	2	Elution		
2	4	2	Focus		
4	9	5	Focus + Inject		
9	10	1	Relaxation		
10	15	5	Elution	2.00	0.50
15	25	10	Elution	0.50	0.20
25	83	58	Elution	0.20	0.20
83	93	10	Elution	0.00	0.00

Tableau 9: Méthode 2 utilisée pour la caractérisation des agrégats fractals et mixtes.

Début (min)	Fin (min)	Durée (min)	Mode	Fc début (ml.min ⁻¹)	Fc fin (ml.min ⁻¹)
0	2	2	Elution		
2	4	2	Focus		
4	9	5	Focus + Inject		
9	10	1	Relaxation		
10	15	5	Elution	1.50	1.50
15	20	5	Elution	1.50	0.50
20	30	10	Elution	0.50	0.05
30	52	22	Elution	0.05	0.05
52	62	10	Elution	0.00	0.00

L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés à l'aide du logiciel ASTRA de Wyatt Technology Corporation (version 6.1.2.84 pour PC). M_{wi} et R_{Gi} (masse molaire et rayon de giration de la $i^{\text{ème}}$ tranche du fractogramme) ont été obtenus à partir des données du détecteur multi-angle en extrapolant avec le modèle de Berry (premier ordre) et un indice de réfraction (dn/dc) de $0,185 \text{ mL.g}^{-1}$ (Guyomarc'h, Violleau, Surel, & Famelart, 2010; Zhao, Brown, & Schuck, 2011). Le modèle de Berry, plus adapté pour les polymères de grandes tailles (Aberle, Burchard, Vorweg, & Radosta, 1994), a été préféré au modèle de Zimm. Sept angles (de 44 à 90°) ont été utilisés pour calculer les rayons de giration et les masses molaires. Le rayon de giration moyen (\overline{R}_{GZ}) et la masse molaire moyenne (\overline{M}_w) ont été calculés à partir de l'intégration des pics comme décrit par Rolland-Sabaté et al. (2007) pour caractériser

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

des polysaccharides. La dimension fractale apparente (d_{fapp}) a été déterminée à partir de la pente de la courbe représentant le R_G en fonction de la M_w (échelle logarithmique) :

$$R_G = \frac{1}{d_{fapp}} \times M_w$$

En considérant une sphère équivalente avec une répartition homogène de densité dans la particule, la densité apparente (d_{Gappi}) peut être calculée selon l'équation suivante:

$$d_{Gappi} = \frac{M_{wi}}{\frac{4}{3} \times \pi \times R_{Gi}^3 \times N_A}$$

avec N_A le nombre d'Avogadro.

- ✓ Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Principe

L'appareil est constitué d'une source d'électron, dans notre cas un filament de tungstène, de lentilles électromagnétiques et d'un détecteur d'électrons. Grâce à un faisceau d'électron, la MET permet d'observer des objets plus ou moins isolés (protéines ou agrégats) avec une résolution de quelques nanomètres. L'échantillon doit être très fin afin de laisser traverser le faisceau électronique. Pour obtenir un contraste de bonne qualité, il est fréquent que l'échantillon subisse au préalable une coloration par des sels de métaux lourds comme l'acétate d'uranyle.

Mesure

Afin de se trouver dans les meilleures conditions d'observation, la concentration en protéines ainsi que la nature de la solution de dilution ont été optimisées pour chaque échantillon et sont résumées dans le Tableau 10.

Tableau 10: Conditions d'observations des agrégats en MET.

	Concentration (g/L)	Solution utilisée pour la dilution
Fractals	0,5	Eau Milli-Q
Microgels	0,5	Eau Milli-Q
Mixtes (AM82/18 ; AM56/44 et AM30/70)	0,5	Solution de Perméat
Solution de protéines sériques chauffée (PS82/18 ; PS56/44 et PS30/70)	0,05	Solution de Perméat
Dispersion de micelles de caséines	0,05	Solution de Perméat
Fibrilles	0,08	Eau Milli-Q

Un volume de 15 µL d'échantillon ajusté à la concentration mentionnée dans le Tableau 10 a été déposé sur une grille en carbone (200 mailles) et coloré avec une solution d'acétate d'uranyle 2% pendant 2 minutes (coloration négative). Les échantillons sont ensuite rincés deux fois avec de l'eau milli-Q et séchés pendant 20 minutes à 50 ° C dans une étuve. Pour finir, les échantillons sont observés en utilisant un microscope électronique à transmission JEOL JEM-1230 (JEOL, Tokyo, Japon) fonctionnant à 80 kV.

3.3.1.3 Stabilité aux cisaillements lors de l'homogénéisation haute pression (HP)

La stabilité aux cisaillements a été vérifiée uniquement pour les agrégats fractals, les microgels et les fibrilles qui restent les particules les plus sensibles à l'étape d'homogénéisation. Les solutions d'agrégats sont homogénéisées à des pressions croissantes avant d'être caractérisées par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et observées au Microscope Electronique à Transmission (Tableau 11). En revanche, les agrégats mixtes, qui sont relativement stables et conservent leur structure dans la gamme de pression utilisée, n'ont pas été étudiés (Desobry-Banon, Richard, & Hardy, 1994; Huppertz, Kelly, & Fox, 2002; López-Fandiño, Ramos, & Olano, 1997)

Tableau 11: Méthodes utilisées pour déterminer la stabilité aux Hautes Pressions des agrégats de protéines.

Méthodes utilisées	
Fractals	Diffusion dynamique de la lumière (DLS) + Microscopie Electronique à Transmission (MET)
Microgels	
Fibrilles	Microscopie Electronique à Transmission (MET)

- ✓ Diffusion dynamique de la lumière

Principe

Le diamètre hydrodynamique des protéines après passage aux HP a été déterminé par diffusion dynamique de la lumière à partir de l'équation de Stokes-Einstein (modèle d'une sphère):

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d}$$

k : constante de Boltzmann (J.K⁻¹)

T : température absolue (K)

h : viscosité apparente de la phase continue (Pa.s)

D : coefficient de diffusion (m².s⁻¹)

d : diamètre

La diffusion dynamique de la lumière permet de déterminer le coefficient de diffusion puis, connaissant les autres paramètres et en faisant une hypothèse de sphéricité des échantillons, de calculer un diamètre hydrodynamique de la particule. L'appareil enregistre les variations d'intensité de la lumière diffusée par les protéines soumises au mouvement brownien. Plus les particules sont petites, plus elles seront mobiles et plus l'intensité va fluctuer. Il y a donc une relation inversement proportionnelle entre la taille des particules et les variations d'intensité. Seules les distributions de taille en intensité de la lumière diffusée seront présentées.

Mesure

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées à l'aide d'un Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, UK). Les solutions d'agrégats sont diluées au 1:100 dans de l'eau Milli-Q et introduites dans une cellule de spectroscopie. Le diamètre hydrodynamique a été mesuré en triple pendant 120 secondes en utilisant un indice de réfraction de 1,45. Chaque mesure a été effectuée en rétrodiffusion (173°) à 20 ° C.

3.3.2 Propriétés d'étalement des agrégats fractals à l'interface air-eau

La structure des agrégats en solution peut être différente de celle des agrégats une fois adsorbés à l'interface air-eau ou huile-eau. Ainsi, après avoir caractérisé les agrégats en solution, il est nécessaire de déterminer leurs propriétés d'étalement à l'interface et de visualiser leur structure après adsorption. Afin de suivre l'étalement des agrégats et d'observer leurs structures à l'interface, nous avons déposé les agrégats de protéines sériques sur une interface air-eau dans une balance de Langmuir. Il est important de noter que l'interface air-eau n'est pas exactement identique à l'interface huile-eau que l'on retrouve dans une émulsion laitière. En effet, des expériences au tensiomètre à gouttelette seraient envisageables mais dans le cadre d'un mélange protéines solubles/agrégats, seulement les protéines non chauffées s'adsorbent à l'interface du fait de leur plus forte affinité pour l'interface et d'un coefficient de diffusion supérieur à celui des agrégats.

3.3.2.1 Propriétés d'étalement sur balance de Langmuir

Principe

La balance de Langmuir, qui est une adaptation du tensiomètre à lame de Wilhelmy, a été utilisée pour déterminer la tension interfaciale en fonction de la densité en molécules tensioactives présentes à l'interface air-eau.

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

La balance de Langmuir est composée d'une cuve en téflon contenant 135 mL de solution (sous phase) et de deux barrières mobiles capable de faire varier la surface de la cuve pour moduler la densité de tensioactifs à l'interface (Figure 21). Une aiguille en platine reliée à un capteur de force (balance) est placée à l'interface pour mesurer la tension de surface. Lorsque cette aiguille est plongée dans un liquide, il se forme un ménisque autour d'elle et la tension de surface va exercer une force verticale vers le bas (Figure 22).

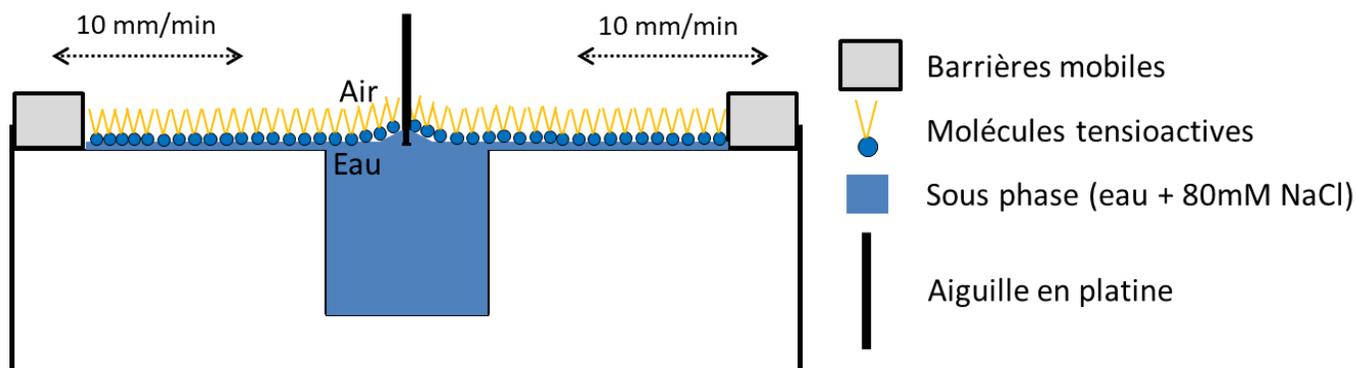


Figure 21: Principe de fonctionnement de la balance de Langmuir.

La force verticale exercée sur l'aiguille est directement reliée à la tension de surface (γ en $N.m^{-1}$) par l'équation suivante:

$$F = p\gamma \cos \theta$$

p : périmètre du capteur (m)

θ : Angle de contact ($^{\circ}$)

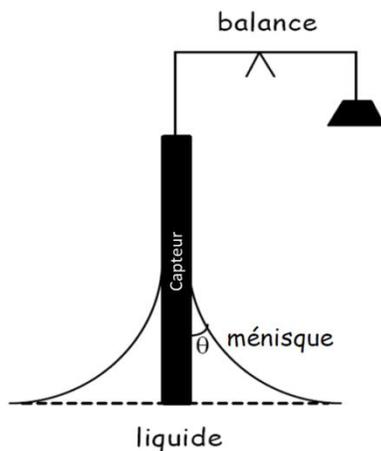


Figure 22: Schéma de la formation d'un ménisque autour du capteur placé à l'interface.

La matière de l'aiguille, le platine, est choisie de sorte à avoir un mouillage parfait et un angle de contact nul. Par conséquent, la valeur de $\cos \Theta$ égale à 1. Ainsi, en mesurant la force appliquée sur l'aiguille, il est facile de remonter à la valeur de la tension de surface :

$$\gamma = \frac{F}{p}$$

Les tensioactifs ont pour rôle de diminuer la tension de surface. La pression de surface Π est directement liée à l'abaissement de la tension de surface suite à la présence de molécules tensioactives :

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma$$

γ_0 : Tension de surface de la sous phase, sans tensioactif (N.m^{-1})

γ : Tension de surface en présence de tensioactifs (N.m^{-1})

La pression de surface représente les forces d'interaction entre les molécules à l'interface.

Mesure

La balance de Langmuir utilisée est un modèle Kibron microthrough XL (Kibron, Espoo, Finlande), équipée d'une cuve en téflon de 59 x 409 mm (24131 mm²). Elle est placée dans une pièce climatisée à 22°C. La sous phase utilisée est une solution contenant 80 mM de NaCl préparée dans une verrerie traitée au préalable à 400°C afin d'éliminer toutes traces de tensioactifs résiduels. Aussi bien pour les protéines solubles que pour les agrégats, 20 μL d'une solution à 0,5 g.L⁻¹ ont été déposés sous forme de 40 gouttelettes à l'aide d'une micro-seringue au niveau de l'interface air-eau. La répartition des gouttelettes doit se faire de manière homogène de part et d'autre du capteur. Ainsi, nous avons déposé 5 rangées de 4 gouttelettes de chaque côté du capteur. L'interface est laissée à l'équilibre pendant 30 min avant de commencer la compression à une vitesse de 10 mm/min jusqu'à atteindre une pression de 15 mN. Les données obtenues permettent de représenter la pression de surface en fonction de l'aire interfaciale.

3.3.2.2 Prélèvement de films interfaciaux selon la technique de Langmuir-Blodgett

L'objectif est de prélever le film interfacial afin de l'observer en Microscopie à Force Atomique (AFM). Pour cela, nous avons utilisé la technique de Langmuir-Blodgett qui permet de transférer le film interfacial sur une lame de mica. La lame de mica (1 x 2 mm) est dans un premier temps clivée afin d'avoir une surface propre avant d'être positionnée sur un axe vertical équipé d'un moteur dont la vitesse est contrôlée. La lame de mica est ensuite plongée dans la sous-phase jusqu'à avoir une surface immergée de 1 cm² (Figure 23). Le capteur de pression est ensuite positionné à l'interface et l'échantillon est déposé selon le protocole décrit en 1.3.2.1. Les barrières se rapprochent à une vitesse de 10 mm/min et la surface interfaciale diminue entraînant une compression de l'interface jusqu'à atteindre la pression cible de 15 mN. La lame de mica est ensuite relevée à une vitesse de 2,5 mm/min pour prélever le film interfacial (Figure 23) tout en fermant les barrières pour maintenir la pression de surface constante. Pour finir, la lame de mica est séchée à température ambiante et stockée à l'abri de la poussière avant observation en AFM.

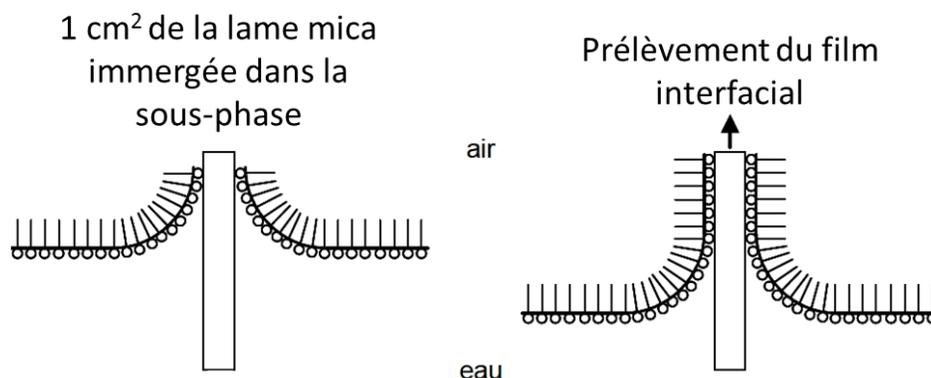


Figure 23 : Prélèvement de l'interface sur lame mica.

3.3.2.3 Microscopie à force atomique (AFM)

Principe

La microscopie à force atomique (AFM) permet d'obtenir la topographie de surface d'un film interfacial avec une résolution atteignant le nanomètre. Contrairement à la microscopie dite « classique », l'AFM n'est pas régie par les lois de l'optique visible ou électronique. Il s'agit d'un contraste mécanique où une pointe micrométrique, munie en son extrémité, d'un apex de diamètre nanométrique, est fixée orthogonalement à un microlevier et va balayer la surface de l'échantillon. Les déplacements verticaux du microlevier, dépendant de la résultante des forces d'interaction entre la pointe et la surface de l'échantillon, sont mesurés avec précision grâce à un faisceau laser réfléchi sur le microlevier en direction

d'une photodiode quadripôle. Les mouvements du spot lumineux sont ensuite traduits en signaux électriques par l'intermédiaire de cette même photodiode. Ces derniers sont traités par un processeur pour reconstruire une représentation 3D de la surface de l'échantillon. Plusieurs modes additionnels d'imagerie peuvent être utilisés en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon :

- Mode contact : faible distance entre la pointe et l'échantillon favorisant les forces répulsives à courtes portées au détriment des forces attractives de plus longue portée.
- Mode non-contact : Distance plus importante entre la pointe et l'échantillon permettant aux forces attractives de dominer les forces répulsives.

Mesure

Les films interfaciaux prélevés sur lame de mica ont été caractérisés par un microscope à force atomique Innova (Bruker, Billerica, Massachusetts, Etats-Unis) en mode tapping (pointe oscillante) et monté avec une pointe AFM pyramidale en nitrure de silicium (Digital Instruments). La topographie de surface des films a été déterminée à partir des images acquises à sec avec une force d'appui inférieure à 10 nN. Plusieurs zones en surface de chaque échantillon ont été observées pour s'assurer de l'homogénéité du film interfacial. Plusieurs surfaces, allant de $80 \times 80 \mu\text{m}^2$ à $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ont été analysées en utilisant le logiciel Nanoscope Analysis 1.2 (Bruker).

3.4 Préparation des émulsions

3.4.1 Préparation des émulsions en mettant les agrégats avant homogénéisation

Les émulsions sont composées d'une phase dispersée, dans notre cas, de la matière grasse laitière anhydre (MGLA) et d'une phase continue. Cette dernière, ajustée à pH 7, contient des protéines sous formes natives et/ou agrégées dispersées dans une phase aqueuse contenant 80 mM de NaCl (force ionique du lait). Concernant les agrégats mixtes, l'émulsion ne contient pas de NaCl mais est préparée dans une solution à 5,6 p/p% de perméat (PUF) pour apporter les minéraux nécessaires au maintien de l'intégrité des micelles. Les deux phases sont placées 10 minutes dans un bain marie à 60°C afin de fondre la matière grasse puis pesées et pré-émulsionnées à 60°C à l'aide d'un rotor-stator (SilentCrusher M, Heidolph, Allemagne) pendant 3 min à 14000 rpm avec une tige d'un diamètre de 18 mm. La pré-émulsion obtenue est ensuite homogénéisée à 60°C avec un homogénéisateur haute pression (Panda plus 1000; GEA Niro Saovi, Italie) sous recirculation (6 passages) pendant 5 minutes. Pour finir, les émulsions sont conservées à 60, 20 et 4°C (Figure 24– itinéraire bleu).

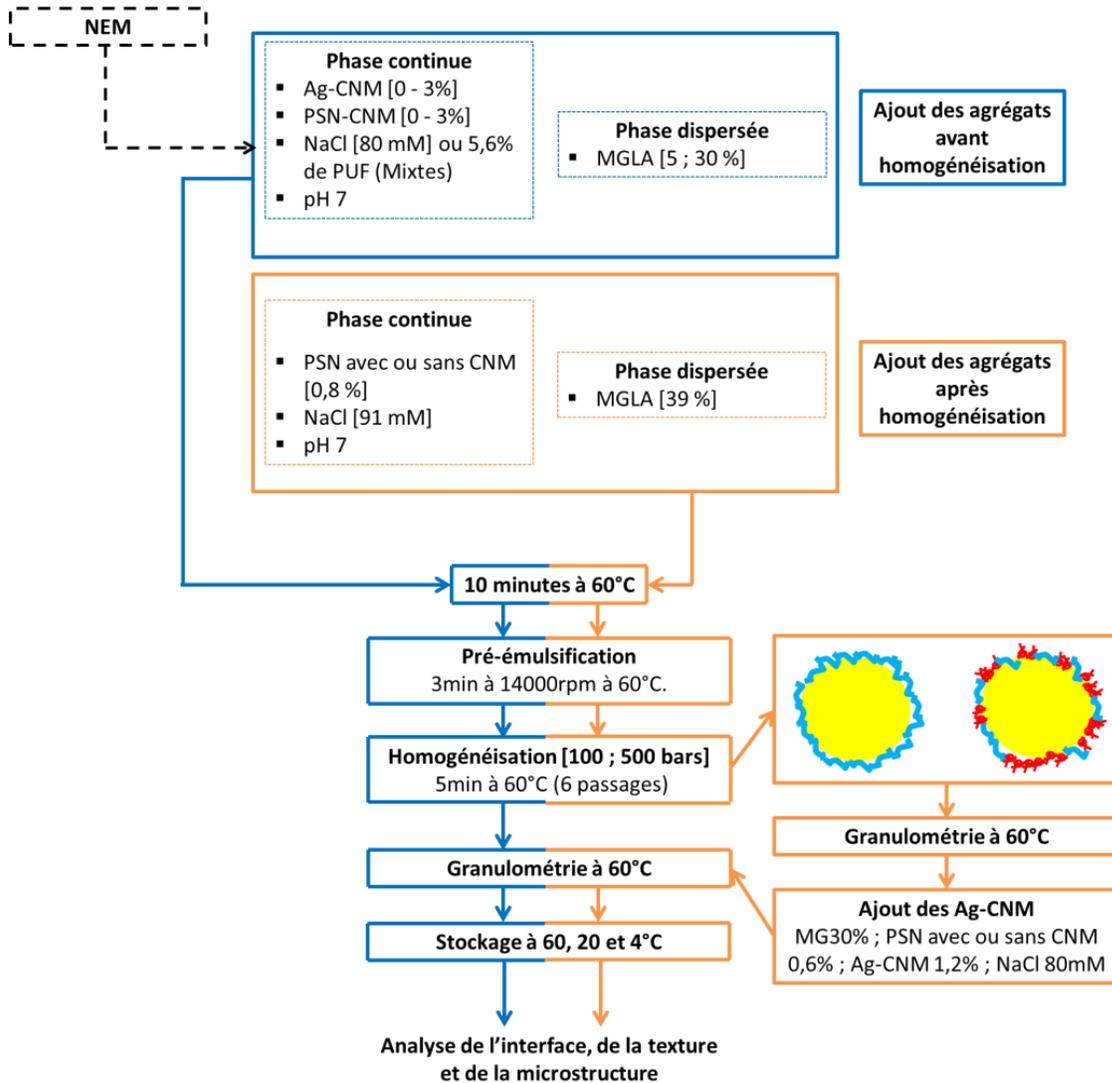


Figure 24 : Protocole de fabrication des émulsions à pH 7 : ajout des agrégats avant (itinéraire bleu) ou après (itinéraire orange) homogénéisation.

Au cours de la fabrication des émulsions, plusieurs paramètres vont varier afin de définir les conditions optimales pour la texturation des émulsions :

- La concentration en MGLA : 5 ou 30 p/p% de la masse totale de l'émulsion,
- La pression d'homogénéisation : fixée à 100 ou 500 bars,
- La quantité de protéines solubles (protéines sériques natives (PSN) + caséines non micellaires (CNM)) et d'agrégats, contenant également des CNM amenées par la poudre de protéines sériques (Ag-CNM) : comprise entre 0-3 p/p %.

Les résultats seront représentés sous forme de diagramme d'état avec la proportion de PSN-CNM en ordonnées et la quantité d'agrégats en abscisse et ce pour chaque condition de pression et de fraction volumique de matière grasse.

3.4.2 Ajout des agrégats après homogénéisation

L'objectif est de créer, dans un premier temps, une émulsion avec une interface composée uniquement de protéines sériques natives ou d'un mélange de PSN-CNM. Puis, dans un second temps, d'ajouter les agrégats après l'étape d'homogénéisation afin de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre les PSN et/ou les caséines non micellaires à l'interface et les agrégats de la phase continue. Dans ce cas, une première émulsion plus concentrée en MGLA (39 p/p%) contenant seulement des protéines sériques natives avec ou sans caséine est produite : ainsi, la phase dispersée et la phase continue sont placées 10 minutes à 60°C avant d'être pré-émulsifiées puis homogénéisées dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 24– itinéraire orange). Après homogénéisation, la taille des gouttelettes de l'émulsion concentrée est mesurée au granulomètre laser puis la solution d'agrégats est ajoutée au système. L'ajout des agrégats provoque la dilution de l'émulsion concentrée pour arriver à l'émulsion ciblée : MG30% ; PSN avec et sans CNM 0,6% ; Ag-CNM 1,2% ; NaCl 80mM. Le diamètre des gouttelettes est de nouveau mesuré et les émulsions sont stockées à 60, 20 et 4°C.

3.4.3 Utilisation d'un agent bloquant la formation de pont disulfure

Le N-ethylmaléimide (NEM) est un agent bloquant la formation de ponts disulfures. Il réagit avec les groupements thiols (-SH) des protéines mais n'a aucun effet sur les ponts disulfures déjà présents dans le système. Lors de cette étude, le NEM a été dissous directement dans la phase continue pendant 30 minutes sous agitation magnétique. L'émulsion est ensuite réalisée comme décrit dans la Figure 24 puis stockée à 60, 20 et 4°C.

3.5 Méthodes de caractérisation des émulsions

3.5.1 Texture des émulsions

3.5.1.1 Observation visuelle

Après homogénéisation, la texture des émulsions est immédiatement jugée de manière visuelle et classée en deux catégories : l'émulsion s'écoule ou l'émulsion ne s'écoule pas et s'est déjà texturée pendant l'homogénéisation. Lorsque l'émulsion coule en sortie d'homogénéisateur, l'observation se poursuit sur les deux premières heures de stockage à 60, 20 et 4°C afin de visualiser l'évolution de la texture du système. Si l'émulsion se texture pendant le stockage, l'émulsion est dite « gel différée » alors

que si elle reste liquide, l'émulsion est considérée comme liquide voir, si un déphasage est observé, instable. A l'inverse, les émulsions directement texturées pendant l'étape d'homogénéisation sont qualifiées d'émulsions « gels instantanées ». Ainsi, à l'échelle macroscopique, les émulsions sont classées soit comme étant liquides, instantanées ou différées (Figure 25). Les émulsions sont suivies visuellement tous les jours pendant 7 jours afin de contrôler l'évolution de la texture et de leur stabilité au cours du temps.

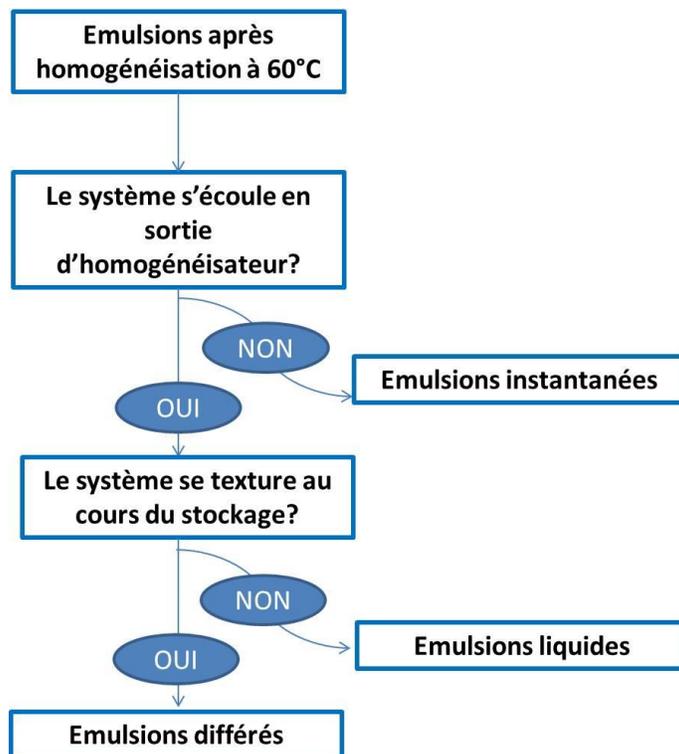


Figure 25 : Arbre de décision concernant l'observation visuelle des émulsions.

3.5.1.2 Propriétés rhéologiques des émulsions

Principe

Les caractérisations rhéologiques ont été réalisées en régime harmonique. Le principe consiste à appliquer une faible déformation à l'échantillon induisant une contrainte. Dans le domaine linéaire, la déformation et la contrainte sont des fonctions sinusoïdales du temps de fréquence angulaire (ω) similaire, mais avec un déphasage δ . La déformation (γ) et la contrainte (τ) sont écrites sous forme de nombre complexe :

$$\gamma^* = \gamma_0(\cos(\omega t + \delta) + i \sin(\omega t + \delta))$$

$$\tau^* = \tau_0(\cos \omega t + i \sin \omega t)$$

A partir des valeurs de contrainte et de déformation, il est possible de définir le module complexe:

$$G^* = \tau^* / \gamma^* = G' + iG''$$

$$\text{avec } G' = (\tau_0 / \gamma_0) \cos \delta$$

$$G'' = (\tau_0 / \gamma_0) \sin \delta$$

- G' représente la composante élastique du système et est appelé module conservatif
- G'' traduit la dissipation d'énergie au sein du système et est relatif au caractère visqueux du milieu ; il est nommé module dissipatif.

Le tracé des modules conservatif et dissipatif d'un système en fonction de la pulsation (spectres mécaniques) donne des informations sur la structure de l'échantillon. La déformation imposée à l'échantillon doit être relativement faible afin de rester dans le domaine viscoélastique linéaire et d'être dans des conditions non-destructives.

Mesure

La caractérisation des propriétés viscoélastiques des émulsions ont été réalisées à l'aide d'un rhéomètre à déformation imposée ARES (TA Instruments, New-Castle, USA) équipé d'une géométrie plan-plan (diamètre 40 mm) striée pour limiter les glissements dus à d'éventuels phénomènes de synérèse (entrefer 1-2 mm). Les échantillons sont placés sur le plateau du rhéomètre à 60 °C directement après homogénéisation et recouverts d'une couche d'huile de paraffine afin de limiter le séchage de l'échantillon. Les cinétiques de suivi des modules conservatif (G') et dissipatif (G'') en fonction du temps ont été effectuées à une fréquence angulaire de 1 rad.s⁻¹. Les G'' étant constamment inférieurs aux G' , nous avons décidé de ne pas les représenter sur les cinétiques de texturation. Toutes les mesures ont été effectuées dans le domaine viscoélastique linéaire en appliquant une déformation comprise entre 0,3 et 3%.

Comportement des émulsions en fonction de la température :

Emulsion utilisée : MG 30% ; PSN-CNM 0,6 % ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars (avec ajout des agrégats avant ou après homogénéisation)

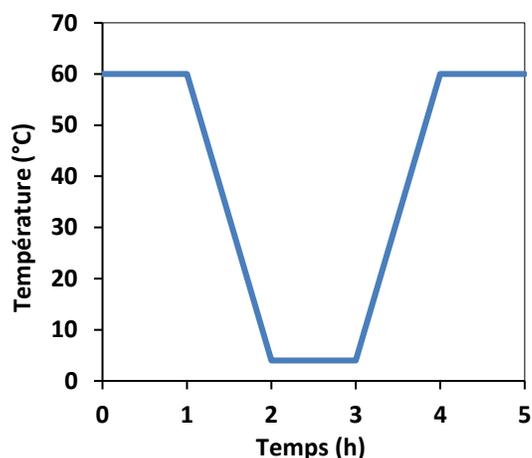


Figure 26 : Cinétique thermique afin de visualiser le comportement des émulsions aux changements de température.

L'émulsion est déposée en sortie d'homogénéisateur sur le plateau du rhéomètre au préalable thermostaté à 60°C. La température est, dans un premier temps, maintenue 1h à 60°C puis une rampe de 60 à 4°C à 1°C.min⁻¹ est appliquée avant qu'un palier d'1h à 4°C ne soit réalisé. Une seconde rampe de 4 à 60°C à 1°C.min⁻¹ est ensuite programmée puis la température est maintenue 1h à 60°C (Figure 26). Les modules conservatif (G') et dissipatif (G'') sont enregistrés à 1 rad.s⁻¹ avec un entrefer de 1 mm tout au long des variations de température.

Etude de la formation de ponts disulfures pendant l'étape d'homogénéisation :

*Emulsions utilisées : MG 30% ; PSN-CNM 1,4% ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars
MG 30% ; PSN-CNM 0,6 % ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars*

Afin de mettre en évidence la formation de ponts disulfures pendant l'homogénéisation, des phases continues contenant différentes concentrations en agent bloquant la formation des ponts disulfures (N-éthylmaléimide ; NEM) ont été préparées comme indiqué dans la partie 3.4.3. Après homogénéisation à 60°C, les émulsions sont directement placées sur le plateau du rhéomètre et les modules G' et G'' sont mesurés en fonction du temps à une température de 60°C. L'entrefer est fixé à 1 mm.

Formation de ponts disulfures au cours du stockage à 60°C :

*Emulsions utilisées : MG 5% ; PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 500 bars
MG 5% ; PSN-CNM 0,1 % ; Ag-CNM 3% ; 500 bars*

La formation de ponts disulfures au cours du stockage peut être mise en évidence uniquement avec des émulsions dont la granulométrie et l'aspect visuel sont identiques après homogénéisation quelle que soit la quantité de NEM utilisée. En effet, s'il y a une différence entre une même émulsion réalisée avec ou sans NEM dès la sortie de l'homogénéisateur, aucune conclusion concernant la formation de ponts disulfures durant le stockage ne pourra être avancée car les systèmes de départ seront différents. En d'autre terme, il faut produire des émulsions dont les caractéristiques en sortie d'homogénéisateur (taille des gouttelettes et texture) soient identiques en présence ou en absence de NEM (Figure 27).

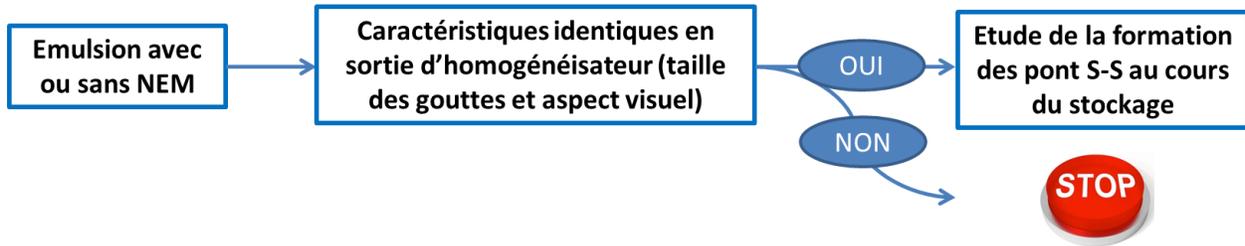


Figure 27 : Arbre de décision pour le choix des émulsions concernant la formation de ponts disulfures durant le stockage.

C'est la raison pour laquelle nous avons travaillé sur des émulsions contenant 5% de matière grasse produites avec 0 ou 30 mM de NEM. Après fabrication, les émulsions sont rapidement déposées sur le plateau du rhéomètre à 60°C et les modules G' et G'' sont enregistrées au cours du temps à une température maintenue à 60°C. En présence de NEM, les systèmes contiennent des grains. Ainsi, afin d'avoir un entrefer suffisamment important par rapport à la taille des grains, nous l'avons fixé à 2 mm.

Formation de ponts disulfures au cours du stockage à 20°C:

*Emulsions utilisées : MG 5% ; PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 500 bars
MG 5% ; PSN-CNM 0,1 % ; Ag-CNM 3% ; 500 bars*

En sortie d'homogénéisateur, les émulsions à 5% de matière grasse contenant 0 ou 30 mM de NEM sont directement positionnées sur le plateau du rhéomètre à 60°C. Tout d'abord, une rampe de température allant de 60 à 20 ° C en 1 heure ($0,67 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) est réalisée puis la température est maintenue à 20°C pendant 1h. Tout au long de cette cinétique, les modules G' et G'' sont mesurés à $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ et l'entrefer entre le plan et le plateau est fixé à 2 mm.

Mise en évidence des liaisons réversibles pendant le refroidissement :

Emulsion utilisée : MG 5% ; PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 500 bars

Pour mettre en évidence la formation des liaisons réversibles pendant le refroidissement, l'émulsion à 5% de matière grasse sans NEM est placée en sortie d'homogénéisateur sur le plateau du rhéomètre à 60°C en utilisant un entrefer de 1mm. Une première rampe de température entre 60 et 20 °C ($0,67^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) est appliquée puis, une fois à 20 °C, une seconde rampe allant de 20 à 60°C à la même vitesse est programmée. Les valeurs des modules G' et G'' sont enregistrées à $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$.

Caractère cicatrisant des émulsions :

Emulsion utilisée : MG 5% ; PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 500 bars

Après homogénéisation, une partie de l'émulsion à 5% de matière grasse est stockée à 20°C dans des tubes de 40 mL alors qu'une autre partie est directement placée sur le plateau du rhéomètre thermostaté à 60°C (entrefer 1 mm). Une rampe de 60 à 20°C est réalisée en 1h puis une isotherme à 20°C est appliquée pendant 42h. Un balayage en fréquence de 0,01 à 100 rad.s⁻¹ est ensuite réalisé à 20°C afin de caractériser les propriétés viscoélastiques de l'émulsion. Ensuite, l'échantillon stocké en tube à 20 °C est secoué manuellement puis placé sur le plateau du rhéomètre pour effectuer un second balayage fréquence de 0,01 à 100 rad.s⁻¹ à 20°C. Une isotherme de 24h à 20°C est ensuite réalisée avant de finir par un balayage fréquence de 0,01 à 100 rad.s⁻¹.

3.5.1.3 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Principe

La cristallisation de la matière grasse est directement liée à la taille des gouttelettes présentes dans l'émulsion (Lopez et al., 2002). Pour déterminer l'état de cristallisation et de fusion de la matière grasse en fonction de la taille des gouttelettes, nous avons utilisé la calorimétrie différentielle à balayage. La mesure est basée sur les quantités de chaleur échangées entre un échantillon et une référence en fonction de la température. Ces différences de flux thermiques vont dépendre de la nature endothermique ou exothermique de la réaction. Ainsi, la fonte de la matière grasse étant un processus endothermique, la quantité de chaleur nécessaire à fournir à l'échantillon pour rester à la même température que la référence sera plus importante. A l'inverse, lors de la cristallisation, l'échantillon va libérer de la chaleur du fait du caractère exothermique de la transition. La DSC va mesurer les variations de flux de chaleur entre l'échantillon et la référence afin de caractériser de manière précise les températures de changement d'état de la matière grasse.

Mesure

L'appareil est une DSC Q100 (TA instrument, New-Castle, USA) utilisant des capsules en aluminium de 50µL scellées de façon hermétique. La référence est une simple capsule remplie d'air. Afin de coupler les résultats de DSC avec ceux de rhéologie, il est primordial d'appliquer les mêmes cinétiques de température. Ainsi, nous avons réalisé une rampe allant de 60 à 4 °C à une vitesse d'1°C.min⁻¹ pour visualiser la cristallisation de la matière grasse et une rampe de 4 à 60 °C à la même vitesse pour visualiser sa fonte. Afin d'appréhender l'impact de la taille des gouttelettes sur la cristallisation de la MG,

deux émulsions contenant 30% de MG et 4,2% de PSN-CNM ont été fabriquées, l'une avec une taille moyenne de gouttelettes de 0,25 μm (500 bars) et l'autre de 1 μm (100 bars).

3.5.2 Microstructure

3.5.2.1 Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)

Principe

Le microscope confocal à balayage laser (MCBL ; Figure 28) entre dans la catégorie des microscopes optiques. La microscopie confocale est utilisée avec des sondes fluorescentes, spécifiques des molécules ou des structures à observer. La longueur d'onde du laser sélectionné doit correspondre à la longueur d'onde d'excitation de la sonde fluorescente choisie. Une fois excitée par le laser, les sondes fluorescentes émettent de la lumière à une longueur d'onde supérieure qui est captée par un photomultiplicateur qui convertit le signal lumineux en signal électrique. Un microscope optique classique est capable de donner une image nette uniquement de la partie qui se situe en surface de l'objet analysé. Les objets situés en profondeur par rapport au plan de focalisation rendent l'image floue. Avec le MCBL, l'objet est éclairé non plus par une lumière blanche mais par un laser qui est focalisé dans un seul plan situé à l'intérieur de l'échantillon. Ce laser va balayer point par point ce plan focal. La technique MCBL permet de filtrer les photons qui proviennent des coupes optiques supérieures ou inférieures au plan focal grâce à un orifice de sortie (pinhole), placé avant le photomultiplicateur, qui va laisser passer uniquement les photons provenant du plan focal (Figure 28). Ainsi, le contraste et la résolution de l'image obtenue est nettement améliorée. A la différence d'un microscope optique classique, le MCBL est également capable de déplacer le plan focal au sein de l'échantillon selon l'axe z pour reconstituer sa structure en trois dimensions.

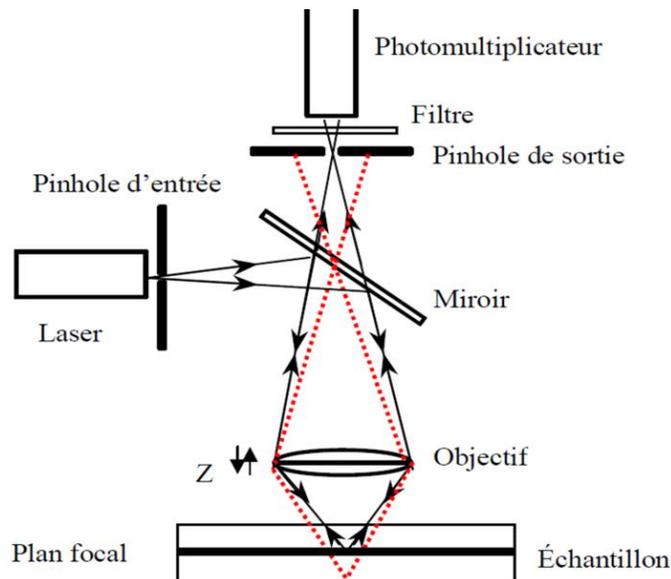


Figure 28 : Principe de fonctionnement du MCBL.

Mesure

La microstructure des émulsions a été caractérisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Nikon A1 (Nikon, Japon). Après homogénéisation, quelques μL d'émulsions ont été placées sur une lame dans une cellule d'hybridation (Gene Fram, ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis) de 250 μm de profondeur. Afin de marquer les lipides, 5 μL de Rouge de Nile ($0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) dissous dans du diméthylformamide ont été ajoutés à la préparation. Une lamelle est délicatement déposée sur le spacer puis les échantillons ont été recouverts d'aluminium afin de les protéger de la lumière. Les préparations sont ensuite stockées à 4, 20 et 60 ° C pendant un jour avant d'être observées à 20°C à une longueur d'onde d'excitation de 561 nm. Pour tous les échantillons, les observations ont été réalisées en utilisant un objectif x20 (chapitre 6) et x40 à immersion en eau (chapitre 7).

3.5.2.2 Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Après 7 jours de stockage à 60, 20 ou 4 ° C, les émulsions texturées ont été découpées en petits cubes (1 mm^3) puis placées dans une solution liquide de 1.5% d'agar à 40 ° C. Les émulsions liquides ne pouvant pas être découpée, une gouttelette de 5 μL est déposée dans la solution d'agar. Après refroidissement, les cubes et les gouttelettes d'émulsions entourés d'agar ont été délicatement retirés du gel d'agar. L'excès d'agar est éliminé à la lame de rasoir et les émulsions sont placées pendant 4 heures à 4 ° C dans 1,5 mL de glutaraldéhyde 3 v/v% dilué dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2. Les échantillons sont ensuite déshydratés par trempage successif dans des bains éthanol/eau contenant une concentration croissante en éthanol (30, 50, 70, 85, 95, 100 v/v%). Après déshydratation, l'éthanol a été progressivement remplacé par de l'oxyde de propylène en utilisant une série de mélanges oxyde de propylène/éthanol (50 et 100 v/v%). L'oxyde de propylène est ensuite remplacé par une résine EPON en plaçant les échantillons dans un mélange d'oxyde de propylène et d'EPON de différentes concentrations (50 et 100 v/v%). Enfin, les échantillons ont été inclus dans l'EPON pure et placés 3 jours à 55 ° C afin de polymériser la résine. Des coupes ultra-fines (80 nm) ont été réalisées sur chaque inclusion en utilisant un ultramicrotome Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Allemagne) équipé d'un couteau en diamant. Les coupes sont placées sur une grille en cuivre avant d'être colorées par une solution d'acétate d'uranyle 2% puis observées avec un microscope électronique à transmission JEOL JEM-1230 (JEOL, Japon) fonctionnant à 80 kV.

3.5.2.3 Taille des gouttelettes de matière grasse

Principe

La taille des gouttelettes de matière grasse a été déterminée par granulométrie laser dont le fonctionnement est basé sur la diffraction d'un rayon laser monochromatique par les gouttelettes en suspension dans l'émulsion. Un capteur va ensuite enregistrer la répartition angulaire de l'intensité diffractée. L'angle de diffraction étant inversement proportionnel à la taille des gouttelettes de matière grasse, plus les particules seront petites, plus l'angle de diffraction sera important. A l'inverse, les particules de taille plus importante diffracteront moins la lumière et la majorité de l'intensité sera récupérée aux petits angles. A partir de l'intensité de lumière diffractée, le logiciel calcule par itérations successives la distribution de tailles des gouttelettes pour corrélérer les valeurs expérimentales avec les données déterminées en utilisant la théorie de Mie. Le diamètre moyen des particules peut être pondéré en surface ($d_{3,2}$) ou en volume ($d_{4,3}$). La surface spécifique (SSp), quant à elle, découle directement du diamètre pondéré en surface :

$$d_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$$

$$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

$$SSp = \frac{6}{d_{3,2}}$$

où n_i est le nombre de gouttelettes de classe i et d_i , le diamètre des gouttelettes de classe i .

Mesure

Le diamètre des gouttelettes de matière grasse a été mesuré grâce à un granulomètre Partica LA-960 (Horiba, Japon) utilisant deux lasers monochromatiques de longueur d'onde 405 et 650 nm. Après homogénéisation, quelques μL d'émulsion sont introduits directement dans la cuve du granulomètre contenant de l'eau jusqu'à atteindre une obscurité aux alentours de 10%. En parallèle, 240 μL d'émulsion sont dilués dans 3 mL de SDS 1% et laissé 1h à 20°C afin de mettre en évidence des phénomènes de floculation. Toutes les mesures ont été réalisées avec un indice de réfraction de 1,548 pour la phase dispersée (MGLA) et 1,33 pour la phase continue (Eau).

3.5.3 Composition de l'interface

3.5.3.1 Concentration interfaciale

Principe

La technique consiste à séparer les gouttelettes de matière grasse et la phase continue afin d'isoler les protéines adsorbées à l'interface comme décrit dans la méthode de Patton and Huston (1986). Dans un premier temps, l'émulsion fraîchement fabriquée est diluée dans une solution de saccharose pour accroître la densité de la phase aqueuse. Le mélange est ensuite déposé délicatement au fond d'un tube contenant déjà une solution tampon de composition identique à celle de la phase continue mais avec 5% de saccharose. Après centrifugation, les gouttelettes crémees ont traversé la solution tampon permettant de laver l'interface et de retirer les constituants non adsorbés. Après centrifugation, trois phases apparaissent :

- Une phase supérieure, dite phase crème, correspondant aux gouttelettes entourées des protéines adsorbées,
- Une phase intermédiaire, composée des gouttelettes les plus petites de l'émulsion présentes en très faible quantité,
- La phase continue incluant les protéines non adsorbées.

Les tubes sont ensuite congelés à -20°C puis découpés en trois pour récupérer les 3 phases. Pour chaque phase, nous avons déterminé à la fois la concentration en protéine par absorption à 280 nm ainsi que la composition interfaciale par électrophorèse SDS-PAGE (uniquement pour la crème).

Mesure

Après émulsification, 2 mL d'émulsion sont dilués dans 2 mL d'une solution tampon contenant 50 p/v% de saccharose. La solution tampon est identique à la phase continue de l'émulsion et contient donc 80mM de NaCl. Les 4 mL d'émulsion diluée sont introduits à l'aide d'une seringue au fond d'un tube centrifuge contenant 10 mL d'une solution tampon de saccharose 5 p/v%. Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 g pendant 2h à 20°C en utilisant un rotor swing, puis les tubes sont congelés à -20°C en position verticale et conservés à cette température jusqu'à analyse (Figure 29).

Les tubes sont découpés aux hauteurs correspondantes à la zone de séparation des phases. La phase crème ainsi que la phase intermédiaire sont décongelées à 40°C alors que la phase aqueuse est décongelée à 20°C. Pour quantifier les protéines adsorbées à l'interface, leur désorption préalable est nécessaire. Pour se faire, la crème récupérée est pesée et diluée au 1/3 avec une solution de SDS 1 p/p%.

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

Le mélange est agité au vortex et laissé au repos pendant 1h à 40°C avant d'être centrifugé à 3000 g pendant 1h à 10°C. Deux phases sont obtenues :

- Une phase supérieure compacte contenant les gouttelettes stabilisées par le SDS
- Une phase inférieure aqueuse contenant les protéines désorbées de l'interface

La phase inférieure, récupérée à l'aide d'une seringue en traversant délicatement la phase supérieure, est diluée 5 fois dans une solution dénaturante contenant 8M d'urée, 0,05M de Trisodium citrate, 5g/L de SDS, 0,2M de tris et 10 mM de β -mercaptoéthanol (Figure 29). La concentration en protéine à l'interface est ensuite mesurée au spectrophotomètre (UV-1800 Spectrophotometer, Shimadzu, Japon) à 280 nm. A partir de la concentration en protéines adsorbées et de la surface spécifique, nous pouvons calculer une concentration interfaciale en mg.m^{-2} .

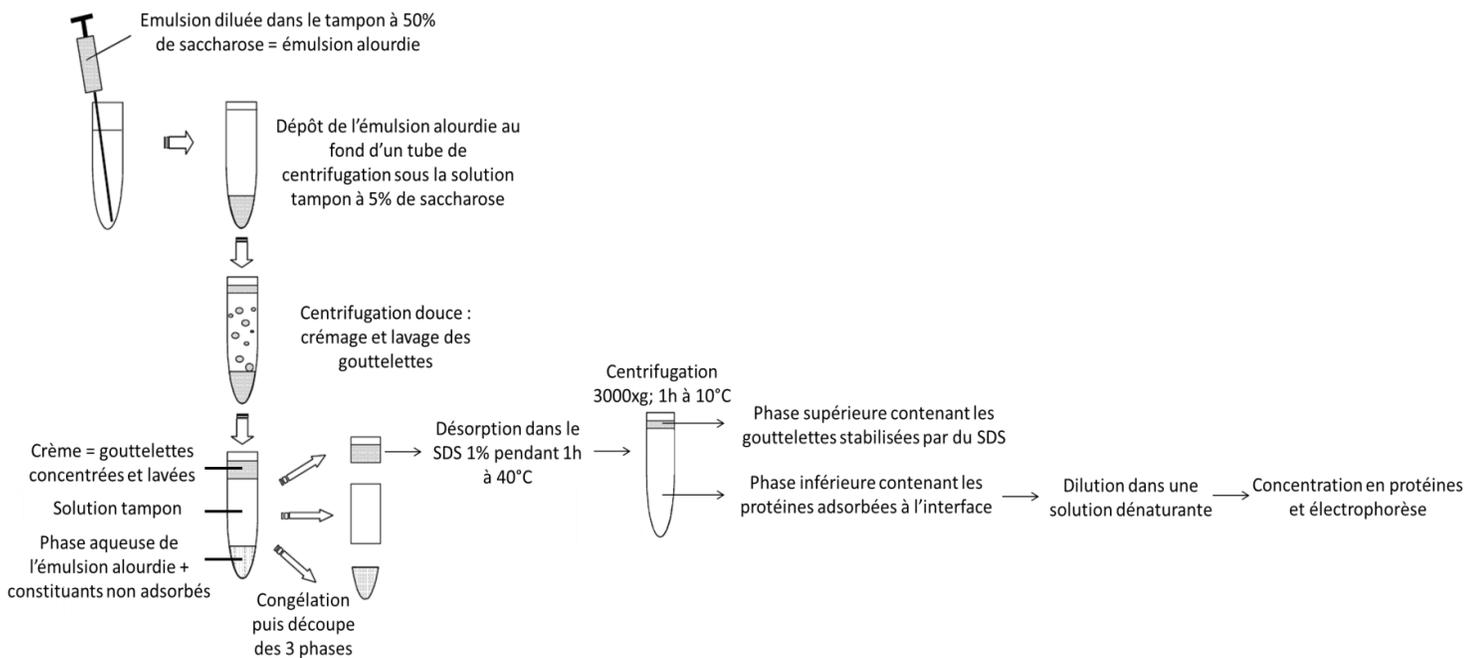


Figure 29 : Technique de caractérisation des films interfaciaux.

3.5.3.2 Composition de l'interface

La composition interfaciale a été déterminée par électrophorèse SDS-PAGE à partir de la phase aqueuse contenant les protéines desorbées de l'interface (Partie 3.5.3.1). Celle-ci a été diluée dans de l'eau Millipore pour atteindre une concentration de 2 mg.mL^{-1} puis à nouveau diluée dans un volume de tampon de solubilisation en condition dénaturante ou non (condition dénaturante : Tris-HCl 0,125M, pH 6,8, SDS 4 %, glycérol 20 %, β -mercaptoéthanol 10%, 0,1% bleu de bromophénol ; condition non-

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

dénaturante : Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, SDS 4 %, glycérol 10 %, 0,1% bleu de bromophénol). Le bétamercaptoéthanol va permettre la dénaturation des protéines par réduction des ponts disulfures. Les échantillons sont ensuite portés 5 min à ébullition afin de dénaturer les protéines. Les gels d'électrophorèses sont des gels pré-coulés de 10 puits présentant un gradient de concentration en polyacrylamide de 4 à 12% (Bolt 4-12% Bis-tris plus, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis). Une quantité identique de protéines est déposée dans chaque puits (10 µg) puis la migration est réalisée dans un tampon MES-SDS 1X (Bolt MES SDS running buffer (20x), Novex, Life Technologie, Carlsbad, États-Unis) à ampérage constant (100V) pendant 1h20 à l'aide d'un générateur power source 300V (VWR, Radnor, Etats-Unis). Après migration, une coloration au Bleu de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-rad Laboratories, Hercules, Etats-Unis) est réalisée en immergeant les gels dans une série de bains (Figure 30).

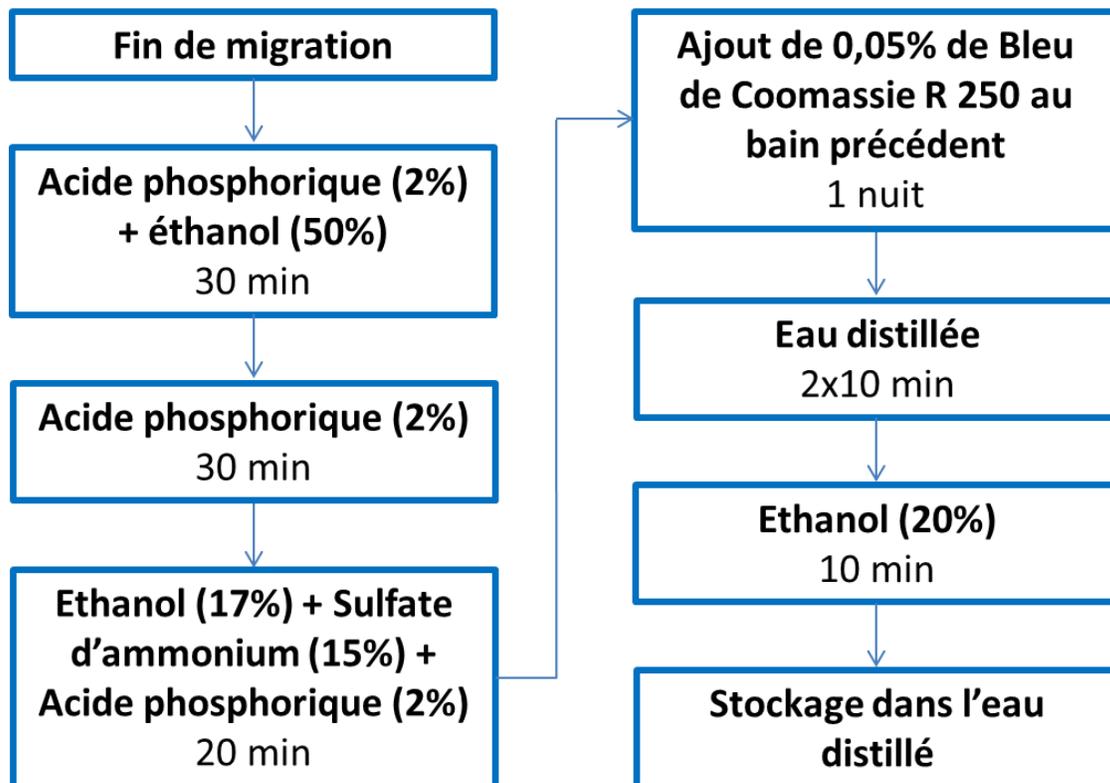


Figure 30 : Protocole de coloration au Bleu de Coomassie R 250.

Afin de connaître le poids moléculaire des protéines, un standard moléculaire (SDS Page Molecular Weight Standards low range, Bio-rad Laboratories, Hercules, Etats-Unis) est déposé dans le premier puit.

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

Après migration des protéines, les gels sont scannés et le poids moléculaire de chaque bande est estimé à l'aide du logiciel Multigauge (Fujifilm, Tokyo, Japon).

Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats de protéines laitières

Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats de protéines laitières

Ce chapitre est consacré à la caractérisation de quatre types d'agrégats de protéines laitières, chacun obtenu par traitement thermique dans des conditions physico-chimiques bien spécifiques (cf partie 3.2.3):

- Les agrégats fractals, produits à pH 7 ;
 - Les microgels, fabriqués à pH 5,8 ;
 - Les fibrilles, obtenues sous cisaillement à pH 2 ;
 - Les agrégats mixtes, produits à pH 6,3 et composés de micelles de caséines avec des agrégats de protéines sériques adsorbés à leur surface.
- } Composé uniquement de protéines sériques

La caractérisation de ces assemblages est divisée en trois parties (Tableau 12):

- L'état d'agrégation, réalisé par Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES) pour les agrégats fractals et les microgels ou par ultrafiltration centrifuge pour les fibrilles,
- La stabilité aux cisaillements, déterminée par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) couplée à de la Microscopie Electronique à Transmission (MET),
- Les rayons de giration (R_G) ainsi que les masses molaires (M_w) ont été déterminés par Fractionnement Asymétrique Flux-Force couplé à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angle et à un réfractomètre (A4F-MALLS-DRi). Ces mesures ont été complétées par des observations en MET afin de visualiser la structure des agrégats.

Tableau 12: Méthodes utilisées pour la caractérisation des agrégats de protéines laitières.

	Fractals	Microgels	Fibrilles	Mixtes
Etat d'agrégation	CES	CES	Ultracentrifugation centrifuge	Biblio
Structure	A4F-MALLS-DRi + TEM	A4F-MALLS-DRi + TEM	MET	A4F-MALLS-DRi + TEM
Stabilité aux cisaillements	DLS + MET	DLS + MET	MET	Biblio

La taille des agrégats aurait pu être déterminée par l'intermédiaire de la DLS ou de la CES. Cependant, la DLS est essentiellement adaptée à des particules sphériques et monodisperses. En effet, les échantillons polydisperses nécessitent une première étape de fractionnement pour séparer les différentes entités

Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats de protéines laitières

avant de les caractériser. Ainsi, la chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angle (CES-MALLS) s'est avérée être une technique appropriée pour déterminer le R_G et la M_w d'agrégats de protéines sériques (de la Fuente, Singh, & Hemar, 2002; Schokker, Singh, & Creamer, 2000). En revanche, la CES est inadaptée pour la caractérisation des micelles de caséines et des agrégats mixtes car ils interagissent avec la colonne et sont retenus dans le système (Almlöf, Larsson-Raźnikiewicz, Lindqvist, & Munyua, 1977; Guyomarc'h et al., 2010; Kang, Moon, & Lee, 2011). Nous avons donc mis en place une méthode de caractérisation douce et innovante valable pour tous les agrégats de protéines laitières : l'A4F-MALLS-DRI.

4.1 Etat d'agrégation

Le traitement thermique des protéines induit leur dénaturation puis leur aggrégation. Cependant, ces phénomènes dépendent à la fois de l'intensité et de la durée du traitement thermique appliqué. Au cours de cette étude, nous avons voulu quantifier la proportion de protéines sériques agrégées suite au traitement thermique. Ainsi, nous avons caractérisé les solutions de protéines avant et après chauffage par Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES). La diminution de surface du pic correspondant aux protéines sériques natives (PSN) nous permettra de connaître la proportion de protéines non-agrégées résiduelles.

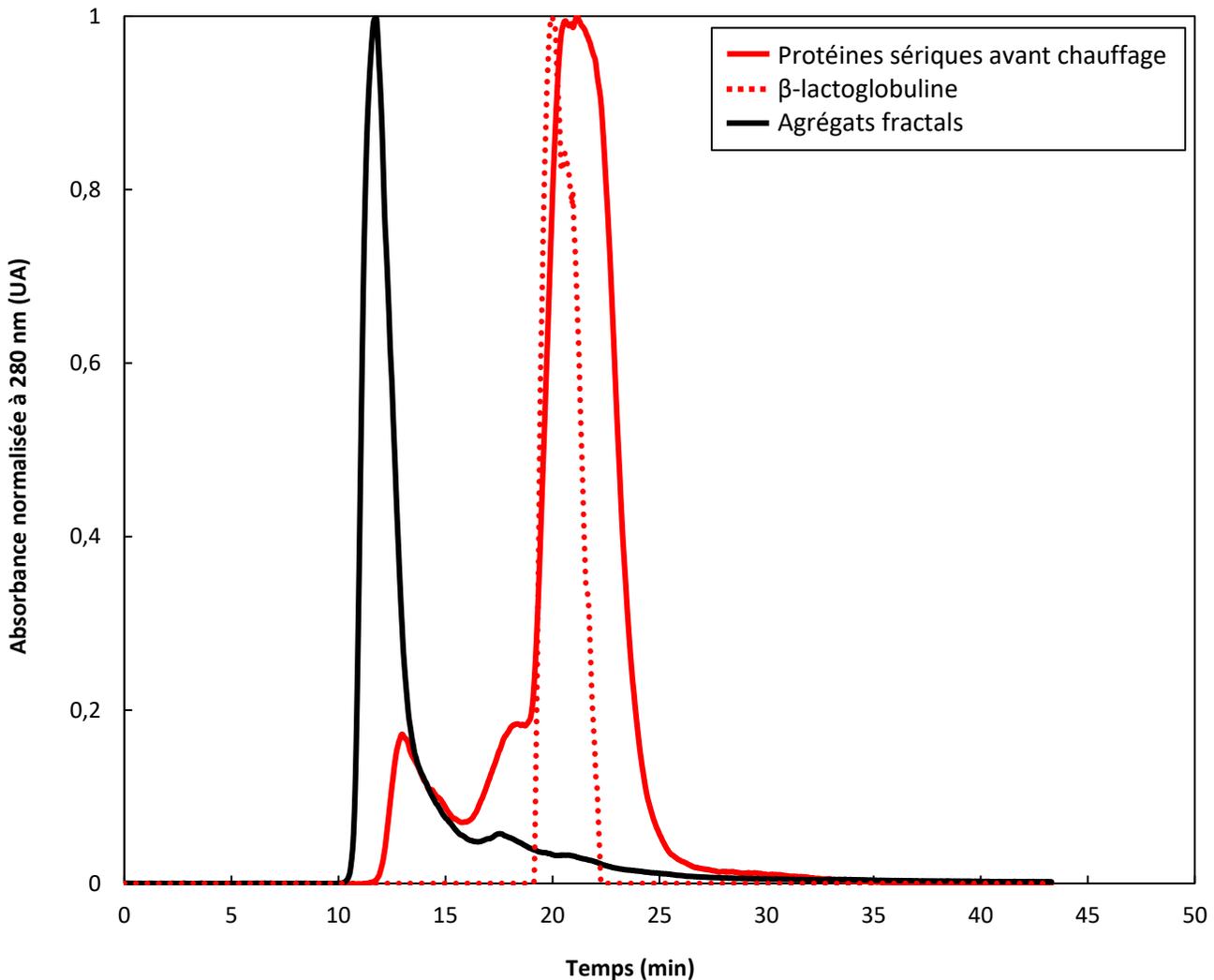


Figure 31: Analyse par CES d'une solution de β-lactoglobuline, de protéines sériques avant chauffage ainsi qu'une solution d'agrégats fractals obtenue après traitement thermique (2h à 80°C, pH 7 ; 45mM NaCl).

4.1.1 La solution de protéines sériques avant traitement thermique:

La Figure 31 représente l'absorbance normalisée à 280 nm en fonction du temps d'élution. L'élugramme assigné à la β -lactoglobuline montre une première population éluée à 20 minutes et une seconde éluée à 21 minutes correspondant respectivement à des dimères et à des monomères de β -lactoglobuline. La solution de protéines sériques avant chauffage est composée majoritairement de protéines sériques natives (PSN) éluée à 21 minutes. Deux populations, présentes en minorité, sont éluées entre 12 et 19 minutes et correspondent à de petits agrégats qui sont initialement présents dans la poudre de protéines sériques. Ces derniers peuvent se former au cours de la fabrication des poudres ou lors de leur stockage. La poudre de protéines sériques étant un mélange de β -lactoglobuline, d' α -lactalbumine et de BSA, la population éluée à 21 minutes est plus étendue que celle correspondant à la β -lactoglobuline seule.

4.1.2 Les agrégats fractals

Le chromatogramme correspondant aux agrégats fractals montre la disparition quasi totale du pic assigné aux PSN au profit d'une population majoritaire éluée à 12 minutes et correspondant aux agrégats formés durant le traitement thermique (Figure 31). Cependant, en intégrant le pic assigné à la faible quantité de PSN présente après chauffage, nous calculons un taux de conversion de 95% ce qui est en accord avec les résultats publiés par Mahmoudi et al. (2007).

4.1.3 Les microgels

Pour déterminer la proportion d'agrégats et de protéines non agrégées, nous avons centrifugé la suspension de microgels fabriqués avec le protocole 1 (cf partie 3.2.3.2). Les microgels, agrégats denses et de grande taille, sédimentent dans le culot alors que le surnageant contient les protéines ne participant pas à la formation des microgels. Nous avons ainsi déterminé un taux d'agrégation de 88,5 % (+/-0,6%). Ce résultat est proche de celui calculé par Jung et al. (2008b) et Phan Xuan (2013). Les protéines présentes dans le surnageant correspondent d'une part à des protéines sériques non agrégées mais également à des caséines non micellaires ainsi que des petits agrégats solubles. En effet, lors de la fabrication des microgels, le pH de la solution augmente ce qui provoque la formation de quelques agrégats solubles moins denses qui restent dans le surnageant (Donato et al., 2009). La proportion de caséines non micellaire dans la poudre de protéines sériques étant de 21%, une partie des CNM est incluse dans les microgels.

Afin d'éviter l'obturation du canal d'A4F lors de l'étude de la structure des agrégats de protéines (partie 4.2), nous avons préféré utiliser un protocole permettant d'agréger seulement une partie des

protéines (protocole 2 ; cf partie 3.2.3.2). Par conséquent, nous avons repris la méthode développée par Schmitt et al. (2010) qui consiste à traiter thermiquement pendant seulement 15 minutes une solution de protéines sériques à 4%. Ce protocole permet d'obtenir un taux de dénaturation de 76,0 % (+/- 0,5%) limitant ainsi la taille des microgels et l'encrassement du canal d'A4F.

4.1.4 Les fibrilles

Le principe de formation des fibrilles est différent de celui des agrégats fractals et des microgels (cf partie 1.3.2.3.3). En effet, la première étape consiste en une hydrolyse acide des protéines entraînant la formation de peptides aux propriétés physicochimiques contrastées. Dans un deuxième temps, certains de ces peptides nouvellement formés vont s'assembler en de longs filaments fins appelés fibrilles. Après séparation des peptides non agrégés et des fibrilles par ultrafiltration centrifuge, nous avons quantifié la teneur en peptides dans chaque fraction et nous obtenons un taux de conversion des protéines en fibrilles de 34%, résultat qui est supérieur à ceux déterminés par Bolder et al. (2007) dans des conditions similaires. A l'inverse, d'autres travaux montrent la possibilité d'atteindre des taux de conversion largement supérieurs allant jusqu'à 82% (Jung et al., 2008a; Veerman, Ruis, Sagis, & van der Linden, 2002a). Le faible taux de conversion en fibrilles va être un problème lors de l'utilisation de ce type d'agrégats en émulsions. En effet, les peptides libres restant pourraient s'adsorber à l'interface plus rapidement que les fibrilles limitant ainsi la possibilité que celles-ci connectent les gouttelettes et texturent le système.

4.1.5 Les agrégats mixtes

Les agrégats mixtes sont constitués d'un cœur de micelles de caséines avec des protéines sériques dénaturées et agrégées en surface. Le paramètre essentiel pour la formation de ce type d'assemblage n'est pas l'état d'agrégation des protéines sériques mais la localisation des agrégats de protéines sériques. En effet, pour former des agrégats mixtes, il est nécessaire que les protéines sériques s'agrègent à la surface des micelles mais ne forment pas d'agrégats fractals en solution. Pour cela, deux paramètres entrent en considération :

- Le pH : Anema and Li (2000) indiquent que lorsque le pH est supérieur à 6,7, les micelles de caséines ont tendance à se dissocier au chauffage et les agrégats de protéines sériques vont interagir avec les caséines- κ en solution. En revanche, pour un pH inférieur à 6,7, tous les agrégats de protéines sériques se situent sur la micelle de caséine (Anema & Li, 2000; Anema, 2007). De ce fait, pour fabriquer des agrégats mixtes, nous nous sommes placés à un pH de 6,3.

- Le ratio micelles de caséines/protéines sériques (MCas/PS) (Guyomarc'h, Law, & Dalgleish, 2003 ; Guyomarc'h, Queguiner, Law, Horne, & Dalgleish 2003): afin de déterminer quel est le meilleur compromis pour obtenir des agrégats mixtes, trois ratios MCas/PS ont été testés : 82/18, 56/44 et 70/30. Chaque suspension d'agrégats est ensuite analysée par A4F-MALLS-DRi afin de déterminer le ratio le plus pertinent pour connecter les gouttelettes de matière grasse et texturer les émulsions.

4.2 Structure des agrégats de protéines

Les agrégats de protéines ont d'abord été caractérisés par Fractionnement Asymétrique Flux-Force couplé à un détecteur de diffusion de lumière multi-angle et à un réfractomètre (A4F-MALLS-DRi) puis par Microscopie Electronique à Transmission (MET) afin de compléter les résultats obtenus avec la méthode séparative. Au vu de leur structure, les fibrilles n'ont pas pu être caractérisées par A4F-MALLS-DRi mais les images en MET donnent tout de même des informations concernant leur structure.

4.2.1 La solution de protéines sériques avant traitement thermique

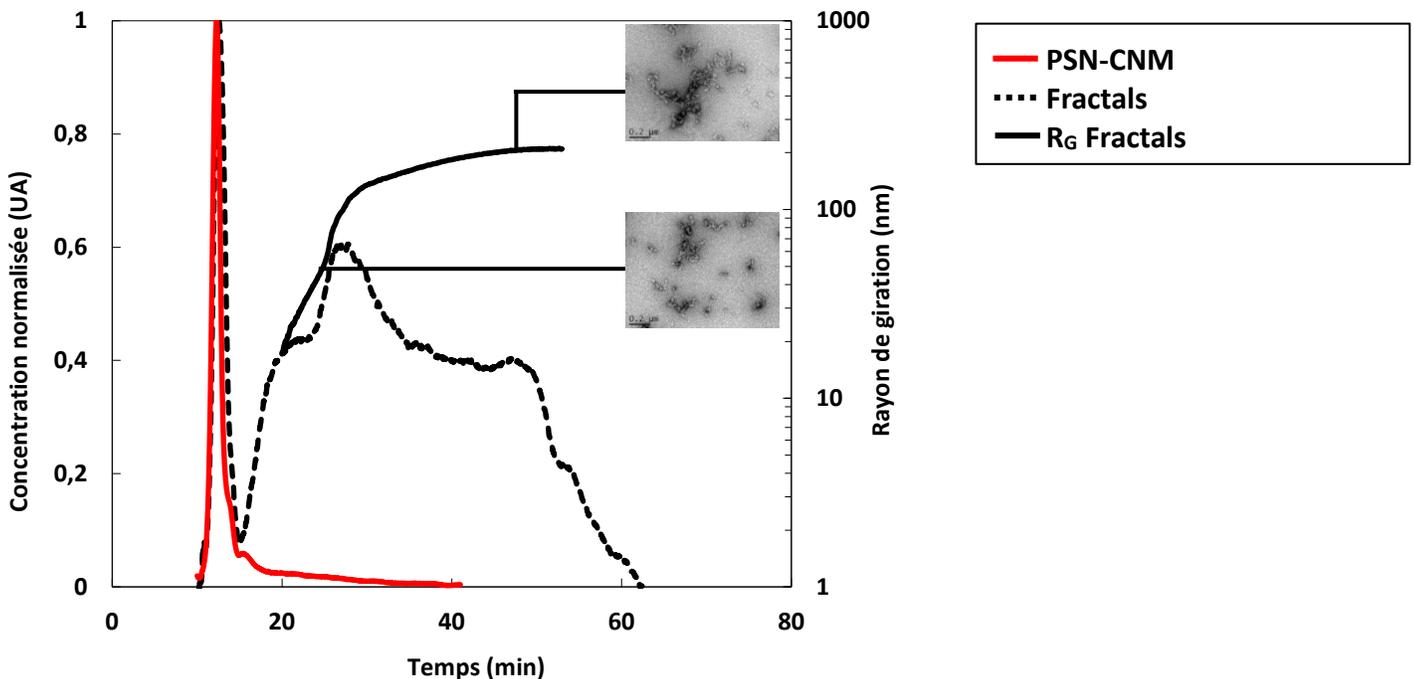


Figure 32: Elugrammes d'AF4-MALLS-DRi des solutions de protéines sériques solubles (PSN-CNM) et d'agrégats fractals représentant la concentration normalisée ainsi que le rayon de giration des entités éluées, couplés à des observations en MET.

Avant d'étudier la structure des agrégats, nous avons caractérisé une solution de protéines solubles (PSN-CNM) avant chauffage. Ainsi, le profil d'élution de la solution protéines solubles présente un pic principal centré sur 13 min : cette population est assignée à de petites entités correspondant à des protéines sériques non agrégées et à des caséines non micellaires. La trainée élue jusqu'à 40 minutes est probablement liée à de petits agrégats de protéines sériques présents naturellement dans la poudre de protéines sériques (Figure 32). Du fait des faibles masses molaires et rayons de giration de ces entités, ceux-ci n'ont pas pu être déterminés avec notre système.

4.2.2 Les agrégats fractals

La Figure 32 présente le profil de concentration et le rayon de giration (R_G) des agrégats fractals obtenus par AF4-MALLS-DRi. L'éluogramme est divisé en quatre segments distincts correspondant à quatre populations de protéines. La première population, élue entre 10 et 15 minutes, est assignée aux protéines sériques non-agrégées et à des caséines non micellaires présentes dans la poudre de protéines sériques. Les trois autres populations, élues à des temps supérieurs, correspondent à des agrégats de protéines sériques de différentes formes et tailles. La population élue entre 15 et 23,5 minutes est associée aux petits agrégats primaires ayant une masse molaire moyenne (\overline{M}_w) de 8.1×10^6 g.mol⁻¹. Ces derniers sont considérés comme l'unité de base pour la formation des agrégats fractals (Nicolai et al., 2011b). Le pic élue entre 23,5 et 40 minutes représente la population d'agrégats majoritaire. Elle est composée d'agrégats avec un rayon de giration moyen (\overline{R}_{GZ}) de 149 nm et une \overline{M}_w égale à 1.6×10^8 g.mol⁻¹. Ces résultats sont en accord avec les valeurs déterminées par Mahmoudi et al. (2007). La dernière population, élue après 40 minutes, correspond à des agrégats fractals de grande taille présents en minorité dans l'échantillon et ayant un \overline{R}_{GZ} de 200 nm. Les agrégats de protéines ont ainsi des R_G et des masses molaires (M_w) très polydisperses. En effet, le R_G s'étend de 17 à 209 nm avec un rayon de giration moyen (\overline{R}_{GZ}) de 171 nm alors que la M_w est comprise entre 3.2×10^5 et 2.3×10^8 g.mol⁻¹ avec une masse molaire moyenne (\overline{M}_w) de 1.2×10^8 g.mol⁻¹. Les observations en MET confirment la polydispersité des agrégats fractals et renforcent la nature branchée de ces assemblages (Figure 32).

4.2.3 Les microgels après 15 minutes de traitement thermique

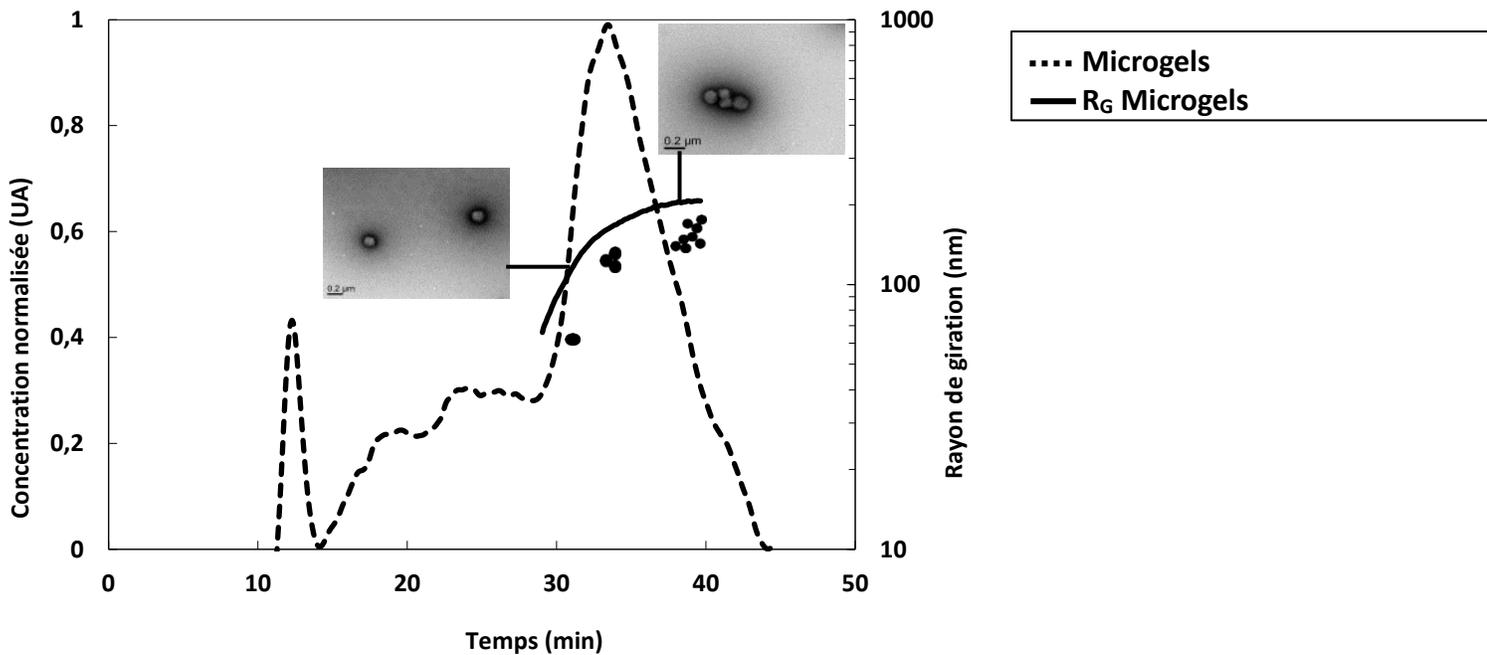


Figure 33: Elugramme d'AF4-MALLS-DRi de la solution de microgels représentant la concentration normalisée ainsi que le rayon de giration des entités éluées, couplé à des observations en MET.

L'éluogramme correspondant aux microgels met également en évidence quatre populations distinctes (Figure 33). La première, élue entre 11 et 14 minutes, est toujours associée aux protéines non agrégées et au matériel micellaire présent dans la poudre de protéines sériques. Les deux populations visibles entre 14 et 29 minutes correspondent à de petits agrégats de protéines sériques qui constituent l'unité de base pour la formation des microgels (Schmitt et al., 2010). Le dernier pic, élué après 29 minutes, représente la population majoritaire et est assigné aux microgels formés durant le traitement thermique. Le R_G de cette population s'étend de 66 à 207 nm avec un \overline{R}_{GZ} de 180 nm alors que la masse molaire est comprise entre 6.1×10^7 et 3.8×10^9 g.mol⁻¹ avec une \overline{M}_w de 2.5×10^9 g.mol⁻¹. Ces valeurs sont supérieures à celles déterminées par Jung et al. (2008) qui ont calculé des valeurs de \overline{R}_{GZ} et de \overline{M}_w respectivement égales à 60 nm et 6×10^8 g.mol⁻¹. Ces différences sont expliquées par la plus faible concentration en protéines utilisée par Jung et al. (2008) pendant le traitement thermique. Les observations en microscopie électronique à transmission mettent en évidence la présence de clusters composés de plusieurs microgels individuels (Figure 33). Les résultats d'AF4-MALLS-DRi montrent que ces clusters peuvent atteindre des \overline{R}_{GZ} de 207 nm et une \overline{M}_w de 3.8×10^9 g.mol⁻¹ alors que les microgels individuels ont un \overline{R}_{GZ} de 115 nm et une \overline{M}_w de $9,6 \times 10^8$ g.mol⁻¹. Ces résultats sont en accord avec les données

publiées par Schmitt et al. (2009). Le pic principal du profil de concentration, élué à 33,5 minutes, correspond à de petits clusters composés seulement de quelques microgels individuels. Ces clusters ont un \overline{R}_{GZ} et une \overline{M}_w respectivement égaux à 163 nm et 2.5×10^9 g.mol⁻¹.

4.2.4 Les micelles de caséines

L'élugramme correspondant aux micelles de caséines peut également être divisé en 4 populations distinctes (Figure 34). La première, éluée entre 11 et 17 minutes, est attribuée à des caséines qui ne sont pas associées aux micelles de caséines. La deuxième population, éluée entre 17 et 22 minutes, peut aussi bien être assignée à de petits assemblages de caséines non micellaires stabilisés par la présence de calcium dans l'éluant (Guyomarc'h et al., 2010) qu'à des micelles de caséines dissociées (Creamer and Berry, 1975; Pitkowski, Nicolai, et Durand, 2008) ou encore des "minimicelles" autour de 20 nm de diamètre (Müller-Buschbaum, Gebhardt, Roth, Metwalli, & Doster, 2007). Les deux autres populations, correspondant aux micelles de caséines, sont éluées entre 22 et 56 minutes avec un R_G allant de 32 à 250 nm et une M_w comprise entre $2,2 \times 10^7$ et $7,3 \times 10^9$ g.mol⁻¹. Ces résultats sont proches de ceux décrits par Fox et al. (2008) et Glantz et al. (2010) qui précisent que dans ces gammes de R_G et M_w , les micelles de caséines sont essentiellement de petite taille. En effet, le troisième pic, élué entre 22 et 40 minutes, représente la population majoritaire (70 % de l'aire totale associée aux micelles de caséines) et est assignée aux petites micelles de caséines. Ces dernières ont un R_G allant de 32 à 88 nm avec un \overline{R}_{GZ} de 68 nm alors que la M_w est incluse entre $8,4 \times 10^7$ à $8,0 \times 10^8$ g.mol⁻¹ avec une \overline{M}_w égale à $3,5 \times 10^8$ g.mol⁻¹. Ces résultats sont en concordance avec la littérature (Fox & Brodkorb, 2008; Lin, Dewan, Bloomfield, & Morr, 1971; Pitkowski et al., 2008). La dernière population, éluée entre 40 et 56 min, est attribuée à de grosses micelles de caséines avec un \overline{R}_{GZ} de 218 nm et une \overline{M}_w de 4.8×10^9 g.mol⁻¹. Ces résultats confirment la polydispersité de taille des micelles de caséines décrite dans la littérature (Fox & Brodkorb, 2008; Holt, De Kruif, Tuinier, & Timmins, 2003).

ainsi des valeurs allant jusqu'à 134 nm avec un \overline{R}_{GZ} de 86 nm. La M_w est comprise entre $1,5 \times 10^5$ et $2,0 \times 10^9$ g.mol⁻¹ avec une \overline{M}_w de $8,6 \times 10^7$ g.mol⁻¹.

L'élugramme assigné aux AM 82/18 montre une première population éluee entre 11 et 18,5 minutes présageant la présence de protéines sériques natives non agrégées ainsi que de caséines non micellaires. De plus, nous observons la présence de micelles de caséines de petites tailles éluees entre 18,5 et 28,5 minutes avec un R_G et une M_w proches de celles présentes dans la dispersion de micelles de caséines seule (Figure 34). Une population supplémentaire, non-visible sur les profils d'élution des micelles de caséines et des PS 82/18, est éluee entre 28,5 et 40 minutes. Cette population est associée à de petits AM 82/18 formés lors du traitement thermique. Enfin, une population majoritaire de grandes particules est éluee entre 40 et 67 minutes avec une concentration maximale à 49 minutes. Pour ce même temps d'élution, le R_G des AM 82/18 augmente et une différence de 35 nm est observée à 49 minutes entre les micelles de caséines et les AM 82/18. Ce décroché a également été observé sur la courbe des M_w des particules et a été attribué à la formation des AM 82/18. En effet, cette augmentation est la conséquence de l'adsorption des protéines sériques sur les micelles de caséines. Ainsi, les images en MET des AM 82/18 montrent la présence d'agrégats fractals ramifiés à la surface des micelles de caséines (Figure 34). Au cours du traitement thermique, des ponts disulfures intermoléculaires ainsi que des interactions hydrophobes sont formées entre les protéines sériques et les caséines- κ présentes à la surface des micelles de caséines. Ces interactions induisent l'adsorption des protéines sériques sur les micelles provoquant une augmentation de la taille et de la masse molaire de ces dernières (Anema & Li, 2003; Jang & Swaisgood, 1990; Smits & Van Brouwershaven, 1980). Ainsi, le R_G des AM 82/18 est compris entre 148,0 et 260 nm avec un \overline{R}_{GZ} de 250 nm contre 218 nm pour les micelles de caséines. De la même manière, la M_w des AM 82/18 est comprise entre $3,4 \times 10^9$ et $7,5 \times 10^9$ g.mol⁻¹ avec une \overline{M}_w de $6,5 \times 10^9$ g.mol⁻¹ tandis que, pour les micelles de caséines, celle-ci est égale à $4,8 \times 10^9$ g.mol⁻¹. Ces valeurs sont supérieures à celles rapportées par Guyomarc'h et al. (2010). Toutefois, Anema & Li, (2003) ont montré que la variation de taille et de forme des AM était directement corrélée avec le niveau de dénaturation des protéines sériques. Ainsi, plus la durée du traitement thermique est importante, plus les protéines du lactosérum seront dénaturées et plus les AM seront de grandes tailles. Ainsi, les différences observées sont dues à une durée du traitement thermique appliquée lors de la fabrication des agrégats plus courte dans le cadre des travaux de Guyomarc'h et al. (2010). La Figure 34 montre que seuls le R_G et la M_w des micelles de caséines de grande taille augmentent alors que ceux correspondant aux petites micelles restent inchangés. De ce fait, les protéines sériques semblent interagir

préférentiellement avec les caséine- κ situées sur les plus grosses micelles de caséines. Sachant que la concentration en caséine- κ par unité de surface est indépendante de la taille des micelles de caséines (Davies & Law, 1983; Donnelly, McNeill, Buchheim, & McGann, 1984; McGann, Donnelly, Kearney, & Buchheim, 1980; Sullivan, Fitzpatrick, & Stanton, 1959), le nombre de caséines- κ et de groupements thiols libres est plus important sur les micelles de caséines de grandes tailles que sur les petites. Par conséquent, les grandes micelles sont plus enclines à former des complexes protéines sériques/caséine- κ via la formation de ponts disulfures et d'interactions hydrophobes. De plus, la surface disponible pour l'interaction des protéines sériques avec les caséines- κ est supérieure sur les micelles de grandes tailles. Ainsi, à la surface des grandes micelles de caséines, les protéines sériques peuvent interagir avec les caséines- κ à des endroits différents alors que l'encombrement stérique limite les interactions sur les plus petites micelles.

4.2.6 Les agrégats mixtes produits avec le ratio MCas/PS 56/44 (AM 56/44)

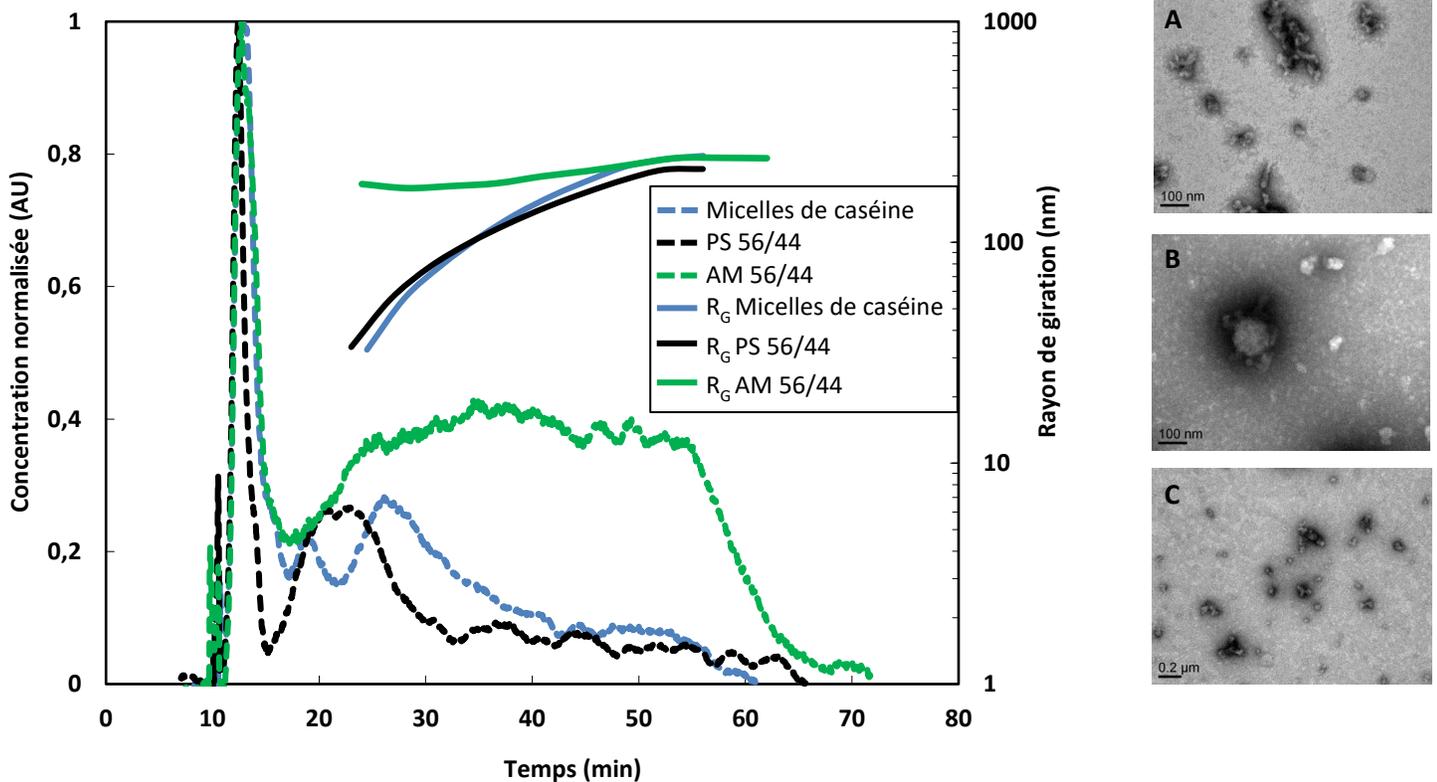


Figure 35: Eluogrammes d'AF4-MALLS-DRI des solutions de micelles de caséines, de PS 56/44 et d'AM 56/44 représentant la concentration normalisée ainsi que le rayon de giration des entités éluées, couplés à des observations en MET (A : PS 56/44; B et C : AM 56/44).

L'éluogramme de la solution de protéines sériques chauffée en l'absence d'ajout de micelles de caséines (PS 56/44) montre la présence de protéines sériques non agrégées et de caséines non micellaires éluées entre 11 et 15 minutes (Figure 35). Les agrégats de protéines sériques sont quant à eux élués entre 15 et 66 minutes avec un maximum enregistré à 21,5 minutes. Le temps maximal d'éluion de ces agrégats PS 56/44 (66 minutes) est plus long que celui des PS 82/18 (41 minutes) indiquant la présence d'agrégats de taille supérieure dans l'échantillon PS 56/44. Ce résultat est dû à la concentration plus élevée en protéines sériques dans la solution PS 56/44 induisant la formation d'agrégats de taille plus importante lors du chauffage. Ainsi, les valeurs de \overline{R}_{GZ} et la \overline{M}_w sont respectivement égales à 159 nm et $1,6 \times 10^8$ g.mol⁻¹ pour les agrégats PS 56/44 contre 86 nm et $8,6 \times 10^7$ g.mol⁻¹ pour les agrégats PS 82/18. L'éluogramme correspondant aux agrégats mixtes AM 56/44 met en évidence la présence de deux populations distinctes (Figure 35). La première, éluée de 11 à 17 min est attribuée à des protéines sériques non agrégées et des caséines non micellaires. La deuxième population, éluée entre 17 et 71,5 minutes, est assignée à des agrégats de protéines. Entre 24 et 54 minutes, le profil de concentration tend vers un plateau laissant présager que l'échantillon est composé d'un mélange très polydisperse comprenant à la fois de petites et de grandes particules. De plus, les valeurs des R_G et des M_w restent relativement constantes et stagnent autour de 217 nm et de $1,7 \times 10^9$ g.mol⁻¹. Cependant, entre 24 et 40 minutes, les valeurs de R_G et les M_w sont supérieures à celles calculées pour les micelles de caséines ou les PS 56/44. Ce résultat reflète à la fois la présence de petits agrégats mixtes et d'un mélange de particules de différentes tailles et formes n'ayant pas bien été fractionnées par cette méthode à cause de propriétés hydrodynamiques proches. Les images en MET corroborent ces résultats et en particulier la présence de plus petits agrégats dans l'échantillon AM 56/44 par rapport au ratio 82/18 (Figure 35). Pour des temps d'éluion supérieurs à 40 minutes, les R_G et les M_w des AM 56/44 ont des valeurs similaires à celles déterminées pour les micelles de caséines alors que nous observons un décroché pour les AM 82/18. Ces résultats amènent à penser qu'aucun AM 56/44 de grande taille n'a été formé pour ce ratio.

Comme mentionné précédemment, la solution de micelles de caséines est principalement composée de petites micelles. De ce fait, pour le ratio MCas/PS égal à 56/44, seule une faible proportion de grandes micelles est présente dans la solution comparée au ratio 82/18. Malgré l'affinité des protéines sériques pour les larges micelles, aucun AM 56/44 de grande taille n'a pu être détecté du fait de la faible proportion de grosses micelles. Par conséquent, aucune variation entre le R_G des AM 56/44 et celui des micelles de caséines n'est observé pour des temps d'éluion compris entre 40 et 56 minutes. De par l'absence des grosses micelles de caséines dans la solution, les protéines sériques sont contraintes

d'interagir avec les caséines- κ présent à la surface des plus petites micelles. Ces interactions engendrent la formation de petits AM 56/44, même si l'encombrement stérique sur ces petites micelles réduit la cinétique d'interaction entre les caséines- κ et les protéines sériques induisant la présence d'agrégats de protéines sériques non adsorbés sur les micelles. De ce fait, l'échantillon est composé d'un mélange d'agrégats de protéines sériques, de micelles de caséines et de petits AM 56/44 dont les différentes tailles et formes compromettent l'efficacité du fractionnement par la méthode A4F.

4.2.7 Les agrégats mixtes produits avec le ratio MCas/PS 30/70 (AM 30/70)

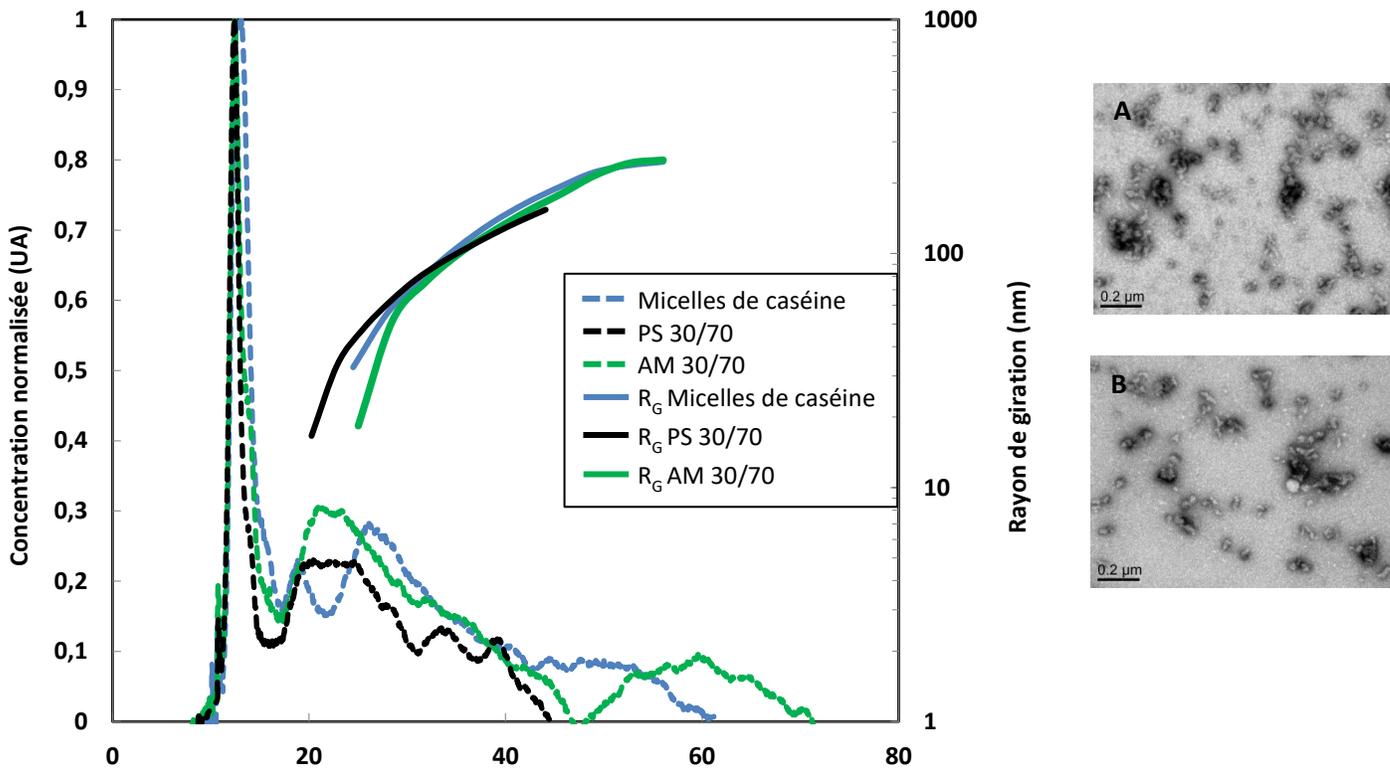


Figure 36: Eluogrammes d'AF4-MALLS-DRi des solutions de micelles de caséines, de PS 30/70 et d'AM 30/70 représentant la concentration normalisée ainsi que le rayon de giration des entités éluées, couplés à des observations en MET (A : PS 30/70 ; B : AM 30/70).

Comme pour les ratios précédents, le chromatogramme des PS 30/70 confirme la présence d'une population correspondant aux protéines sériques non agrégées et aux caséines non micellaires éluées entre 10 et 17 minutes. La seconde population, élue entre 17 et 44,5 minutes, est assignée à de petits agrégats de protéines sériques ayant un \bar{R}_{GZ} de 107 nm et une \bar{M}_w de $5,2 \times 10^7$ g.mol⁻¹ (Figure 36). Au vu de la forte concentration en protéines sériques et afin d'éviter le phénomène de gélification au cours du traitement thermique, la concentration totale en protéines pour ce ratio est abaissée à 3 % contre 5

% pour les ratios précédents. Ainsi, les valeurs du \overline{R}_{GZ} et du \overline{M}_w sont inférieures à celles déterminées pour le ratio 56/44 du fait de la différence de concentration en protéines totales.

Le profil d'éluion des AM 30/70 peut être divisé en trois populations distinctes (Figure 36). La première, élue entre 11 et 17 minutes, est attribuée aux protéines sériques non agrégées et aux caséines non micellaires. La seconde population, élue entre 17 et 47,5 minutes, correspond à la population principale avec un maximum à 21 minutes. Cette dernière est similaire à celle observée sur le profil de concentration des PS 30/70. De ce fait, cette population est assignée à des agrégats uniquement composés de protéines sériques ayant un \overline{R}_{GZ} de 139 nm et une \overline{M}_w de $1,8 \times 10^8$ g.mol⁻¹. La dernière population, élue entre 47,5 et 70 minutes, est probablement due à la formation de quelques AM 30/70. En revanche, la concentration de cette population reste très faible avec un R_G proche de celui des micelles de caséines. Par conséquent, ce sont principalement des agrégats de protéines sériques qui sont obtenus avec le ratio MCas/PS de 30/70 et très peu d'agrégats mixtes de grande taille sont formés. Les observations par MET confirment la présence d'agrégats de protéines sériques non lié aux micelles de caséines (Figure 36 - B) avec des structures similaires à celles des agrégats fractals (Figure 36 - A). Comme démontré dans la littérature (Guyomarc'h, Law, & Dalgleish, 2003 ; Guyomarc'h, Queguiner, Law, Horne, & Dalgleish 2003), la taille et la forme des agrégats peuvent être modulées par le ratio MCas/PS et variées entre des agrégats mixtes de grande taille avec le ratio 82/18 et des agrégats de protéines sériques avec le ratio 30/70.

4.2.8 Effet du pH sur la stabilité des AM 82/18

Les AM 82/18 sont produits à pH 6,3 afin d'éviter la dissociation des micelles de caséines lors du chauffage et de favoriser la formation du complexe caseines- κ /protéines sériques (Anema & Li, 2000). Or, l'objectif est de texturer des émulsions laitières à pH neutre avec ces agrégats mixtes. Il est donc primordial de vérifier si une augmentation du pH entre 6,3 et 7 engendre une dissociation de ces agrégats. Pour se faire, nous avons comparé les AM 82/18 élués dans un éluant ajusté soit à pH6,3, soit à pH7 .

Le Tableau 13 montre que les \overline{R}_{GZ} et les \overline{M}_w des AM 82/18 sont supérieures à ceux des micelles de caséines en raison de la présence des protéines sériques adsorbées à la surface des micelles. De plus, les résultats indiquent que les \overline{R}_{GZ} et les \overline{M}_w sont similaires quel que soit le pH (Tableau 13). Ainsi, les protéines sériques restent adsorbées à la surface des micelles de caséines et l'intégrité des AM 82/18 est conservée dans une gamme de pH comprise entre 6,3 et 7.

Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats de protéines laitières

Tableau 13: Effet des variations de pH sur la structure des agrégats mixtes 82/18.

	Gamme d'élution (min)	\bar{R}_{GZ} (nm)	\bar{M}_w (g.mol ⁻¹)
AM 82/18; pH 7	40-56	245,6 (+/- 0,7)	7x10 ⁹ (+/- 0,22x10 ⁹)
AM 82/18; pH6,3	40-56	249,6 (+/- 0,8)	6,5x10 ⁹ (+/- 0,24x10 ⁹)
Micelles de caséines; pH6,3	40-56	217,9 (+/- 1,1)	4,8x10 ⁹ (+/- 0,19x10 ⁹)

4.2.9 Comparaison des agrégats fractals, microgels et AM 82/18: densité apparente et dimension fractale

Tableau 14: Dimension fractale et densité moyenne apparente des agrégats de protéines et des micelles de caséines.

Agrégats	Gamme d'élution (min)	Gamme de R _G (nm)	d _{fapp}	d _{Gapp} (kg/m ³)
Fractals	26,5 – 31,0	89 - 140	2,1	40 (+/- 7)
Micelles	40,0 – 56,0	147 - 250	2,3	168 (+/- 27)
AM 82/18	40,0 – 56,0	148 - 260	2,5	172 (+/- 17)
Microgels	30,4 – 33,3	99 - 161	3	251 (+/- 8)

La dimension fractale apparente (d_{fapp}) donne des informations sur la structure des agrégats et a été calculée, tout comme la densité moyenne apparente (d_{Gapp}), sur la gamme d'élution correspondant aux différents agrégats de protéines (Tableau 14). La Figure 37 décrit la d_{Gapp} de chaque agrégat en fonction du rayon de giration. Concernant les agrégats fractals, nous constatons que la d_{Gapp} diminue lorsque leur taille augmente. Ainsi, pour des R_G inférieurs à 38 nm, la d_{Gapp} moyenne des protéines éluées est de 179 kg.m⁻³. Ces valeurs élevées de densité correspondent aux petits agrégats primaires produits lors de la première étape du processus d'agrégation et qui constituent l'unité de base pour la formation des agrégats fractals. Pour les R_G supérieurs compris entre 89 et 140 nm, la densité des agrégats diminue et la pente de la courbe est de plus en plus faible. Ceci correspond à la deuxième étape du processus d'agrégation où les unités de base vont s'agréger pour former des structures plus fractales ($d_{fapp} = 2,1$) et moins dense ($d_{Gapp} = 40$ kg.m⁻³) (Tableau 14). Ces résultats sont en accord avec la littérature qui explique que des agrégats primaires vont s'agréger par l'intermédiaire de ponts disulfures et d'interactions hydrophobes pour former des agrégats fractals de faible densité (Nicolai et al., 2011a). La d_{fapp} de 2.1 confirme la présence d'agrégats ramifiés, de faible densité correspondant à une structure flexible qui est

en accord avec les résultats publiés par Mahmoudi et al. (2007) et Gimel et al. (1994). Les images MET ont confirmé la structure fractale des agrégats de protéines sériques de grande taille (Figure 32). En ce qui concerne la solution de microgels, la densité des particules augmente dans un premier temps de 91 à 263 kg.m⁻³ avec leur taille dans la gamme de 70 à 130 nm (Figure 37). Ce résultat confirme que des agrégats primaires interagissent ensemble pour former des agrégats individuels plus denses et sphériques (Schmitt et al. (2010)). La densité des microgels individuels est largement supérieure à celle des agrégats fractals et atteint une valeur moyenne de 251 kg.m⁻³ (Tableau 14). Les microgels individuels ont une d_{fapp} proche de 3 correspondant à une structure dense et sphérique confirmée par les observations en MET (Figure 33). En revanche, les images obtenues en MET montrent que ces microgels individuels sont capables de s'agréger pour former des clusters moins denses et de taille supérieure. Ainsi, dans un second temps, la densité des particules diminue de 263 à 139 kg.m⁻³ pour des tailles augmentant de 130 à 209 nm en raison de la formation de clusters composés de plusieurs microgels individuels.

La densité des AM 82/18 décroît de 233 à 150 kg.m⁻³ lorsque leur rayon de giration augmente (Figure 37). Ce résultat est la conséquence de l'adsorption des protéines sériques sur la surface des micelles de caséines. En effet, les protéines du lactosérum interagissent avec les caséine- κ provoquant une augmentation de la M_w et du R_g des micelles de caséines tout en diminuant leur densité. Cependant, la densité apparente des AM 82/18 reste proche de celle des micelles de caséines (Tableau 14). Ce résultat s'explique par la faible différence entre le R_g et la M_w des AM 82/18 et des micelles de caséines. En effet, entre les AM 82/18 et les micelles de caséines, une faible différence de $1,7 \times 10^8$ g.mol⁻¹ et de 32 nm a été observée concernant la M_w et le R_g (Tableau 14). Les AM 82/18 ont une d_{Gapp} et une d_{fapp} comprises entre celles des microgels et des agrégats fractals. Cela s'explique par la structure des AM 82/18 qui correspond à une micelle de caséines sphérique sur laquelle quelques agrégats fractals de petite taille sont adsorbés.

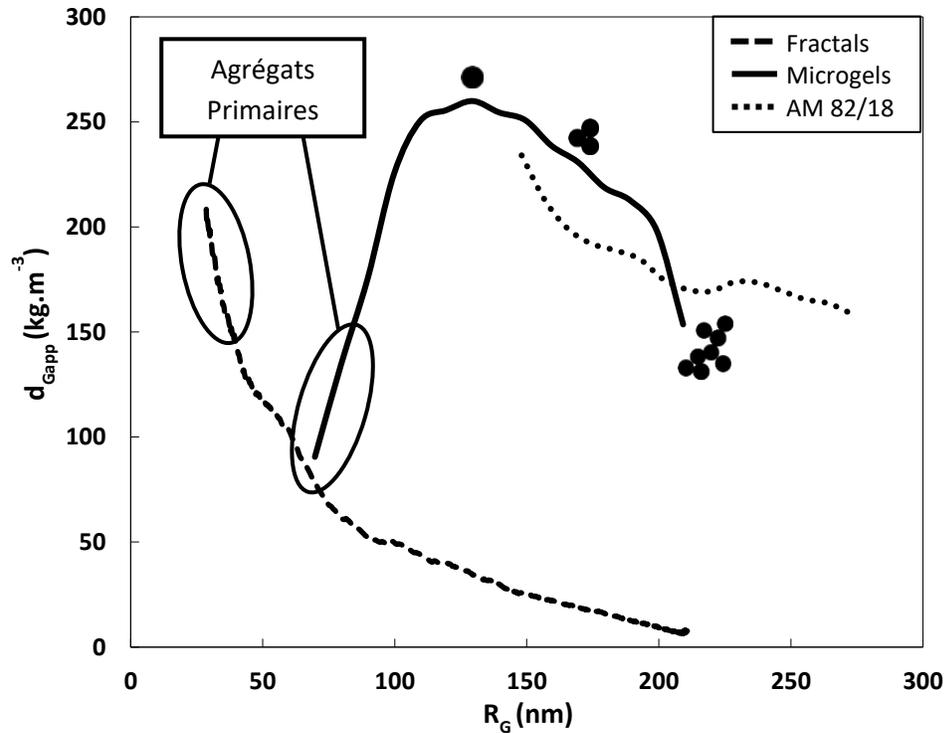


Figure 37: Comparaison de la densité apparente en fonction du rayon de giration des agrégats fractals, microgels et AM82/18.

4.2.10 Les fibrilles

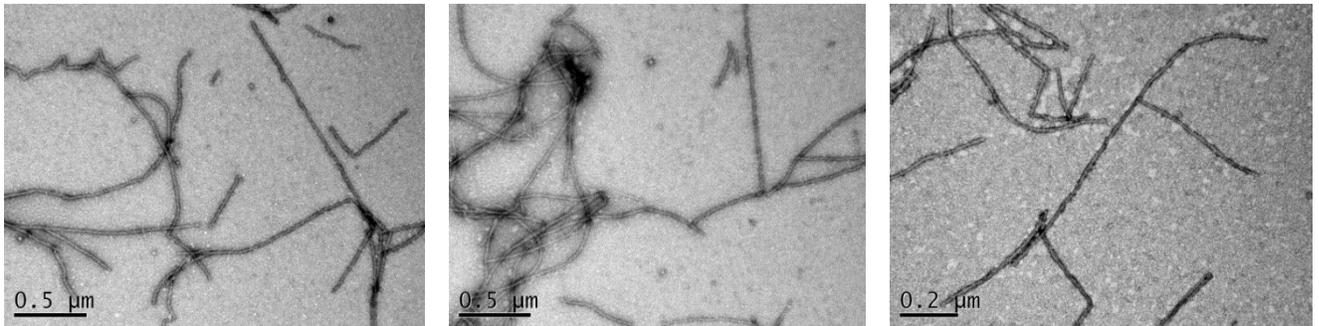


Figure 38: Observation de fibrilles en MET.

La structure des fibrilles n'a pas permis de les caractériser en A4F. En effet, de par leur longueur, il est difficile de prévoir l'orientation de ce type d'objet au cours du fractionnement, rendant la mise au point de méthode relativement complexe. Cependant, la MET confirme que ces agrégats peuvent être assimilés à de longs filaments très fins (Figure 38). En effet, la MET nous permet de déterminer une longueur approximative allant de 500 nm à plusieurs micromètres avec un diamètre relativement constant et proche de 15 nm. Les images microscopiques amènent à penser que les fibrilles peuvent être ramifiées. Cependant, cette information est à prendre avec prudence car cet effet de ramification peut

également provenir de la préparation de l'échantillon et correspondre à une superposition de fibrilles orientées différemment.

4.3 Stabilité aux cisaillements

Lors du procédé de fabrication des émulsions, l'étape d'homogénéisation hautes pressions provoque de forts cisaillements susceptibles de modifier la structure des agrégats et par conséquent, leur capacité à connecter les gouttelettes de matière grasse. Ainsi, nous avons étudié l'impact des hautes pressions sur la structure des agrégats.

4.3.1 Les agrégats fractals

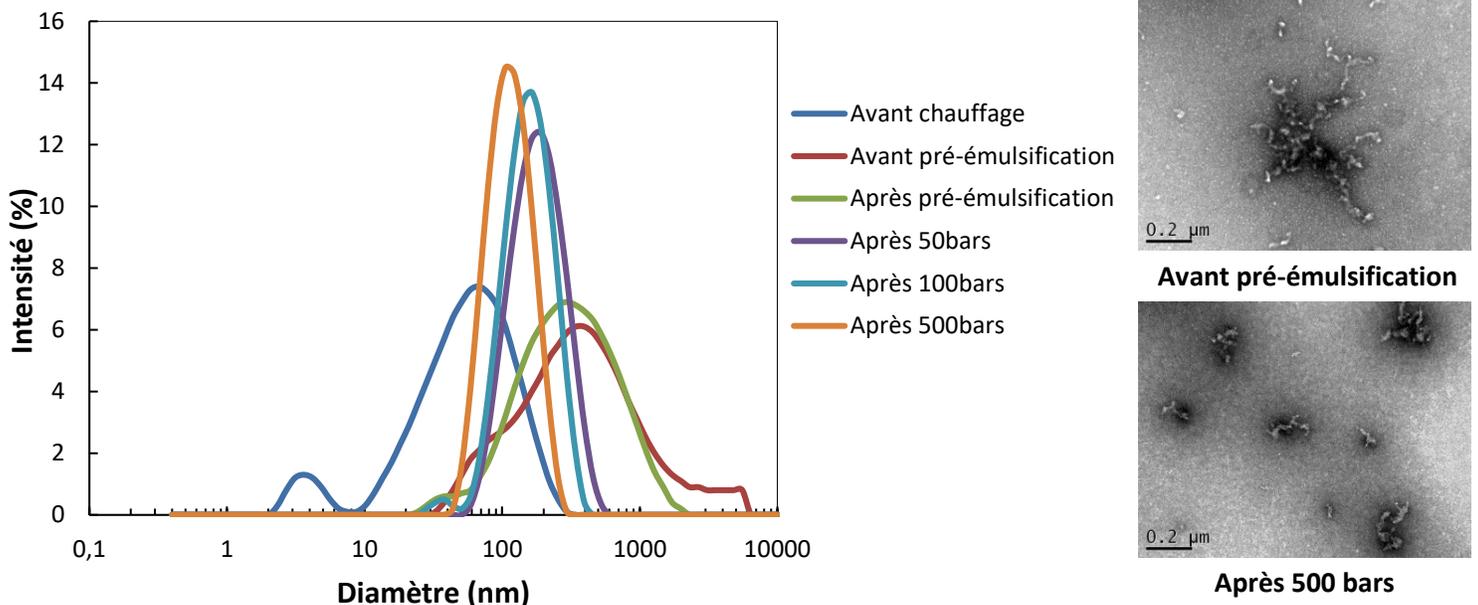


Figure 39 : Effet des cisaillements sur la structure des agrégats fractals.

La Figure 39 montre l'effet des hautes pressions sur la structure des agrégats fractals. Avant traitement thermique, la distribution de taille des protéines sériques est bimodale, avec une première population centrée sur 4 nm, correspondant aux protéines sériques natives non agrégées alors que la seconde, centrée sur 70 nm, est assignée à de petits agrégats naturellement présents dans la poudre de protéines sériques. Avant pré-émulsification, une population polydisperse est obtenue confirmant la formation d'agrégats de protéines sériques au cours du traitement thermique. La distribution de tailles de ces derniers s'étend de 30 nm à 5,6 µm avec une moyenne de 194 nm (+/- 17 nm). Après pré-émulsification, la polydispersité de l'échantillon est réduite du fait de la rupture des agrégats de grande taille sous l'action du cisaillement. Le passage à 50 bars engendre une diminution plus drastique de la taille et de la

Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats de protéines laitières

polydispersité des agrégats et ce phénomène va devenir de plus en plus significatif avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation. En effet, plus les pressions d'homogénéisation sont importantes, plus les forces de cisaillement appliquées à la solution d'agrégats sont élevées et plus ces derniers vont être fragmentés. Ainsi, après homogénéisation, et ce dès 50 bars, la distribution de taille des agrégats devient de plus en plus monodisperse pour atteindre un diamètre moyen de 140,5 nm (+/- 1,1 nm) après passage de la solution à 100 bars. Après homogénéisation à 500 bars, la taille des agrégats s'étend de 44 à 295 nm avec une valeur moyenne de 105,8 nm (+/- 1 nm). Les images en MET confirment l'érosion des agrégats fractals de grande taille suite à une homogénéisation haute pression engendrant la formation d'assemblages de plus petite taille (Figure 39).

4.3.2 Les fibrilles

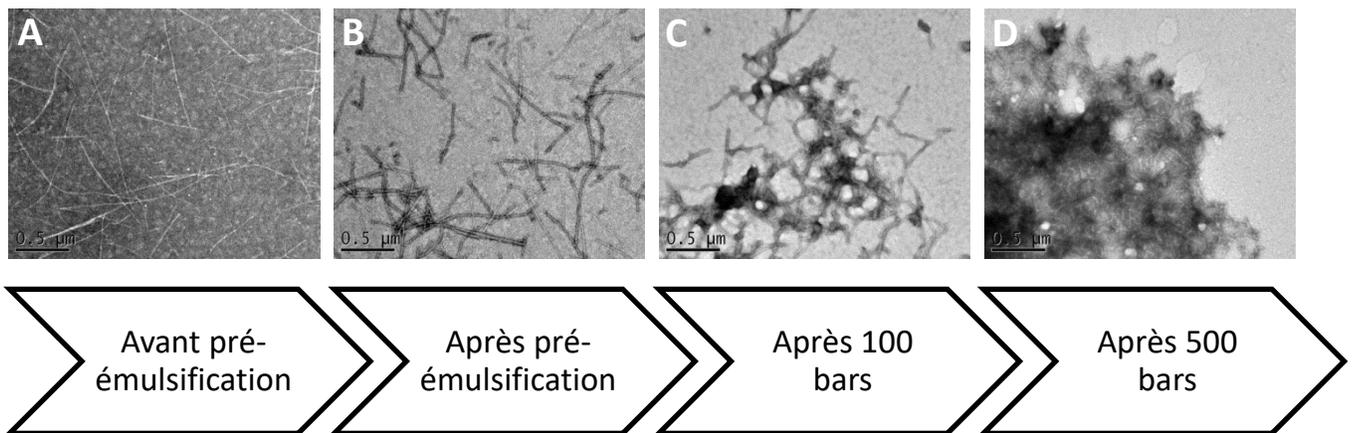
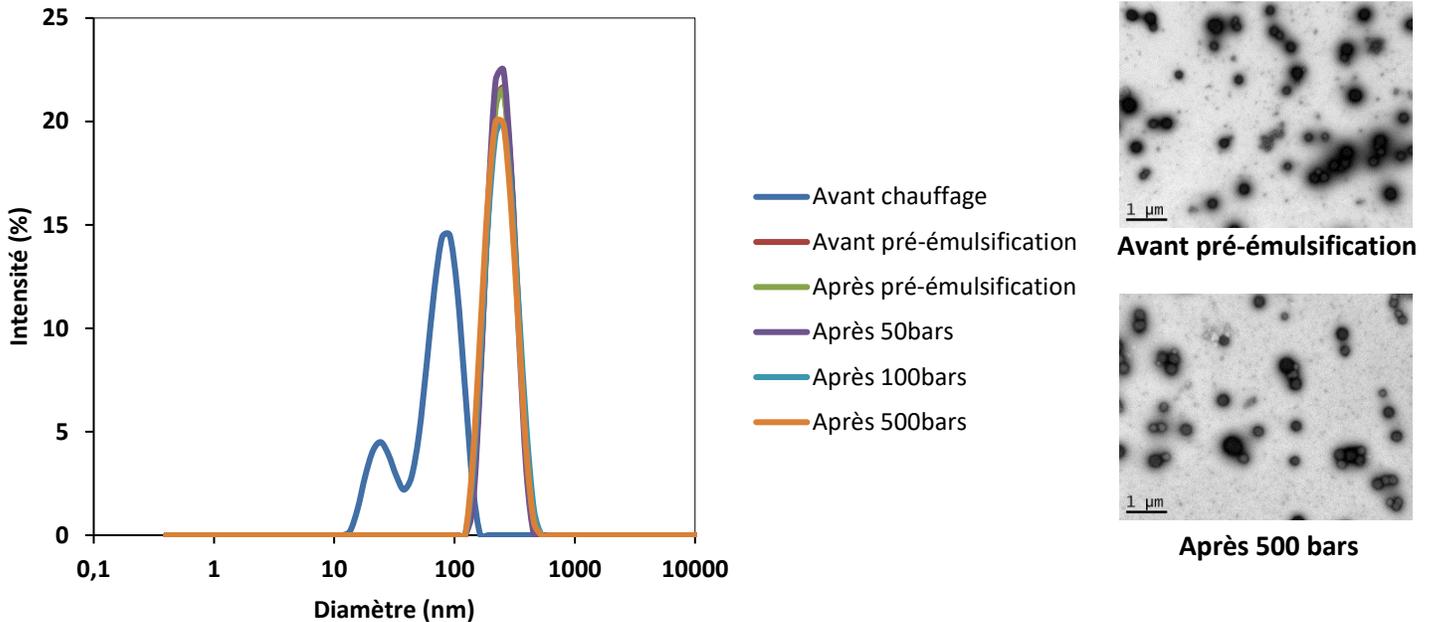


Figure 40 : Effet des cisaillements sur la structure des fibrilles.

L'intérêt supposé des fibrilles était de pouvoir connecter les gouttelettes de matière grasse sur de longues distances. Avant pré-émulsification, nous observons la présence de longs filaments fins (Figure 40). Cependant, dès la pré-émulsification, nous constatons une diminution de la longueur des fibrilles, diminution qui va dépendre des cisaillements appliqués. Ainsi, après un passage à 500 bars, les fibrilles sont réduites en de petits filaments qui ont tendance à s'agglomérer pour former un amas de débris fibrillaires. De ce fait, l'intérêt initial des fibrilles pour une utilisation dans des émulsions est fortement compromis.

4.3.3 Microgels



Indépendamment de la pression d'homogénéisation appliquée, la distribution de taille des microgels est monodisperse et s'étend de 140 à 460 nm avec une moyenne de 238,7 nm (+/- 2 nm) (Figure 41). Les observations en MET confirment ces résultats et mettent en évidence la présence de clusters de microgels aussi bien avant qu'après homogénéisation (Figure 41). Contrairement aux agrégats fractals, les microgels sont extrêmement stables aux hautes pressions.

4.3.4 Les agrégats mixtes

Desobry-Banon et al. (1994) ont montré que la structure des micelles de caséines, constituant la partie majoritaire des agrégats mixtes, n'était pas affectée par les cisaillements pour des pressions allant jusqu'à 2000 bars. De plus, Huppertz et al. (2002) ont prouvé que dans les gammes de pression utilisées pour cette étude, les agrégats mixtes sont stables et restent intacts après homogénéisation. Par conséquent, la stabilité de ce type d'agrégat aux cisaillements n'a pas été évaluée et nous considérons, pour la suite de la thèse, que les agrégats mixtes sont identiques avant et après homogénéisation.

4.4 Conclusion

Tableau 15: Caractéristiques des agrégats fractals, microgels, fibrilles et MA 82/18.

Agrégats	Etat d'agrégation (%)	Stabilité aux hautes pressions	\bar{R}_{GZ} (nm)	\bar{M}_w (g.mol ⁻¹)	d_{Gapp} (kg.m ⁻³)
Fractals	95	Mauvaise	149 (+/- 3,7)	1,6x10 ⁸ (+/- 0,08x10 ⁸)	40 (+/- 7)
Fibrilles	34	Mauvaise	-	-	-
Microgels	88,5	Bonne	115 (+/- 1,3)	9,6x10 ⁸ (+/- 0,03x10 ⁸)	251 (+/- 8)
AM 82/18	-	Bonne	250 (+/- 0,7)	6,5x10 ⁹ (+/- 0,22x10 ⁹)	172 (+/- 17)

Au vu de la polydispersité et de la forme des agrégats, la DLS semble peu adaptée pour ce genre d'objet notamment en ce qui concerne les agrégats fractals et les mixtes. De plus, la CES ne peut être utilisée pour caractériser les agrégats mixtes, car les micelles de caséines interagissent avec la colonne et sont retenues dans la matrice. Par contre, nous avons montré que l'A4F-MALLS-DRi est une méthode séparative innovante et bien appropriée pour caractériser les agrégats de protéines laitières.

En fonction des conditions physico-chimiques du milieu, des agrégats de formes et de tailles variables peuvent être produits. Ainsi, les agrégats fractals, produits à pH 7, ont une structure branchée, peu dense (40 kg.m⁻³) avec un \bar{R}_{GZ} de 149 nm et une \bar{M}_w de 1,6x10⁸ g/mol (Tableau 15). En 2h de chauffage, 95 % des protéines sont agrégées ce qui fait des agrégats fractals une piste intéressante pour la connexion des GG. Ces derniers sont cependant sensibles aux hautes pressions qui induisent l'érosion des agrégats fractals en de plus petits assemblages.

Les microgels, fabriqués à pH 5,8, sont assimilés à des sphères très denses (251 kg.m⁻³) et monodisperses ayant un \bar{R}_{GZ} de 115 nm et une \bar{M}_w de 9,6x10⁸ g/mol (Tableau 15). Après traitement thermique, 88,5 % des protéines sont agrégées. De plus, les microgels sont très stables aux hautes pressions présageant une capacité de pontage des gouttelettes de matière grasse même dans des conditions extrêmes.

Au cours d'un traitement thermique en présence de micelles de caséines, les protéines sériques vont interagir avec les caséines-κ présentes à la surface des micelles pour former des agrégats mixtes. La formation de ces agrégats va fortement dépendre du ratio micelles de caséines/protéines sériques. Ainsi, pour le ratio 82/18, de larges agrégats mixtes sont formés alors que des agrégats de protéines sériques, de structure fractale, sont obtenus pour le ratio 30/70. Le ratio intermédiaire engendre la formation d'un mélange complexe d'agrégats de protéines sériques et de petits agrégats mixtes qui peut être

Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats de protéines laitières

intéressant pour texturer des émulsions laitières. L'A4F-MALLS-DRi a montré que les protéines sériques interagissent préférentiellement avec les caséines- κ situées sur les micelles de grande taille. Les AM 82/18 ont respectivement un \overline{R}_{GZ} et une \overline{M}_w de 250 nm et $6,5 \times 10^9$ g/mol et présentent une stabilité aux hautes pressions ainsi qu'au pH qui fait des AM 82/18 de bons candidats pour connecter les gouttelettes de matière grasse en vue de texturer des émulsions laitières.

Les fibrilles étaient *a priori* des objets intéressants pour connecter des GG sur de longues distances. Cependant, lors du traitement thermique, le rendement de transformation des protéines en fibrilles est seulement de 1/3. De plus, les fibrilles sont totalement instables aux cisaillements ce qui limite fortement leur intérêt initial. Ainsi, pour la suite de l'étude, nous retiendrons seulement les agrégats fractals, les microgels, les AM 82/18 et les AM 56/44.

**Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes
et texturation des émulsions par les
agrégats de protéines laitières**

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines lactières

Ce chapitre a pour objectif de définir quels sont les agrégats les plus efficaces pour connecter les gouttelettes d'une émulsion en vue de la texturer. Pour cela, deux paramètres majeurs sont à prendre en considération :

- La **taille** ainsi que la **concentration en agrégats** (Figure 42). En effet, plus la taille des agrégats est importante, plus les connexions peuvent se faire sur de longues distances. De plus, en augmentant la concentration en agrégats, les connexions inter-gouttelettes seront plus nombreuses et l'émulsion sera davantage texturée.

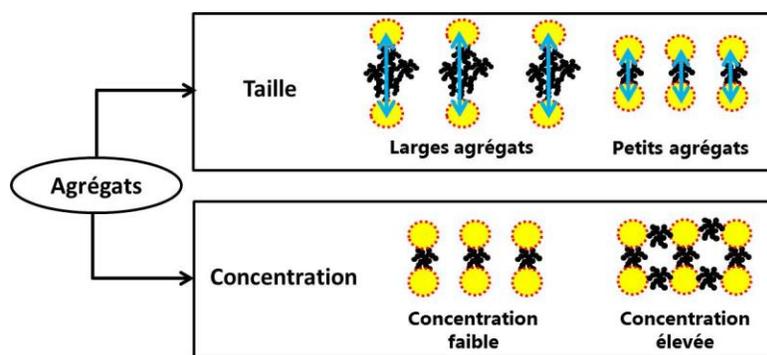


Figure 42: Impact de la taille des agrégats et de leur concentration sur la connexion des gouttelettes.

- Le second paramètre est la **distance entre les gouttelettes**. Cette dernière va dépendre à la fois de la quantité de matière grasse laitière anhydre (MGLA) incorporée dans l'émulsion et de la taille des gouttelettes (Figure 43).

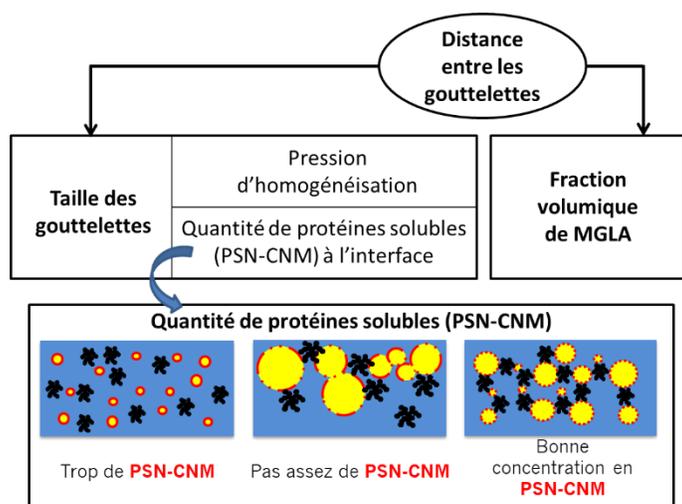


Figure 43: Influence de la distance inter-gouttelettes sur la connexion des gouttelettes de matière grasse.

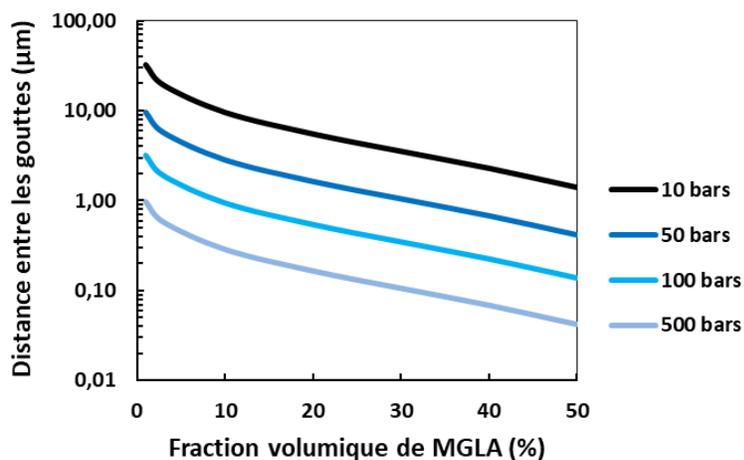


Figure 44 : Modélisation de l'effet de la fraction volumique de MGLA et de la pression d'homogénéisation sur la distance entre les gouttelettes.

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières

Comme le montre la simulation Figure 44, plus la concentration en MGLA est élevée, plus la distance entre les gouttelettes sera faible. La taille des gouttelettes, quant à elle, dépend de la pression d'homogénéisation et de la quantité de tensioactifs disponibles qui sont dans notre cas les protéines solubles : protéines sériques natives (PSN) et les caséines non micellaires (CNM). Pour une fraction volumique de matière grasse fixée, plus la pression d'homogénéisation est élevée, plus les gouttelettes seront petites, donc plus nombreuses, et plus la distance moyenne inter-gouttelettes sera faible (Figure 44). La quantité de protéines solubles impacte également la taille des gouttelettes. En effet, les PSN et les CNM vont jouer le rôle d'émulsifiant en se plaçant plus rapidement que les agrégats à l'interface huile-eau. Elles vont ainsi permettre de maîtriser la taille des gouttelettes et d'éviter la déstabilisation de l'émulsion. En effet, si la quantité de protéines solubles n'est pas suffisante, les gouttelettes flocculent voire coalescent et l'émulsion ne pourra pas être texturée. En revanche, si la quantité de protéines solubles à l'interface est trop élevée, les agrégats ne pourront pas s'adsorber sur les gouttelettes et aucune connexion ne pourra se faire. Ainsi, il faut trouver un compromis permettant de maîtriser la taille des gouttelettes tout en laissant aux agrégats la capacité de s'adsorber et de connecter les gouttelettes afin de texturer les émulsions.

Comme indiqué dans le chapitre matériels et méthodes (Chapitre 3 ; partie 3.1.1), des caséines non micellaires (CNM) sont présentes dans la poudre de protéines sériques. C'est la raison pour laquelle nous parlerons de protéines solubles (PSN-CNM) et de mélange agrégats-caséines non micellaires (Ag-CNM) pour la suite de l'étude. Pour chaque type d'agrégat, nous avons fait varier la concentration en MGLA [5 – 30 p/p%], la pression d'homogénéisation [100 – 500 bars], la quantité de protéines solubles (PSN-CNM) et la concentration en Agrégats-caséines non micellaires (Ag-CNM). Nous montrerons les résultats sous forme de diagrammes d'état présentant la concentration en protéines solubles en fonction de la quantité d'Ag-CNM. Pour chaque type d'agrégat, nous avons donc testé les conditions suivantes :

- MGLA 30 p/p% et pression d'homogénéisation 500 bars
- MGLA 30 p/p% et pression d'homogénéisation 100 bars
- MGLA 5 p/p% et pression d'homogénéisation 500 bars

5.1 Concentration limitante en protéines solubles (Protéines sériques natives (PSN) + Caséines non micellaires (CNM))

La concentration limitante en protéines correspond à la concentration à partir de laquelle la taille des gouttelettes ne varie plus avec l'augmentation de la quantité de protéines. En d'autres termes, cela signifie que l'interface est saturée par les protéines. La concentration limitante en protéines solubles a été déterminée à différentes pressions d'homogénéisation et pour une fraction volumique de matière grasse de 30% (Figure 45) :

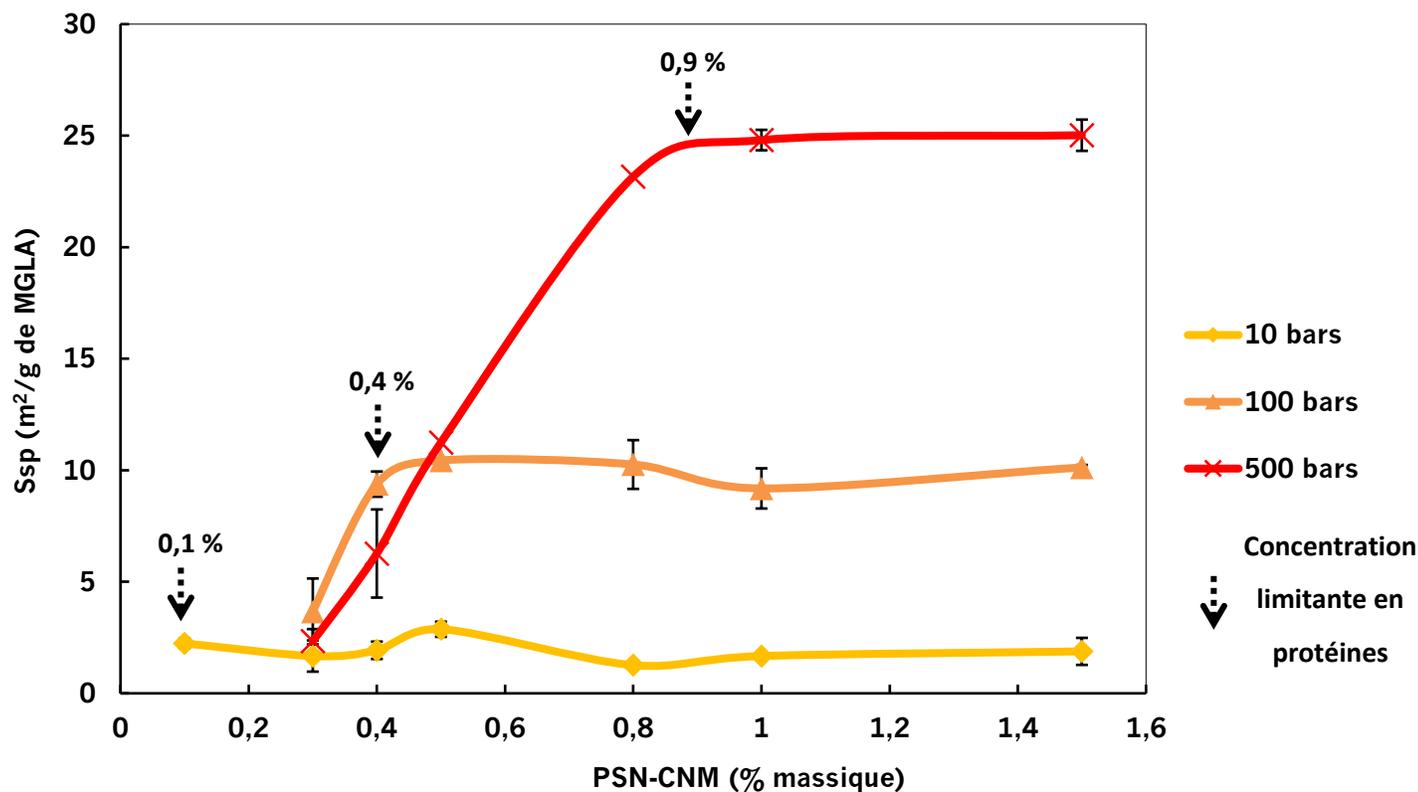


Figure 45: Evolution de la surface spécifique (Ssp) développée en fonction de la quantité de protéines sériques solubles (PSN-CNM).

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières

La surface spécifique (Ssp), calculée à partir des données du granulomètre laser, correspond à la surface interfaciale développée par les gouttelettes de matière grasse. Plus la pression d'homogénéisation est importante, plus le diamètre des gouttelettes sera faible (Tableau 16) et plus la surface spécifique sera élevée. La Figure 45 montre l'évolution de la Ssp en fonction de la concentration en protéines solubles. Pour une pression d'homogénéisation de 10 bars, les gouttelettes ont une taille de 3,8 μm engendrant une surface spécifique développée relativement faible. En effet, à partir de 0,1 p/p% de PSN-CNM, la Ssp est constante quelle que soit la concentration en protéines solubles, ce qui montre que 0,1 p/p% de PSN-CNM suffisent à couvrir l'interface et à stabiliser l'émulsion. En revanche, lorsque la pression d'homogénéisation est de 100 bars, les gouttelettes sont de taille inférieure (Tableau 16) entraînant une augmentation de la Ssp. Ainsi, la quantité de PSN-CNM nécessaire pour stabiliser l'interface se situe à 0,4 p/p%. De la même manière, pour une pression d'homogénéisation de 500 bars, les gouttelettes ont un diamètre de 0,25 μm . La surface spécifique est donc beaucoup plus élevée et l'interface est saturée à partir de 0,9 p/p% de PSN-CNM. Ces valeurs de concentration en PSN-CNM (0,1 p/p% ; 0,4 p/p% et 0,9 p/p%) correspondent à la concentration limitante en protéines pour chaque pression d'homogénéisation. Si la quantité de protéines solubles est inférieure à cette concentration limitante, les gouttelettes ont tendance à coalescer pour former des gouttelettes de plus grosse taille et par conséquent moins nombreuses. Ainsi, la Ssp diminue et la distance inter-gouttelettes augmente limitant les probabilités de connexion (Figure 46):

Tableau 16: Evolution du diamètre des gouttelettes en fonction de la pression d'homogénéisation appliquée lorsque la concentration en protéines solubles est supérieure à la concentration limitante.

Pression (bars)	D43 (μm)
10	3,8 (+/-1,3)
50	1,5 (+/-0,57)
100	0,9 (+/-0,11)
500	0,25 (+/-0,01)

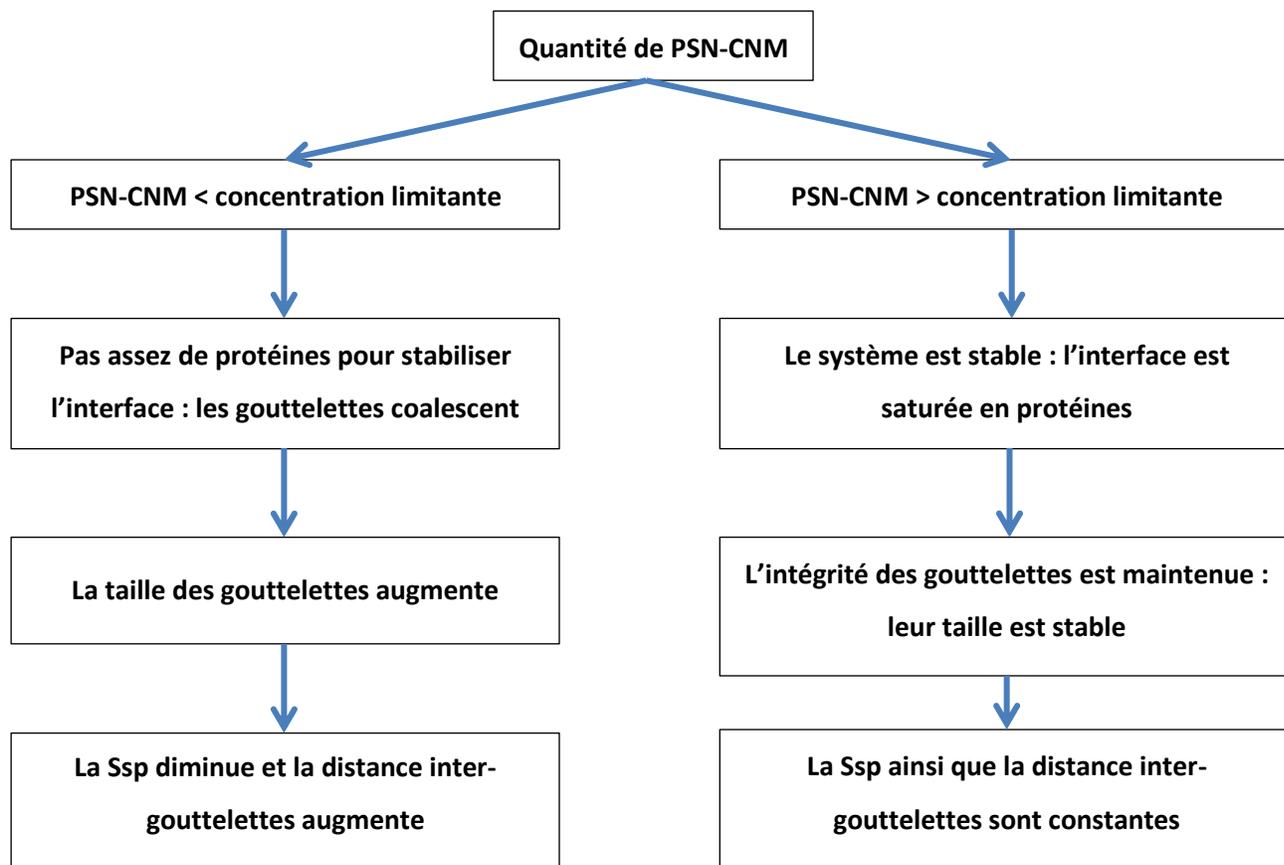


Figure 46: Evolution de la Ssp en fonction de la concentration en protéines solubles (PSN-CNM).

Exemple pour illustrer la Figure 46 :

Si la quantité de PSN-CNM est égale à 0,4 p/p%, celle-ci sera trop faible pour stabiliser l'émulsion à 500 bars. En effet, à 500 bars, cette quantité de protéines est inférieure à la concentration limitante ce qui engendre la formation de gouttelettes de diamètre moyen largement supérieur à 0,25 μm . De plus, la distribution de tailles des gouttelettes obtenue à 500 bars est indépendante de la présence de SDS ce qui confirme un phénomène de déstabilisation par coalescence au cours de la formation de l'émulsion (Figure 47). En revanche, à 100 bars, cette concentration est suffisante pour éviter la coalescence des gouttelettes et stabiliser le système. De ce fait, à 100 bars, le diamètre moyen est proche de 0,9 μm (Figure 47).

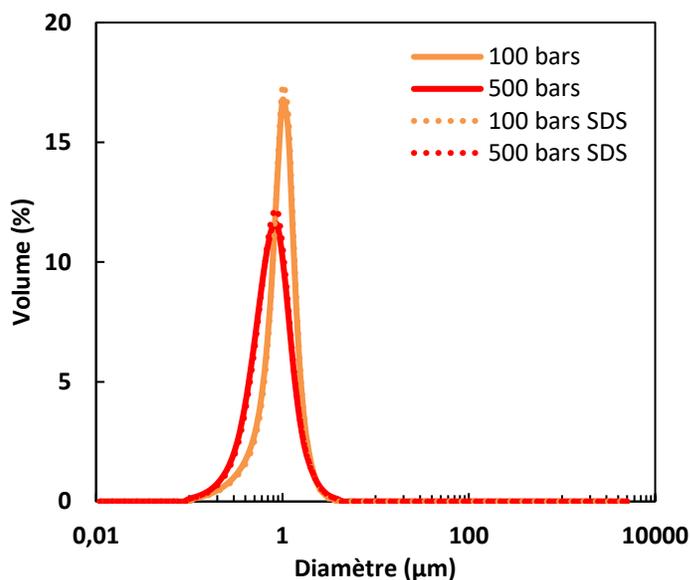


Figure 47: Distribution de taille des gouttelettes obtenues à différentes pressions en présence de 0,4% de PSN-CNM.

Afin de texturer les émulsions, il est donc essentiel d'avoir une concentration suffisante en protéines solubles pour stabiliser le système tout en permettant aux agrégats de connecter les gouttelettes. Pour cela, la quantité optimale de protéines solubles devra être légèrement inférieure à la concentration limitante déterminée à la pression d'homogénéisation cible. La concentration limitante a également été calculée pour des fractions volumique de matière grasse de 5 p/p%.

5.2 Capacité de connexion des gouttelettes de matière grasse par les agrégats de protéines

Afin de déterminer les conditions optimales de connexion des gouttelettes par les agrégats, un plan d'expérience à quatre variables a été mené :

- La proportion de Matière Grasse Laitière Anhydre (MGLA) pour faire varier la distance inter-gouttelettes.
- La pression d'homogénéisation, pour jouer sur la taille et la distance entre chaque gouttelette,
- La concentration en protéines solubles (protéines sériques natives (PSN) – caséines non micellaires (CNM)) pour stabiliser le système,
- La quantité d'agrégats pour connecter les gouttelettes et texturer les émulsions.

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières

Pour chaque couple pression d'homogénéisation/fraction volumique de MGLA, les concentrations en protéines solubles (PSN-CNM) et en agrégats-caséines non micellaires (Ag-CNM) varient. Les résultats sont donc présentés sous forme de diagramme d'état avec la quantité d'Ag-CNM en abscisses et la concentration en PSN-CNM en ordonnée en utilisant un code couleur pour caractériser la texture de l'émulsion.

5.2.1 Les agrégats fractals

5.2.1.1 Emulsions à 30% de MGLA homogénéisées à 500 bars

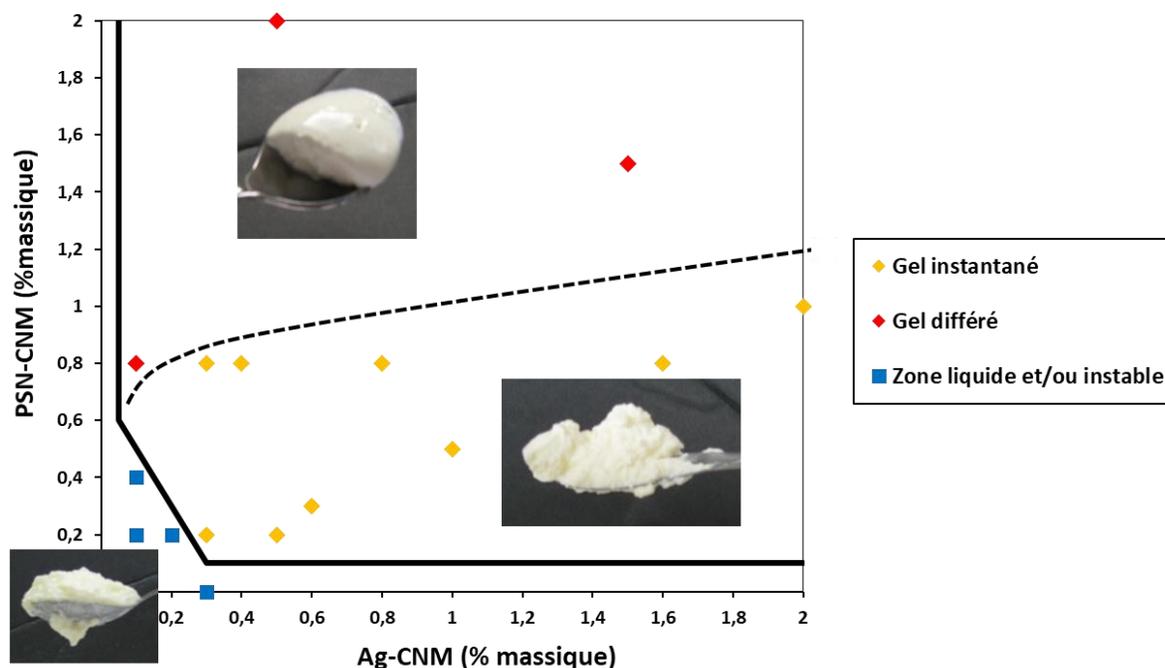


Figure 48: Diagramme d'état des émulsions contenant des agrégats fractals et fabriquées à 500 bars avec 30% de MGLA puis stockées à 20°C.

La Figure 48 montre que les agrégats fractals sont capables de connecter les gouttelettes de matière grasse dans un grand nombre de conditions. En effet, la plupart des émulsions sont texturées directement en sortie d'homogénéisateur et sont considérées comme étant des émulsions gels instantanées. Cependant, dans certains cas, les émulsions se texturent au cours du stockage à 20°C. En revanche, lorsque la concentration en PSN-CNM et/ou en agrégats est très faible, les émulsions restent liquides voire déphasent. Les distributions de tailles de gouttelettes de matière grasse ont été mesurées en sortie d'homogénéisateur, avec et sans SDS, afin d'apporter des explications sur les phénomènes mis en jeu (Figure 49).

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières

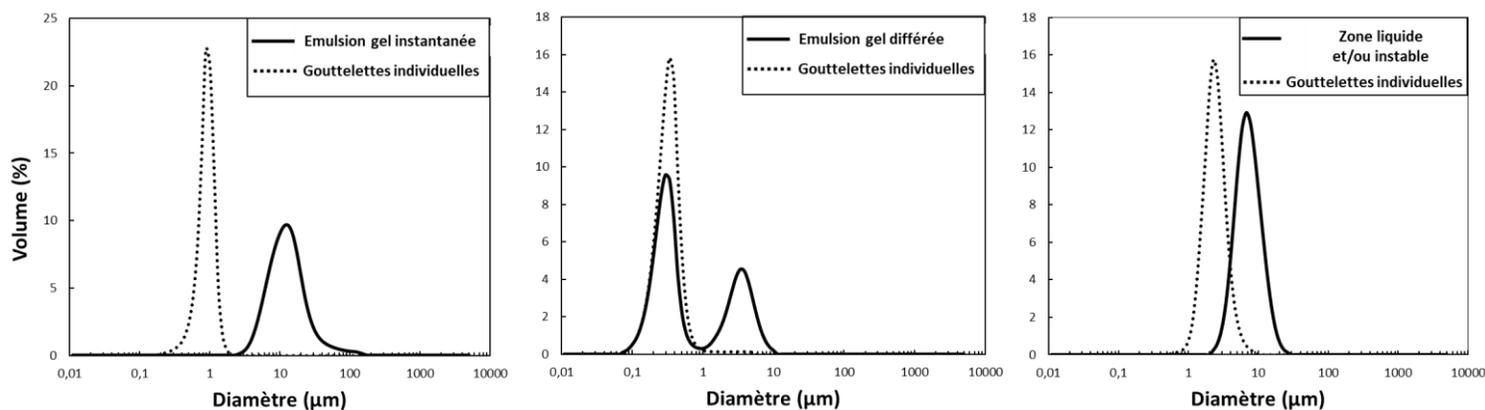


Figure 49 : Distributions de tailles d'une émulsion gel instantanée, gel différée et instable contenant des agrégats fractals et préparées à 500 bars avec 30% de MGLA.

Dans les conditions d'une **émulsion gel instantanée**, les gouttelettes flocculent durant l'étape d'homogénéisation formant de gros amas autour de 10µm (Figure 49 – émulsion gel instantanée). Pour obtenir ce type d'émulsion, il est important d'avoir une quantité suffisante d'Ag-CNM pour connecter les gouttelettes durant l'homogénéisation et texturer le système dès la sortie de l'homogénéisateur. De plus, il est préférable de se placer à des concentrations en protéines solubles inférieures à la concentration limitante (0,9 % dans ces conditions). C'est la raison pour laquelle, en présence de SDS, les gouttelettes individuelles ont tendance à avoir un diamètre moyen supérieur à 0,25 µm (Figure 49 – émulsion gel instantanée). Cependant, des émulsions gel instantanées sont également obtenues en ayant une concentration en protéines solubles égale à 1% et donc supérieure à la concentration limitante. Ainsi, l'hypothèse de départ, qui décrivait que pour texturer une émulsion, la quantité de protéines solubles ne doit pas dépasser la concentration en protéines limitantes, n'est pas si simple. En sortie d'homogénéisateur, la détermination des propriétés rhéologiques des émulsions gels instantanées préparés dans ces conditions montre une valeur de module conservatif très élevée aux alentours de 1300 Pa (à 1 rad.s⁻¹).

Les résultats de granulométrie montrent que les **émulsions gel différées** sont composées de petits amas de gouttelettes dus à des phénomènes de floculation et/ou de gouttelettes individuelles d'un diamètre moyen de 0,25 µm (Figure 49 – émulsion gel différée). Ces émulsions, qui sont liquides en sortie d'homogénéisateur mais se texturent durant le stockage, sont obtenues lorsque la quantité d'agrégats est trop faible ou pour des concentrations en protéines solubles trop élevées. En effet, la concentration en PSN-CNM est largement supérieure à la concentration limitante en protéines. Ces résultats montrent que, par un mécanisme de texturation différée, il est possible de texturer les émulsions même si la

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières

concentration en protéines solubles est largement supérieure à la concentration limitante en protéines (conditions compromettant la connexion des gouttelettes, Figure 43).

Les émulsions **liquides et/ou instables** sont obtenues lorsque la concentration en agrégats et/ou en PSN-CNM est très faible. La quantité d'agrégats est insuffisante pour texturer l'émulsion alors que la concentration en PSN-CNM est trop faible pour stabiliser le système. Ainsi, les gouttelettes individuelles formées ont un diamètre supérieur à $0,25 \mu\text{m}$ ce qui augmente la distance inter-gouttelettes. Malgré la formation de quelques amas de gouttelettes (Figure 49 – zone liquide et/ou instable), la distance inter-gouttelettes reste trop importante pour pouvoir connecter l'ensemble des gouttelettes et texturer le système. Ainsi, les amas de gouttelettes sont contraints de crêmer provoquant la déstabilisation de l'émulsion.

5.2.1.2 Emulsions à 30% de MGLA homogénéisées à 100 bars

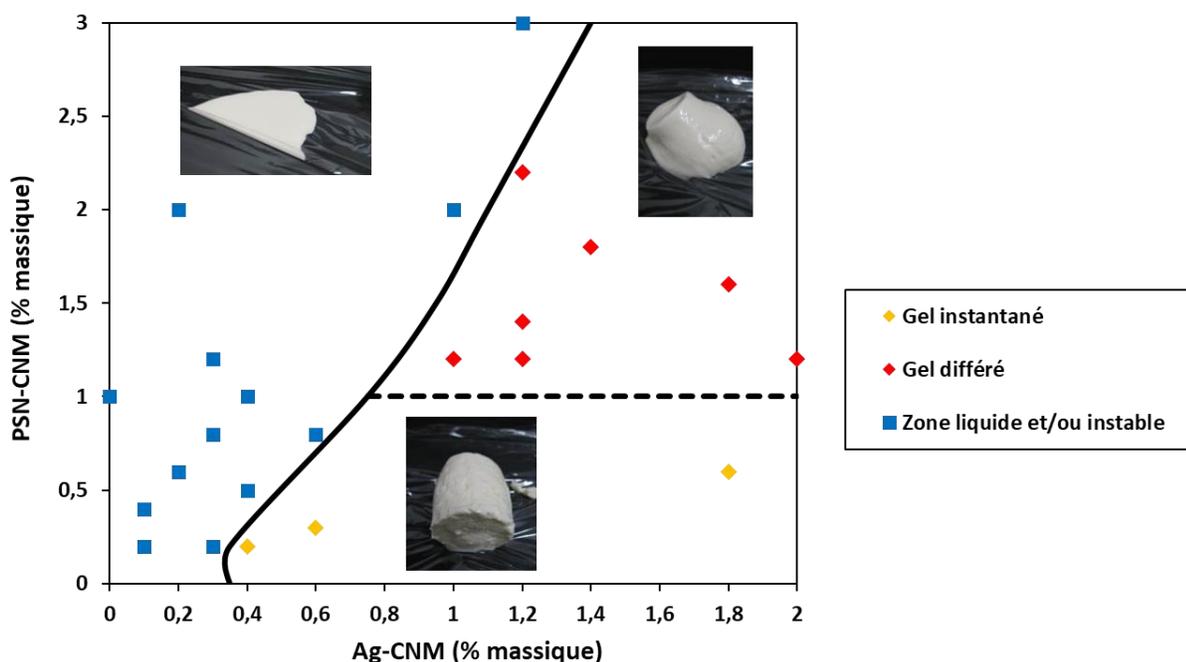


Figure 50 : Diagramme d'état des émulsions contenant des agrégats fractals fabriquées à 100 bars avec 30% de MGLA puis stockées à 20°C.

La Figure 50 montre la présence des zones « gel instantané » et gel différé ainsi que d'une zone où les émulsions sont liquides et/ou instables lorsqu'une pression d'homogénéisation de 100 bars est appliquée. Cependant, la zone correspondant aux émulsions gel instantanées est plus restreinte à 100 bars (Figure 50) qu'à 500 bars (Figure 48). Ceci est dû à la différence de pression d'homogénéisation qui impacte directement la taille des gouttelettes et donc la distance entre ces dernières. En effet, à fraction volumique de MGLA constante, plus la pression est faible, plus le diamètre des gouttelettes est

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières

important et plus la distance inter-gouttelettes est élevée. De ce fait, les agrégats connectent plus difficilement les gouttelettes à 100 bars qu'à 500 bars (Figure 50). Par conséquent, la zone de gélification instantanée est plus restreinte à 100 bars au profit de la zone liquide et/ou instable qui est plus étendue. Dans ces conditions, la concentration limitante en protéines solubles se situe à 0,4 p/p%. Or, même pour des concentrations en protéines supérieures à la concentration limitante, certaines émulsions se texturent pendant l'homogénéisation (émulsions gel instantanées). Ce résultat confirme les observations faites précédemment sur les émulsions fabriquées à 500 bars. Ceci est probablement dû au fait que les protéines solubles (PSN-CNM) et les agrégats sont en compétition pour l'interface. De ce fait, les agrégats arriveraient tout de même à s'adsorber à la surface des gouttelettes et à texturer l'émulsion pendant l'homogénéisation même pour des concentrations en protéines supérieures à la concentration limitante. Cependant, à partir d'un certain seuil, la concentration en protéines solubles serait assez importante pour prendre le dessus et limiter la quantité d'agrégats à l'interface pour conduire à des émulsions gel différées. La zone liquide et/ou instable, quant à elle, est la conséquence d'une concentration en agrégats trop faible pour connecter les gouttelettes ou d'une quantité de PSN-CNM trop importante empêchant les agrégats de s'adsorber à l'interface. La distance inter-gouttelettes étant supérieure à 100 bars qu'à 500 bars, les émulsions gel instantanées sont tout de même moins texturées à 100 bars et les mesures rhéologiques donnent des valeurs de G' en sortie d'homogénéisateur proches de 150 Pa contre 1300 Pa à 500 bars (à 1 rad.s^{-1}).

De la même manière que les émulsions produites à 500 bars, les émulsions gel instantanées et différées sont composées d'amas de gouttelettes même si ces derniers sont de taille supérieure pour les émulsions gel instantanées. En revanche, les émulsions liquides sont uniquement composées de gouttelettes individuelles car la quantité de PSN-CNM est largement supérieure à la concentration limitante empêchant les agrégats de s'adsorber à l'interface et de connecter les gouttelettes (Figure 51).

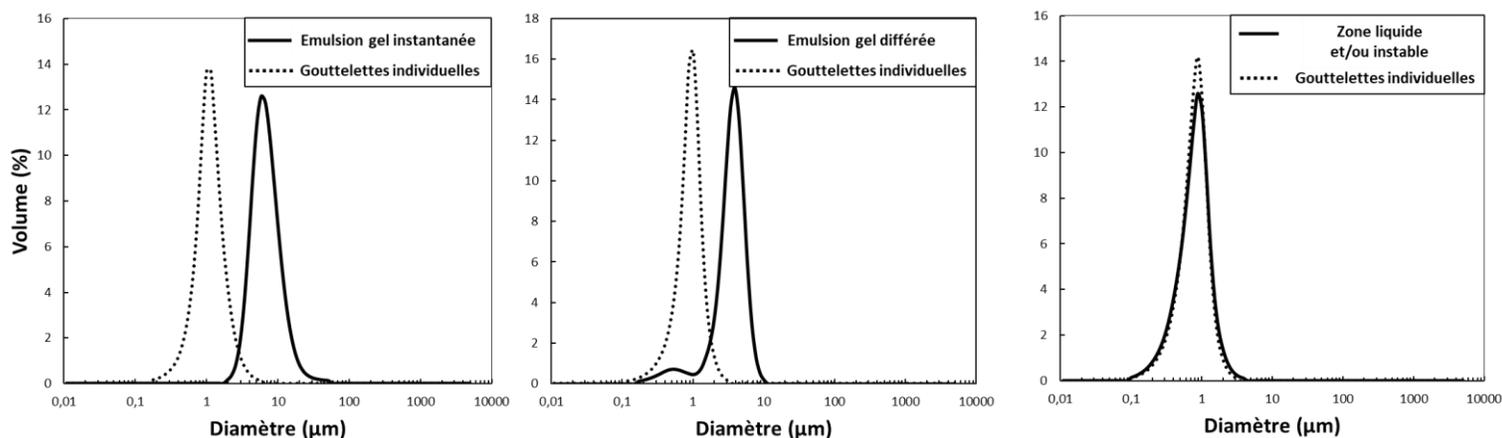


Figure 51 : Distributions de tailles d'une émulsion gel instantanée, différée et instables contenant des agrégats fractals et préparées à 100 bars avec 30% de MGLA.

5.2.1.3 Emulsions à 5 % de MGLA homogénéisées à 500 bars

Comme dans ces conditions, la quantité de MGLA est divisée par six, les concentrations limitantes déterminées précédemment pour les émulsions à 30% de MGLA (partie 5.1) seront six fois plus faible.

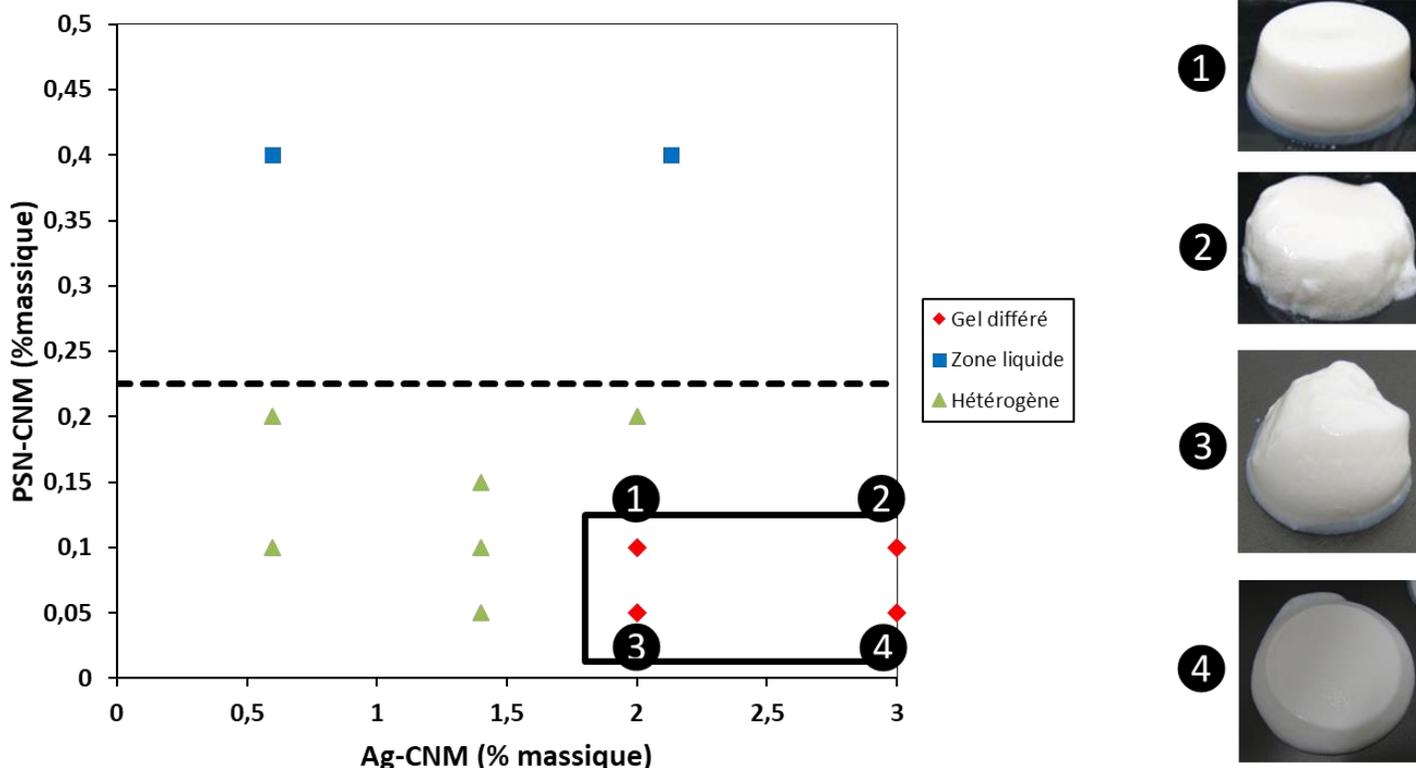


Figure 52 : Diagramme d'état des émulsions contenant des agrégats fractals et fabriquées à 500 bars avec 5% de MGLA puis stockées à 20°C.

Avec une fraction volumique en MGLA de 5%, la distance entre les gouttelettes est très élevée (de l'ordre de 450 nm (Figure 44)), même pour une pression d'homogénéisation de 500 bars, ce qui explique l'absence d'émulsions gel instantanées et la faible étendue de la zone « gel différé ». La concentration limitante en protéines solubles étant de 0,15 p/p%, les émulsions ayant une quantité de PSN-CNM nettement supérieure à cette valeur restent liquides (Figure 52). La zone hétérogène est caractéristique des émulsions à 5 p/p% de MGLA et correspond à une zone où les agrégats sont capables de connecter les gouttelettes mais le système se texture de manière hétérogène. Ainsi, nous pouvons observer la formation de fragments de gel avec des phénomènes de synérèse (proche du lait caillé).

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières

La zone « gel différé » est certes restreinte mais reste très intéressante car les émulsions se texturent alors que la quantité de MGLA est très faible. Du fait d'une distance inter-gouttelettes élevée, le système est liquide en sortie d'homogénéisateur puis va se texturer très lentement en formant d'abord des fragments de gel puis un système stable, homogène et structuré en quelques heures (Figure 52). Les G' (à 1 rad.s^{-1}) correspondant aux émulsions en sortie d'homogénéisateur sont très faibles et proches de 5 Pa.

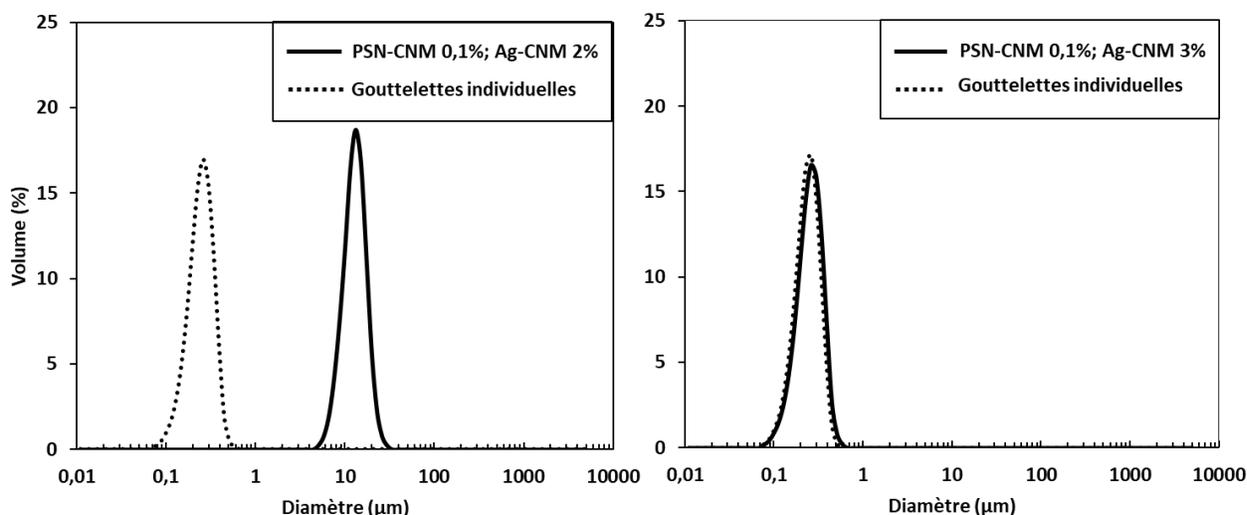


Figure 53: Distributions de tailles des émulsions gel différées contenant des agrégats fractals et préparées à 500 bars avec 5% de MGLA.

De façon inattendue, les émulsions contenant 3 p/p% d'agrégats (Figure 52 - points 2 et 4) sont macroscopiquement moins texturées que les émulsions composées de 2 p/p% d'agrégats (Figure 52 - points 1 et 3). Ce résultat est en accord avec les distributions de taille présentées à la Figure 53. En effet, ces dernières montrent que les émulsions contenant 2 p/p% d'agrégats ont tendance à flocculer et à former des amas de gouttelettes lors de l'homogénéisation. En revanche, avec 3 p/p% d'agrégats, seules des gouttelettes individuelles sont observées en sortie d'homogénéisateur malgré une concentration en agrégats supérieure (Figure 53). Ce résultat est contraire aux hypothèses de départ qui suggéraient qu'une concentration élevée en agrégats favoriserait la connexion des gouttelettes de matière grasse et entraînerait une augmentation de la texture des émulsions. Ce résultat sera développé au cours du chapitre 6.

5.2.2 Les microgels

L'objectif de cette partie est de comparer l'efficacité des microgels à texturer les émulsions par rapport aux agrégats fractals (Figure 54).

5.2.2.1 Emulsions à 30% de MGLA homogénéisées à 500bars

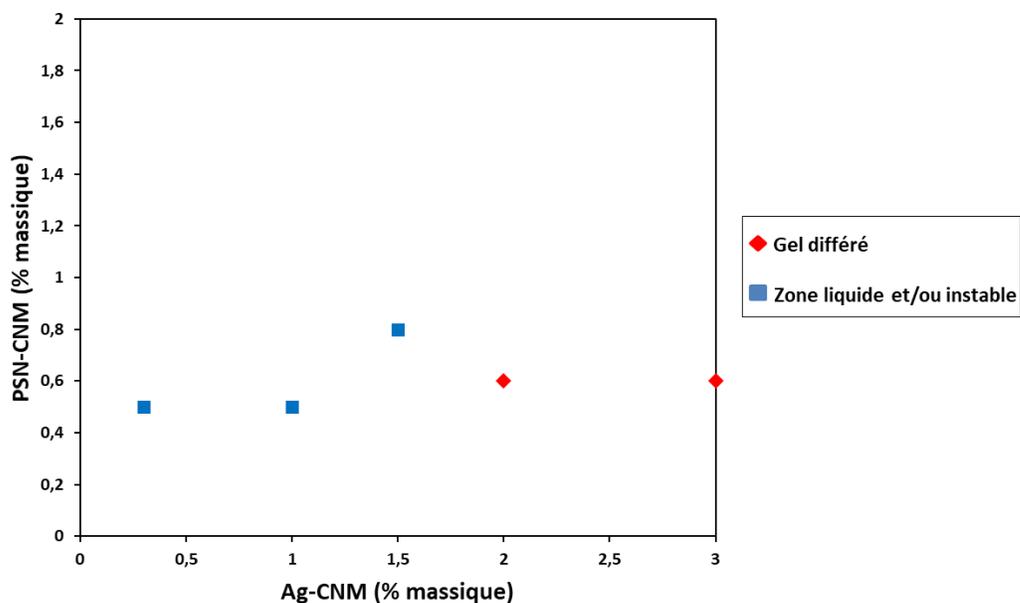


Figure 54: Diagramme d'état des émulsions contenant des microgels et fabriquées à 500 bars avec 30% de MGLA puis stockées à 20°C.

Le diagramme d'état réalisé avec les microgels montre que toutes les émulsions sont liquides après homogénéisation (pas de zone « gel instantané »). De plus, la concentration en microgels doit atteindre 2% pour commencer à observer une texturation pendant le stockage à 20°C. Le comportement observé avec les microgels est donc totalement différent de celui obtenu avec les agrégats fractals. Les distributions de taille confirment ces observations en montrant que des amas de gouttelettes commencent à se former au cours de l'homogénéisation lorsque la concentration en agrégats est supérieure ou égale à 2% (Figure 55 – émulsion gel différée). Les émulsions de la zone liquide et/ou instable sont quant à elles essentiellement composées de gouttelettes individuelles (Figure 55 – zone liquide et/ou instable).

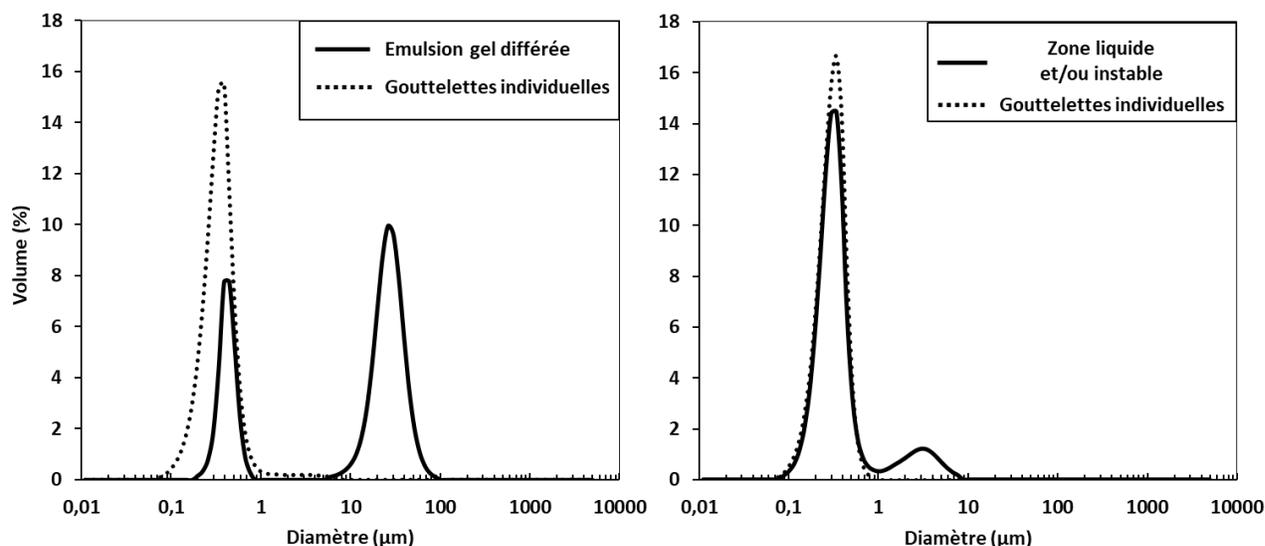


Figure 55: Distributions de tailles d'une émulsion gel différée et liquide contenant des microgels et préparées à 500 bars avec 30% de MGLA.

Cette absence de texturation est probablement due à la différence de densité entre les agrégats fractals et les microgels. En effet, les résultats des analyses par A4F-MALLS-DRi (Partie 4.2.3) ont montré que les microgels sont 6,25 fois plus denses que les agrégats fractals. Ainsi, pour une même concentration en agrégats, le nombre d'agrégats fractals est 6,25 fois supérieur à celui des microgels. De ce fait, la concentration massique en microgels doit être largement supérieure pour parvenir à connecter les gouttelettes de matière grasse. En revanche, ce résultat peut présenter un intérêt pour des produits hyper-protéinés avec des concentrations en protéines supérieures à 3% sans développer une texture trop ferme. Au vu de la quantité de microgels nécessaire pour texturer les émulsions, nous avons pris la décision de ne pas poursuivre l'étude avec ce type d'assemblages car les agrégats fractals se sont montrés beaucoup plus efficaces pour connecter les gouttelettes de matière grasse.

5.2.3 Les agrégats Mixtes

Les résultats du chapitre 4 ont montré que des agrégats mixtes peuvent être obtenus avec les ratios micelles de caséines/protéines sériques 82/18 et 56/44 (MCas/PS 82/18 et 56/44). Ainsi, l'objectif de cette partie est de déterminer les capacités de texturation de ces agrégats.

5.2.3.1 Emulsions à 30% de MGLA homogénéisées à 500bars

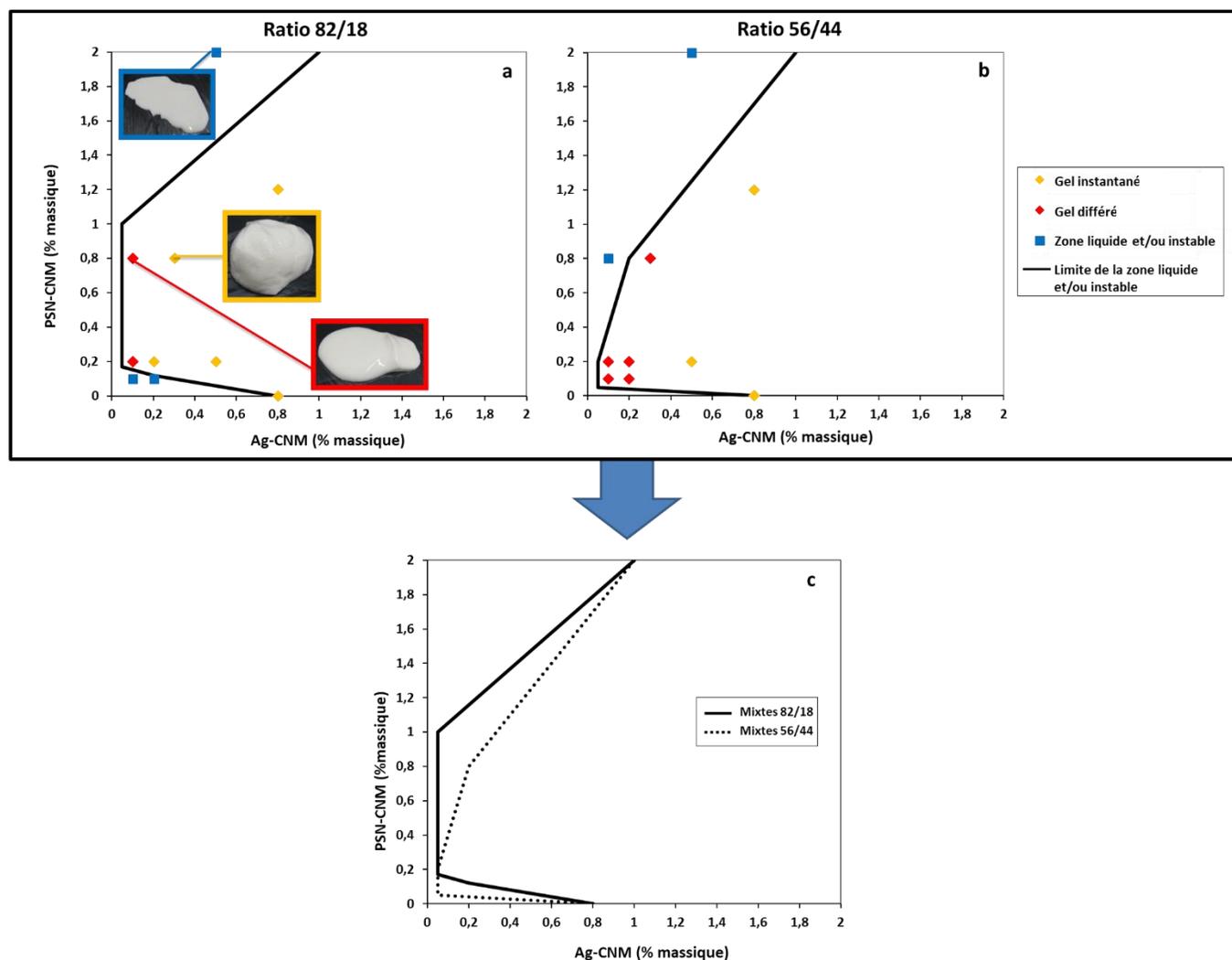


Figure 56 : Diagramme d'état des émulsions contenant des agrégats mixtes 82/18 (a) et 56/44 (b) fabriquées à 500 bars avec 30% de MGLA puis stockées à 20°C. Superposition des limites des zones liquides et/ou instables obtenues à partir des deux diagrammes d'état (c).

Les diagrammes d'état réalisés avec les agrégats mixtes 82/18 et 56/44 (Figure 56 - a et b) mettent en évidence la présence d'une zone « gel instantané », où les agrégats connectent les gouttelettes durant l'homogénéisation donnant lieu à une émulsion texturée en sortie d'homogénéisateur, d'une zone « gel différé » où l'émulsion, liquide après homogénéisation, se texture au cours du stockage puis d'une zone liquide et/ou instable (Figure 56 - a et b). A partir des diagrammes d'état, nous avons superposé les limites des zones liquides et/ou instables afin de montrer les différences d'états entre les émulsions

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières

réalisées avec les agrégats mixtes 82/18 et celles avec les mixtes 56/44 (Figure 56 - c). En effet, les agrégats mixtes 56/44 sont capables de texturer des émulsions pour des concentrations totales en protéines légèrement plus faibles que les agrégats mixtes 82/18. A l'inverse, les émulsions réalisées avec les agrégats mixtes 56/44 sont plus sensibles à la présence de protéines solubles que les émulsions fabriquées avec les agrégats mixtes 82/18. En effet, les systèmes contenant des agrégats mixtes 56/44 vont rapidement rencontrer des difficultés à se texturer lorsque la concentration en PSN-CNM augmente.

Les distributions de taille (Figure 57) en sortie d'homogénéisateur montrent que les émulsions gel instantanées et différées contiennent des amas de gouttelettes dues au pontage durant l'homogénéisation. Cependant, les amas de gouttelettes formés dans le cas d'une émulsion gel différée sont plus petits que ceux formés avec les émulsions gel instantanées. Les émulsions liquides, quant à elles, sont composées très majoritairement de gouttelettes individuelles (Figure 57).

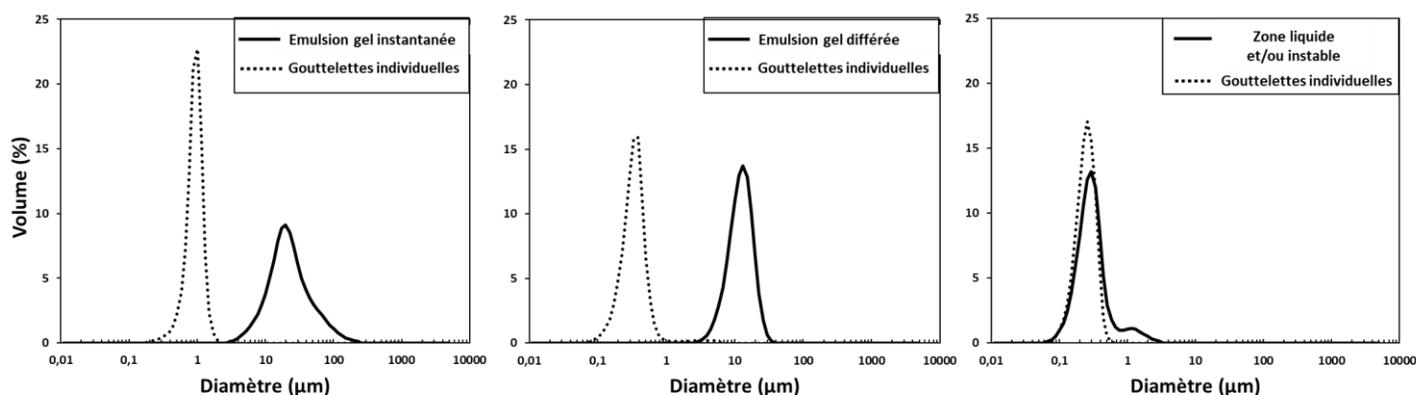


Figure 57: Distributions de tailles d'une émulsion gel instantanée, différée et liquide contenant des agrégats mixtes 82/18 et préparées à 500 bars avec 30% de MGLA.

5.2.3.2 Emulsions à 30% de MGLA homogénéisées 100 bars

En appliquant une pression d'homogénéisation de 100 bars, les gouttelettes de matière grasse vont avoir un diamètre plus élevé qu'à 500 bars induisant une diminution de leur nombre et une augmentation de la distance inter-gouttelettes ce qui influe directement sur la texture des émulsions.

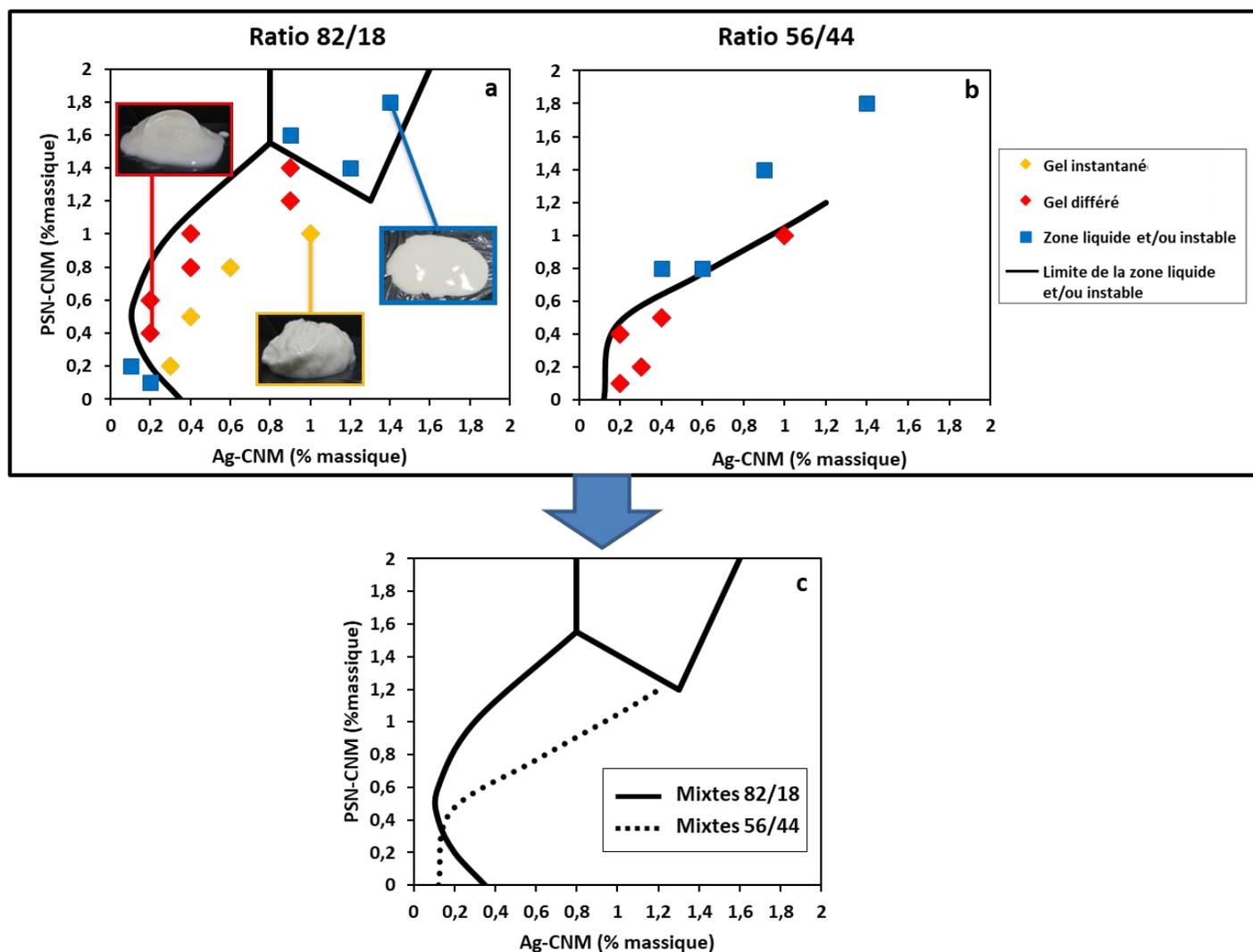


Figure 58: Diagramme d'état des émulsions contenant des agrégats mixtes 82/18 (a) et 56/44 (b) fabriquées à 100 bars avec 30% de MGLA puis stockées à 20°C. Superposition des limites des zones liquides et/ou instables obtenues à partir des deux diagrammes d'état (c).

Le diagramme d'état obtenu avec les agrégats mixtes 82/18 à 100 bars montre, de la même manière qu'à 500 bars, la présence d'une zone « gel instantané », d'une zone « gel différé » et d'une zone liquide et/ou instable (Figure 58- a). A l'opposé, le diagramme d'état obtenu avec les agrégats mixtes 56/44 ne présente aucune condition qui permette l'obtention d'une émulsion gel instantanée mais seulement une capacité à texturer les systèmes de manière différée (Figure 58 - b). Ainsi, les agrégats mixtes 82/18 permettent de texturer des émulsions sur une gamme de ratio PSN-CNM/Ag-CNM plus importante que les agrégats mixtes 56/44 (Figure 58 - c). En revanche, les agrégats mixtes 56/44 sont capables de texturer de manière différée des émulsions contenant une très faible concentration en protéines totales

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières

alors que ces dernières restent liquides voir se déstabilisent avec les agrégats mixtes 82/18. Ces observations confirment les résultats obtenus avec une pression d'homogénéisation de 500 bars.

Les distributions de taille mettent en évidence des gouttelettes isolées de 0,9 μm pour les émulsions liquides alors que des amas de gouttelettes de matière grasse de plusieurs μm , formés durant l'homogénéisation, sont observés dans les zones « gel instantané » et gel différé (Figure 59). Les amas de gouttelettes obtenus avec les émulsions gel différées ont un diamètre moyen inférieur à ceux formés dans le cas des émulsions gel instantanées.

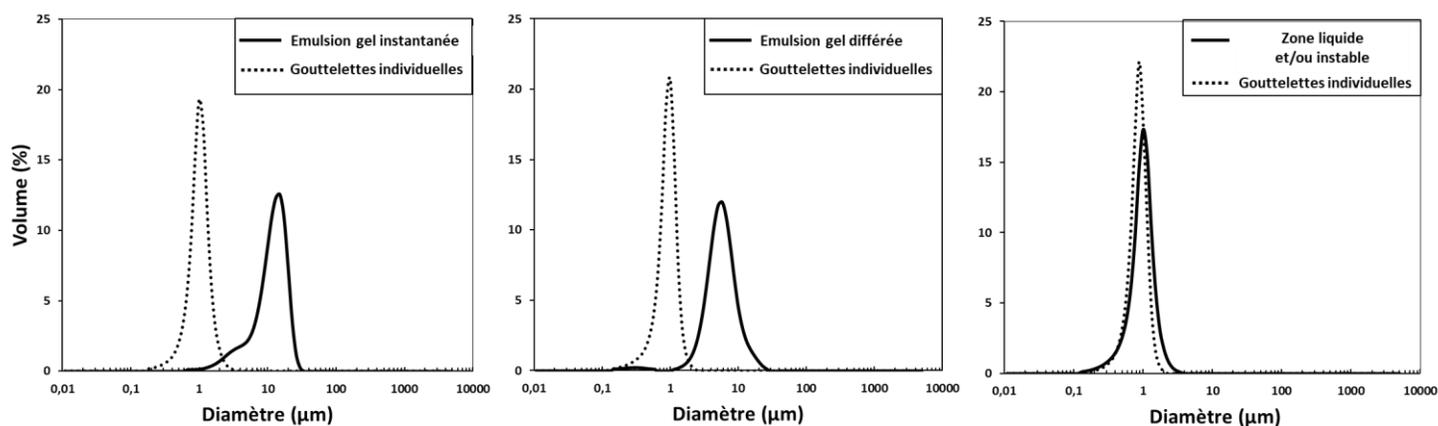


Figure 59: Distributions de tailles d'une émulsion gel instantanée, différée et liquide contenant des agrégats mixtes 82/18 et préparées à 100 bars avec 30% de MGLA.

A l'exception des émulsions contenant de très faible concentration en protéines, les agrégats mixtes 82/18 permettent de texturer les systèmes sur une gamme de ratio PSN-CNM/Ag-CNM plus importante que les agrégats mixtes 56/44. Cette différence est probablement due à la structure des agrégats. En effet, la caractérisation des agrégats mixtes (partie 4.2) a mis en évidence la présence d'agrégats mixtes de grande taille pour le ratio 82/18 (250 nm) alors que de plus petites structures sont observées avec le ratio 56/44 (217 nm). Ainsi, les agrégats mixtes 82/18 peuvent ponter les gouttelettes sur de plus longues distances et texturer les émulsions sur une gamme de ratio PSN-CNM/Ag-CNM plus large. De plus, contrairement au ratio 82/18 qui est majoritairement composé d'agrégats mixtes, le ratio 56/44 contient un mélange de petits agrégats mixtes et d'agrégats de protéines sériques. De ce fait, une compétition pour l'interface entre ces deux types d'agrégats se produit. La présence d'agrégats de protéines sériques à l'interface huile-eau avec le ratio 56/44 peut également être à l'origine des différences observées entre les deux ratios. En effet, lorsqu'un agrégat de protéines sériques s'adsorbe à

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines lactières

l'interface, la distance d'interaction avec une autre gouttelette est plus faible que dans le cas de l'adsorption d'un agrégat mixte (Figure 60).

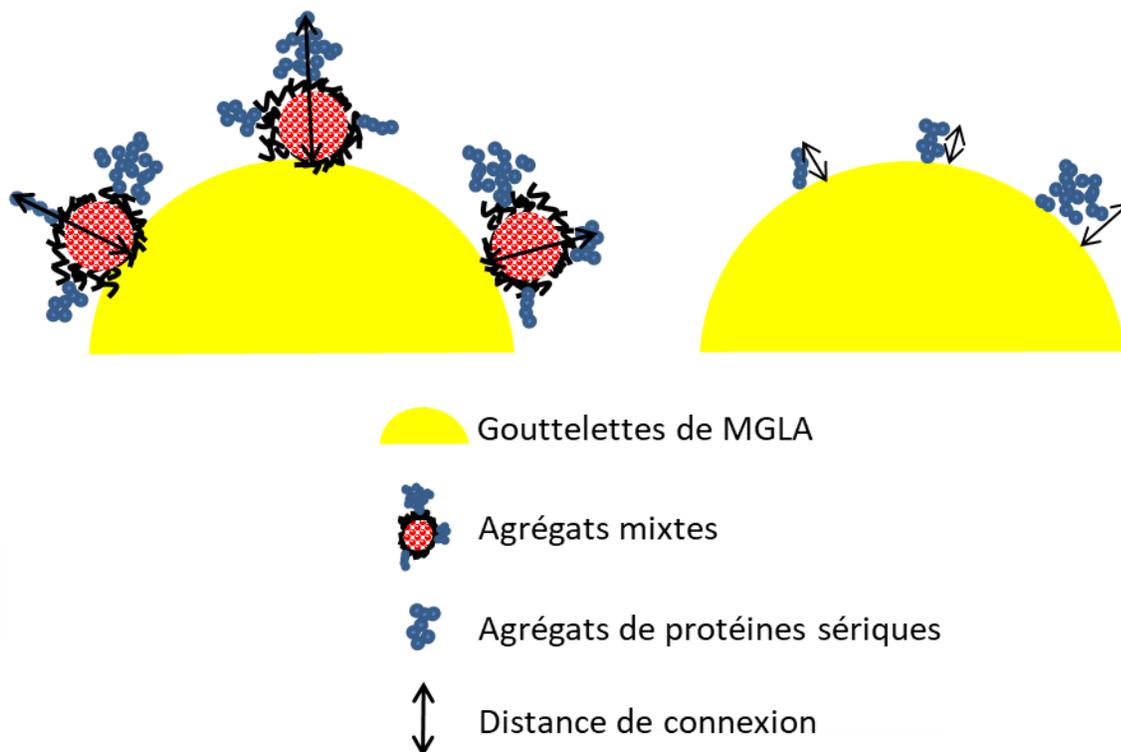


Figure 60: Distance de connexion entre les agrégats mixtes et les agrégats de protéines sériques.

5.2.3.1 Emulsions à 5% de MGLA homogénéisées à 500 bars

Les émulsions réalisées avec 5% de MGLA sont toutes restées liquides et les distributions de taille mesurées en sortie d'homogénéisateur montrent uniquement la présence de gouttelettes individuelles. Par conséquent, les agrégats mixtes ne sont pas adaptés pour texturer des émulsions à faible taux de matière grasse.

5.3 Conclusion

La Tableau 17 résume la capacité de chaque agrégat à connecter les gouttelettes d'une émulsion en vue de la texturer :

Tableau 17: Capacité des différents agrégats à texturer les émulsions.

	MG 30% ; 500bars	MG 30% ; 100bars	MG 5% ; 500bars	MG 5% ; 100bars
Fractals	✓	✓	✓	X
Microgels	X	X	X	X
Mixtes 82/18	✓	✓	X	X
Mixtes 56/44	✓	✓	X	X

Nous avons démontré que les agrégats fractals et les agrégats mixtes sont d'excellents candidats pour la texturation des émulsions laitières à pH neutre. Cependant, les agrégats mixtes produits pour un ratio micelles de caséines/protéines sériques 82/18 (MCas/PS 82/18) sont plus efficaces et permettent de texturer les émulsions sur une plus large gamme de ratio PSN-CNM/Ag-CNM que les agrégats mixtes 56/44. A l'inverse, de par leur densité, la quantité de microgels nécessaire pour arriver à texturer les émulsions est largement supérieure à celle utilisée avec les agrégats mixtes et les agrégats fractals. Nous avons donc fait le choix d'abandonner l'étude de la texturation des émulsions par les microgels même s'ils pourraient s'avérer intéressants dans le cadre de produits hyper-protéinés.

Les agrégats fractals et les agrégats mixtes ont permis, en jouant sur le ratio PSN-CNM/Ag-CNM, de produire trois types d'émulsions (Tableau 18) :

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines laitières

Tableau 18: Explication des différentes zones des diagrammes d'états.

Zones	Conditions d'obtention
Emulsion instantanée	Les agrégats pontent les gouttelettes et texture l'émulsion durant l'homogénéisation.
Emulsion différée	Après homogénéisation, l'émulsion est liquide et le système se texture pendant le stockage.
zone Liquides et/ou instables	Les émulsions contiennent peu de protéines solubles et/ou peu d'Agrégat. Dans ces conditions, il n'y a pas assez de protéines solubles à l'interface pour stabiliser le système et la quantité d'agrégat est trop faible pour pouvoir ponter les gouttelettes : l'émulsion se déphase ou reste liquide. De plus, si la quantité de PSN-CNM est très largement supérieure à la concentration limitante, les agrégats ne texturent plus le système qui reste liquide.

Explication 1 : La quantité d'agrégats est trop faible pour texturer l'émulsion pendant l'homogénéisation : le produit se texture lors du stockage.

Explication 2 : La concentration en protéines solubles est trop élevée (largement supérieure à la concentration limitante) : l'interface des gouttelettes contient majoritairement des PSN-CNM et les agrégats ne sont plus en capacité de ponter les gouttelettes. Par conséquent, la texturation du produit est plus lente.

La concentration limitante en protéines solubles est un facteur très important pour expliquer les trois états observés pour les émulsions. Cependant, même pour des concentrations en PSN-CNM supérieure à la concentration limitante, les émulsions sont capables de se texturer. Ces résultats sont probablement dus à la notion de **compétition interfaciale entre les protéines solubles et les agrégats** permettant à ces derniers de s'adsorber à l'interface et de ponter les gouttelettes de matière grasse même pour des concentrations en protéines solubles supérieures à la concentration limitante.

Surel et al. (2014) ont montré la capacité des agrégats de protéines laitières à texturer des émulsions directement dans l'homogénéisateur (émulsions gel instantanées). Pour cela, les agrégats vont ponter les gouttelettes en se plaçant à l'interface de deux gouttelettes différentes (Figure 61).

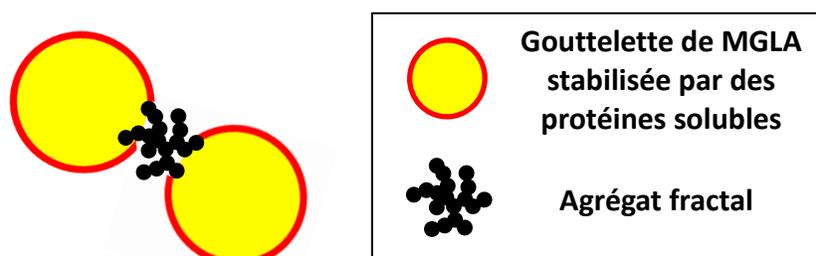


Figure 61: Mécanismes de pontage des gouttelettes par un agrégat.

En revanche, la notion de **gel différé** est un résultat inattendu et intéressant aussi bien d'un point de vue scientifique que d'un point de vue industriel. En effet, les systèmes sont liquides en sortie d'homogénéisateur mais se texturent au cours du stockage limitant ainsi les risques d'obturation des tuyaux au sein des laiteries. Cette texturation différée des systèmes montre que d'autres mécanismes que le pontage sont impliqués dans la connexion des gouttelettes et la texturation des émulsions au cours du stockage. A ce jour, très peu de travaux ont mis en évidence la capacité des agrégats à texturer les émulsions lors du stockage (émulsions gel différées). L'intérêt, dans notre cas, est d'utiliser un mélange d'agrégats et de protéines solubles (PSN + CNM) afin de **maitriser ces mécanismes en jouant sur la compétition interfaciale** dans l'objectif de contrôler le type d'émulsion que nous voulons obtenir. L'explication de ces mécanismes sera développée dans le chapitre 6.

Nous avons également constaté que les agrégats fractals sont capables de texturer des émulsions réalisées à 5 p/p% de MGLA (émulsions gel différées). Cependant, dans ces conditions, augmenter la concentration en agrégat conduit à des systèmes visuellement moins texturés. Ces résultats étonnants et divergents de nos hypothèses de travail résultent probablement, là encore, d'une notion de **compétition interfaciale** entre les protéines solubles et les agrégats (chapitre 6).

Les agrégats fractals sont capables de texturer les émulsions dans une plus large gamme de fraction volumique de matière grasse que les agrégats mixtes (Tableau 17). En effet, alors que les émulsions produites avec les agrégats mixtes restent toujours liquides avec une teneur en matière grasse de 5%, les agrégats fractals permettent d'obtenir des émulsions gel différées dans des conditions bien précises. Pour la suite de l'étude, nous avons décidé de travailler à la fois sur la compréhension des mécanismes de texturation des émulsions gel différées et sur l'influence de la composition interfaciale sur la texture

Chapitre 5 : Connexion des gouttelettes et texturation des émulsions par les agrégats de protéines lactières

des émulsions. Ces travaux ont été menés exclusivement à partir d'émulsions produites avec des agrégats fractals. Les agrégats mixtes, quant à eux, sont écartés du reste de la thèse.

**Chapitre 6 : Contrôler la texture des
émulsions en modulant la composition
interfaciale des gouttelettes de matière
grasse**

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

La partie précédente a mis en évidence la possibilité de texturer de manière différée des émulsions même pour des concentrations en MGLA de 5 p/p%. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu et ainsi maîtriser la texturation de ce type de système, nous avons analysé l'évolution de la floculation et de la texture des émulsions au cours du stockage. Des analyses complémentaires en microscopie ont permis d'étudier la microstructure de ces émulsions gel différées. Deux émulsions gel différées, *a priori* difficiles à texturer, ont été sélectionnées pour cette étude :

- MG5% ; PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 500bars
- MG5% ; PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 3% ; 500bars

Nous avons constaté, dans le chapitre précédent, que l'émulsion contenant 2 p/p% d'agrégats (Ag-CNM 2%) a une texture plus ferme que celle fabriquée avec 3 p/p%. Ce résultat est contraire aux hypothèses formulées en début de projet qui supposaient que l'augmentation de la concentration en agrégats favorise la connexion des gouttelettes de matière grasse et par conséquent la texturation des émulsions. Afin de comprendre les raisons de cette apparente contradiction, des études complémentaires portant sur la composition interfaciale et les propriétés d'étalement des agrégats à l'interface ont été réalisées.

Ce chapitre est donc divisé en deux parties :

- Compréhension des mécanismes de texturation des émulsions gel différées à 5 p/p% de MGLA au cours du stockage à différentes températures,
- Influence de la composition interfaciale sur la texture macroscopique des émulsions.

6.1 Les mécanismes de texturation des émulsions gel différées à 5% de matière grasse

Afin de comprendre de manière plus précise les mécanismes de texturation différée des émulsions, nous avons travaillé à plusieurs températures de stockage : 20 et 60°C.

6.1.1 Flocculation au cours du stockage

Immédiatement après fabrication, les émulsions contenant 2 et 3 p/p % d'agrégats sont liquides (Figure 62). Des mesures par granulométrie laser ont mis en évidence la présence de amas de gouttelettes d'une taille moyenne de 10 μm dans les émulsions contenant 2 p/p% d'agrégats alors que des gouttelettes individuelles d'un diamètre moyen de 240 nm sont observées pour les émulsions fabriquées avec 3 p/p% d'agrégats (Figure 62). Les observations à l'échelle microscopique confirment la présence d'amas de gouttelettes avec 2 p/p% d'agrégats (Figure 62 - A) alors qu'un tapis homogène de gouttelettes individuelles est observé pour les émulsions comportant 3 p/p% d'agrégats (Figure 62 - B). Quelle que soit la concentration en agrégats, la taille moyenne des gouttelettes individuelles (en présence de SDS) est égale à 240 nm. Les phénomènes de flocculation pendant l'homogénéisation et le stockage sont dus à la connexion des gouttelettes de matière grasse par les agrégats de protéines.

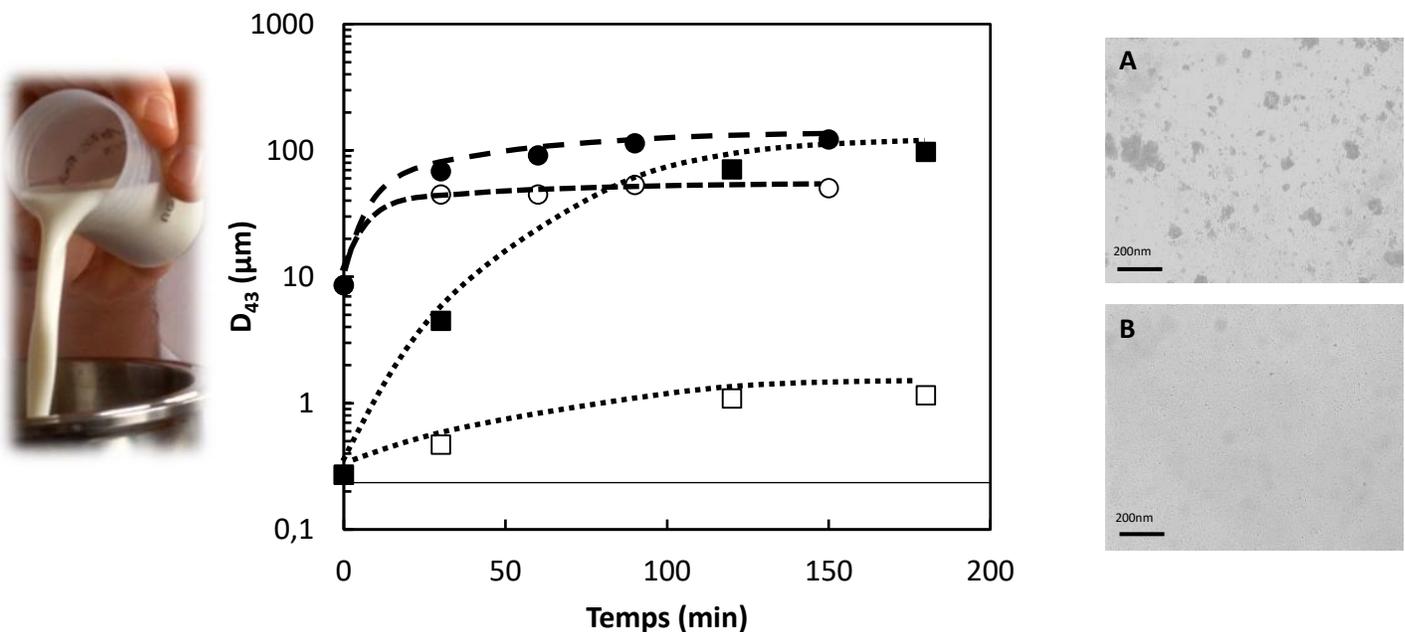


Figure 62: Evolution de la taille des gouttelettes de matière grasse au cours du stockage des émulsions à 60 ° C (symboles pleins) et à 20 ° C (symboles vides) contenant 2 p/p% (cercles) et 3 p/p% d'Ag-CNM (carrés). La ligne continue représente la taille de gouttelettes individuelle mesurée en présence de SDS. La photo montre l'état macroscopique de l'émulsion à 2 p/p% d'Ag-CNM après homogénéisation. Les observations microscopiques réalisées en sortie d'homogénéisateur informent sur la microstructure des émulsions contenant 2 (A) et 3 (B) p/p% d'Ag-CNM.

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

Durant les premières heures de stockage, les émulsions à 2 et 3 p/p% d'agrégats vont évoluer d'un état liquide vers une texture proche d'un gel quelle que soit la température de stockage. Au cours de cette phase, nous observons une augmentation du niveau de floculation et de la taille des amas de gouttelettes de matière grasse alors que les gouttelettes individuelles conservent leur taille de départ (240 nm). La floculation évolue au cours du temps et va dépendre aussi bien de la température de stockage que de la concentration initiale en agrégats (Figure 62). Ainsi, les émulsions avec 2 ou 3 p/p% d'agrégats floculent plus rapidement lors d'un stockage à 60°C en comparaison à un stockage à 20°C. La floculation au cours du temps est probablement la conséquence d'interactions moléculaires entre les protéines (Chen & Dickinson, 1998).

En ce qui concerne la concentration en agrégats, la floculation des gouttelettes est plus rapide pour les émulsions contenant 2 p/p% d'agrégats que 3 p/p%. Contrairement aux hypothèses de départ, la floculation et la connexion des gouttelettes de matière grasse est plus efficace à 2 p/p% d'agrégats qu'à 3p/p%. Nous avons tenté d'expliquer ce résultat surprenant dans les parties suivantes.

6.1.2 Texturation au cours du refroidissement

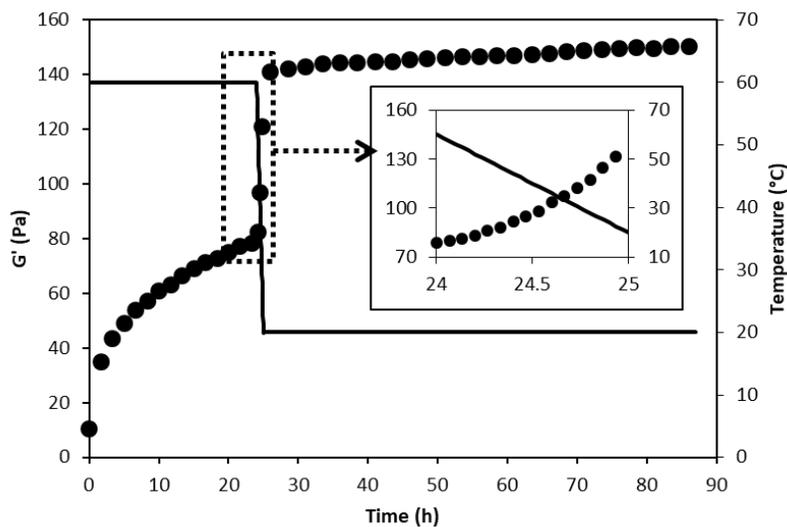


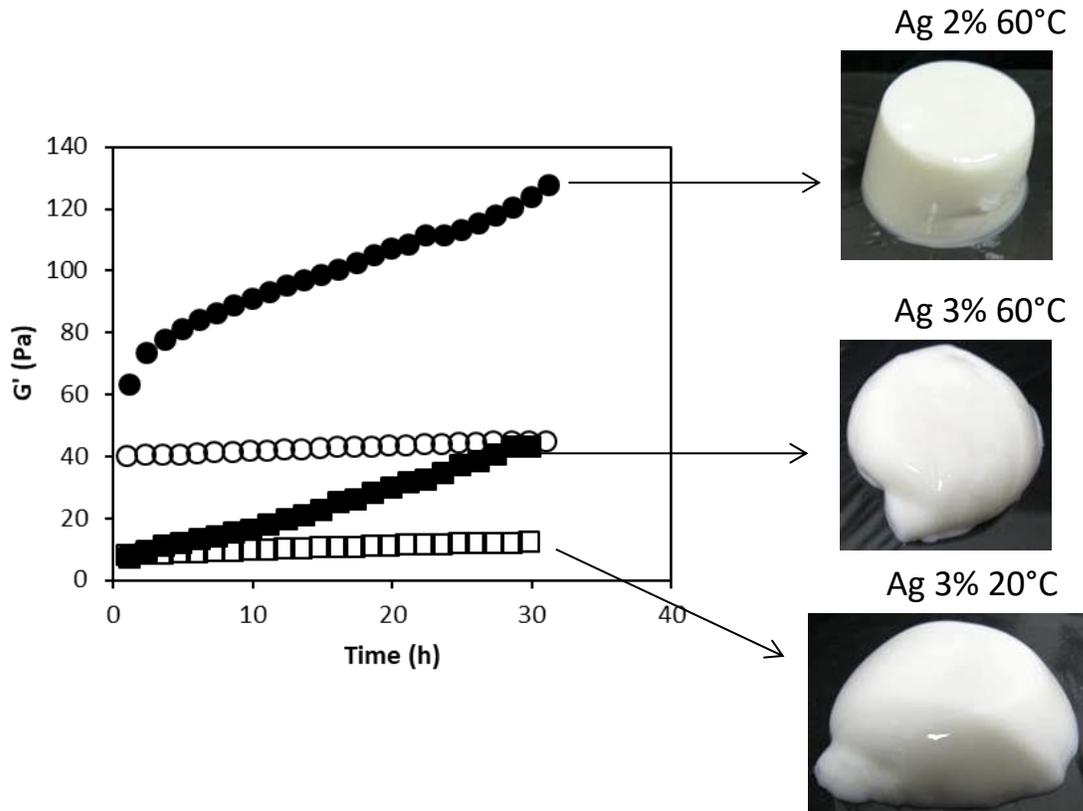
Figure 63: Evolution du module conservatif (cercles) en fonction du temps lors du refroidissement (température en ligne continue) d'une émulsion contenant 2 p/p% d'Ag-CNM.

Après homogénéisation à 60°C, les émulsions sont liquides quel que soit leur état de floculation et vont évoluer vers un gel lors du stockage. Au cours du refroidissement de 60 à 20°C, les valeurs du module conservatif augmentent rapidement pour passer de 80 à 140 Pa en 1h (Figure 63). Ce comportement est également observé pour les émulsions contenant 3 p/p% d'agrégats. Cette augmentation est

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

directement liée à la floculation des gouttelettes de matière grasse et à la formation d'un réseau tridimensionnel responsable de la texturation du système.

6.1.3 Texturation au cours du stockage



La Figure 64 présente l'évolution de la texture des émulsions en fonction du temps et de la température de stockage. A 60°C, le module conservatif des émulsions contenant 2 p/p% d'agrégats atteint 127 Pa en 30h alors que les émulsions à 3 p/p% d'Ag voient leur module croître jusqu'à 43 Pa. Ce résultat est corrélé avec les cinétiques de floculation présentées sur la Figure 62. En effet, la texture des émulsions évolue dans le même sens que la connexion et la floculation des gouttelettes de matière grasse. Ainsi, comme les gouttelettes floculent plus rapidement avec 2 p/p% d'agrégats, la vitesse de croissance du module conservatif va être plus importante avec 2 p/p% d'agrégats qu'avec 3 (essentiellement durant les deux premières heures de chauffage). Les observations macroscopiques confirment que les émulsions contenant 3 p/p% d'agrégats sont moins texturées que celles fabriquées avec 2 p/p% (Figure 63). Lorsque la phase continue (sans matière grasse) est stockée à 60°C, nous observons une texturation de la solution liée à la dénaturation et à l'agrégation des protéines pour former un réseau. Cependant, la

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

présence de gouttelettes de MGLA augmente la résistance du gel indiquant qu'elles agissent comme des particules actives remplisseuses et participent à la formation du réseau (Dickinson & Chen, 1999). Ainsi, le rôle de la matière grasse et de l'interface est essentiel pour expliquer et contrôler la texturation des émulsions. Par conséquent, les différences observées entre les émulsions à 2 et 3 p/p% d'agrégats sont probablement liées à une variabilité de composition interfaciale en protéines.

Concernant le stockage des émulsions à 20°C, nous avons constaté sur la Figure 63 que les systèmes se texturent pendant la phase de refroidissement. En revanche, la Figure 64 montre qu'une fois les émulsions stabilisées à 20°C, les modules de stockage évoluent de manière très lente pour augmenter de quelques Pascals en 30h de stockage. De ce fait, à 20°C, les émulsions à 2 p/p% d'agrégats ont des valeurs de module conservatif proches de 40 Pa contre 20 Pa concernant les émulsions à 3 p/p% d'agrégats. Ces résultats montrent que la texturation des émulsions stockées à 20°C est essentiellement due au refroidissement entre 60 et 20 °C (Figure 63). La différence entre les deux émulsions pourrait également être liée à des variations de composition interfaciale en protéines. En effet, contrairement au stockage à 60°C, lorsque la phase aqueuse seule est stockée à 20 °C, elle reste liquide. Ainsi, la présence des gouttelettes de matière grasse et donc d'interface H-E est essentielle pour arriver à texturer ces systèmes.

6.1.4 Microstructure des émulsions

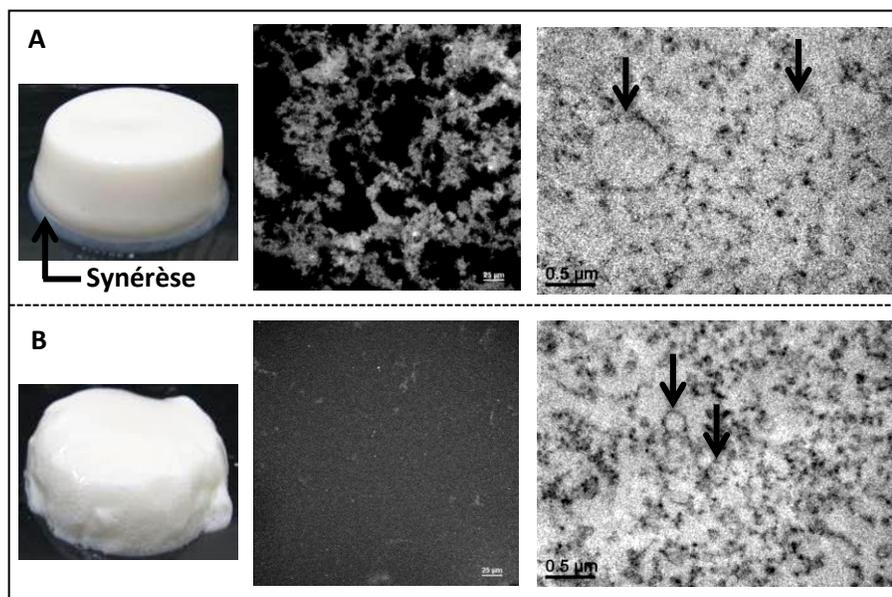


Figure 65: Observations macroscopiques et microscopiques (confocale et microscopie électronique) d'émulsions composées de 2 p/p% (A) et 3 p/p% (B) d'Ag-CNM et stockées à 60°C. Les flèches indiquent l'emplacement des gouttelettes de matière grasse.

Les émulsions présentées sur la Figure 65 ont été stockées à 60°C avant observation en microscopie confocale et électronique. A l'échelle macroscopique, les émulsions contenant 2 p/p% d'agrégats sont plus fermes que celles en contenant 3 p/p%. Cependant, des phénomènes de synérèse sont observés pour les émulsions contenant 2 p/p% d'agrégats (Figure 65 - A) alors que la capacité de rétention d'eau semble supérieure pour les systèmes comprenant 3 p/p% d'agrégats (Figure 65 - B). Pour des raisons de clarté, seul le marquage des lipides est présenté sur les observations au microscope confocal. Ainsi, les émulsions fabriquées avec 2 p/p% d'agrégats montrent la présence d'une matrice hétérogène constituées de gouttelettes de matière grasse et contenant des pores de sérum. Ce résultat est en accord avec la synérèse observée à l'échelle macroscopique. Les amas de gouttelettes formés pendant l'homogénéisation vont s'assembler pour former un réseau tridimensionnel hétérogène qui va expulser du sérum. En revanche, avec 3 p/p% d'agrégats, aucun amas de gouttelettes n'est formé pendant l'étape d'homogénéisation conduisant à un système homogène à cette échelle, avec une meilleure capacité de rétention d'eau et une synérèse limitée.

Des observations réalisées avec un double marquage des lipides et des protéines ont permis de montrer que ces molécules sont localisées au même endroit dans les gels mettant en évidence la présence d'un réseau constitué de protéines et de gouttelettes de matière grasse : le **réseau protéines-lipides**.

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

Cependant, une fraction des protéines reste tout de même présente dans la phase aqueuse de l'émulsion.

À une échelle inférieure, les images obtenues par Microscopie Electronique à Transmission (MET) confirment que les gouttelettes de matière grasse sont connectées via des protéines sériques interagissant les unes avec les autres. Ainsi, le rôle des gouttelettes de matière grasse et du contrôle de leur connexion par l'interface est essentiel pour expliquer et maîtriser la texturation des émulsions. Les connexions inter-gouttelettes par les agrégats conduisent à la formation d'un réseau protéines-lipides plus dense et moins ouvert avec 3 p/p% d'agrégats qu'avec 2 p/p% (Figure 65). Les phénomènes de synérèse observés à l'échelle macroscopique sont probablement corrélés à cette différence de densité au sein du réseau protéines-lipides. Ainsi, plus le réseau est dense, plus la capacité de rétention d'eau est importante et plus la synérèse sera faible.

Les mêmes conclusions ont été formulées pour les émulsions stockées à 20 °C même si ces dernières sont moins texturées avec un réseau protéines-lipides moins développé.

Alors que Surel et al. (2014) ont montré la capacité des agrégats à se partager entre deux gouttelettes pour texturer les émulsions durant l'homogénéisation, les analyses rhéologiques et les observations microscopiques présentées dans cette partie ont permis de mettre en évidence la formation d'un réseau protéines-lipides lors du stockage des émulsions. Ainsi, les gouttelettes de matières grasses sont connectées entre elles par l'intermédiaire d'un réseau de protéines jusqu'à obtenir un système gélifié (Figure 66). Ce mécanisme de texturation va donc fortement être influencé par la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse. Cette notion de compétition interfaciale peut éventuellement expliquer la raison pour laquelle les émulsions contenant 2 p/p% d'agrégats sont plus texturées que celles en contenant 3 p/p% (à 5 p/p% de MGLA). Dans la partie suivante, nous allons donc détailler l'influence de la composition interfaciale sur la texture des émulsions.

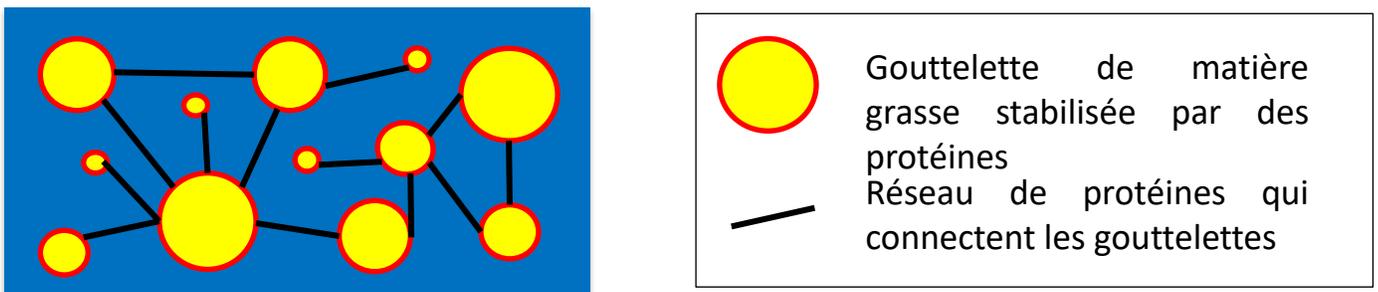


Figure 66: Formation du réseau protéines-lipides responsable de la texturation différée des émulsions.

6.2 Moduler la composition interfaciale afin de contrôler la texture des émulsions

L'objectif de cette partie est de corréliser composition interfaciale et texture macroscopique des émulsions. Lors de la fabrication des émulsions, une compétition interfaciale a lieu entre les caséines non micellaires (CNM), les protéines sériques natives (PSN) et les agrégats. Cependant, il est difficile de prédire laquelle de ces trois entités va s'adsorber préférentiellement à l'interface d'autant plus que l'étape d'homogénéisation génère un régime turbulent masquant ainsi les phénomènes de diffusion (Dickinson et al., 1989). Afin de comprendre cette compétition et de contrôler la composition interfaciale, nous avons réalisé une analyse précise de l'interface des gouttelettes (composition et structure) sur des émulsions réalisées à 30 p/p% de matière grasse avec une pression d'homogénéisation de 100 bars :

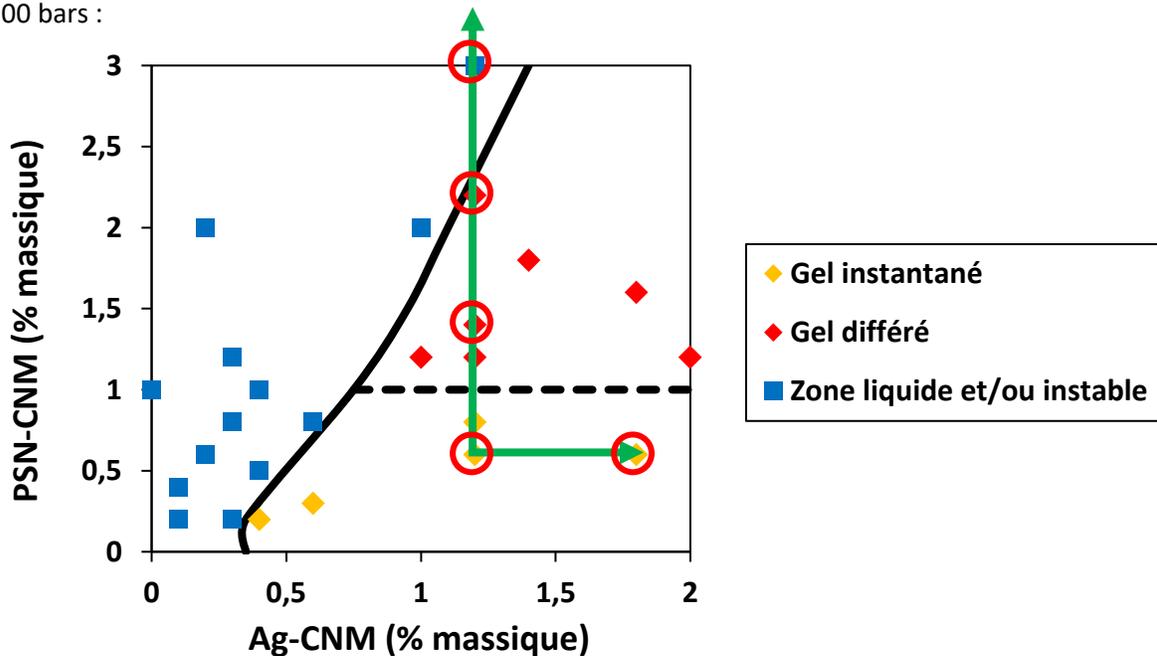


Figure 67: Diagramme d'état des émulsions préparées avec les agrégats fractals, à 100bars, 30% de MG et stockage des émulsions à 20°C.

En se plaçant dans ces conditions de fabrication, nous allons étudier et comparer des émulsions gel instantanées, gel différenciées et des émulsions liquides. Pour cela, nous avons fait varier le ratio PN/Ag afin d'étudier les émulsions suivantes (cercles rouges, Figure 67):

- MG30% ; PSN-CNM 0,6% ; Ag-CNM 1,2% ; 100bars
- MG30% ; PSN-CNM 1,4% ; Ag-CNM 1,2% ; 100bars
- MG30% ; PSN-CNM 2,2% ; Ag-CNM 1,2% ; 100bars
- MG30% ; PSN-CNM 3% ; Ag-CNM 1,2% ; 100bars

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

- MG30% ; PSN-CNM 0,6% ; Ag-CNM 1,8% ; 100bars

6.2.1 Observations macroscopique et microscopique des émulsions

- **Concentration en protéines solubles (PSN+CNM) constante (flèche horizontale)**

La Figure 68 montre le comportement macroscopique des différentes émulsions ainsi que les observations réalisées au microscope confocal à balayage laser. Les observations visuelles ont montré que l'émulsion fabriquée avec 1,8% d'agrégats est légèrement moins texturée que celle en contenant 1,2%. Concernant l'échelle microscopique, le marquage des lipides permet d'affirmer que l'émulsion avec le ratio PSN-CNM 0.6%/Ag-CNM 1.2% présente une structure hétérogène et rugueuse avec des amas de gouttelettes de matière grasse et des poches de sérum. Lorsque la concentration en agrégats augmente jusqu'à 1.8%, le système devient de plus en plus lisse et homogène.

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

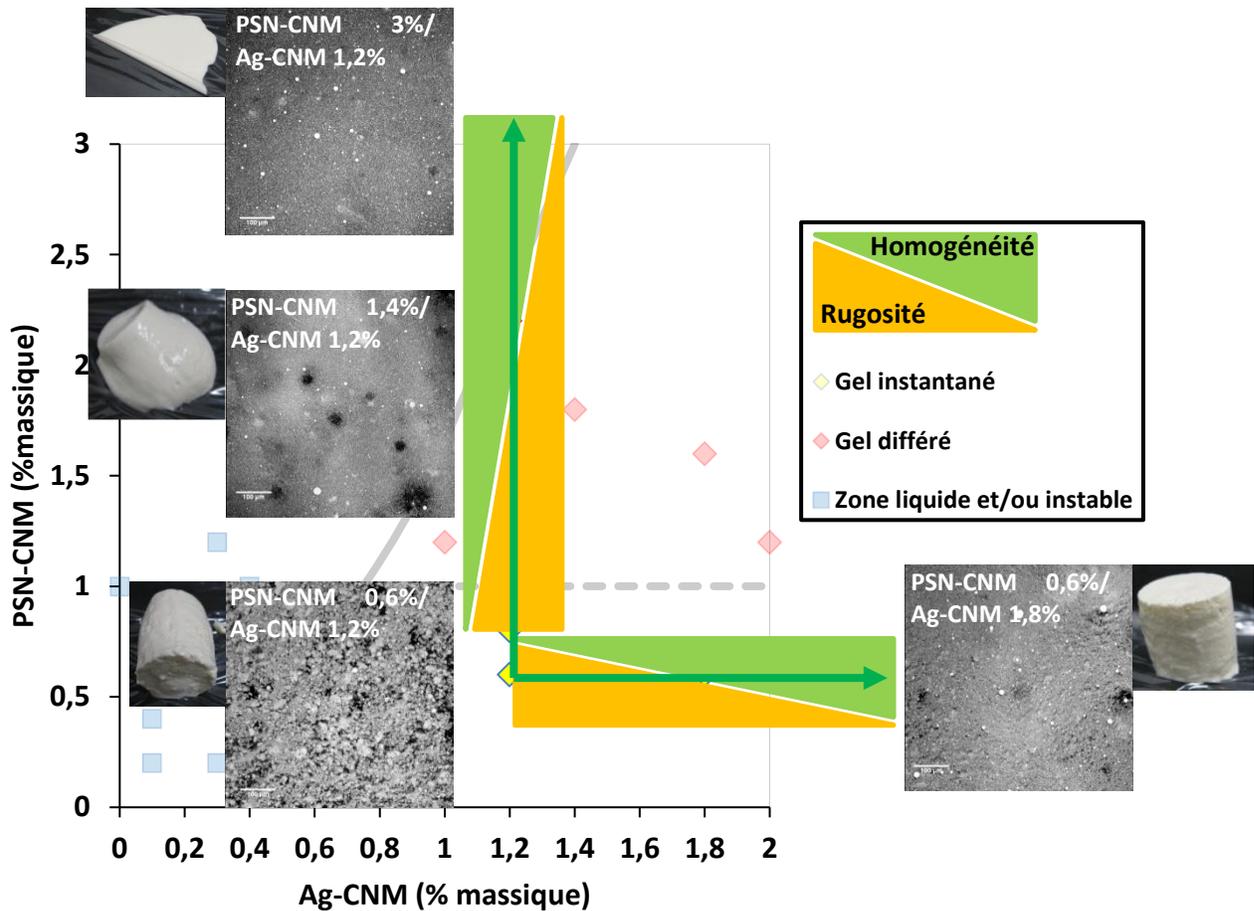


Figure 68: Effet du ratio PSN-CNM/Ag-CNM sur la structure macroscopique et microscopique des émulsions.

Cette différence de structure peut s'expliquer par l'état de floculation des gouttelettes après homogénéisation. En effet, pendant l'homogénéisation, des amas de gouttelettes sont obtenus que ce soit avec 1,2 ou 1,8 % d'agrégats. Cependant, l'émulsion fabriquée avec 1,2% d'agrégats contient des amas de gouttelettes de taille plus importante que ceux formés avec 1,8 p/p% d'agrégats (Figure 69). De ce fait, plus les amas de gouttelettes formés durant l'homogénéisation sont de taille importante, plus les systèmes seront rugueux, hétérogènes et texturés. Tout comme pour les émulsions à 5% de matière grasse, à partir d'une certaine concentration (autour de 1,2%), l'ajout d'agrégats entraîne une diminution de la texture du système à l'échelle macroscopique corrélée à une structure microscopique plus lisse et homogène.

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

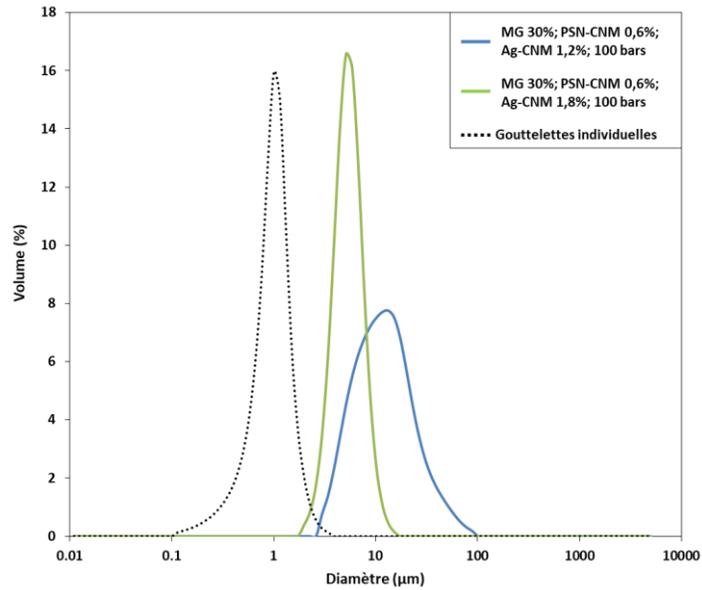


Figure 69: Distribution de taille en sortie d'homogénéisateur des émulsions préparées avec 1,2 et 1,8% d'Ag-CNM et 0,6% de PSN-CNM.

- **Concentration en agrégats (Ag-CNM) constante (flèche verticale)**

A l'échelle macroscopique, une augmentation de la concentration en protéines solubles induit une baisse de la texture des émulsions allant jusqu'à un effondrement du système (Figure 68). A l'échelle microscopique, l'ajout de protéines solubles engendre une diminution de la rugosité et de l'hétérogénéité du système. Les analyses au granulomètre laser montrent que plus la concentration en PN augmente, moins il y a d'amas de gouttelettes en sortie d'homogénéisateur. Par conséquent, les distributions de taille en sortie d'homogénéisation se rapprochent des petites tailles pour atteindre le diamètre des gouttelettes individuelles avec 3% d'agrégats (Figure 70). Ainsi, le système est rugueux, hétérogène et composé de amas de gouttelettes avec 0,6% de PN alors que des gouttelettes individuelles sont observées à 3% d'agrégats induisant l'obtention d'un système liquide avec une structure lisse et homogène.

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

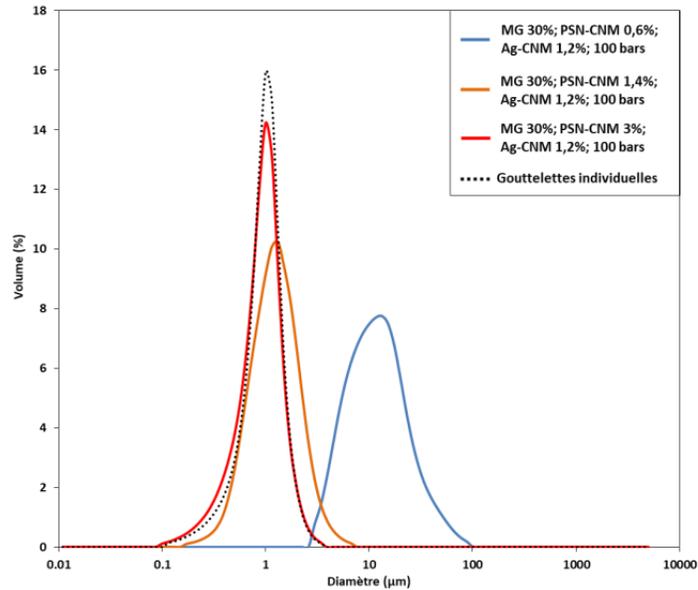


Figure 70: Distribution de taille en sortie d'homogénéisateur des émulsions préparées avec 1,2% d'Ag-CNM et 0,6 ; 1,4 et 3% de PSN-CNM.

Pour conclure, l'augmentation de la concentration en protéines solubles ou, à partir d'un certain seuil (1,2%), en agrégats, engendre la formation d'un système moins texturé macroscopiquement et plus homogène à l'échelle microscopique. Nous avons directement corrélé la structure des émulsions avec l'état de floculation des gouttelettes en sortie d'homogénéisateur. Pour expliquer ce résultat, nous faisons l'hypothèse que la composition interfaciale puisse être responsable de ces différents états de floculation. Afin de valider le lien entre l'interface et la texture des émulsions, nous avons étudié de manière précise la composition ainsi que la structure de l'interface. Pour ce faire, nous avons choisi de fixer la concentration en agrégats à 1,2% et de faire varier uniquement la quantité de PN dans le système afin d'obtenir des émulsions appartenant aux trois zones du diagramme d'état.

6.2.2 Etude de l'interface

L'objectif de cette partie est de déterminer en quoi la composition interfaciale influe sur la floculation et la texture des émulsions. Pour cela, nous allons déterminer quelles sont les protéines adsorbées à l'interface et, par conséquent, quelles sont celles qui se retrouvent dans la phase continue.

6.2.2.1 Concentration interfaciale

Afin de déterminer la concentration interfaciale en protéine, nous nous sommes inspirés du protocole décrit par Patton & Huston (1986). Ce dernier nécessitant des centrifugations successives, les émulsions à caractériser doivent être suffisamment liquides après fabrication afin de pouvoir crémier lors des

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

centrifugations. Par conséquent, il est donc impossible de réaliser ce type d'expérience sur des gels instantanés. Ainsi, nous avons fixé la quantité d'agrégats à 1,2% et nous avons augmenté progressivement la concentration en PSN-CNM en partant d'une émulsion gel différée (Figure 71):

- MG30% ; PSN-CNM 1,4% ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars (émulsion gel différée)
- MG30% ; PSN-CNM 2,2% ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars (émulsion gel différée)
- MG30% ; PSN-CNM 3% ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars (émulsion liquide)

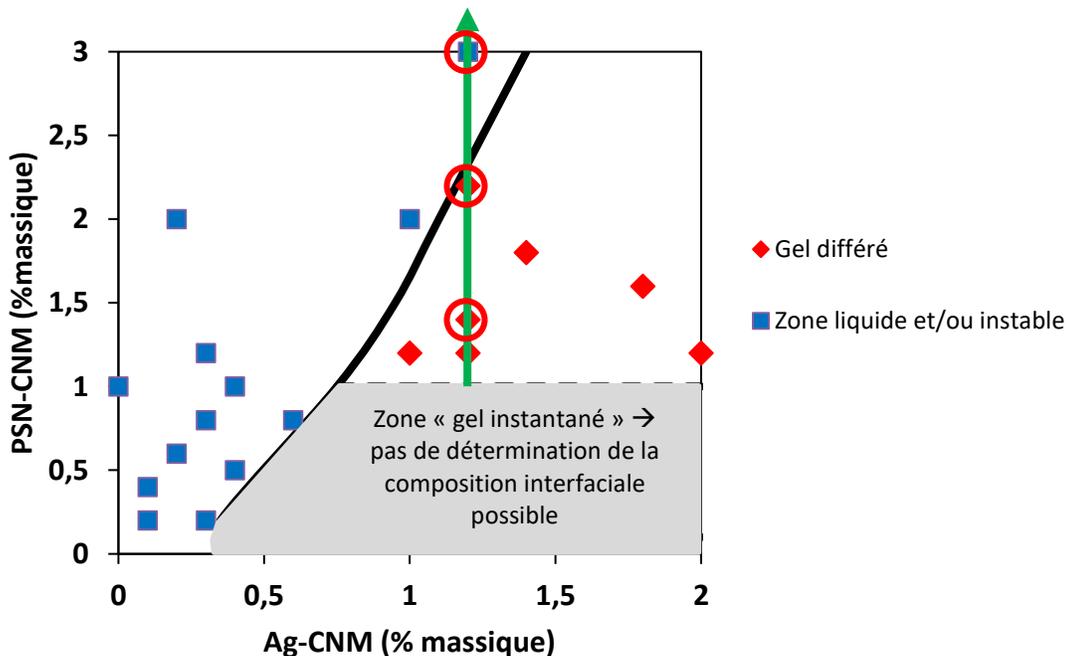


Figure 71: Emulsions sélectionnées pour déterminer la composition interfaciale des gouttelettes en augmentant la quantité de PSN-CNM.

Après centrifugation des émulsions, la phase crème, correspondante aux gouttelettes de matière grasse stabilisées par les protéines laitières, est diluée dans une solution de SDS afin de dessorber les protéines présentes à l'interface des gouttelettes. Après une seconde centrifugation, les protéines anciennement à l'interface se retrouvent dans la phase inférieure alors que les gouttelettes de matière grasse stabilisées par le SDS sont dans la phase surnageante. Ainsi, les éventuels agrégats présents à l'interface vont former un culot plus opaque que les protéines solubles. La Figure 72 montre que l'augmentation de la concentration en protéines solubles induit une diminution de volume de ce culot synonyme d'une baisse de la concentration en agrégats à l'interface. De ce fait, plus la concentration en protéines solubles est importante, moins il y a d'agrégats à l'interface.

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

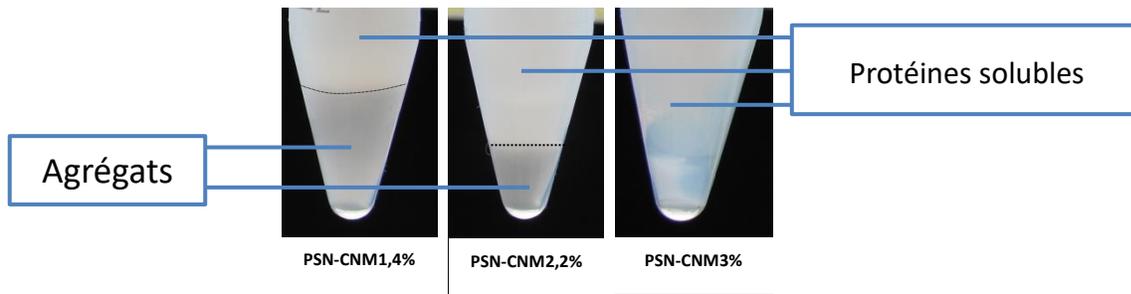


Figure 72: Protéines adsorbées à l'interface des gouttelettes en fonction de la concentration en PSN-CNM.

En parallèle, la Figure 73 montre qu'une augmentation de la concentration en protéines solubles induit une diminution de la concentration interfaciale. Ceci peut s'expliquer par la notion d'épaisseur du film protéique à l'interface. En effet, si les agrégats ne s'étalent pas à l'interface, la quantité de protéines apportée par ces agrégats à l'interface est supérieure à celle apportée par les protéines solubles qui forment un film plus fin. En d'autres termes, le film interfacial sera plus épais lorsqu'il est composé d'agrégats que de protéines solubles. Ainsi, sachant que la quantité d'agrégats à l'interface est supérieure pour les émulsions fabriquées avec 1,4% de PSN-CNM qu'avec 3% (Figure 72), l'épaisseur du film interfacial ainsi que sa concentration vont être plus élevées avec 1,4% de PSN-CNM. De ce fait, les résultats présentés dans la Figure 73 sont en accord avec les observations décrites précédemment (Figure 72).

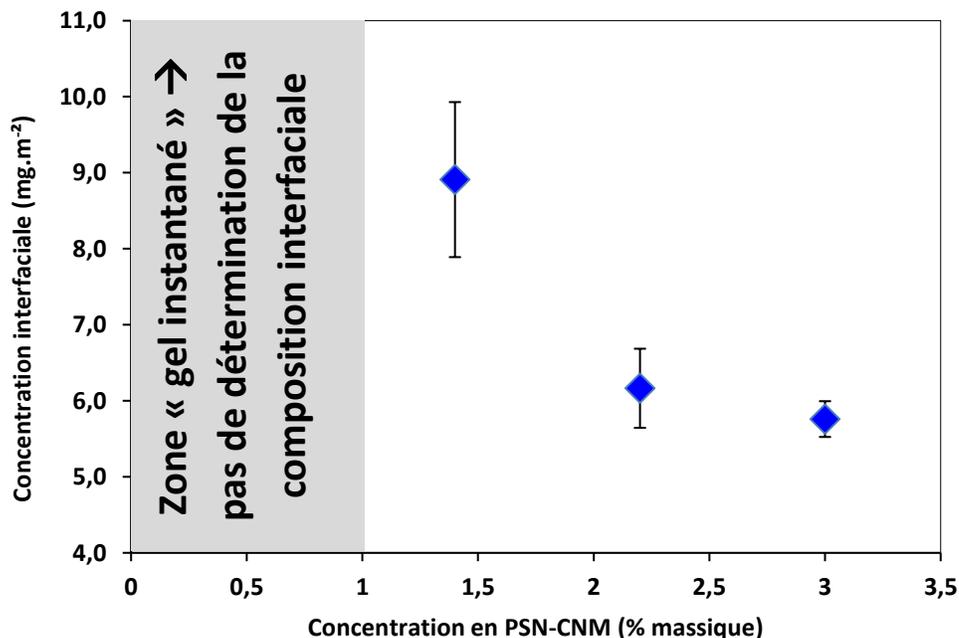


Figure 73: Effet de l'augmentation de la concentration en protéines solubles sur la concentration interfaciale des émulsions contenant 1,2% d'Ag-CNM et 30% de matière grasse.

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

Cependant, cette notion d'épaisseur de film est valable uniquement si les agrégats ne s'étalent pas à l'interface. Pour vérifier les propriétés d'étalement aux interfaces, nous avons réalisé des prélèvements obtenus en déposant les différents ratios sur une balance de Langmuir pour analyser leur topologie par microscopie à force atomique.

6.2.2.2 Propriétés d'étalement sur interface modèle air-eau

Les propriétés d'étalement des agrégats ont été réalisées avec les phases continues correspondant à une émulsion de chaque zone du diagramme d'état:

- MG30% ; **PSN-CNM 0,6%** ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars (émulsion gel instantanée)
 - MG30% ; **PSN-CNM 1,4%** ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars (émulsion gel différée)
 - MG30% ; **PSN-CNM 3%** ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars (émulsion liquide et/ou instable)
- Ces émulsions seront utilisées jusqu'à la fin du chapitre.

La Figure 74 présente l'évolution de la pression en fonction de la concentration en protéines à l'interface. Ainsi, nous constatons que les isothermes de compressions observées pour une même quantité de protéines déposée présentent des caractéristiques différentes. En effet, avec les agrégats fractals, la pression atteint 15 mN pour une concentration à l'interface de 3,2 mg.m⁻² contre 1,2 mg.m⁻² avec les protéines solubles. Ainsi, à pression constante, la concentration en protéines à l'interface est supérieure pour les agrégats que pour les protéines solubles (Figure 74).

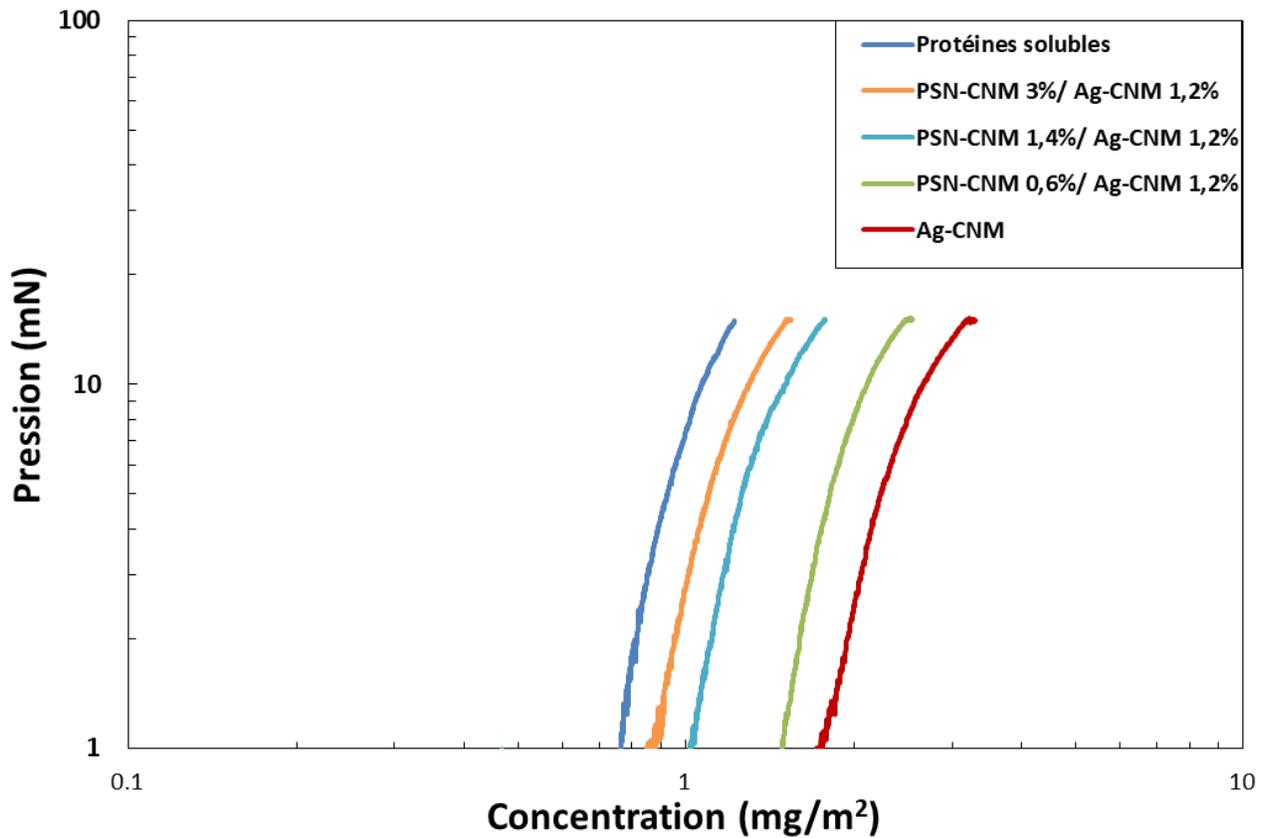


Figure 74: Isothermes de compression des protéines solubles (PSN-CNM), des agrégats (Ag-CNM) et des ratios PSN-CNM 0.6%/ Ag-CNM 1.2%; PSN-CNM 1.4%/ Ag-CNM 1.2% et PSN-CNM 3%/ Ag-CNM 1.2% obtenues sur interface modèles air-eau.

Concernant les différents ratios, les isothermes de compression sont intermédiaires entre celle correspondant aux agrégats et celle correspondant aux protéines solubles. L'allure des isothermes dépend du ratio PSN-CNM/Ag-CNM. Ainsi, plus ce ratio est faible (plus la concentration en agrégats est importante), plus les concentrations interfaciales pour atteindre 15 mN seront élevées. Ces résultats amènent donc à penser que les agrégats conservent leur structure, ou du moins une partie, lorsqu'ils sont adsorbés à l'interface air-eau. En effet, si les agrégats s'étaient totalement à l'interface, leur isotherme de compression serait identique à celle des protéines solubles. Afin de compléter ces résultats, nous avons observé les films interfaciaux par microscopie à force atomique.

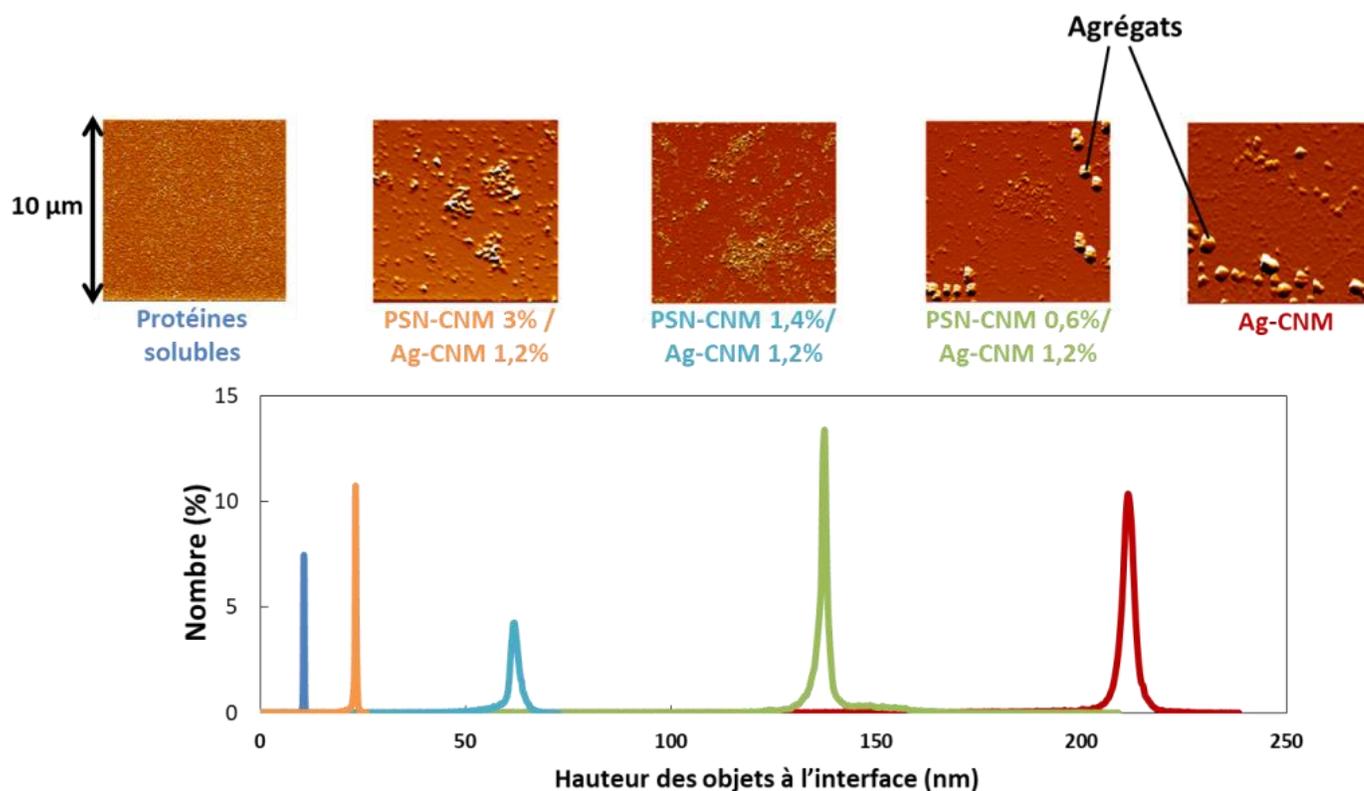


Figure 75: Observation des films interfaciaux et distribution des hauteurs des objets à l'interface air-eau.

Le film concernant les protéines solubles semble lisse, continu, homogène et composé de nano objets. A l'inverse, l'interface composée d'agrégats contient des objets de taille largement supérieure, augmentant la rugosité du film et la hauteur des objets à l'interface. Ainsi, la hauteur moyenne des objets est de 210 nm concernant les agrégats contre 10 nm pour les protéines solubles (Figure 75). Des objets de grande taille sont également présents pour le ratio PSN-CNM 0,6/ Ag-CNM 1,2. En revanche, les ratios PSN-CNM 1,4/ Ag-CNM 1,2 et PSN-CNM 3/ Ag-CNM 1,2 forment un film moins rugueux avec une hauteur des objets à l'interface inférieure à 70nm. Ceci est la conséquence de l'absence d'agrégat de grande taille à l'interface air-eau au profit d'objets de taille inférieure (Figure 75). Ces expériences montrent que les agrégats fractals conservent une certaine structure à l'interface air-eau.

En couplant les résultats concernant la structure des agrégats et leurs propriétés d'étalement sur l'interface modèle air-eau, nous pouvons expliquer les différences observées au niveau des isothermes de compression (Figure 74). En effet, nous avons déposé la même quantité de protéines mais les agrégats étant de gros objets, leur concentration en nombre sur la surface du film va être inférieure à celle des protéines solubles. Par conséquent, à l'interface, les protéines solubles entrent plus rapidement

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

en contact les unes avec les autres que les agrégats du fait de leur plus grande concentration en nombre. De ce fait, la pression cible (15 mN) est atteinte plus rapidement avec les protéines solubles qu'avec les agrégats.

De plus, nous avons vu que les agrégats ne s'étalent pas ou peu à l'interface et forment un film interfacial relativement épais contrairement aux protéines solubles qui forment une interface plutôt fine. Ainsi, l'épaisseur du film étant plus importante avec les agrégats, la concentration interfaciale rapportée à la surface est supérieure pour les agrégats que pour les protéines solubles.

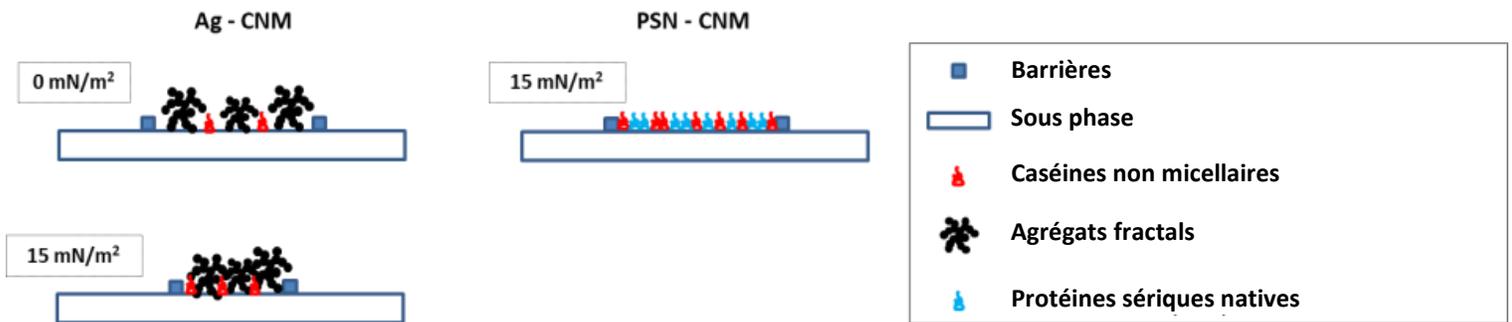
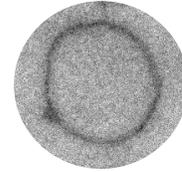
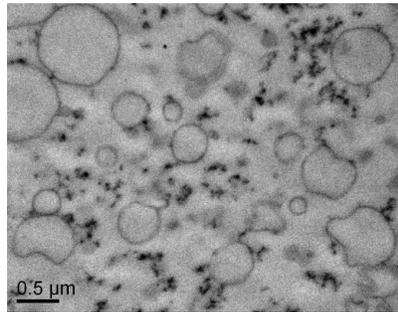


Figure 76: Schéma explicatif concernant la différence entre les isothermes de compression des agrégats fractals et des protéines solubles.

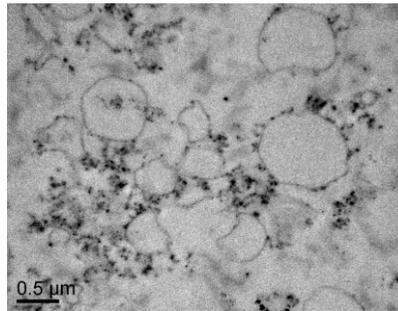
Afin d'extrapoler ces propriétés d'étalement à l'interface huile-eau, des observations *in situ* (dans les émulsions) en microscopie électronique à transmission ont été réalisées (Figure 77).

6.2.2.3 Propriétés d'étalement sur interface huile-eau in situ

PSN-CNM 3%/Ag-CNM 1,2%



PSN-CNM 1,4%/Ag-CNM 1,2%



PSN-CNM 0,6%/Ag-CNM 1,2%

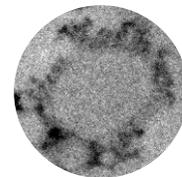
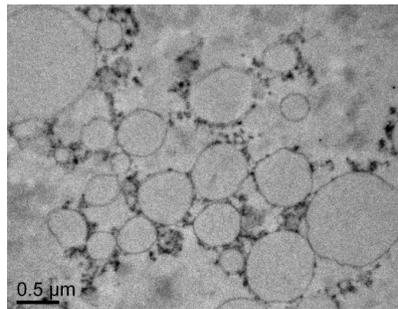


Figure 77: Observations microscopiques des émulsions composées de 0,6; 1,4 et 3% de protéines solubles ; 1,2% d'Ag-PSN et 30% de matière grasse. Pression d'homogénéisation: 100 bars.

Les observations microscopiques montrent que l'interface des gouttelettes de matière grasse avec le ratio PSN-CNM 0,6%/Ag-CNM 1,2% est composée en partie d'agrégats fractals. En effet, la surface des gouttelettes correspond à un film hétérogène comprenant à la fois des agrégats fractals et quelques protéines solubles. A l'interface, les agrégats conservent leur structure provoquant la formation d'un film interfacial épais (Figure 77). Les protéines solubles adsorbées à l'interface sont, quant à elle, identifiables par la formation d'un film lisse et fin. La présence des agrégats à l'interface entraîne la connexion des gouttelettes de matière grasse entre elles. Les agrégats vont jouer le rôle de colle pour former un réseau hétérogène composé de gouttelettes connectées les unes aux autres. A l'inverse, les émulsions contenant 3% de protéines solubles présentent une interface huile-eau très fine composée essentiellement de protéines solubles (Figure 77). Par conséquent, les agrégats fractals se retrouvent

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

dans la phase continue et très peu de connexions entre gouttelettes de MG sont observées. Le ratio intermédiaire montre la présence de quelques agrégats à l'interface pouvant, dans certains cas, provoquer la connexion des gouttelettes même si le réseau reste peu développé par rapport aux émulsions gel instantanées (PSN-CNM 0,6%/ Ag-CNM 1,2%).

En couplant les résultats d'AFM et de microscopie *in situ*, nous pouvons faire l'hypothèse que les agrégats jouent un rôle de **point d'ancrage** pour la connexion des gouttelettes de matière grasse.

6.2.3 Composition interfaciale

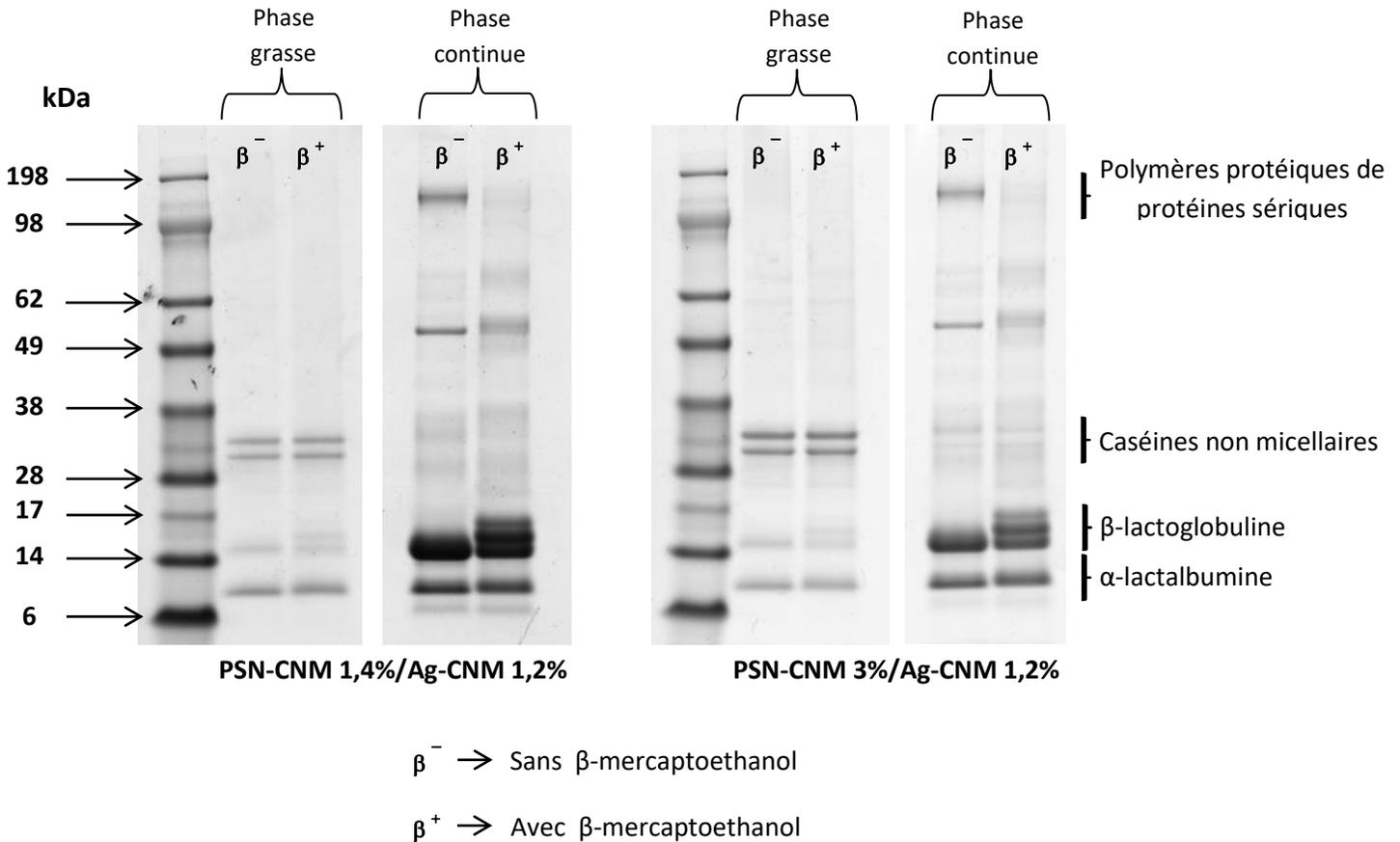


Figure 78: Les protéines laitières à l'interface (phase grasse) et dans la phase continue concernant les émulsions PSN-CNM 1,4%/ Ag-CNM 1,2% et PSN-CNM 3%/ Ag-CNM 1,2%.

La Figure 78 présente la composition des protéines adsorbées à l'interface (phase grasse) et celles présentes dans la phase continue. Afin de caractériser la présence ou non d'agrégats protéiques, chaque phase a été analysée en condition non réductrice (sans β -mercaptoethanol : β^-) et réductrice (avec β -mercaptoethanol : β^+) pour dissocier les éventuels agrégats. Lors de la fabrication des émulsions, les

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

protéines sériques natives, les agrégats et les caséines non micellaires sont en compétition pour l'interface huile-eau. Cependant, étant en large excès de protéines, une partie ne sera pas adsorbée à l'interface et va se retrouver dans la phase continue. Les protéines présentes à l'interface sont en majorité des caséines non micellaires même si des bandes correspondant aux protéines sériques sont tout de même visibles (Figure 78). En effet, les CNM sont détectées dans la phase grasse alors que très peu le sont dans la phase continue indiquant que la quasi-totalité d'entre elles est adsorbée à l'interface. A l'inverse, les protéines sériques sont essentiellement situées dans la phase continue. Les CNM vont s'adsorber plus rapidement à l'interface que les protéines sériques, qu'elles soient agrégées ou non. Par conséquent, seule une partie des agrégats et des protéines sériques natives seront présentes à l'interface alors que la majorité se retrouve dans la phase continue. Ainsi, des polymères protéiques d'une masse molaire de 200kDa sont visibles dans la phase continue. En effet, en présence du β -mercaptoethanol, cette bande disparaît pour laisser apparaître des protéines de plus petites tailles (Figure 78).

En résumé, lorsque la concentration en protéines solubles dans l'émulsion augmente, les caséines non micellaires vont préférentiellement s'adsorber à l'interface au détriment des protéines sériques natives et des agrégats. La Figure 79 correspond uniquement aux protéines adsorbées à l'interface pour une émulsion gel différée (MG30% ; PSN-CNM 1,4% ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars) et une émulsion liquide (MG30% ; PSN-CNM 3% ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars). Ainsi, nous constatons que l'intensité des bandes correspondant aux CNM augmente lorsque la concentration en protéines soluble croît. Ce résultat confirme la forte affinité des caséines non micellaires pour l'interface par rapport aux protéines sériques natives et agrégées. De ce fait, lorsque l'on augmente la concentration en protéines solubles, ce sont les CNM présentes dans la poudre de protéines sériques (environ 21%) qui se placent prioritairement à l'interface et contrôlent la taille des gouttelettes. Il est donc essentiel de contrôler cette compétition pour maîtriser la distance inter-gouttelettes et la connexion des gouttelettes par les agrégats.

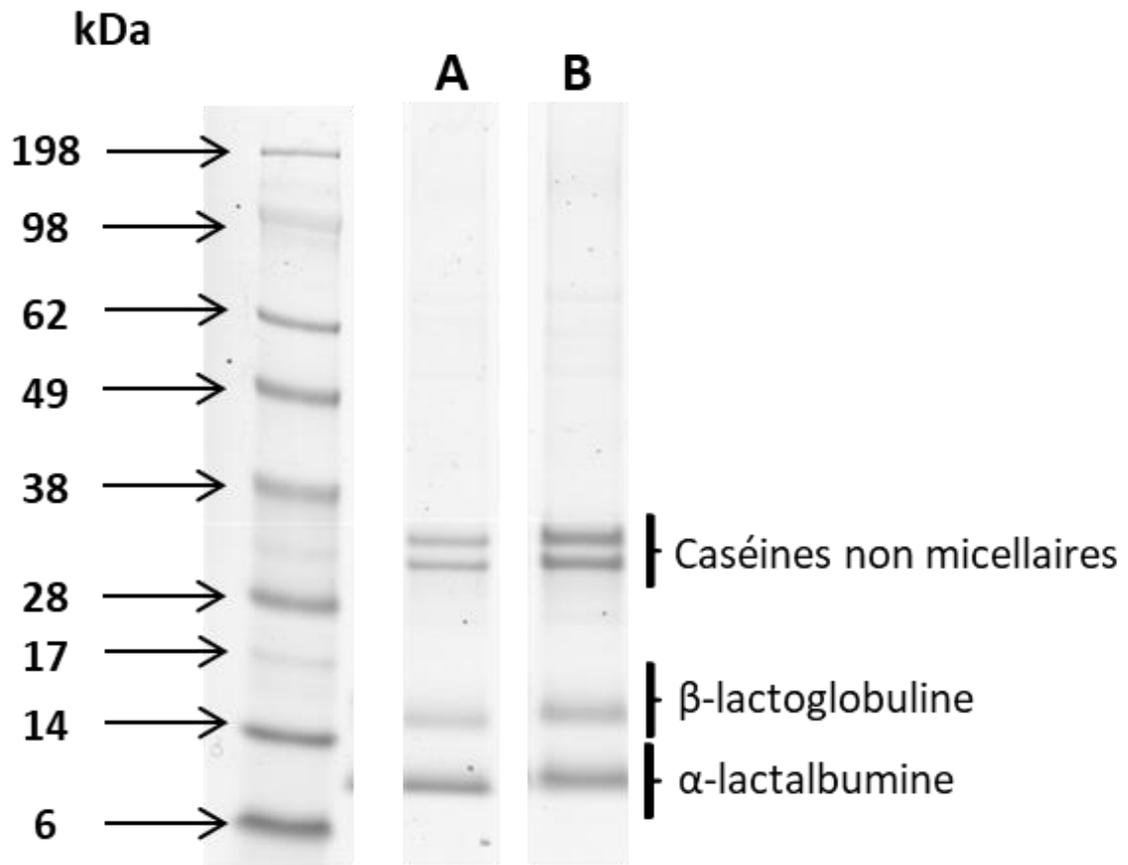


Figure 79: Effet de l'augmentation de la concentration en protéines solubles sur la composition interfaciale : A \rightarrow PSN-CNM 1,4% / Ag-CNM 1,2% (émulsion gel différée); B \rightarrow PSN-CNM 3% / Ag-CNM 1,2% (émulsion liquide).

6.3 Conclusion

Nous avons démontré qu'augmenter la concentration en protéines solubles dans l'émulsion induisait une augmentation de la quantité de caséines non micellaires adsorbées à l'interface au détriment des protéines sériques natives et agrégées. Ainsi, la diminution de la quantité d'agrégats adsorbés à l'interface réduit la concentration interfaciale en protéines et par conséquent, l'épaisseur du film interfacial. De ce fait, une augmentation de la quantité de PSN-CNM engendre la formation d'un gel de moins en moins structuré suite à la diminution de la concentration en agrégats à l'interface. En couplant ces résultats avec des travaux antérieurs, nous pouvons classer les caséines non micellaires, les protéines sériques natives et les agrégats par ordre croissant d'affinité pour l'interface (Figure 80):



Figure 80: Classement des caséines non micellaires, des protéines sériques natives et des agrégats par ordre croissant d'affinité pour l'interface.

En effet, Kiokias et al (2006) ont montré que les protéines sériques natives sont de meilleurs émulsifiants que les agrégats. Ainsi, les caséines non micellaires vont donc s'adsorber à l'interface avant les protéines sériques natives qui vont elles-mêmes se positionner plus rapidement à l'interface que les agrégats.

Augmenter la concentration en agrégats engendre également une augmentation de la concentration en caséines non micellaires car elles sont présentes dans la poudre de protéines sériques ayant servi à la préparation des agrégats (partie 3.1). C'est la raison pour laquelle, et de façon inattendue, à partir d'un certain seuil, augmenter la concentration en agrégats (Ag-CNM) diminue la texture des émulsions du fait de l'adsorption des caséines non micellaires à l'interface au détriment des agrégats.

Les analyses en AFM et en microscopie électronique ont permis de considérer l'agrégat comme un point d'ancrage pour connecter des gouttelettes de matière grasse. De ce fait, la taille des agrégats ainsi que leur nombre sont des paramètres importants pour la texture des émulsions. En effet, la taille des agrégats module la distance de connexion des gouttelettes alors que le nombre d'agrégats permet de contrôler la quantité de liaisons inter-gouttelettes susceptibles de se former. Cependant, il serait

Chapitre 6 : Contrôler la texture des émulsions en modulant la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse

intéressant d'identifier la nature des interactions impliquées dans ces connexions inter-gouttes et les entités protéiques concernées par ces interactions. C'est l'objet du chapitre suivant de cette thèse.

**Chapitre 7 : Les Interactions
moléculaires et les protéines impliquées
dans la formation du réseau protéines-
lipides**

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

Nous avons conclu dans le chapitre 6, que les différences entre les émulsions gels instantanées et différées étaient dues à des variations au niveau de la composition interfaciale et plus particulièrement de la concentration en agrégats à l'interface. En effet, les agrégats jouent un rôle de point d'ancrage pour la texturation des émulsions. Des interactions moléculaires entre les protéines vont donc se former pour donner naissance à un réseau protéines-lipides et ainsi texturer l'émulsion. Cependant, la nature de ces interactions reste inconnue.

L'objectif de ce chapitre est donc de comprendre quelles sont les interactions moléculaires qui régissent la texture des émulsions. Dans un premier temps, nous avons étudié les interactions qui se mettent en place durant l'étape d'homogénéisation et qui sont responsables de la floculation des émulsions. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux interactions moléculaires intervenant durant le stockage à différentes températures. Pour cela, l'état de floculation ainsi que les propriétés rhéologiques ont été suivis sur plusieurs émulsions, au cours des différentes étapes du procédé de fabrication et à plusieurs températures.

Après avoir identifié les interactions moléculaires responsables de la texturation des émulsions, nous avons identifié les protéines impliquées dans la formation de ces interactions. En effet, nous avons constaté (chapitre 6) que l'interface des gouttelettes de matière grasse peut être composée de trois types d'entités protéiques: les caséines non micellaires, les agrégats et les protéines sériques natives. Cependant, les protéines sériques natives, lorsqu'elles sont adsorbées à l'interface, se dénaturent partiellement (Audebrand, Ropers, & Riaublanc, 2013; Fang & Dalgleish, 1997) pour exposer leurs résidus hydrophobes ainsi que leur groupement thiol vers la phase aqueuse ce qui leur donne la capacité d'interagir avec les agrégats via différentes interactions (De Wit & Swinkels, 1980; Demetriades et al., 1997a; Millqvist-Fureby, Elofsson, & Bergenståhl, 2001; Paulsson & Dejmek, 1990). Nous les appellerons donc les protéines sériques partiellement dénaturées (PSPD). Afin de déterminer le rôle des différentes entités protéiques dans la formation du réseau, nous avons fabriqué des émulsions stabilisées par trois types d'interfaces :

- Une interface composée uniquement de protéines sériques partiellement dénaturées (PSPD).
- Une interface contenant un mélange de protéines sériques partiellement dénaturées et de caséines non micellaires,
- Une interface composée de protéines sériques partiellement dénaturées, de caséines non micellaires et d'agrégats.

Concernant les deux premières émulsions, les agrégats ont été ajoutés après l'étape d'homogénéisation afin d'étudier leur capacité d'interaction avec les PSPD et/ou les caséines non micellaires adsorbées à

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

l'interface. Par conséquent, en maîtrisant la nature des interactions formées et la composition en protéines interfaciales, nous pourrions moduler la structure du réseau protéines-lipides ainsi que la texture des émulsions.

7.1 Les interactions moléculaires inter-gouttelettes

7.1.1 Interactions générées pendant l'homogénéisation

L'objectif de cette partie est de déterminer quels sont les mécanismes responsables de la floculation des gouttelettes de matière grasse pendant l'étape d'homogénéisation. D'après la bibliographie, nous savons que durant cette étape, un agrégat protéique est capable de s'adsorber sur les interfaces de deux gouttelettes, afin de couvrir un maximum de surface, ce qui conduit à leur connexion et provoque de la floculation (Dickinson, 2010; Surel et al., 2014). Cependant, afin de vérifier si des ponts disulfures pourraient être impliqués dans les mécanismes de floculation, un agent bloquant la formation des ponts disulfures a été ajouté aux émulsions. L'objectif étant d'empêcher la formation de nouveaux ponts disulfures autres que ceux présents dans les agrégats. Nous avons réalisé ces expériences sur une émulsion gel instantanée et une émulsion gel différée (Figure 81 – cercles rouges) :

- MG30% ; PSN-CNM 0,6% ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars (émulsion gel instantanée)
- MG30% ; PSN-CNM 1,4% ; Ag-CNM 1,2% ; 100 bars (émulsion gel différée)

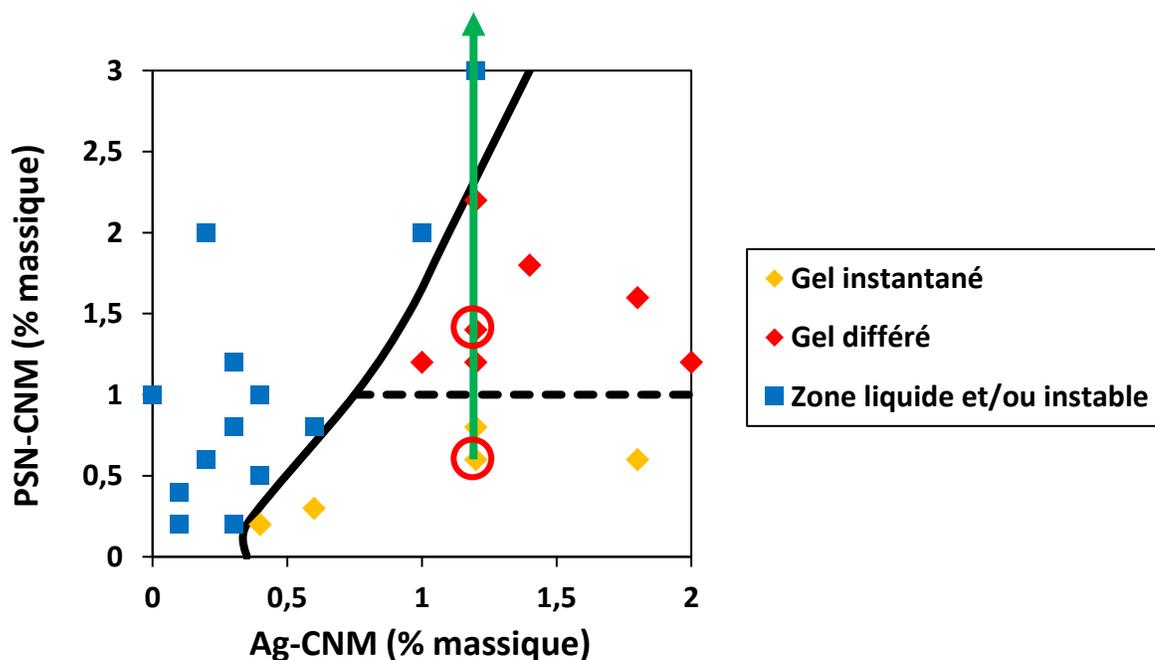


Figure 81: Emulsions sélectionnées pour l'étude des interactions moléculaires pendant l'homogénéisation.

7.1.2 Emulsions gels instantanées

La Figure 82 présente l'influence de la concentration en agent bloquant (N-éthylmaléimide - NEM) sur le niveau de floculation des gouttelettes en sortie d'homogénéisateur. L'ajout de NEM, en empêchant la formation des ponts disulfures, provoque une diminution de la taille des amas de gouttelettes de matière grasse. Ce résultat amène à penser que des ponts disulfures sont impliqués dans la connexion des gouttelettes de matière grasse au cours de l'homogénéisation. Cependant, des amas de gouttelettes sont observés malgré une concentration élevée en NEM. Ainsi, en présence de 30mM de NEM, les gouttelettes forment des amas autour de 1,5 μ m contre 10 μ m en absence de NEM (Figure 82). L'ajout de forte concentration en NEM ne permet donc pas de retrouver des gouttelettes individuelles. Par conséquent, des interactions autres que les ponts disulfures sont impliquées dans la floculation initiale des gouttelettes. De ce fait, la floculation observée au cours de l'homogénéisation lors de la fabrication des émulsions gel instantanées serait due à la fois au partage d'un agrégat entre deux gouttelettes (Dickinson, 2010; Surel et al., 2014) et à la formation de nouveaux ponts disulfures entre les protéines à l'interface.

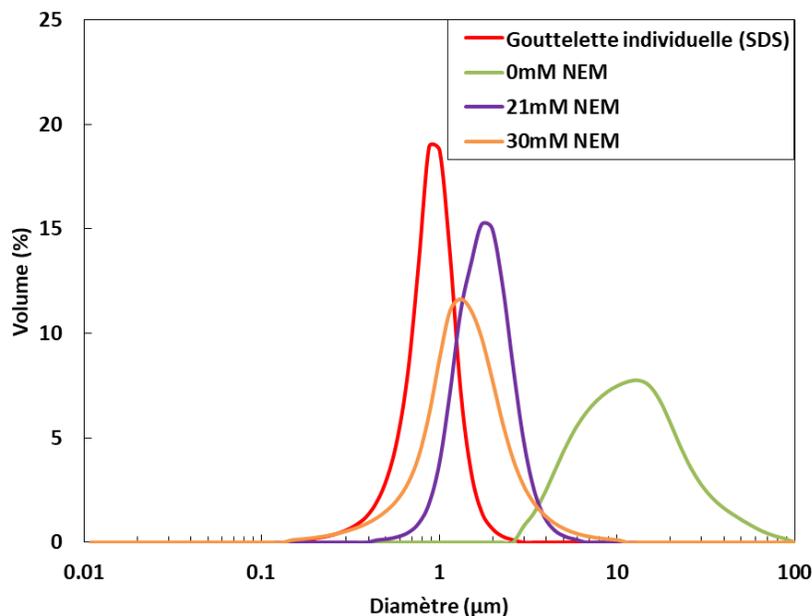


Figure 82: Influence de la concentration en NEM sur les distributions de taille des émulsions gel instantanées en sortie d'homogénéisateur.

Les caractérisations rhéologiques montrent que les émulsions contenant 21 et 30mM de NEM ont des valeurs de module conservatif G' à 1 rad.s⁻¹ proche de 17 Pa en sortie d'homogénéisateur contre 97 Pa sans agent bloquant (Figure 83). Ces données sont en accord avec les résultats précédents et confirment

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

la formation de ponts disulfure dès l'étape d'homogénéisation. Lors du stockage à 60°C, la texture des émulsions avec 21mM de NEM augmentent jusqu'à 85Pa en 1h contre 335 Pa sans agent bloquant. Quant aux émulsions réalisées avec 30mM de NEM, leur texture augmente seulement jusqu'à 66Pa. Malgré la présence de NEM, les émulsions se texturent au cours du stockage à 60°C ce qui indique que des liaisons autres que des ponts disulfures se forment et sont responsables de la texturation des émulsions (à 60°C).

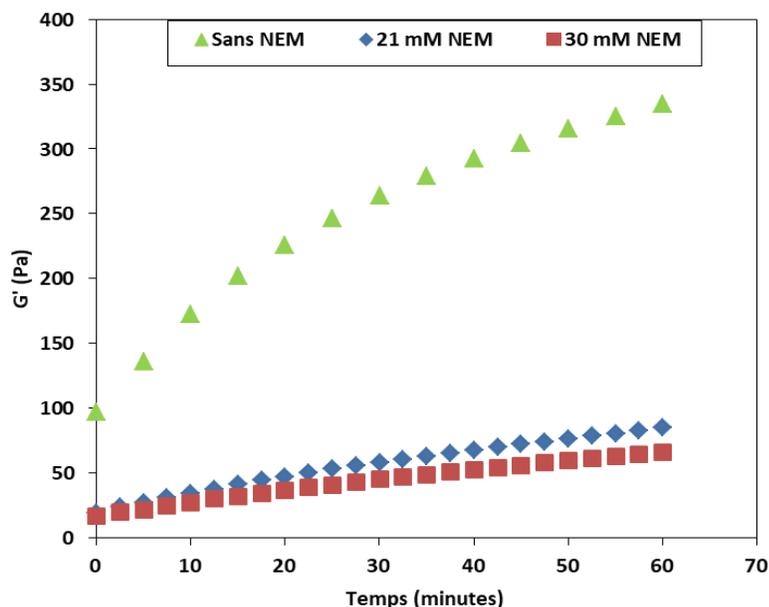


Figure 83: Effet de la concentration en NEM sur la texture des émulsions gel instantanées lors d'un stockage à 60°C.

Afin de valider le rôle des ponts disulfures dans la floculation des gouttelettes lors de l'homogénéisation, nous avons produit des émulsions gel différées en présence de NEM.

7.1.3 Emulsions gel différées

La Figure 84 montre les distributions de taille des gouttelettes de matière grasse en sortie d'homogénéisateur. En absence d'agent bloquant la formation des ponts disulfures, les gouttelettes floculent et forment de petits amas d'une taille moyenne de 1,3 μm . En revanche, dès l'ajout de 4mM de NEM, la plupart des liaisons inter-gouttelettes sont rompues conduisant à la réduction du diamètre des amas dont la distribution de taille se rapproche de celle des gouttelettes individuelles. Lorsque la quantité d'agent bloquant atteint 30mM, les gouttelettes de matière grasse ne sont plus connectées et nous observons uniquement des gouttelettes individuelles d'un diamètre de 0,9 μm (Figure 84). Ces résultats permettent de confirmer que, durant l'homogénéisation, les gouttelettes peuvent être

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

connectées par des ponts disulfures formées entre les protéines à l'interface. En revanche, dans ces conditions, aucun agrégat n'est partagé entre deux gouttelettes. En effet, la concentration en protéines solubles est largement supérieure à la concentration limitante, de ce fait, la quantité d'agrégats à l'interface est plus faible que dans les conditions d'une émulsion gel instantanée. Par conséquent, la probabilité de partage d'un agrégat entre deux gouttelettes est faible et les émulsions vont se texturer au cours du stockage via des interactions entre les protéines.

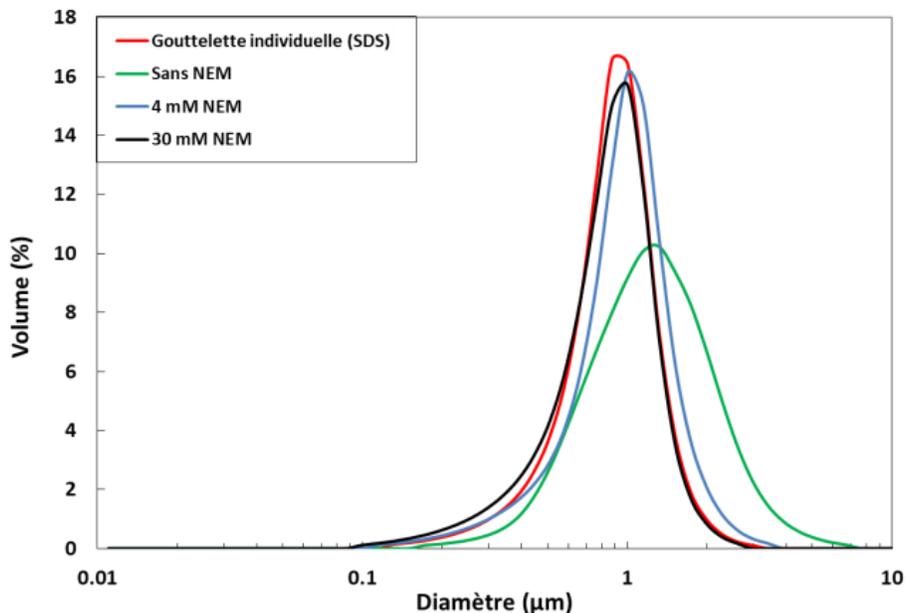


Figure 84: Influence de la concentration en NEM sur les distributions de taille des émulsions gel différées en sortie d'homogénéisateur.

Les mesures rhéologiques sur les émulsions ne contenant pas d'agent bloquant présentent des valeurs de module conservatif (G'), en sortie d'homogénéisateur, de 18 Pa contre 3,5 Pa en présence de 4 mM de NEM et 0,1 Pa avec 30 mM de NEM (Figure 85). Ces valeurs confortent l'idée que la formation de nouveaux ponts disulfures contribue à la floculation des gouttelettes au cours de l'homogénéisation. Lors du stockage à 60°C, les émulsions sans NEM voient leur texture augmenter de 18 à 70 Pa en 1h alors que les G' de celles contenant 4 mM de NEM n'augmentent que de 3,5 à 5 Pa. Les émulsions réalisées avec 30mM de NEM n'évoluent pas et les valeurs de module conservatif stagnent à 0,1 Pa. Les observations à l'échelle macroscopique sont en concordance avec les caractérisations rhéologiques : les émulsions sans agent bloquant sont les plus texturées. Cependant, malgré la présence de NEM, toutes les émulsions se texturent progressivement au stockage sur des temps plus ou moins longs (Figure 85 – échelle macroscopique). Ceci permet d'affirmer que d'autres types d'interactions que les ponts disulfures interviennent dans la texturation des émulsions au cours du stockage.

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

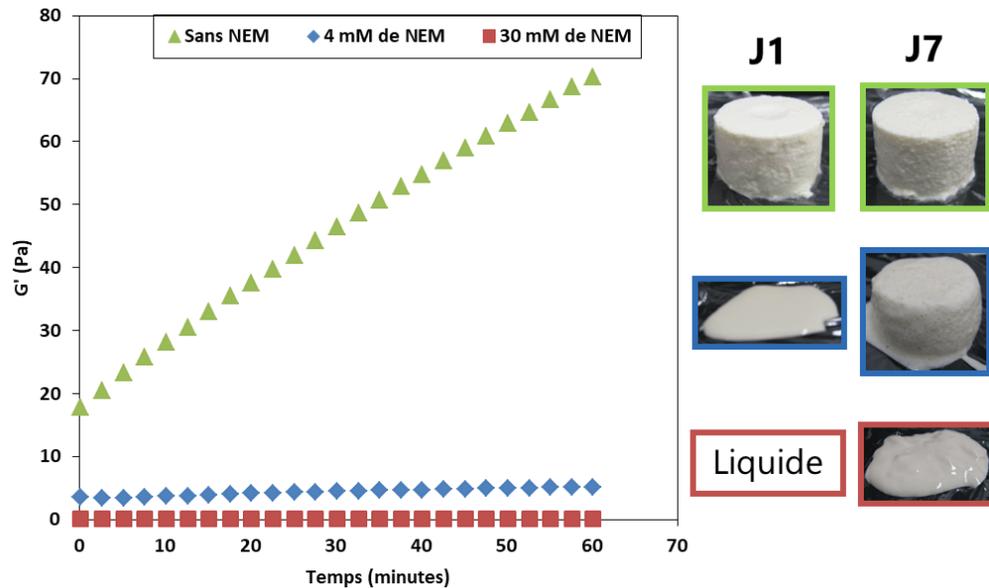


Figure 85: Effet de la concentration en NEM sur la texture des émulsions gel différées à l'échelle micro et macroscopique lors d'un stockage à 60°C.

Que ce soit pour les émulsions gels instantanées ou gel différées, le diamètre des gouttelettes individuelles est identique et proche de 0,9 μm . Ainsi, au cours de l'homogénéisation, la différence entre les deux émulsions concerne principalement sur la composition interfaciale. En effet, les résultats du chapitre précédent ont montré que les protéines solubles et plus particulièrement les caséines non micellaires avaient davantage d'affinité pour l'interface que les agrégats. De ce fait, plus la concentration en protéines solubles est importante, moins il y aura d'agrégats présents à l'interface et plus les probabilités de partage entre deux interfaces seront faibles. Par conséquent, seules les émulsions gels instantanées possèdent assez d'agrégats à l'interface pour que certains d'entre eux soient adsorbés à l'interface de deux gouttelettes adjacentes.

Ces résultats mettent en évidence deux mécanismes de connexion des gouttelettes de matière grasse au cours de l'homogénéisation :

- Partage d'un agrégat entre les interfaces de deux gouttelettes adjacentes. Ce mécanisme est observé uniquement si la quantité d'agrégats présents à l'interface est suffisamment importante.
- Formation de ponts disulfures entre les protéines adsorbées aux interfaces de différentes gouttelettes.

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

Malgré la présence d'agent bloquant la formation de ponts disulfures, nous avons constaté que la texture des émulsions évoluait au cours du stockage à 60°C. Par conséquent, des interactions autres que des ponts disulfures sont également responsables de la formation du réseau protéines-lipides. La partie suivante a donc pour objectif d'approfondir la nature des interactions responsables de la texturation des émulsions durant le stockage à différentes températures.

7.2 Interactions développées pendant le stockage

L'objectif de cette partie est de déterminer quelles sont les interactions moléculaires responsables de la texturation des émulsions durant le stockage. Pour ce faire, nous avons travaillé avec les émulsions suivantes :

- MG 30% ; PSN-CNM 0,6% ; Ag-CNM 1.2% ; 100 bars (émulsion gel instantanée): Cette émulsion a permis de suivre l'évolution de la texture du système en fonction de la température de stockage. Ainsi, après fabrication, l'émulsion est directement placée entre les deux plans du rhéomètre afin de réaliser différentes cinétiques de température ayant pour objectif de simuler un stockage à 60°C et à 4°C. Les modules conservatifs sont mesurés afin de visualiser leurs évolutions au cours du temps pendant les variations de température (Figure 86).

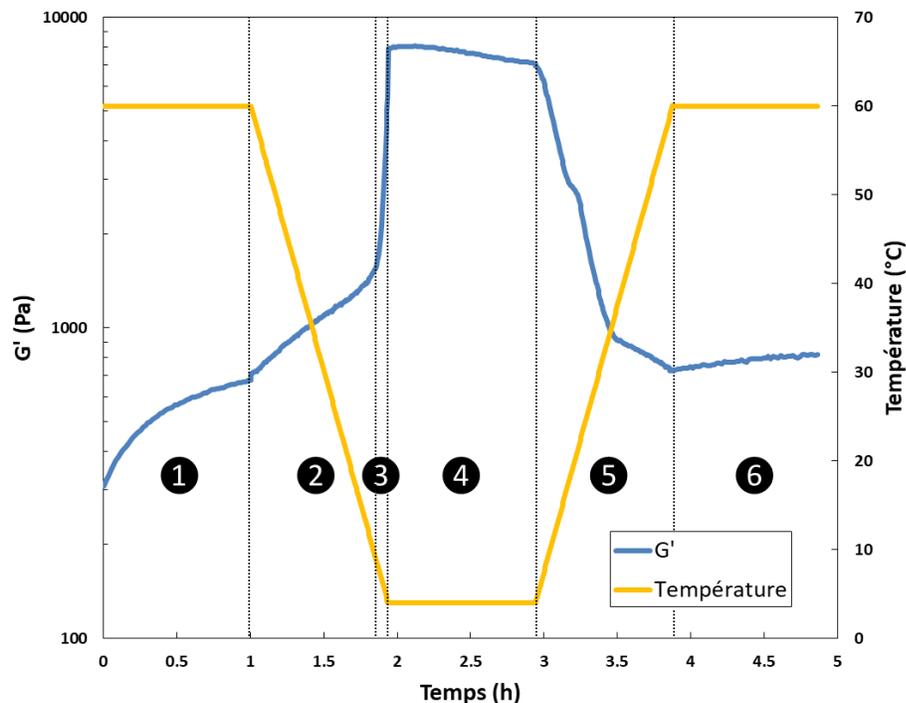


Figure 86: Evolution de la texture d'une émulsion gel instantanée lors des variations de température au cours du temps.

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

Les modules conservatifs (G') varient en fonction de la température de stockage. Ainsi, lors du premier palier à 60°C, l'émulsion se texture progressivement avec des valeurs de G' passant de 309 à 669 Pa (❶). Lors du refroidissement, le module conservatif augmente jusqu'à 1426 Pa entre 60 et 10°C (❷) avant de subir une augmentation très importante entre 10 et 4°C pour atteindre 8000 Pa (❸). En revanche, durant le palier d'une heure à 4°C, la texture de l'émulsion décroît faiblement de 8000 à 7100 Pa (❹). Durant la phase de chauffage entre 4 et 60°C, le module conservatif diminue (❺) avant d'augmenter de nouveau lors de l'isotherme à 60°C (❻). La suite de l'étude est consacrée aux interactions moléculaires responsables de ces différentes variations de texture.

Afin de caractériser les éventuels effets de la formation de nouveaux ponts disulfures au cours du stockage, il est essentiel de sélectionner des émulsions dont les ponts disulfures n'interviennent pas durant l'homogénéisation. En effet, l'état de floculation et la texture des émulsions en sortie d'homogénéisateur doivent être indépendants de la concentration en agent bloquant la formation des ponts disulfures (NEM). En d'autres termes, les émulsions en sortie d'homogénéisateur doivent être identiques quelle que soit la concentration en NEM utilisée. De ce fait, l'agent bloquant va uniquement agir sur les ponts disulfures qui se forment lors du stockage. A l'inverse, aucune conclusion ne pourra être tirée si l'état de floculation et la texture de l'émulsion après homogénéisation dépend de la concentration en NEM. En effet, les éventuelles différences observées lors du stockage pourront aussi bien provenir des modifications engendrées par le NEM lors de l'homogénéisation que durant le stockage. Ainsi, après plusieurs essais, nous avons sélectionné une émulsion produite avec 5 % de matière grasse pour l'étude de la formation des ponts disulfures au cours du stockage.

- MG 5% ; PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 100 bars (émulsion gel différée)

Afin de valider notre choix, nous avons vérifié l'état de floculation et la texture de l'émulsion avec 0 et 30 mM de NEM. La Figure 87 montre l'état de floculation de l'émulsion à 5% de MG en fonction de la concentration en NEM utilisée. Les distributions de taille sont identiques quelle que soit la proportion en agent bloquant ajoutée. Ainsi, des amas de gouttelettes d'une taille aux alentours de 12 μm sont observés. Ce résultat indique que les gouttelettes ne sont pas connectées via des ponts disulfures mais plutôt par des agrégats partagés entre les gouttelettes.

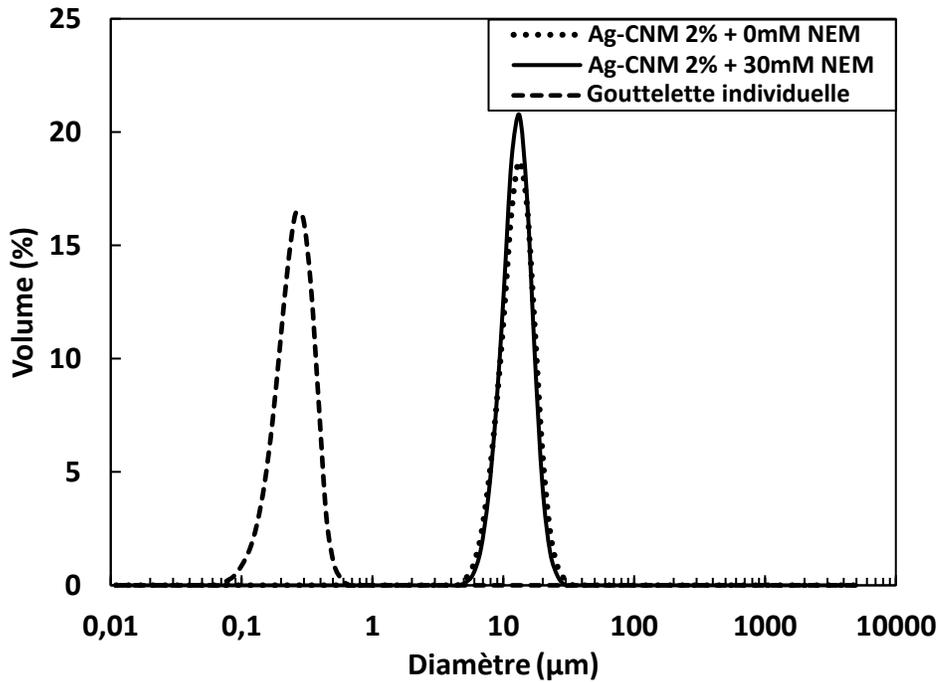


Figure 87: Etat de floculation d'une émulsion à 5% de matière grasse (PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 500 bars) en fonction de la concentration en NEM ajoutée.

Macroscopiquement, les émulsions sont liquides en sortie d'homogénéisateur quelle que soit la concentration en NEM puis se texturent au cours du stockage. Ainsi, cette formulation d'émulsion paraît appropriée pour cette étude.

7.2.1 Stockage à 60°C (1)

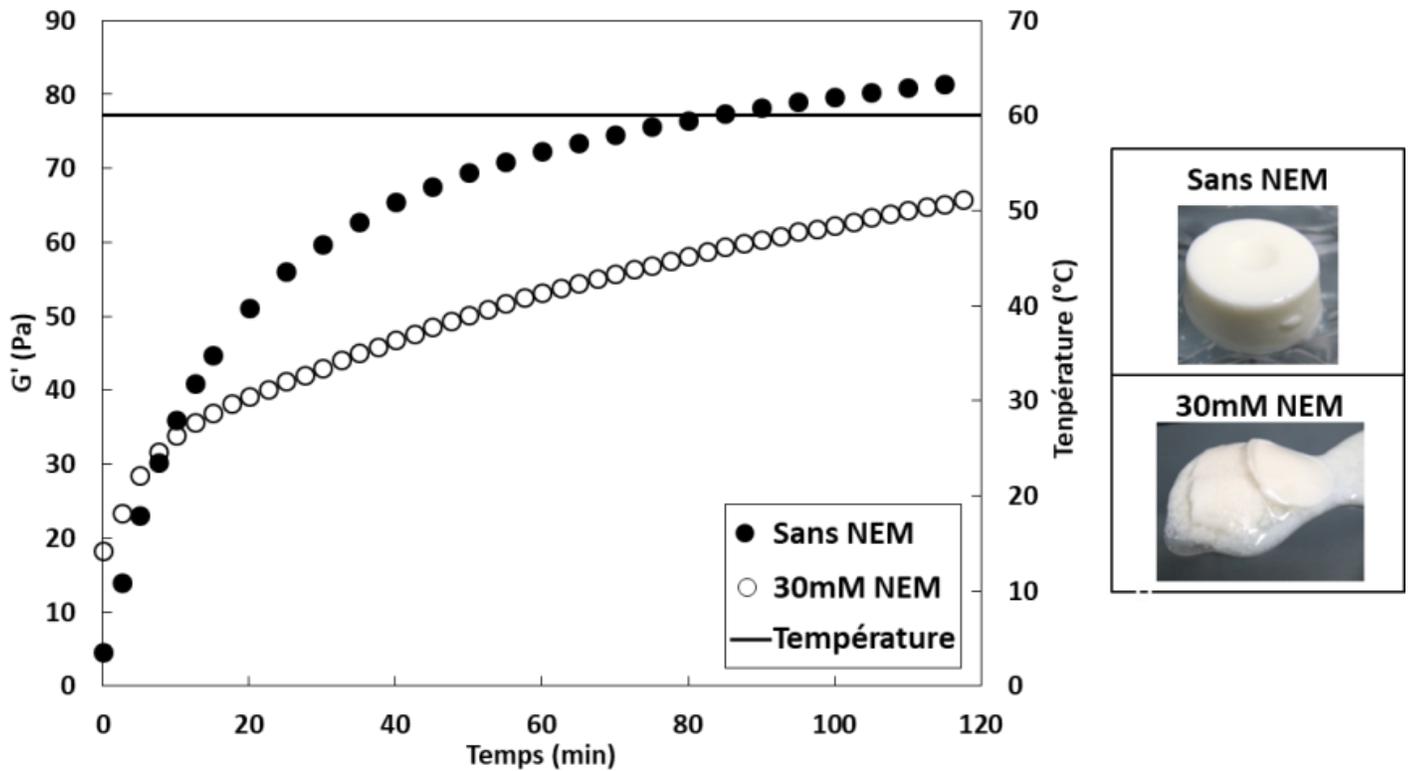


Figure 88: Influence de la concentration en NEM sur la texture des émulsions à 5% de MG (PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 500 bars) lors d'un stockage à 60°C.

La Figure 88 présente la texturation de cette émulsion contenant 2% d'agrégats lors d'un stockage à 60°C. Tout comme l'émulsion gel instantanée, nous observons une augmentation du module G' au cours du temps. Ainsi, en l'absence d'agent bloquant la formation des ponts disulfures, le module conservatif atteint 81 Pa en 1h à 60°C contre 66 Pa en présence de NEM (Figure 88). Cette différence indique que des ponts disulfures se forment au cours du stockage des émulsions à 60°C. En revanche, malgré la présence de l'agent bloquant, le système se texture tout de même indiquant la formation de liaisons autres que des ponts disulfures. A cette température, les interactions hydrophobes entre les protéines à l'interface augmentent engendrant la connexion des gouttelettes et la texturation des émulsions (Chen & Dickinson, 1998; Euston, Finnigan, & Hirst, 1999; Monahan et al., 1996; Sliwinski, Roubos, Zoet, Van Boekel, & Wouters, 2003). Les observations à l'échelle macroscopique confirment les résultats de rhéologie. En effet, les deux émulsions ont l'aspect d'un gel mais l'émulsion contenant du NEM s'effondre et présente une forte synérèse. Cette forte synérèse est probablement liée à l'absence de formation de ponts disulfures entre gouttelettes.

7.2.2 Refroidissement (2 et 3)

7.2.2.1 Zone (2)

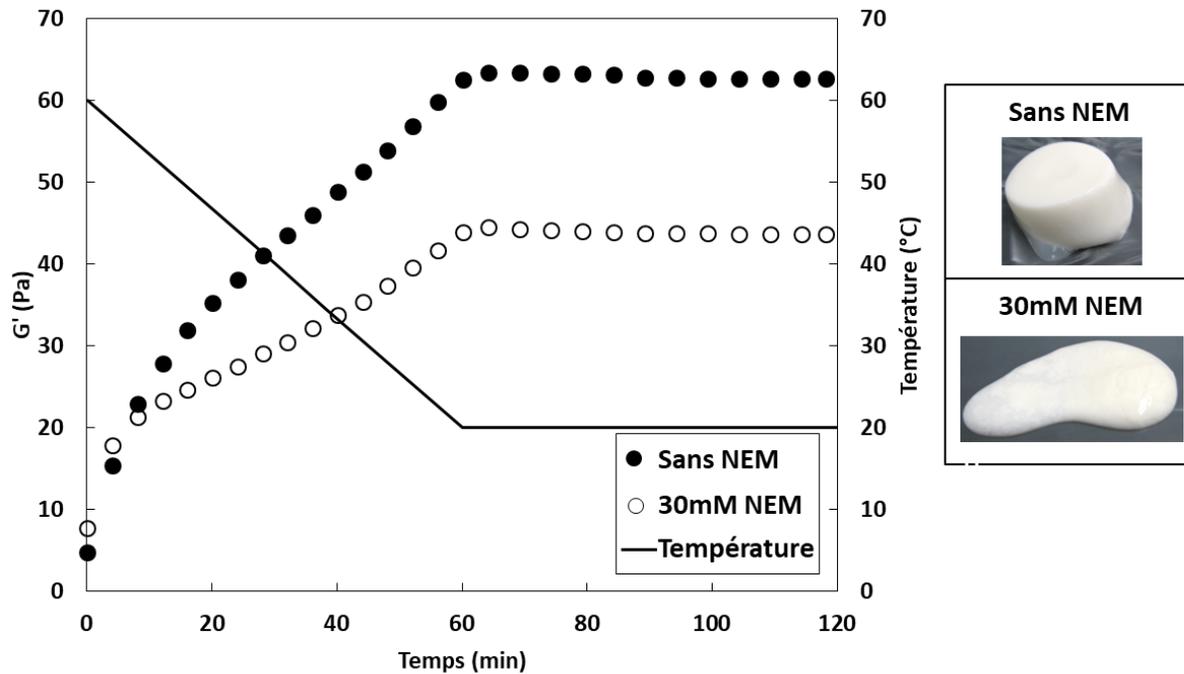


Figure 89: Influence de la concentration en NEM sur la texture des émulsions à 5% de MG (PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 500 bars) lors d'un refroidissement entre 60 et 20°C.

Au cours du refroidissement, les émulsions se texturent puis se stabilisent une fois la température cible atteinte. Ainsi, le module conservatif de l'émulsion sans agent bloquant la formation des ponts disulfures augmente de 58 Pa pendant la rampe 60-20°C contre 36 Pa en présence de NEM (Figure 89). Cette différence met en évidence la formation de ponts disulfures même au cours du refroidissement ce qui impacte la texturation des émulsions. Cependant, l'émulsion se texture malgré la présence de 30mM de NEM, indiquant la formation de liaisons différentes des ponts disulfures entre les gouttelettes. En effet, plusieurs études ont déjà montré qu'au cours d'un refroidissement, des liaisons hydrogènes se forment entre les protéines à l'interface induisant une texturation du système (Beveridge, Jones, & Tung, 1984; Chen & Dickinson, 1998). Une fois la température cible atteinte, les émulsions semblent ne plus évoluer et les valeurs du module conservatif stagnent à 63 Pa pour les systèmes sans NEM contre 44 Pa en présence d'agent bloquant. Les observations macroscopiques corroborent les analyses rhéologiques et confirment l'importance de la formation de nouveaux ponts disulfures en complément des liaisons Hydrogènes durant le refroidissement.

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

7.2.2.2 Zone (3)

La zone (3) de la Figure 86 montre une brusque augmentation de la texture de l'émulsion lors d'un refroidissement entre 10 et 4°C. En effet, le module conservatif augmente de 1500 à 5530 Pa en seulement 6 minutes. Cette augmentation est probablement due à la cristallisation de la matière grasse. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons fabriqué des émulsions avec deux tailles de gouttelettes individuelles : 0,25 μm (500 bars) et 0,9 μm (100 bars). Nous avons ensuite réalisé des analyses en calorimétrie différentielle (DSC) entre 60 et 4°C afin de déterminer la plage de fonte de la MGLA en fonction de la taille des gouttelettes (Figure 90).

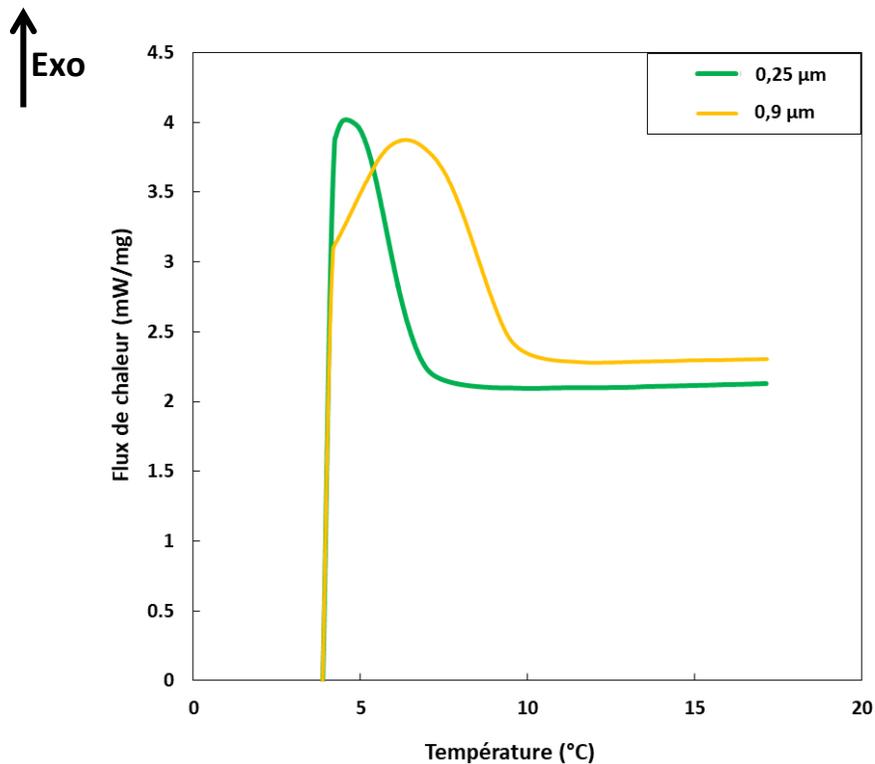


Figure 90: Influence de la taille des gouttelettes sur la cinétique de cristallisation de la matière grasse.

La Figure 90 présente l'impact de la taille des gouttelettes sur la température de cristallisation de la matière grasse. La cristallisation étant un phénomène exothermique, une augmentation du flux de chaleur est synonyme de cristallisation de la matière grasse. Ainsi, lorsque la taille des gouttelettes est de 0,9 μm , la cristallisation de la matière grasse débute à 11,4°C contre 8,8°C pour des diamètres de 0,25 μm (Figure 90). D'une manière plus générale, plus les gouttelettes de matière grasse sont de petite taille, plus la température de cristallisation sera faible. Ces résultats sont en accord avec les observations de Lopez et al. (2002). De ce fait, les gouttelettes des émulsions réalisées à 100 bars cristallisent à des

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

températures plus hautes que celles fabriquées à 500 bars. De plus, la cristallisation des gouttelettes va avoir une influence sur la texture des émulsions d'autant plus importante que la fraction volumique de matière grasse augmente. Par conséquent, la texture des émulsions fabriquées à 100 bars et 30 p/p% de MGLA va être bien plus sensible à la cristallisation de la matière grasse que les émulsions fabriquées à 500 bars et 5 p/p% de MGLA.

La Figure 91 représente le flux de chaleur d'une émulsion réalisée à 100 bars et 30 p/p% de MGLA ainsi que le module conservatif au cours du refroidissement. D'après les données obtenues en DSC, la cristallisation débute à une température de 11,4°C. En parallèle, l'augmentation brutale des G' commence très peu de temps après cette température, à 10°C. L'écart de 1,4°C observé est simplement dû au temps nécessaire pour qu'une fraction suffisante de matière grasse ait cristallisé afin d'avoir un impact sur la texture des émulsions. Ainsi, la texturation drastique observée entre 10 et 4°C sur la Figure 86 (zone ③) est directement liée à la cristallisation de la matière grasse.

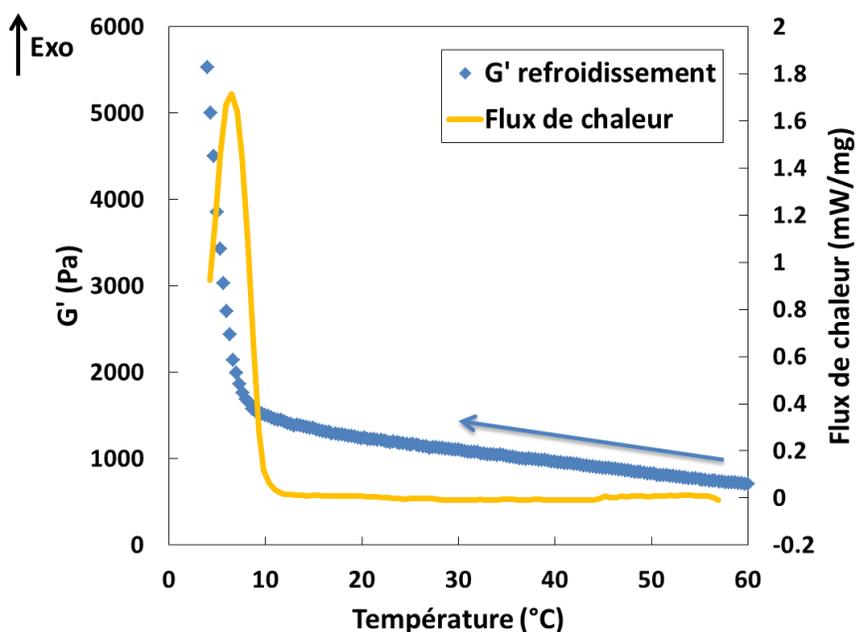


Figure 91: Relation entre le flux de chaleur et le module conservatif en fonction de la température au cours du refroidissement (taille des gouttelettes : 0,9 μm).

7.2.3 Stockage à 4°C (④)

La partie ④ de la Figure 86 indique que les valeurs du module conservatif diminuent lors d'un stockage à 4°C. Cette diminution peut être due à des phénomènes de microsynchronisation ou à des réorganisations au sein du système.

7.2.4 Chauffage de 4 à 60°C (5)

7.2.4.1 Fonte de la matière grasse

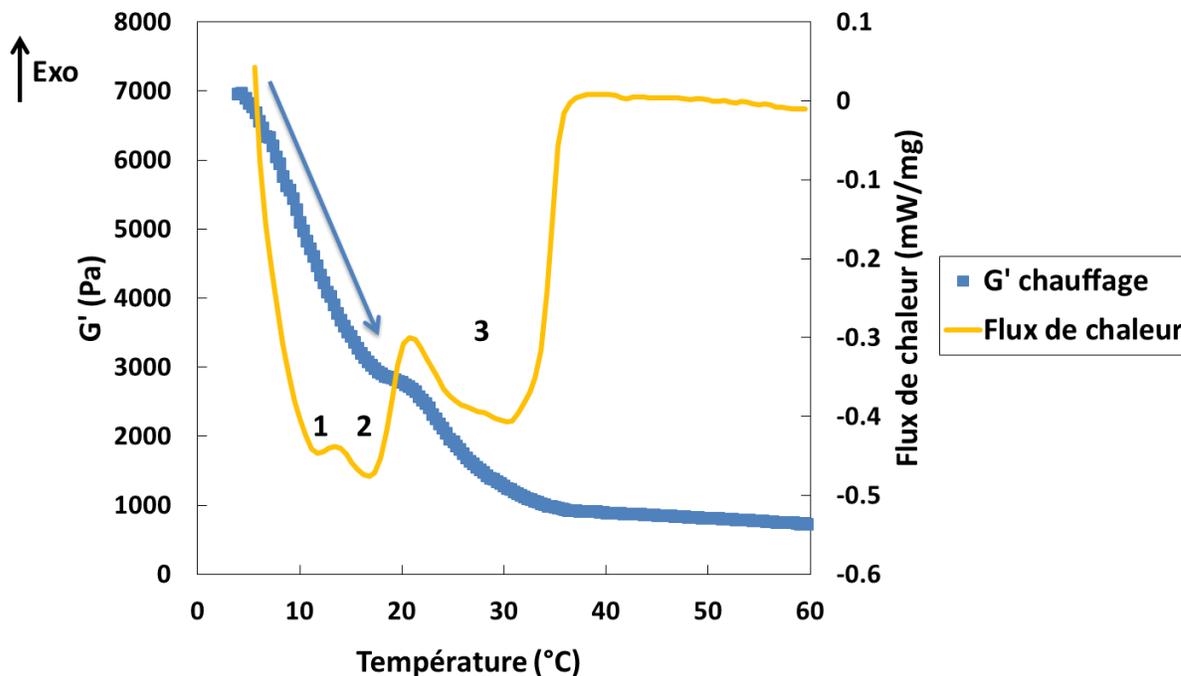


Figure 92: Relation entre le flux de chaleur et le module conservatif en fonction de la température au cours du chauffage (taille des gouttelettes : 0,9 μm).

La Figure 92 montre l'évolution du flux de chaleur et de la texture de l'émulsion lors du chauffage. La fonte de la matière grasse étant un phénomène endothermique, les valeurs du flux de chaleur vont être négatives. Ainsi, au vu du thermogramme, la matière grasse fond entre 4 et 37°C. En effet, la courbe assignée au flux de chaleur met en évidence trois pics correspondant à la fonte des trois classes de lipides. Ainsi, les pics 1, 2 et 3 sont respectivement dus à la fonte des triglycérides de bas, moyen et haut point de fusion (Drelon, 2006). La fonte de la matière grasse explique en grande partie la diminution du module conservatif lors du chauffage. Le décroché observé concernant les valeurs de G' aux alentours de 20°C est directement corrélé à la transition entre la fonte des triglycérides de moyen et de haut point de fusion. La diminution des valeurs de G' enregistrée entre 4 et 60°C (zone 5 ; Figure 86) est entre autre la conséquence de la fonte de la matière grasse. Cependant, la disparition de certaines liaisons réversibles formées lors du refroidissement (partie 7.2.2.1) pourraient également expliquer la diminution des G' observée lors du chauffage.

7.2.4.2 Rupture des liaisons réversibles formées lors du refroidissement

Dans l'objectif de déterminer quelles sont les liaisons qui disparaissent et qui sont impliquées dans la diminution des G' observée durant le chauffage, nous avons réalisé, sur la même émulsion (MG5% ; PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 100bars), un cycle refroidissement-chauffage de 60 à 20°C puis de 20 à 60°C (Figure 93).

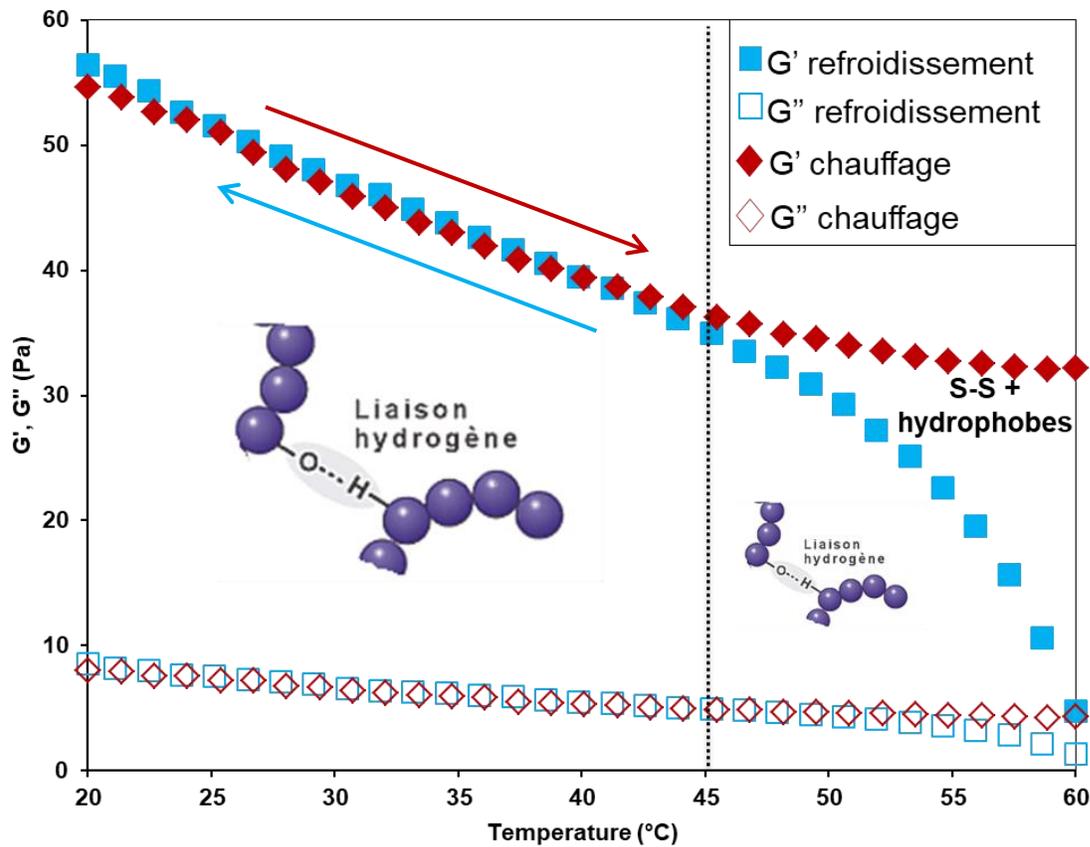


Figure 93: Influence des interactions moléculaires impliquées lors du refroidissement et du chauffage sur les propriétés rhéologiques des émulsions (MG 5% ; PSN-CNM 0,1% ; Ag-CNM 2% ; 100bars).

Comme vu précédemment (partie 7.2.2), l'émulsion se texture pendant le refroidissement entre 60 et 20°C avec des valeurs de module conservatif passant de 4 à 56 Pa. A l'inverse, pendant la phase de chauffage, le module conservatif diminue signifiant que les interactions formées durant le refroidissement sont partiellement rompues lors du traitement thermique (Figure 93). En effet, entre 45 et 20°C, les valeurs de G' mesurées lors du chauffage et du refroidissement sont superposées. Ce résultat signifie que dans cette gamme de températures, seules des interactions réversibles correspondant à des liaisons hydrogènes sont formées (Beveridge et al., 1984; Chen & Dickinson, 1998). Ainsi, les interactions irréversibles de type ponts disulfure mises en évidence lors du refroidissement (Figure 89) se forment à

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

des températures supérieures à 45°C. En effet, entre 45 et 60°C, les G' mesurés lors du chauffage sont supérieurs à ceux correspondant au refroidissement présageant la formation de liaisons pérennes comme les ponts disulfures dans cette gamme de températures. De plus, la formation d'interactions hydrophobes entre 45 et 60°C peut également expliquer la différence entre les G' observés lors du chauffage et du refroidissement. Cependant, le module conservatif (G') mesuré lors de chauffage continue de diminuer légèrement entre 45 et 60°C témoignant de la rupture des liaisons hydrogènes également formées à ces températures. La formation simultanée des liaisons hydrogènes, des interactions hydrophobes et des ponts disulfures entre 60 et 45°C explique l'augmentation rapide des valeurs de G' lors du refroidissement sur cette gamme de températures. A l'inverse, entre 45 et 20 °C, seules des liaisons hydrogènes sont formées ce qui ralentit la texturation de l'émulsion.

7.2.4.3 Intérêt fonctionnel des liaisons réversibles dans le réseau protéines-lipides

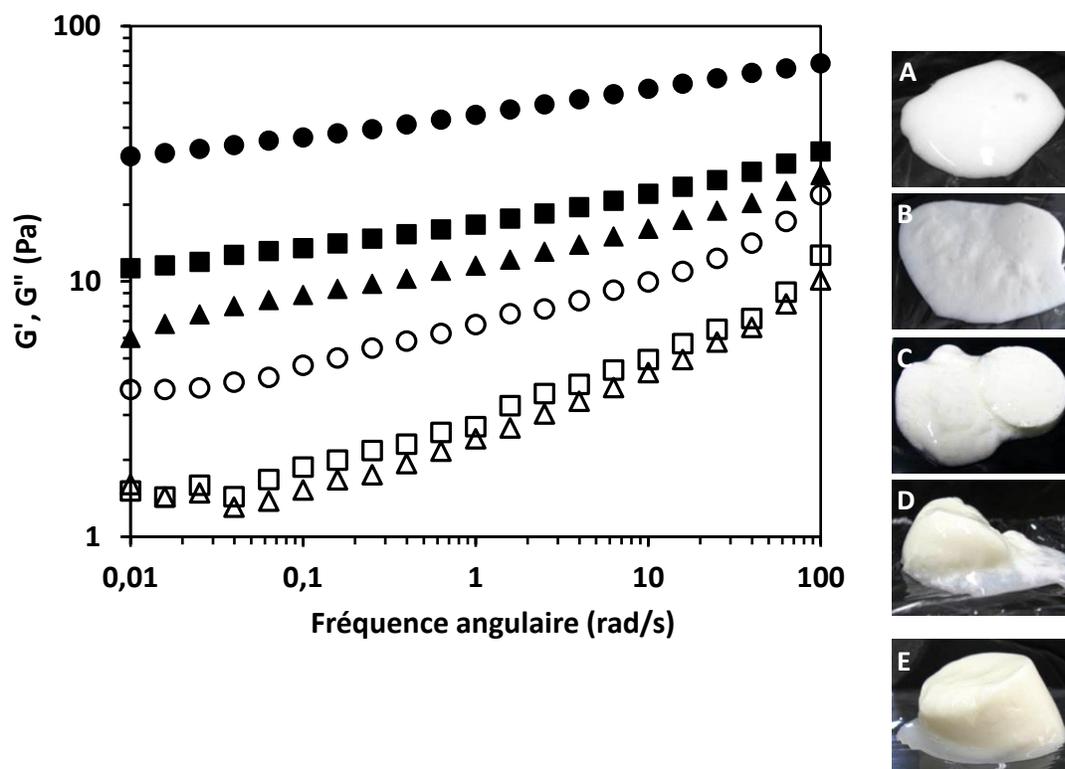


Figure 94: Propriétés rhéologiques des émulsions contenant 2 p/p% d'agrégats après cisaillement à 20°C. G' (symboles pleins) et G'' (symboles vides) avant cisaillement (cercles), après cisaillement (triangles) et après 1 jour de stockage à 20°C (carrés). Observations macroscopiques de l'émulsion après cisaillement (A), après 1 (B), 3 (C) et 7 (D) jours de stockage à 20°C. La photo E correspond à la même émulsion stockée 7 jours à 20°C n'ayant subi aucun cisaillement.

Afin de vérifier la présence d'interactions réversibles (liaisons hydrogènes) dans le réseau protéines-lipides, des émulsions gélifiées contenant 2 p/p% d'agrégats et 5 p/p% de MGLA ont été agitées manuellement après 42h de stockage afin de rompre le réseau protéines-lipides. Avant cisaillement, les

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

émulsions sont gélifiées et le module conservatif à 1 rad.s^{-1} est de 45 Pa. En revanche, après agitation, les systèmes retrouvent un aspect liquide proche de celui obtenu en sortie d'homogénéisateur avec un module conservatif à 1 rad.s^{-1} qui a diminué à 11,5 Pa (Figure 94). De plus, avant la rupture du réseau, les spectres mécaniques présentent un début de plateau aux faibles fréquences d'oscillation alors qu'après cisaillement, une pente est observée montrant un système plus liquide malgré le fait que les G' restent au-dessus des G'' sur toute la gamme de fréquences étudiées. Après 24h de récupération, le module conservatif des émulsions augmente à nouveau (de l'ordre de 5 Pa) et le spectre tend vers un plateau aux faibles fréquences d'oscillation indiquant que les propriétés rhéologiques sont partiellement récupérées. Ce caractère réversible est confirmé à l'échelle macroscopique : nous constatons que l'émulsion se reforme au cours du stockage après avoir subi un cisaillement. Cette propriété confirme le caractère réversible d'une partie des liaisons impliquées dans la mise en place du réseau protéines-lipides et ouvre des perspectives intéressantes pour certaines applications comme la fabrication de produits foisonnés.

7.3 Rôle des ponts disulfures sur la microstructure des émulsions

Les résultats précédents ont montré que les ponts disulfures ont un rôle majeur dans la texturation des émulsions. En effet, sans la formation de ponts disulfures, les systèmes présentent un niveau de texture trop faible pour supporter leurs poids et s'effondrent quelle que soit la température de stockage. Afin de visualiser l'importance des ponts disulfures sur la microstructure des systèmes, nous avons observé des émulsions contenant 0 ou 30 mM de NEM au microscope confocal et ce pour trois températures de stockage (60, 20 et 4°C). Afin d'avoir des gouttelettes de matière grasse de taille observable par microscopie optique, nous avons réalisés les expériences sur l'émulsion gel instantanée MG30% ; PSN-CNM 0,6% ; Ag-CNM 1.2% homogénéisée à 100bars (Figure 95).

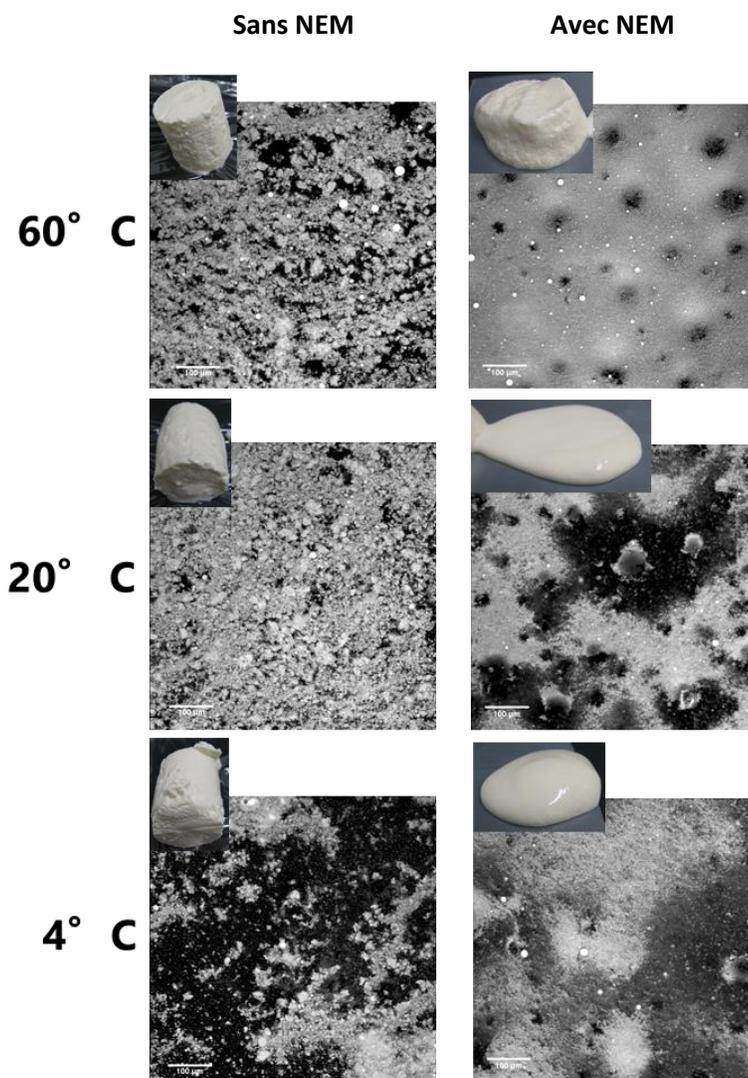


Figure 95: Microstructures d'une émulsion gel instantanée (MG30% ; PSN-CNM 0,6% ; Ag-CNM 1.2%) stockée à 60, 20 et 4°C en présence (30 mM) et en absence de NEM observées par microscopie confocale à balayage laser. Coloration des lipides au rouge de Nile.

En absence d'agent bloquant la formation des ponts disulfures, les émulsions sont toutes texturées à l'échelle macroscopique mais présentent des microstructures relativement différentes avec des niveaux d'hétérogénéité très différents aux trois températures de stockage (Figure 95). En effet, les émulsions stockées à 4°C sont très hétérogènes avec des endroits clairs correspondant aux gouttelettes de matière grasse connectées par les protéines et des parties plus sombres assignées à la présence de poches de sérum conduisant à des phénomènes de synérèse. Cette hétérogénéité du réseau protéines-lipides traduit un phénomène de contraction du système avec éjection de sérum. Ces résultats sont en accord avec la diminution du module conservatif observée dans la partie 7.2.3. En revanche, lors d'un stockage à

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

20 et 60°C, les émulsions sont plus granuleuses et les poches de sérum sont moins présentes présageant des phénomènes de synérèse plus limités à ces températures.

L'ajout d'agent bloquant modifie considérablement la structure macroscopique et microscopique des émulsions. En effet, à l'échelle macroscopique, les systèmes sont moins texturés et ce indépendamment de la température de stockage. Cependant, malgré la présence de NEM, une texturation des émulsions est tout de même observée montrant que les ponts disulfures ne sont pas les seules interactions responsables de la structure générale du système. A l'échelle microscopique, les systèmes sont plus lisses et moins granuleux en présence d'agent bloquant confirmant que les ponts disulfures participent à la formation du réseau protéines-lipides durant le stockage. Les microstructures des émulsions stockées à 4 et 20°C en présence de NEM restent relativement hétérogènes alors que celle stockée à 60°C présente une microstructure beaucoup plus homogène. Ce résultat montre l'importance des ponts disulfures dans la connexion des gouttelettes notamment à 60°C où la différence entre une microstructure avec ou sans NEM est plus marquée. Ainsi, les ponts disulfures semblent être impliqués dans la formation d'un réseau protéines-lipides granuleux et dense afin d'obtenir un système macroscopiquement texturé.

Afin d'observer les interactions entre gouttelettes à une échelle plus fine, nous avons observé les mêmes émulsions par microscopie électronique à transmission (Figure 96).

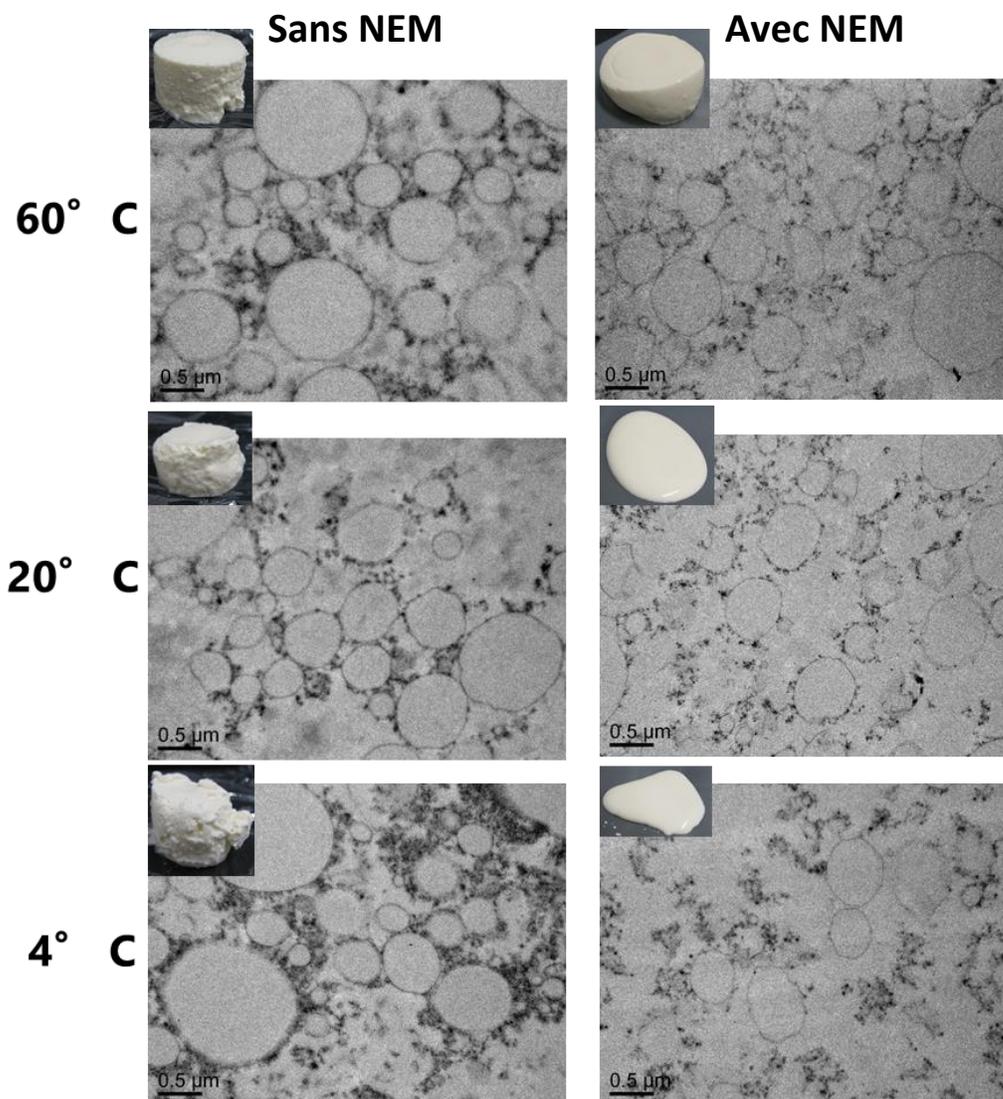


Figure 96: Microstructures d'une émulsion gel instantanée (MG30% ; PSN-CNM 0,6% ; Ag-CNM 1.2%) stockée à 60, 20 et 4°C en présence (30 mM) et en absence de NEM observées par microscopie électronique à transmission.

Les observations réalisées en microscopie électronique à transmission sont en accord avec les résultats de la Figure 95. En effet, en absence d'agent bloquant la formation des ponts disulfures et indépendamment de la température, nous observons que dans les émulsions, les agrégats protéiques connectent les gouttelettes de matière grasse en agissant comme un liant pour former un réseau protéines-lipides (Figure 96). En revanche, dès l'ajout d'agent bloquant, les connexions inter-gouttelettes sont rompues et le réseau protéines-lipides est largement moins développé voire inexistant. Ainsi, des gouttelettes individuelles sont observées prouvant que le réseau protéines-lipides est rompu. Ces observations confirment donc que la formation de ponts disulfures est essentielle à la formation du réseau protéines-lipides quelle que soit la température de stockage.

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

Pour conclure sur les interactions moléculaires responsables de la texturation des émulsions, la Figure 97 synthétise l'ensemble des interactions impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides en fonction de la température.

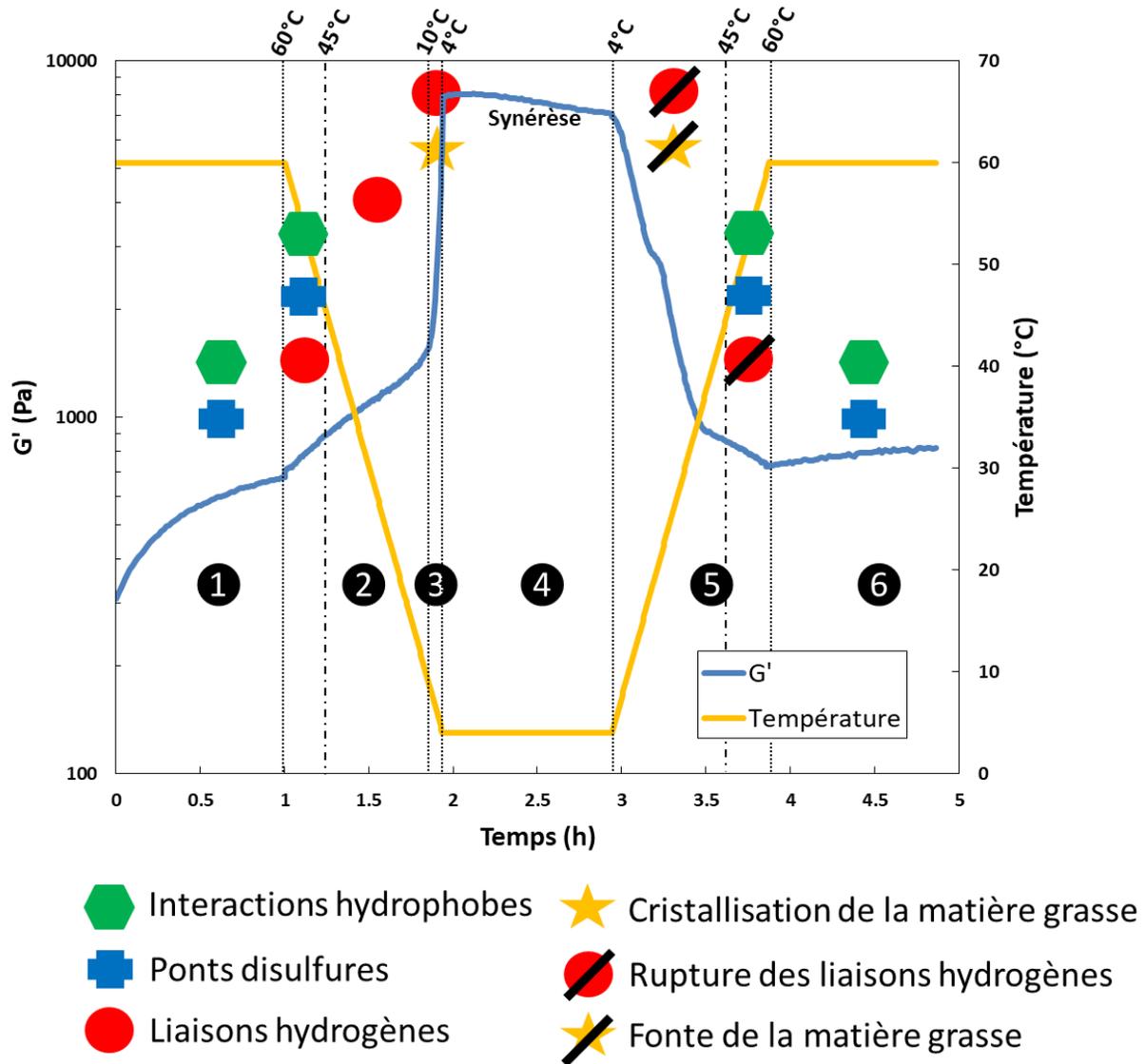


Figure 97: Interactions moléculaires impliquées dans la texturation des émulsions en fonction de la température de stockage.

Pour résumer, différentes interactions, réversibles ou non, vont connecter les gouttelettes et participer à la structuration du réseau protéines-lipides. Ainsi, des interactions hydrophobes et des ponts disulfures sont formés à 60°C. Entre 60 et 45°C, des liaisons hydrogènes, des interactions hydrophobes et des ponts disulfures sont mis en place. De ce fait, plus le refroidissement est lent, plus le nombre de ponts disulfures formés entre 45 et 60°C va être important et plus l'émulsion sera texturée. Lors de la

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

poursuite du refroidissement entre 45 et 4°C, ce sont uniquement des liaisons hydrogènes qui sont formées auxquelles s'ajoutent des phénomènes de cristallisation de la matière grasse au-dessous de 10°C. Une fois à 4°C, des phénomènes de microsynérèse, liés à la contraction du réseau, induisent une diminution des valeurs du module conservatif. Lors du chauffage du système de 4 à 60°C, les liaisons hydrogènes sont rompues et la matière grasse fond entre 4 et 37°C. Cependant, des interactions hydrophobes et des ponts disulfures sont de nouveau formés entre 45 et 60°C. La dernière partie de la figure (zone ⑥) est similaire à la zone ① et correspond à la formation de ponts disulfures et d'interactions hydrophobes. Connaissant le type d'interaction présent en fonction de la température, il est possible de contrôler la texture du système en modulant, par exemple, la vitesse de refroidissement. Cependant, la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse est complexe et peut comporter à la fois des protéines sériques partiellement dénaturées (PSPD) du fait de leur adsorption à l'interface, des agrégats et/ou des caséines non micellaires ce qui peut moduler ces interactions.

7.4 Les protéines impliquées dans le réseau protéines-lipides

Dans l'objectif de comprendre quelles sont les protéines interfaciales impliquées dans la formation des interactions moléculaires et par conséquent, dans la structuration du réseau protéines-lipides, nous avons construit trois interfaces différentes :

- Une interface contenant un mélange de protéines sériques partiellement dénaturées (PSPD) due à l'adsorption à l'interface et de caséines non micellaires.
- Une interface composée uniquement de PSPD.
- Une interface composée de PSPD, de caséines non micellaires et d'agrégats fractals.

Concernant les deux premières interfaces modèles, les agrégats fractals ont été rajoutés après homogénéisation afin d'étudier les interactions possibles entre ces agrégats et les protéines sériques partiellement dénaturées et/ou les caséines non micellaires. Pour cette étude, nous avons utilisée l'émulsion gel instantanée MG30% ; PSN-CNM 0,6% ; Ag-CNM 1,2% ; NaCl80mM ; 100bars afin d'avoir une taille de gouttelette suffisamment importante pour les observer par microscopie confocale.

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

Afin de réaliser une interface sans caséine, la solution de protéines sériques a été centrifugée après acidification à pH 4,6 afin d'éliminer les caséines non micellaires présentes dans la poudre de protéines sériques. Une électrophorèse a été réalisée afin de vérifier la pureté de la solution après centrifugation (Figure 98).

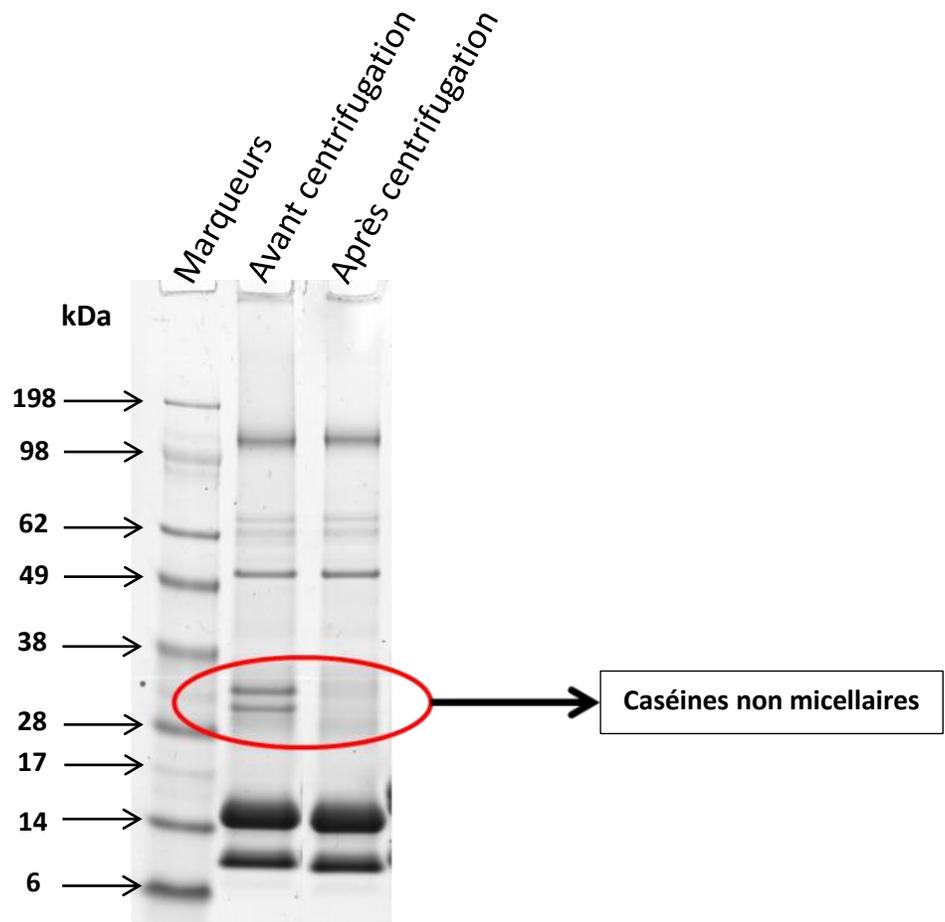


Figure 98: Pureté de la solution de protéines sériques avant et après centrifugation.

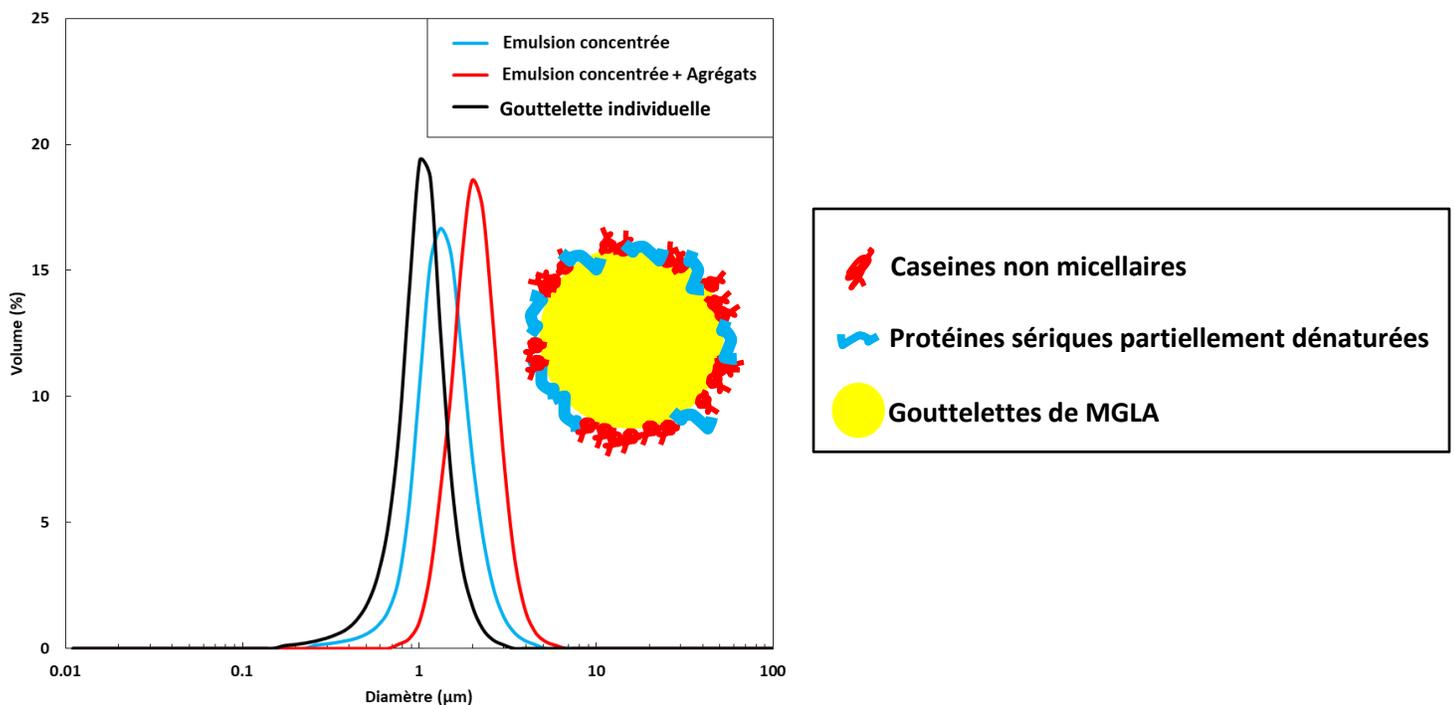
Après centrifugation en condition acide (pH 4,6), la totalité des CNM est éliminée et seules les bandes correspondant aux protéines sériques sont observées (Figure 98). A partir des solutions de protéines avant et après centrifugation, nous avons fabriqué une émulsion concentrée sans agrégat (MG39% ; PSN-CNM 0,8% ; Ag-CNM 0% ; NaCl91mM) homogénéisée à 100 bars. La solution de protéines sériques avant centrifugation a été utilisée pour obtenir une interface composée de protéines sériques partiellement dénaturées et de caséines non micellaires alors que la solution purifiée permet de fabriquer une interface composée uniquement de PSPD. Les agrégats fractals ont ensuite été ajoutés à l'émulsion

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

concentrée induisant une dilution de cette dernière afin d'atteindre les concentrations voulues : MG30% ; PSN-CNM 0,6% ; Ag-CNM 1,2% ; NaCl80mM. Des mesures de taille ont été réalisées à la fois sur l'émulsion concentrée et sur l'émulsion après ajout des agrégats fractals. En parallèle, l'évolution des propriétés mécaniques de l'émulsion contenant les agrégats fractals a été suivie au cours d'un stockage à différentes températures.

7.4.1 Etat de floculation des émulsions après homogénéisation

7.4.1.1 Interface composée de protéines sériques partiellement dénaturées et de caséines non micellaires



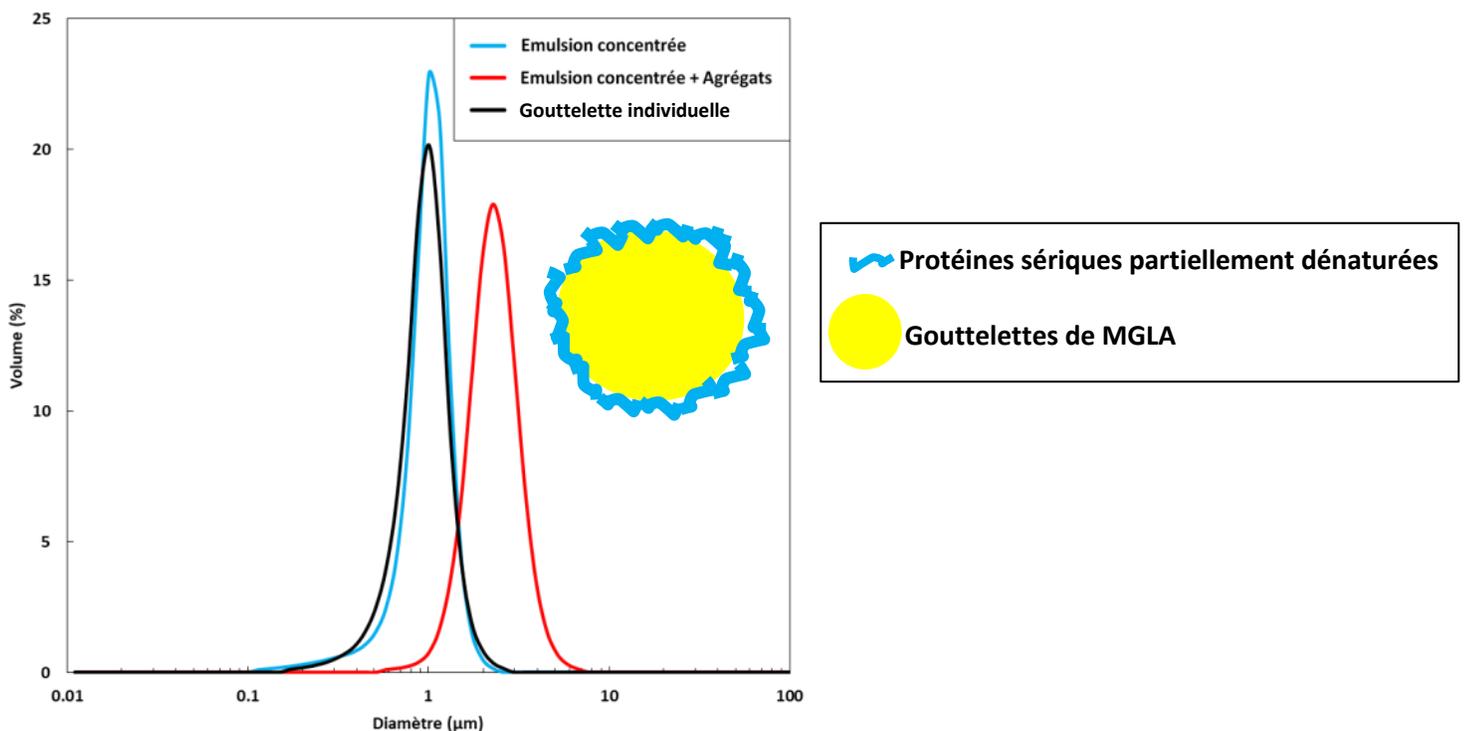
Après fabrication, l'émulsion concentrée est liquide et s'écoule en sortie d'homogénéisateur. Cependant, la Figure 99 met en évidence des phénomènes de floculation avec la formation d'amas de gouttelettes de matière grasse d'environ 1,3µm. Cette floculation peut être due à la présence d'agrégats naturellement présents dans la poudre de protéines sériques et formés au cours de la fabrication des poudres ou lors du stockage (partie 4.1.1). En effet, dans l'émulsion concentrée en matière grasse, la distance inter-gouttelettes est faible et les petits agrégats naturellement présents dans la poudre de

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

protéines sériques sont capables de connecter les gouttelettes de matière grasse et de provoquer de la floculation (McClements, 2004).

L'ajout des agrégats fractals à l'émulsion concentrée provoque une augmentation de la taille des amas due à de nouvelles connexions des gouttelettes. Ainsi, des amas proches de $2\mu\text{m}$ sont formés. Ces résultats montrent que les agrégats sont capables d'interagir avec les protéines sériques partiellement dénaturées et/ou les CNM présentent à l'interface afin de ponter les gouttelettes de matière grasse. Afin de compléter ce résultat, nous avons fabriqué une émulsion dont l'interface est uniquement constituée de PSPD.

7.4.1.2 Interface composée uniquement de protéines sériques partiellement dénaturées



Après centrifugation à pH 4,6, la solution de protéines sériques est dépourvue de CNM et des petits agrégats naturellement présents dans la poudre de protéines sériques qui se retrouvent dans le culot. Ainsi, lors de la fabrication de l'émulsion concentrée, l'interface des gouttelettes de matière grasse est composée uniquement de protéines sériques partiellement dénaturées. En absence des agrégats naturellement présents dans la poudre de protéines sériques, les phénomènes de floculation lors de la

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

fabrication de l'émulsion concentrée sont très limités. Ainsi, les mesures de taille concernant l'émulsion concentrée montrent la présence de gouttelettes individuelles aux alentours de $1\mu\text{m}$ (Figure 100). Comme précédemment, l'ajout d'agrégats fractals engendre la connexion des gouttelettes et la formation de amas d'une taille de $2,3\mu\text{m}$ (Figure 100) contre $2\mu\text{m}$ pour une interface composée de protéines sériques partiellement dénaturées et de caséines non micellaires (Figure 99). Ce résultat confirme que les agrégats sont capables de connecter les gouttelettes de matière grasse en interagissant avec les PSPD présentes à l'interface. Afin de compléter ces résultats, nous avons réalisé des analyses rhéologiques sur les émulsions avec ajout d'agrégats avant (émulsion classique) et après homogénéisation.

7.4.2 Evolution de la texture des émulsions en fonction de la composition interfaciale

Dans l'objectif de comparer la texture des émulsions dont l'interface est composée de protéines sériques partiellement dénaturées, d'agrégats fractals et /ou de caséines non micellaires, nous avons réalisé une cinétique en température identique à celle de la partie 7.2 tout en mesurant les valeurs des modules conservatifs.

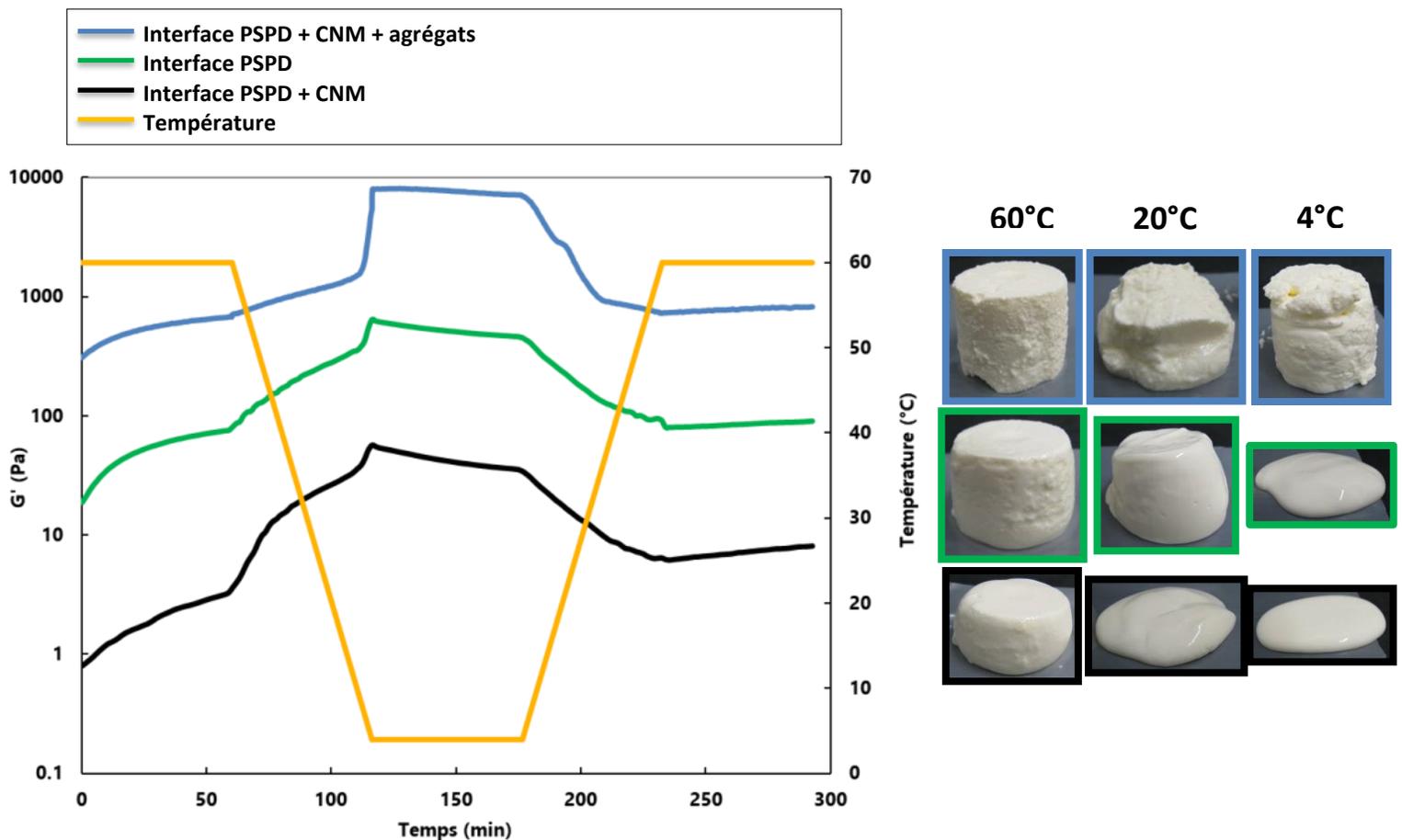


Figure 101: Evolution des propriétés rhéologiques au cours du stockage des émulsions à différentes températures pour trois compositions interfaciales couplée à des observations macroscopiques après 1 jour de stockage à 60, 20 et 4°C.

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

Quel que soit le type d'interface, les profils du module conservatif sont similaires (Figure 101) malgré des niveaux de G' qui diffèrent. Les différentes phases de chaque profil ont été expliquées dans la partie 7.2. Cependant, lorsque des agrégats fractals sont présents à l'interface, les valeurs du module conservatif sont largement supérieures à celles enregistrées pour les émulsions où les agrégats sont ajoutés après homogénéisation. Ainsi, les agrégats, lorsqu'ils sont présents à l'interface, favorisent la connexion des gouttelettes de matière grasse et augmentent la texture du système.

Cependant, une interface composée uniquement de protéines sériques partiellement dénaturées est plus texturée que dans le cas d'un mélange PSN et CNM. Ces résultats démontrent que les agrégats présents dans la phase continue sont capables d'interagir avec les protéines sériques partiellement dénaturées à l'interface et de connecter les gouttelettes. En revanche, lorsque l'interface comporte des caséines non micellaires, les valeurs du module conservatif sont plus faibles suggérant que les agrégats n'interagissent pas avec ces CNM adsorbées (Figure 101).

Les observations macroscopiques de ces émulsions confirment les résultats précédents. En effet, lorsque les agrégats fractals sont adsorbés à l'interface, les émulsions sont plus texturées que lorsque l'interface est composée de protéines sériques partiellement dénaturées et/ou de caséines non micellaires et ce pour toutes les températures. De la même manière, les émulsions dont l'interface comporte uniquement des PSPD s'effondrent moins qu'une interface constituée à la fois de PSPD et de CNM (Figure 101). De plus, ajouter les agrégats après homogénéisation permet l'obtention de systèmes lisses et homogènes alors que les émulsions présentent un aspect rugueux et hétérogène lorsque les agrégats sont ajoutés avant homogénéisation.

7.4.3 Evolution de la microstructure des émulsions en fonction de la composition interfaciale

Afin de visualiser l'influence des différentes compositions en protéines aux interfaces sur la microstructure des émulsions, des observations ont été réalisées par microscopie confocale (Figure 102). Lorsque l'interface contient des agrégats fractals, la microstructure du système est granuleuse et les gouttelettes de matière grasse sont connectées par les agrégats. A l'inverse, une interface composée d'un mélange de protéines sériques partiellement dénaturées et de CNM induit une microstructure lisse et homogène. En effet, les agrégats fractals n'interagissant pas avec les caséines non micellaires, les connexions inter-gouttelettes sont fortement réduites et le système se texture difficilement. Une interface contenant uniquement des protéines sériques partiellement dénaturées engendre la formation

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

d'un réseau plutôt régulier et peu granuleux se traduisant à l'échelle macroscopique par une structure lisse et homogène (Figure 102). En effet, les agrégats fractals sont capables d'interagir avec les PSPD présentes à l'interface. Par conséquent, le réseau protéines-lipides est plus développé dans le cas d'une interface pure protéines sériques partiellement dénaturées que dans le cas d'un mélange avec les caséines non micellaires.

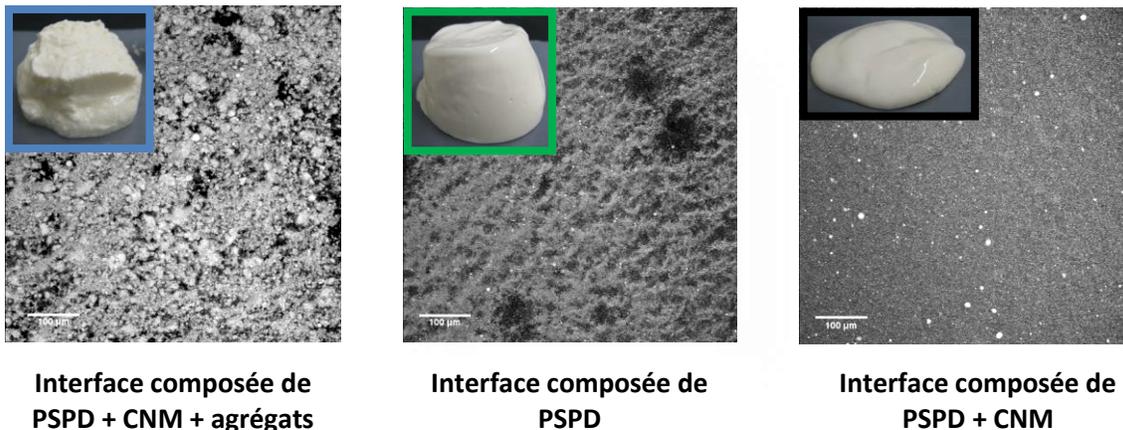


Figure 102: Influence de la composition interfaciale sur la microstructure des émulsions stockées à 20°C observée par microscopie confocale à balayage laser (coloration des lipides au Rouge de Nile) et couplée à des observations macroscopiques.

7.4.4 Rôle des protéines présentes dans la phase continue sur la texturation des émulsions

Les protéines présentes dans la phase continue sont également impliquées dans la texturation des émulsions. En effet, tout comme l'interface, la phase continue des émulsions est composée de caséines non micellaires (CNM), de protéines sériques natives (PSN) et d'agrégats.

- Les caséines non micellaires :

L'ajout des agrégats après homogénéisation a montré que les CNM adsorbées à l'interface n'interviennent pas dans la texturation des émulsions. En extrapolant ce résultat, nous pouvons affirmer que les CNM, qu'elles soient adsorbées à l'interface ou présentes dans la phase continue, ne participent pas à la formation du réseau protéines-lipides.

- Les agrégats fractals :

Concernant les agrégats fractals, le fait de les ajouter après homogénéisation permet de les placer en intégralité dans la phase continue. Ainsi, la texturation des émulsions en ajoutant les agrégats après fabrication montre que les agrégats présents dans la phase continue sont également impliqués dans la formation du réseau protéines-lipides et de ce fait, dans la texturation des systèmes. L'implication des

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

agrégats présents dans la phase continue dans la texturation des émulsions est vraie pour toutes les températures (60, 20 et 4°C) même si le phénomène est plus important à 60°C.

- Les protéines sériques natives

Afin de comprendre le rôle des protéines sériques natives (PSN) présentes dans la phase continue sur la texturation des systèmes, deux émulsions contenant 30% de MGLA et stabilisées uniquement des protéines solubles (CNM+PSN 4,2%) ont été fabriquées à 100 et 500 bars puis stockées à 60, 20 et 4°C.

- Effet de la température de stockage

Même en absence d'agrégats, les émulsions stockées à 60°C se texturent au cours du temps et leur texture macroscopique dépend de la pression d'homogénéisation (Figure 103). Ceci est dû aux protéines sériques natives présentes dans la phase continue. En effet, à cette température, les protéines sériques natives de la phase continue commencent à se dénaturer pour devenir des protéines sériques partiellement dénaturées (PSPD) capable de former un réseau protéines-lipides connecté par des ponts disulfures et des interactions hydrophobes. Les différences de texture observées entre les deux pressions d'homogénéisation sont liées à la quantité de PSPD présentes dans la phase continue. En effet, plus la pression d'homogénéisation est importante, plus les gouttelettes sont petites, plus il y a d'interface et moins il y a de PSPD dans la phase continue. Par conséquent, l'émulsion fabriquée à 500 bars et stockée à 60°C pendant 7 jours est moins texturée que celle produite à 100 bars et stockée dans les mêmes conditions (Figure 103). Cette différence est due à une concentration en PSPD dans la phase continue plus faible à 100 bars.

A l'inverse, lors d'un stockage à 20 et 4°C, les protéines sériques natives de la phase continue ont peu d'impact sur la texturation des émulsions. En effet, dans cette gamme de température, les protéines non adsorbées ne sont pas dénaturées et ne participent donc pas à la texturation de l'émulsion : les systèmes restent liquides.

Ces résultats montrent que les PSPD présentes dans la phase continue ont également une influence sur la texture des émulsions stockées à 60°C.

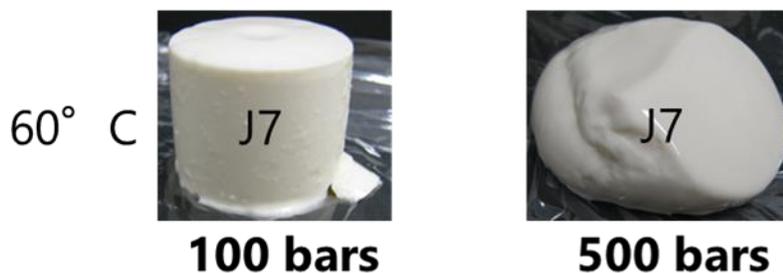


Figure 103: Influence de la concentration en protéines sériques natives dans la phase continue sur la texture macroscopique des émulsions stockées 7 jours à 60°C.

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

7.5 Conclusion

Ce chapitre a permis de déterminer les types d'interactions responsables de la formation du réseau protéines-lipides conduisant à la texturation des émulsions. Ainsi, pendant l'homogénéisation, deux types d'interactions peuvent provoquer la floculation des gouttelettes de matière grasse :

- Des ponts disulfures peuvent se former entre les agrégats adsorbés sur des interfaces différentes et provoquer de la floculation. De plus, les agrégats présents dans la phase continue peuvent également participer à la connexion des gouttelettes.
- Un agrégat peut également être partagé entre deux interfaces et ainsi provoquer la floculation de plusieurs gouttelettes par pontage.

Durant l'étape de stockage, les interactions moléculaires vont dépendre de la température de stockage des émulsions :

- A 60°C : formation de ponts disulfures et d'interactions hydrophobes. De plus, à cette température, les protéines sériques natives présentes dans la phase continue commencent à se dénaturer et participent à la formation du réseau protéines-lipides.
- Pendant le refroidissement 60-4°C : La texturation des émulsions est provoquée par la formation de ponts disulfures et d'interactions hydrophobes entre 60 et 45°C alors que des liaisons hydrogènes sont formées tout au long du refroidissement. A partir de 10°C, la cristallisation de la matière grasse induit une forte augmentation de la texture du système. Cependant, l'influence de la cristallisation sur la texture des émulsions va dépendre du diamètre des gouttelettes et de la fraction volumique de matière grasse.
- Durant le chauffage 4-60°C : La diminution de texture des émulsions est due à la fois à la rupture des liaisons hydrogènes tout au long du chauffage et à la fonte de la matière grasse. En revanche, à partir de 45°C, des ponts disulfures ainsi que des interactions hydrophobes sont formés.

L'interface des gouttelettes de matière grasse ainsi que la phase continue peuvent être composées de protéines sériques natives (partiellement dénaturées ou non), de caséines non micellaires et d'agrégats. Nous avons démontré que les CNM ne sont pas impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides. Les protéines sériques natives participent à la texturation des émulsions uniquement si elles sont partiellement dénaturées ; autrement dit, si elles sont adsorbées à l'interface ou présentes dans la phase continue lors du stockage des émulsions à 60°C. Les agrégats, quant à eux, participent à la formation du réseau qu'ils soient dans la phase continue ou à l'interface (Figure 104).

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

Les agrégats présents dans la phase continue, ou adsorbés à l'interface, sont capables d'interagir entre eux mais également avec les protéines sériques partiellement dénaturées. Les interactions moléculaires peuvent se former entre deux interfaces, entre les protéines de la phase continue et également entre les protéines de la phase continue et l'interface.

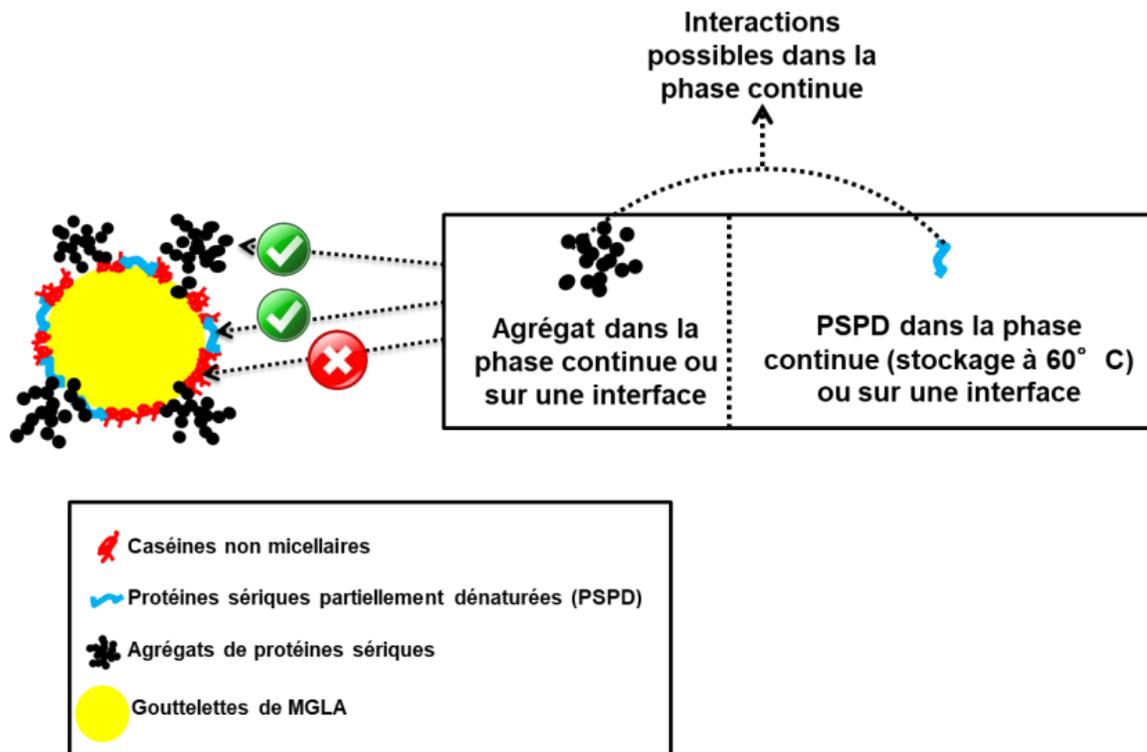


Figure 104: Protéines impliquées dans la formation des interactions moléculaires.

Lorsque l'interface est composée d'agrégats, les émulsions sont plus texturées que dans le cas d'une interface ne contenant aucun agrégat. Deux interprétations peuvent expliquer ce résultat:

- Les interactions impliquant les agrégats à l'interface sont favorisées par rapport aux interactions avec les PNP, D,
- Les interactions formées avec les agrégats sont différentes de celles formées avec les protéines sériques partiellement dénaturées. Ainsi, des interactions de forte énergie (ponts disulfures) se formeraient avec les agrégats alors que des interactions de faible énergie (interactions hydrophobes) seraient impliquées avec les protéines sériques partiellement dénaturées.

Ce chapitre permet de comprendre quelles sont les interactions moléculaires qui régissent la texturation des émulsions. Ainsi, en variant la température de stockage, les vitesses de refroidissement et la

Chapitre 7 : Les Interactions moléculaires et les protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

composition interfaciale, il est possible de moduler les types d'interactions et ainsi contrôler la texture des émulsions.

Chapitre 8 : Discussion générale

Nous avons produit des agrégats de protéines sériques de différentes formes en faisant varier les conditions physico-chimiques de fabrication (chapitre 4). Ainsi, à pH neutre, des agrégats branchés et peu denses (agrégats fractals) sont obtenus alors que des objets sphériques et denses (agrégats microgels) sont fabriqués à pH proche du point isoélectrique (Jung et al., 2008b). En condition acide (pH 2), de longs bâtonnets fins sont obtenus (fibrilles). Un dernier type d'agrégats a été fabriqué (les agrégats mixtes) en chauffant une suspension de micelles de caséines et de protéines sériques. En effet, sous l'action du traitement thermique, les protéines sériques se dénaturent et s'adsorbent autour des micelles de caséines pour former des agrégats mixtes (Haque & Kinsella, 1988; Jang & Swaisgood, 1990; Sawyer, 1969).

La structure des agrégats ainsi que leur résistance aux cisaillements influencent leur capacité à texturer des émulsions. En raison de leur longueur, les fibrilles paraissent intéressantes pour connecter les gouttelettes de matière grasse sur de longues distances. Cependant, étant très instables aux hautes pressions, ce type d'agrégats est éclaté en petits fragments après passage à l'homogénéisateur. De ce fait, les fibrilles ne pourront pas connecter les gouttelettes sur de longues distances et conduisent à des émulsions peu, voire pas du tout texturées. La densité très élevée des microgels implique l'ajout d'une forte concentration en agrégats pour arriver à texturer les systèmes. En effet, toutes les émulsions réalisées avec les microgels restent liquides même si certaines commencent à se texturer pour des concentrations en agrégats supérieures à 2%. Par conséquent, les microgels et les fibrilles ne sont pas de bons candidats pour connecter les gouttelettes de matière grasse et texturer les émulsions.

A l'inverse, les résultats présentés dans le chapitre 5 nous ont montré que les agrégats fractals et les agrégats mixtes sont capables de texturer les émulsions laitières aussi bien pendant l'étape d'homogénéisation (émulsions gel instantanées) que durant le stockage des émulsions (émulsions gel différées). Le caractère différé de la texturation de certaines émulsions est dû à la formation d'interactions protéines-protéines au cours du stockage. Ce phénomène provoque la floculation des gouttelettes de matière grasse et la formation d'un réseau protéines-lipides dont le mécanisme de formation peut être divisé en deux étapes :

- La floculation des gouttelettes de matière grasse pendant l'étape d'homogénéisation
- La floculation des gouttelettes de matière grasse pendant l'étape de stockage

8.1 Floculation durant l'étape d'homogénéisation

Au cours de l'homogénéisation, les caséines non micellaires (CNM), les protéines sériques natives (PSN) et les agrégats sont en compétition pour couvrir l'interface huile-eau. Cependant, pour des

concentrations en protéines similaires, les caséines non micellaires et les protéines sériques natives sont capables de couvrir davantage de surface et de former de plus petites gouttelettes de matière grasse que les agrégats (Kiokias & Bot, 2006). En effet, les PSN et les CNM vont s'adsorber plus rapidement à l'interface que les agrégats. De plus, des analyses de composition interfaciale ont montré que les CNM ont une affinité pour l'interface supérieure à celle des PSN. Ces différences d'affinité pour l'interface engendrent des variations de composition interfaciale en fonction de la concentration initiale de chaque protéine et de la surface interfaciale développée dans l'émulsion.

Kiokias & Bot (2006) ont montré que la composition interfaciale en protéines est très importante pour la texturation des émulsions. Ainsi, en présence de protéines solubles en quantité suffisante, les agrégats, qui présentent une affinité moindre pour l'interface, ne sont pas en mesure de s'adsorber à l'interface et donc de connecter les gouttelettes de matière grasse. De ce fait, aucune floculation n'est observée pendant l'étape d'émulsification (Dickinson, 2010). A l'inverse, lorsque les agrégats s'adsorbent à l'interface, ils peuvent être partagés entre deux gouttelettes voisines et de ce fait les connecter (Dickinson, 2010; Surel et al., 2014) (Figure 105 – cas 1). Cependant, dans notre cas, puisque nous avons travaillé avec une poudre industrielle contenant un mélange de PSN et de CNM, lorsque la concentration en agrégats augmente, la quantité de caséines non micellaires croît également. C'est la raison pour laquelle, à partir d'une certaine concentration en agrégats, la quantité de caséines non micellaires devient suffisante pour saturer l'interface aux dépens des agrégats. Par conséquent, malgré l'augmentation de la concentration en agrégats, la texturation des émulsions diminue. En revanche, les protéines solubles étant de meilleurs émulsifiants que les agrégats, elles sont tout de même essentielles pour contrôler la taille des gouttelettes de matière grasse et ainsi réduire la distance inter-gouttelettes tout en permettant aux agrégats de s'adsorber à l'interface et de texturer les émulsions.

Les résultats obtenus en présence d'agent bloquant la formation de ponts disulfures (NEM) ont montré que ceux-ci jouent un rôle important dans la connexion entre les interfaces de deux gouttelettes de matière grasse. Ces liaisons peuvent se former aussi bien entre deux agrégats adsorbés sur deux interfaces différentes (Figure 105 – Cas 2) qu'entre un agrégat et une protéine sérique partiellement dénaturée (PSPD) (Figure 105 – Cas 3). En effet, les protéines sériques natives se dénaturent partiellement lors de l'adsorption à l'interface (Audebrand et al., 2013; Fang & Dalgleish, 1997). Elles exposent des résidus hydrophobes ainsi que leur groupement thiol initialement enfouis au cœur de la protéine vers la phase aqueuse, ce qui leur donne la capacité d'interagir avec les agrégats (De Wit & Swinkels, 1980; Demetriades et al., 1997b; Millqvist-Fureby et al., 2001; Paulsson & Dejmek, 1990). Il est également envisageable que des liaisons entre agrégats se forment dans la phase continue via des ponts

disulfures pour permettre de connecter les gouttelettes de matière grasse sur de plus grandes distances (Figure 105 – Cas 4). En revanche, la présence de CNM à l'interface réduit considérablement la fermeté des systèmes indiquant que les CNM ne sont pas impliquées dans la formation des interactions moléculaires et par conséquent, dans la texturation des émulsions.

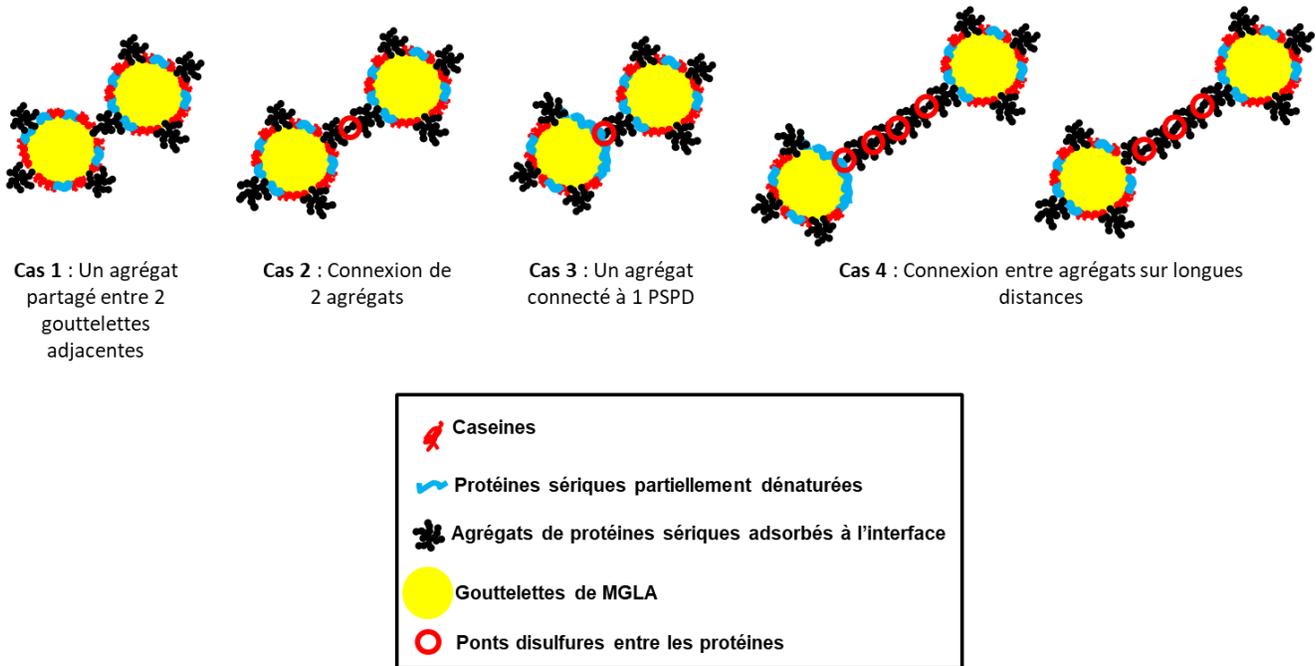


Figure 105: Mécanismes de floculation des gouttelettes de matière grasse pendant l'étape d'homogénéisation.

Durant l'homogénéisation, les interactions de faible énergie semblent peu participer aux connexions des gouttelettes de matière grasse. En effet, l'ajout de NEM réduit considérablement la texture des émulsions au cours de l'homogénéisation laissant penser que, outre le partage d'agrégats entre les interfaces de deux gouttelettes adjacentes, les ponts disulfures participent fortement à la floculation des gouttelettes durant l'homogénéisation. De plus, l'énergie mise en jeu au cours de cette étape est susceptible de rompre les interactions de faible énergie.

Pendant l'homogénéisation, la compétition entre les caséines non micellaires, les protéines sériques natives et les agrégats permet de contrôler la composition interfaciale et donc l'état de floculation dans l'homogénéisateur.

8.2 La floculation pendant l'étape de stockage

Nous avons vu dans le chapitre 5 que certaines émulsions, liquides en sortie d'homogénéisateur, se texturaient lors du stockage. Mantovani et al. (2015) ont montré que durant le stockage, la texturation des émulsions est due à la formation d'interactions moléculaires entre les entités protéiques. La nature

des interactions moléculaires formées va dépendre de la température de stockage (Chen & Dickinson, 1998).

8.2.1 Protéines adsorbées à l'interface

8.2.1.1 Stockage à 60°C

Les résultats obtenus en présence d'agent bloquant la formation de ponts disulfures (chapitre 7) ont montré que des ponts disulfures et des interactions hydrophobes se forment au cours du temps à 60°C, ce qui est en accord avec la littérature (Chen & Dickinson, 1998; Euston et al., 1999; Monahan et al., 1996; Sliwinski et al., 2003). En effet, les agrégats de protéines ont une hydrophobie de surface et un nombre de thiols libres supérieurs aux protéines sériques natives (Alting et al., 2003; Das & Kinsella, 1990; Kim, Cornec, & Narsimhan, 2005; Ruffin, Schmit, Lafitte, Dollat, & Chambin, 2014). Par conséquent, les agrégats sont plus enclins à former des interactions hydrophobes et des ponts disulfures que les protéines sériques natives et que les caséines non micellaires.

Lorsque les agrégats sont adsorbés à l'interface huile-eau, l'hydrophobie de surface des gouttelettes et le nombre de groupements thiols libres à l'interface augmentent, permettant aux gouttelettes d'être connectées pour former un réseau protéines-lipides. Les agrégats de protéines à l'interface peuvent être considérés comme des points d'ancrage pour la formation d'interactions et ainsi la texturation des émulsions. Par conséquent, le nombre d'agrégats présents à l'interface est primordial car il conditionne le nombre de liaisons susceptibles de se former lors du stockage de l'émulsion. Ainsi, plus le nombre d'agrégats à l'interface est élevé, plus le nombre de liaisons susceptibles de se former sera important et plus l'émulsion sera texturée.

L'étude des propriétés interfaciales des agrégats sur une interface modèle et *in situ* (chapitre 6) a montré que ces derniers ne s'étalent pas et qu'ils ont tendance à s'organiser sous forme d'un film épais et très hétérogène. A l'inverse, les protéines sériques natives forment un film fin et homogène. De ce fait, les agrégats qui dépassent largement de l'interface, vont être capables de connecter les gouttelettes sur de longues distances par comparaison aux protéines sériques natives. Par conséquent, en plus du nombre d'agrégats présents à l'interface, la taille des agrégats est également un paramètre à prendre en compte afin de pouvoir connecter sur des distances inter-gouttelettes élevées.

Les protéines sériques partiellement dénaturées (PSPD) vont également participer à la formation du réseau protéines-lipides en interagissant avec les agrégats ou d'autres PSPD via des interactions hydrophobes et des ponts disulfures provoquant des phénomènes de floculation et, par conséquent, une texturation du système (McClements et al., 1993). A l'inverse, l'ajout des agrégats après

homogénéisation a prouvé que les caséines non micellaires adsorbées à l'interface ne participaient pas à la formation d'interaction. C'est la raison pour laquelle, lorsque l'interface est majoritairement composée de caséines non micellaire, les émulsions restent liquides.

8.2.1.2 Refroidissement 60 – 4°C

Les résultats obtenus lors du refroidissement des émulsions en présence de NEM ont montré que la texturation des systèmes est la conséquence de la formation d'interactions hydrophobes et de liaisons hydrogènes mais également de ponts disulfures (Beveridge et al., 1984; Chen & Dickinson, 1998). Ainsi, entre 60 et 45°C, des ponts disulfures et des interactions hydrophobes se forment entre les protéines. Les liaisons hydrogènes, quant à elles, se forment continuellement tout au long du refroidissement (60 – 4°C). En effet, de récentes études ont montré que les agrégats de protéines perdent leurs feuillets β intramoléculaires lorsqu'ils sont adsorbés à l'interface. Cependant, dans le cas d'émulsions concentrées, des feuillets β intermoléculaire peuvent se former entre l'interface de deux gouttelettes adjacentes et ainsi provoquer la floculation du système puis sa texturation (Audebrand et al., 2013). Là encore, plus le nombre d'agrégats présents à l'interface est élevé, plus il y a de point d'encrage pour la formation de liaisons et plus l'émulsion sera texturée. Contrairement aux CNM, les protéines partiellement dénaturées adsorbées à l'interface participent également à la structuration du réseau protéines-lipides. La cristallisation de la matière grasse influe elle aussi sur la texture macroscopique des émulsions gel différées et gel instantanées pour des températures inférieures à 10°C, même si ce phénomène dépend fortement de la distribution de taille des gouttelettes de matière grasse et de la vitesse de refroidissement.

8.2.1.3 Chauffage 4 – 60°C

Les liaisons hydrogènes sont rompues tout au long du chauffage alors que de nouvelles interactions hydrophobes et de nouveaux ponts disulfures recommencent à se former à partir de 45°C. De plus, la fonte de la matière grasse diminue la fermeté du système.

Quelle que soit la température de stockage, ces interactions moléculaires peuvent se former entre des protéines adsorbées sur les interfaces de deux gouttelettes adjacentes mais également avec les protéines présentes dans la phase continue.

8.2.2 Protéines de la phase continue

Les entités protéiques présentes dans la phase continue vont également jouer un rôle dans la texturation des émulsions. En effet, la phase continue contient des protéines sériques natives, des caséines non micellaires et des agrégats.

8.2.2.1 Les protéines sériques natives :

Lors d'un stockage à 60°C, les protéines sériques vont partiellement se dénaturer ce qui favorise la formation d'interactions hydrophobes et de ponts disulfures. Ces interactions peuvent se créer aussi bien entre protéines présentes dans la phase continue qu'entre protéines de la phase continue et protéines adsorbées à l'interface des gouttelettes de matière grasse. Ainsi, ces protéines partiellement dénaturées font partie intégrante du réseau protéines-lipides et augmentent la force du gel (Chen & Dickinson, 1998; Dickinson & Chen, 1999; Jost et al., 1986).

Lors d'un stockage à 20 ou 4°C, les protéines sériques natives ne sont pas dénaturées et ne participent pas à la formation du réseau protéines-lipides. Par conséquent, dans ces gammes de températures, les PSN ne sont pas impliquées dans la texturation des systèmes (chapitre 7.4.4).

8.2.2.2 Les agrégats

L'ajout des agrégats après homogénéisation a mis en évidence, et ce pour toutes les températures testées, leur capacité à interagir à la fois avec les protéines sériques présentes à l'interface, sous forme d'agrégats ou non, et les agrégats contenus dans la phase continue. Lorsque les émulsions sont conservées à 60°C, les agrégats de la phase continue interagissent également avec les protéines sériques partiellement dénaturées contenues dans cette même phase. Ainsi, les agrégats participent à la formation du réseau protéines-lipides en formant différents types d'interactions fonction de la température de stockage.

8.2.2.3 Les caséines non micellaires

Contrairement aux protéines sériques natives et aux agrégats, les caséines non micellaires (CNM) ne sont pas impliquées dans la texturation des émulsions quelle que soit la température de stockage.

Les interactions moléculaires, qui dépendent de la température, vont se former aussi bien entre les protéines présentes dans la phase continue qu'entre protéines adsorbées aux interfaces.

L'influence de la phase continue (surtout à 60°C) peut expliquer en partie les différences de capacité de rétention d'eau et d'homogénéité observées entre les émulsions. En effet, plus la concentration en

protéines sériques natives et en agrégats est importante dans la phase continue, plus le réseau protéines-lipides sera développé et plus le système sera homogène avec une capacité de rétention d'eau améliorée. A l'échelle microscopique, plus la concentration en protéines dans la phase continue est importante, plus la microstructure des émulsions va évoluer d'un système hétérogène et granuleux vers une structure plus lisse et homogène.

Ces résultats, ainsi que les observations en microscopie (chapitre 6.1.4), montrent que les gouttelettes de matière grasse et les protéines sont en mesure de former un réseau protéines-lipides. Ce dernier est maintenu par différents types d'interactions, dépendant de la température de stockage, qui participent à la texture de l'émulsion. Ces interactions peuvent être des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes et/ou des ponts disulfures. Le caractère réversible des liaisons hydrogènes explique la capacité des émulsions à se re-texturer après cisaillement.

Conclusion

Stratégie de la thèse

Le projet PROFIL proposait essentiellement d'étudier les fonctionnalités des assemblages de protéines laitières afin de répondre à un enjeu sociétal fort : trouver une alternative à l'utilisation des additifs pour la texturation des émulsions laitières. Dans ce cadre, l'objectif de cette thèse était, à travers la connaissance de ces assemblages protéiques, d'arriver à moduler la connexion des gouttelettes de matière grasse en contrôlant la composition interfaciale afin de couvrir une large gamme de texture et de maîtriser ainsi les cinétiques de gélification, sans ajout d'additifs.

Surel et al. (2014) auraient montré que les agrégats de protéines laitières étaient capables de se partager entre deux gouttelettes de matière grasse adjacentes pour les connecter et texturer le système pendant la phase d'homogénéisation (émulsions gel instantanées). C'est en se basant sur ce principe que nous avons défini plusieurs hypothèses permettant de comprendre et de contrôler le mécanisme de texturation des émulsions et bâti ainsi la stratégie de cette thèse.

La connexion des gouttelettes de matière grasse dépend d'une part de la structure et de la concentration des agrégats et d'autre part, de la distance inter-gouttelettes. Ces hypothèses de départ ont permis de définir les conditions optimales de connexion des gouttelettes de matière grasse pour maîtriser la texturation des émulsions.

Production et caractérisation des agrégats de protéines laitières

Nous avons étudié le potentiel de texturation de quatre types d'agrégats que nous avons choisis :

- Les agrégats fractals branchés et peu denses
- Les microgels sphériques et denses
- Les fibrilles longues et fines
- Les agrégats mixtes correspondant à une micelle de caséine avec des agrégats de protéines sériques adsorbés à sa surface

Les fibrilles, de par leur sensibilité aux hautes pressions, ont été écartées de cette étude. A l'inverse, les capacités de connexions des gouttelettes des agrégats fractals, des microgels et des agrégats mixtes ont été testés.

Capacité des agrégats à connecter les gouttelettes de matière grasse

Nous avons ensuite étudié la capacité des agrégats à connecter les gouttelettes de matière grasse et à texturer les émulsions. Pour cela, des diagrammes d'état en fonction de la concentration en protéines

Conclusion

solubles et en agrégats (Ag-CNM) ont été réalisés pour différentes pressions d'homogénéisation et plusieurs fractions volumiques de MGLA.

Les agrégats fractals :

Les agrégats fractals sont capables de connecter et de texturer les émulsions laitières sur des gammes de fraction volumique en matière grasse allant de 5 à 30%. En fonction de la concentration en agrégats et en protéines solubles, des systèmes aux propriétés différentes ont été observés :

- Emulsion gel instantanée : la présence des agrégats engendre la texturation des émulsions pendant l'étape d'homogénéisation. Ces systèmes sont très fermes avec un aspect granuleux et hétérogène.
- Emulsion gel différée : ces systèmes sont liquides en sortie d'homogénéisateur mais vont se texturer lors du stockage des émulsions. Les cinétiques de texturation vont dépendre entre autres de la température de stockage.
- Emulsion liquide et/ou instable : dans certaines conditions, les agrégats de protéines laitières ne suffisent pas à stabiliser et texturer le système. Par conséquent, les émulsions peuvent rester liquides voire dans certain cas, se déstabiliser.
- Hétérogène : ce type de système est obtenu uniquement lorsque la fraction volumique de matière grasse est de 5%. Macroscopiquement, les émulsions hétérogènes contiennent des fragments de gel qui baignent dans du sérum leur donnant un aspect similaire à celui du lait caillé.

Les agrégats mixtes 82/18 et 56/44:

Tout comme les agrégats fractals, les agrégats mixtes permettent de connecter les gouttelettes de matière grasse et de texturer les systèmes aussi bien durant la phase d'homogénéisation (émulsion gel instantanée) qu'au cours du stockage (émulsion gel différée). Cependant, si la concentration en agrégats ou la quantité de protéines solubles est trop faible, les émulsions restent liquides ou se déstabilisent. En revanche, contrairement aux agrégats fractals, les agrégats mixtes ne permettent pas de texturer des émulsions à 5% de matière grasse.

Les microgels :

La concentration en microgels à introduire dans les émulsions pour texturer le système est largement supérieure à celle des agrégats fractals et mixtes. Ceci s'explique par la faible densité des agrégats mixtes et fractals comparée aux microgels. Par conséquent, afin d'avoir assez d'agrégats pour texturer les gouttelettes de matière grasse, la concentration en protéines devra être plus élevée pour les microgels.

Conclusion

Ainsi, Surel et al. (2014) ont bien montré la possibilité de texturer les émulsions pendant l'homogénéisation en connectant les gouttelettes de matière grasse via le partage d'un agrégat entre les interfaces de deux gouttelettes adjacentes. Cependant, dans notre cas, la texturation différée des systèmes démontre que le mécanisme décrit par Surel et al. (2014) n'est pas le seul à être impliqué dans la texturation des émulsions : ce résultat n'avait jamais été mis en évidence auparavant.

Les agrégats fractals étant très efficaces pour texturer les émulsions de manière différée (même à 5% de matière grasse), la suite de la thèse a été axée sur les systèmes fabriqués à partir de ces assemblages.

Mécanismes de texturation des émulsions gel différées en lien avec la composition interfaciale

La texturation différée des émulsions est due à une floculation des gouttelettes de matière grasse au cours du temps de stockage. L'intensité de la structuration est fortement dépendante de la température de stockage. Ces phénomènes de floculation provoqués par la présence des agrégats permettent la formation d'un réseau composé de protéines et incluant les gouttelettes de matière grasse : le réseau protéines-lipides. La différence entre la texturation instantanée et différée des émulsions est directement liée à la composition interfaciale en protéines. En effet, au cours de l'homogénéisation, une compétition interfaciale a lieu entre les caséines non micellaires, les protéines sériques natives et les agrégats. Les caséines non micellaires ont une affinité supérieure pour l'interface que les protéines sériques natives qui s'adsorbent elles-mêmes plus rapidement que les agrégats. Par conséquent, plus la quantité de protéines solubles dans l'émulsion augmente, plus il y a de caséines non micellaires à l'interface aux dépens des agrégats et plus la texturation des émulsions est retardée. Les phénomènes de texturation différée des émulsions sont la conséquence d'interactions moléculaires formées entre les protéines.

Interactions moléculaires et protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides

Les interactions moléculaires responsables de la formation du réseau protéines-lipides vont dépendre de la température de stockage des émulsions. Les variations de texture observées à l'échelle macroscopique sont directement liées aux différentes interactions impliquées dans la mise en place du réseau. Le Tableau 19 résume les différents types d'interactions moléculaires présentes dans les systèmes ainsi que leur impact sur la texture des émulsions :

Conclusion

Tableau 19: Interactions moléculaires impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides et effet sur la texture macroscopique des émulsions.

	Ponts disulfures	Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Etat physique de la MGLA	Effet sur la texture
60°C	✓	✓	✗	Liquide	↗
60°C → 45°C	✓	✓	✓	Liquide	↗
45°C → 10°C	✗	✗	✓	Liquide	↗
10°C → 4°C	✗	✗	✓	Cristallisation	↗
4°C → 45°C	✗	✗	Rupture	Fonte	↘
45°C → 60°C	✓	✓	Rupture	liquide	↘

✓	Impliqué	✗	Pas impliqué
↗	Augmentation de la texture	↘	Diminution de la texture

En effet, le réseau protéines-lipides n'est pas dû à l'existence d'un seul type d'interaction mais bien à un ensemble au sein duquel la proportion de chaque interaction va dépendre de la température de stockage. Les propriétés cicatrisantes des émulsions sont dues à l'implication d'interactions réversibles dans la formation du réseau comme les liaisons hydrogènes.

Le rôle des protéines impliquées dans la texturation des émulsions va dépendre de leur position dans le système : soit à l'interface huile-eau, soit dans la phase continue. L'interface huile-eau-E est composée de protéines sériques natives, de caséines non micellaires et d'agrégats. Les protéines sériques natives ainsi que les agrégats sont capables de former ces interactions moléculaires. En revanche, les caséines non micellaires ne participent pas à la formation du réseau. Dans la phase continue, la nature des protéines impliquées dans la connexion des gouttelettes va dépendre de la température de stockage et de l'état de dénaturation des protéines sériques (Tableau 20) :

Conclusion

Tableau 20: Protéines impliquées dans la formation du réseau protéines-lipides.

Interface H-E	60 °C	20°C	4°C
Caséines non micellaires	X	X	X
Protéines sériques partiellement dénaturées	✓	✓	✓
Agrégats	✓	✓	✓
Phase continue	60 °C	20°C	4°C
Caséines non micellaires	X	X	X
Protéines sériques partiellement dénaturées	✓	Pas de dénaturation	Pas de dénaturation
Protéines sériques natives	X	X	X
Agrégats	✓	✓	✓

Impliqué	Pas impliqué
-----------------	---------------------

Pour résumer, qu'ils soient dans la phase continue ou à l'interface, les agrégats sont impliqués dans la formation du réseau protéines-lipides. Les protéines sériques natives sont responsables de la texturation des émulsions uniquement si elles sont dénaturées ou partiellement dénaturées. A l'inverse, les caséines non micellaires ne participent pas à la texturation des émulsions.

Ainsi, en utilisant des agrégats de protéines laitières en compétition avec des caséines non micellaires et des protéines sériques natives, nous avons réussi à moduler la composition interfaciale pour arriver à retarder la texturation des émulsions. En effet, au lieu de se texturer durant l'homogénéisation, ces dernières vont se texturer au cours du stockage. Ce mécanisme de texturation met en œuvre différentes interactions moléculaires entre les protéines, y compris celles présentes à l'interface, pour former un réseau protéines-lipides. Connaissant le type d'interaction ainsi que les protéines impliquées dans la texturation des systèmes, nous pouvons également contrôler la fermeté des émulsions en modulant la température de stockage. Nous avons donc réussi à maîtriser la texture des émulsions laitières sans ajout d'additifs en contrôlant à la fois la composition interfaciale et la nature des interactions mises en

Conclusion

jeu dans la formation du réseau protéines-lipides. Les hypothèses de départ ont donc été vérifiées et de nouveaux mécanismes de texturation, très prometteurs, ont été découverts au cours de cette thèse.

Perspectives

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette étude ouvrent bien entendu des perspectives, aussi bien vers la recherche académique que vers des domaines plus appliqués.

Perspectives de recherche académique

Les résultats présentés au cours de cette thèse ont été réalisés sur des émulsions à pH neutre. Cependant, les produits laitiers peuvent être acidifiés (yaourts, fromages...) et contiennent quasi systématiquement du calcium. De ce fait, de nombreuses études sont portées sur l'influence des variations de pH et des concentrations en calcium sur l'agrégation des agrégats en solution. Dans ce travail, nous avons montré que l'interface avait un rôle primordial dans la texturation des émulsions. Ainsi, il serait intéressant d'étudier les effets du pH et du calcium sur les agrégats en émulsion, lorsqu'ils sont adsorbés à l'interface. En effet, en présence de calcium ou pour des pH plus acides, les propriétés rhéologiques des émulsions ainsi que les diagrammes d'état seront probablement modifiés.

D'autre part, les agrégats mixtes se sont avérés efficaces pour connecter les gouttelettes de matière grasse et texturer les émulsions. Cependant, très peu d'études ont été menées sur les propriétés interfaciales des agrégats mixtes. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier les propriétés d'étalement sur interface modèle et *in situ* afin de les comparer aux agrégats fractals. De plus, l'influence du ratio Mcas/PS sur la structure des agrégats mixtes à l'interface pourra également être abordée. Ces études concernant l'interface pourront être corrélées à la microstructure des systèmes afin d'expliquer les différences observées sur la texture des émulsions.

De récentes expériences ont montré que les petits agrégats ont tendance à former des émulsions hétérogènes et granuleuses. Cependant, en les mélangeant avec des agrégats de plus grosse taille, les émulsions deviennent homogènes et lisses. Ainsi, il serait judicieux de travailler sur la texturation des émulsions en utilisant des mélanges d'agrégats de taille variée et d'étudier, en parallèle, les propriétés d'étalement à l'interface de ces différents agrégats afin de contrôler les mécanismes de texturation des émulsions.

Perspectives de recherche appliquée

Les agrégats se sont montrés très intéressants pour texturer les émulsions laitières. Cependant, avant d'imaginer les utiliser en tant qu'ingrédient, il est essentiel de développer un procédé de fabrication en continu permettant de produire de grandes quantités d'agrégats. De plus, une étape de séchage devra

Perspectives

être mise en place afin de pouvoir conserver l'ingrédient et de faciliter son utilisation. Ce changement d'échelle est un préalable à leur utilisation industrielle

Les additifs actuellement utilisés dans l'industrie laitière permettent eux aussi de texturer certaines émulsions laitières. Il serait intéressant de comparer, sur des systèmes modèles, les propriétés rhéologiques des émulsions réalisées avec les agrégats et celles fabriqués avec les différents additifs de nature polysaccharidique. Ainsi, nous pourrions constater les réels avantages ainsi que les inconvénients de l'ajout d'agrégats de protéines laitières par rapport aux additifs.

Enfin, ces agrégats de protéines pourraient être incorporés directement dans une matrice « crème dessert » ou « yaourt » afin d'étudier leurs rôles dans des systèmes plus complexes et proches des produits finaux.

Bibliographie

Bibliographie

- Aberle, T., Burchard, W., Vorweg, W., & Radosta, S. (1994). Conformational Contributions of Amylose and Amylopectin to the Structural Properties of Starches from Various Sources. *Starch/Starke*, 46(9), 329–335.
- Adamcik, J., & Mezzena, R. (2012). Proteins fibrils from a polymer physics perspective. *Macromolecules*, 45(3), 1137–1150.
- Akkermans, C., Venema, P., van der Goot, A. J., Gruppen, H., Bakx, E. J., Boom, R. M., & van der Linden, E. (2008). Peptides are building blocks of heat-induced fibrillar protein aggregates of β -lactoglobulin formed at pH 2. *Biomacromolecules*, 9(5), 1474–1479.
- Ako, K., Nicolai, T., & Durand, D. (2010). Salt-induced gelation of globular protein aggregates: Structure and kinetics. *Biomacromolecules*, 11(4), 864–871.
- Almlöf, E., Larsson-Raźnikiewicz, M., Lindqvist, I., & Munyua, J. (1977). Fractionation by Size of Casein Micelles on Controlled-Pore Glass. *Preparative Biochemistry*, 7(1), 1–7.
- Alting, A. C., De Jongh, H. H. J., Visschers, R. W., & Simons, J. W. F. A. (2002). Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4682–4689.
- Alting, A. C., Hamer, R. J., De Kruif, C. G., Paques, M., & Visschers, R. W. (2003). Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 469–479.
- Alting, A. C., Hamer, R. J., De Kruif, C. G., & Visschers, R. W. (2000). Formation of disulfide bonds in acid-induced gels of preheated whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 5001–5007.
- Anema, S. G. (2007). Role of κ -casein in the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3635–3642.
- Anema, S. G., & Klostermeyer, H. (1997). Heat-Induced, pH-Dependent Dissociation of Casein Micelles on Heating Reconstituted Skim Milk at Temperatures below 100 ° C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1108–1115.
- Anema, S. G., & Li, Y. (2000). Further studies on the heat-induced, pH-dependent dissociation of casein from the micelles in reconstituted skim milk. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 33(5), 335–343.
- Anema, S. G., & Li, Y. (2003). Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal of Dairy Research*, 70(1), 73–83.
- Asakura, S. G., & Oosawa, F. (1958). Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *Journal of Polymer Science*, 33(126), 183–192.
- Audebrand, M., Ropers, M. H., & Riaublanc, A. (2013). Disappearance of intermolecular beta-sheets upon adsorption of beta-lactoglobulin aggregates at the oil-water interfaces of emulsions. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 178–185.

Bibliographie

- Aymard, P., Nicolai, T., Durand, D., & Clark, A. (1999). Static and Dynamic Scattering of β -Lactoglobulin Aggregates Formed after Heat-Induced Denaturation at pH 2. *Macromolecules*, 32(8), 2542–2552.
- B. Ribadeau-Dumas, R. G. (1989). Milk protein analysis To cite this version : Milk protein analysis. *Le Lait*, 69(5), 357–416.
- Beveridge, T., Jones, L., & Tung, M. a. (1984). Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean, and albumen protein gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 307–313.
- Bingham, E. W. (1971). Influence of Temperature and pH on the Solubility of α 1-, β - and κ -Casein. *Journal of Dairy Science*, 54(7), 1077–1080.
- Bolder, S. G., Vasbinder, A. J., Sagis, L. M. C., & van der Linden, E. (2007). Heat-induced whey protein isolate fibrils: Conversion, hydrolysis, and disulphide bond formation. *International Dairy Journal*, 17(7), 846–853.
- Bos, M. A., & Van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3), 437–471.
- Bouchoux, A., Debbou, B., Gésan-Guizieu, G., Famelart, M. H., Doublier, J. L., & Cabane, B. (2009). Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions. *Journal of Chemical Physics*, 131(16), 1–12.
- Bouchoux, A., Gésan-Guizieu, G., Pérez, J., & Cabane, B. (2010a). How to squeeze a sponge: Casein micelles under osmotic stress, a SAXS study. *Biophysical Journal*, 99(11), 3754–3762.
- Bryant, C. M., & Julian McClements, D. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, 9(4), 143–151.
- Cairolì, S., Iametti, S., & Bonomi, F. (1994). Reversible and irreversible modifications of beta-lactoglobulin upon exposure to heat. *Journal of Protein Chemistry*, 13(3), 347–354.
- Cavallieri, A. L. F., & da Cunha, R. L. (2008). The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 439–448.
- Cesàro, A. (1994). The role of conformation on the thermodynamics and rheology of aqueous solutions of carbohydrate polymers. *Journal of Food Engineering*, 22(1–4), 27–42.
- Cheeseman, G. C., & Manson, W. (1982). Proceedings of the Symposium on Recent Advances in the Chemistry and Physics, (March).
- Chen, J., & Dickinson, E. (1998). Viscoelastic properties of heat-set whey protein emulsion gels. *Journal of Texture Studies*, 29(3), 285–304.
- Chevallier, M. (2017). *Combined effect of the whey protein aggregates and caseins on dairy emulsions stability during technological treatments*. Université Bretagne Loire.
- Christie, W.W., & Clapperton, J. L. (1982). Structures of the triacylglycerols of human milk and some substitutes. *Journal of the Society of Dairy Technology*, (35), 22–24.

Bibliographie

- Creamer, L. K., & Berry, G. P. (1975). A study of the properties of dissociated bovine casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 42(1), 169–183.
- Dalgleish, D. G. (1996). Conformations and structures of milk proteins adsorbed to oil-water interfaces. *Food Research International*, 29(5–6), 541–547.
- Dalgleish, D. G. (1997). Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 8(1), 1–6.
- Dalgleish, D. G., van Mourik, L., & Corredig, M. (1997). Heat-induced interactions of whey proteins and casein micelles with different concentrations of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4806–4813.
- Dalgleish, D. G., & Law, A. J. R. (1988). pH-Induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *Journal of Dairy Science*, 55(1988), 529–538.
- Dalgleish, D. G., & Law, A. J. R. (1989). pH-Induced dissociation of bovine casein micelles. II. Mineral solubilization and its relation to casein release. *Journal of Dairy Research*, 56(1989), 727–735.
- Darling, B. Y. D. F., & Butcher, D. W. (1978). Milk-fat globule membrane in homogenized cream. *J. Dairy Res.*, 45(2), 197–208.
- Darling, B. Y. D. F., & Dickson, J. (1979). Electrophoretic mobility of casein micelles.pdf, (1979), 441–451.
- Das, K. P., & Kinsella, J. E. (1990). Effect of heat denaturation on the adsorption of β -lactoglobulin at the oil/water interface and on coalescence stability of emulsions. *Journal of Colloid And Interface Science*, 139(2), 551–560.
- Davies, D. T., & Law, A. J. R. (1983). Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. *Journal of Dairy Research*, 50(1), 67–75.
- De la Fuente, M. A., Singh, H., & Hemar, Y. (2002). Recent advances in the characterization of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trend in Food Science and Technology*, 13, 262–274.
- De Wit, J. N., & Swinkels, G. (1980). A differential scanning calorimetric study of the thermal denaturation of bovine beta-lactoglobulin. Thermal behaviour at temperatures up to 100 degrees C. *Journal of Biochim Biophys Acta.*, 624(1), 40–50.
- De Wit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2701–2710.
- De Wit, J. N. (1998). Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*, 81(3), 597–608.
- Demetriades, K., Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1997a). Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *Journal of Food Science*, 62(2), 342–347.
- Demetriades, K., Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1997b). Physicochemical properties of whey protein-stabilized emulsions as affected by heating and ionic strength. *Journal of Food Science*, 62(3), 462–467.

Bibliographie

- Desobry-Banon, S., Richard, F., & Hardy, J. (1994). Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. *Journal of Dairy Science*, 77(11), 3267–3274.
- Dickinson, E. (1991). *Food polymers, gels and colloids*. (The royal society of chemistry, Ed.).
- Dickinson, E. (1992). *Les colloïdes alimentaires* (Masson).
- Dickinson, E. (1998). Chapter 5. Rheology of Emulsions: The Relationship to Structure and Stability. In *Modern Aspects of Emulsion Science* (pp. 145–174). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 25–39.
- Dickinson, E. (2010). Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 130–140.
- Dickinson, E., & Chen, J. (1999). Heat-Set Whey Protein Emulsion Gels: Role of Active and Inactive Filler Particles. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 20(1–2), 197–213.
- Dickinson, E., & Matsumura, Y. (1994). Proteins at liquid interfaces: Role of the molten globule state. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3(1–2), 1–17.
- Dickinson, E., Mauffret, A., Rolfe, S. E., & Woskett, C. M. (1989). Adsorption at interfaces in dairy systems. *International Journal of Dairy Technology*, 42(1), 18–22.
- Djabourov, M. (1988). Architecture of gelatin gels. *Contemporary Physics*, 29(January 2013), 273–297.
- Doi, E. (1993). Gels and gelling of globular proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 4(1), 1–5.
- Donato, L., & Guyomarc'h, F. (2009a). Formation and properties of the whey protein/kappa-casein complexes in heated skim milk - A review. *Dairy Science & Technology*, 89(1), 3–29.
- Donato, L., & Guyomarc'h, F. (2009b). Formation and properties of the whey protein/ κ -casein complexes in heated skim milk – A review. *Dairy Science and Technology*, 89(1), 3–29.
- Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L., & Rouvet, M. (2009). Mechanism of formation of stable heat-induced β -lactoglobulin microgels. *International Dairy Journal*, 19(5), 295–306.
- Donnelly, W. J., McNeill, G. P., Buchheim, W., & McGann, T. C. A. (1984). A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 789(2), 136–143.
- Drelon, N. (2006). Élaboration et consolidation thermique de gels à base de substances émulsionnées cristallisables. 1–192.
- Durand, D., Christophe Gimel, J., & Nicolai, T. (2002). Aggregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins. *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications*, 304(1–2), 253–265.
- Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. a, Farrell Jr., H. M., Harwalkar, V. R., Jenness, R., & Whitney, R. M. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *J. Dairy Sci.*, 67(8), 1599–1631.

Bibliographie

- Elfagm, A. A., & Wheelock, J. V. (1978). Heat interaction between α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin and casein in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, *61*(2), 159–163.
- Elfagm, A. A., & Wheelock, J. V. (1977). Effect of Heat on Alpha-Lactalbumin and Beta-Lactoglobulin in Bovine Milk. *Journal of Dairy Research*, *44*(1977), 367–371.
- Euber, J. R., & Brunner, J. R. (1982). Interaction of κ -Casein with Immobilized β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, *65*(12), 2384–2387.
- Euston, S. R., Finnigan, S. ., & Hirst, R. . (2000). Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, *14*, 155–161.
- Euston, S. R., Finnigan, S. R., & Hirst, R. L. (1999). Kinetics of droplet aggregation in heated whey protein-stabilized emulsions: Effect of polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *16*(5), 499–505.
- Fang, Y., & Dalgleish, D. G. (1997). Conformation of β -Lactoglobulin Studied by FTIR: Effect of pH, Temperature, and Adsorption to the Oil–Water Interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, *196*(2), 292–298.
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., ... Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *Journal of Dairy Science*, *87*(6), 1641–1674.
- Foegeding, A., & McGuffey, M. (2002). Advances in modifyin and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, *13*(5), 151–159.
- Fox, P. F., & Brodtkorb, A. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, *18*(7), 677–684.
- Gaucher, I. (2007). Caractéristique de la micelle de caséine et stabilité des lait: de la collecte des laits crus au stockage des laits UHT. Agrocampus Rennes.
- Gaucheron, F. (2004). *Minéraux et produits laitiers*. (Lavoisier, Ed.) (TEC & DOC).
- Glantz, M., Håkansson, A., Lindmark Månsson, H., Paulsson, M., & Nilsson, L. (2010). Revealing the size, conformation, and shape of casein micelles and aggregates with asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering. *Langmuir*, *26*(15), 12585–12591.
- Gliguem, H., Ghorbel, D., Lopez, C., Michon, C., Ollivon, M., & Lesieur, P. (2009). Crystallization and polymorphism of triacylglycerols contribute to the rheological properties of processed cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(8), 3195–3203.
- Gosal, W. S., Clark, A. H., Pudney, P. D. A., & Ross-Murphy, S. B. (2002). Novel amyloid fibrillar networks derived from a globular protein: β -lactoglobulin. *Langmuir*, *18*(19), 7174–7181.
- Guyomarc'h, F., Law, A. J. R., & Dalgleish, D. G. (2003). Formation of soluble and micelle-bound protein aggregates in heated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(16), 4652–4660.
- Guyomarc'h, F., Queguiner, C., Law, A. J. R., Horne, D. S., & Dalgleish, D. G. (2003). Role of the soluble and micelle-bound heat-induced protein aggregates on network formation in acid skim milk gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(26), 7743–7750.

Bibliographie

- Guyomarc'h, F., Violleau, F., Surel, O., & Famelart, M.-H. (2010). Characterization of heat-induced changes in skim milk using asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multiangle laser light scattering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(24), 12592–601.
- Haque, Z., & Kinsella, J. E. (1988). Interaction between heated κ -casein and β -lactoglobulin: predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation. *Journal of Dairy Research*, *55*(1), 67.
- Havea, P., Singh, H., & Creamer, L. K. (2000). Formation of new protein structures in heated mixtures of BSA and alpha-lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(5), 1548–1556.
- Holt, C. (1992). Structure and Stability of Bovine Casein Micelles. *Advances in protein chemistry*, *43*, 63–151.
- Holt, C., de Kruif, C. G., Tuinier, R., & Timmins, P. A. (2003). Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, *213*(2–3), 275–284.
- Holt, C., & Horne, D. S. (1996). The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, *50*, 85–1.
- Huppertz, T., Kelly, A. L., & Fox, P. F. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal*, *12*(7), 561–572.
- Iametti, S., De Gregori, B., Vecchio, G., & Bonomi, F. (1996). Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of beta-lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *237*(1), 106–112.
- Imeson A. (1997). *thickening and gelling agents for food*.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, *22*(7), 1191–1202.
- Jang, H. D., & Swaisgood, H. E. (1990). Disulfide Bond Formation Between Thermally Denatured β -Lactoglobulin and κ -Casein in Casein Micelles. *Journal of Dairy Science*, *73*(4), 900–904.
- Jost, R., Baechler, R., & Masson, G. (1986). Heat gelation of oil-in-water émulsions stabilized by whey-protein. *Journal of Food Science*, *51*, 440–444.
- Ju, Z. Y., & Kilara, A. (1998). Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates. *Journal of Food Science*, *63*(2), 288–292.
- Jung, J.-M., Gunes, D. Z., & Mezzenga, R. (2010). Interfacial activity and interfacial shear rheology of native β -lactoglobulin monomers and their heat-induced fibers. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, *26*(19), 15366–75.
- Jung, J. M., Savin, G., Pouzot, M., Schmitt, C., & Mezzenga, R. (2008a). Structure of heat-induced β -lactoglobulin aggregates and their complexes with sodium-dodecyl sulfate. *Biomacromolecules*, *9*(9), 2477–2486.

Bibliographie

- Jung, J. M., Savin, G., Pouzot, M., Schmitt, C., & Mezzenga, R. (2008b). Structure of heat-induced β -lactoglobulin aggregates and their complexes with sodium-dodecyl sulfate. *Biomacromolecules*, *9*(9), 2477–2486.
- Kang, D. Y., Moon, J. M., & Lee, S. (2011). Comparison of size-exclusion chromatography and flow field-flow fractionation for separation of whey proteins. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *32*(4), 1315–1320.
- Kavanagh, G. M., Clark, a H., & Ross-Murphy, S. B. (2000). Heat-induced gelation of globular proteins: part 3. Molecular studies on low pH β -lactoglobulin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, *28*(1), 41–50.
- Kim, D. A., Cornec, M., & Narsimhan, G. (2005). Effect of thermal treatment on interfacial properties of β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, *285*(1), 100–109.
- Kinsella, J. E., & Whitehead, D. M. (1989). Proteins in Whey: Chemical, Physical, and Functional Properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, *33*(C), 343–438.
- Kiokias, S., & Bot, A. (2006). Temperature cycling stability of pre-heated acidified whey protein-stabilised o/w emulsion gels in relation to the internal surface area of the emulsion. *Food Hydrocolloids*, *20*(2–3 SPEC. ISS.), 245–252.
- Li, Z., Geisel, K., Richtering, W., & Ngai, T. (2013). Poly(N-isopropylacrylamide) microgels at the oil–water interface: adsorption kinetics. *Soft Matter*, *9*(41), 9939.
- Lin, S. H. C., Dewan, R. K., Bloomfield, V. A., & Morr, C. V. (1971). Inelastic light-scattering study of the size distribution of bovine milk casein micelles. *Biochemistry*, *10*(25), 4788–4793.
- Long, J. E., Van Winkle, Q., & Gould, I. a. (1963). Heat-Induced Interaction between Crude κ -Casein and β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, *46*(12), 1329–1334.
- López-Fandiño, R., Ramos, M., & Olano, A. (1997). Rennet Coagulation of Milk Subjected to High Pressures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(8), 3233–3237.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Bernadou, S., Keller, G., & Ollivon, M. (2002). Thermal and Structural Behavior of Milk Fat. *Journal of Colloid and Interface Science*, *254*(1), 64–78.
- Macosko, C. W., & Mewis, J. (1994). Suspension Rheology. *Rheology, Principles, Measurements and Applications*, *10*, 425–475.
- Mahmoudi, N. (2007). Impact de la structure sur les propriétés interfaciales d'agrégats de protéines globulaires du lactosérum. Thèse de doctorat en Sciences Agroalimentaires. Faculté des Sciences et des Techniques de Nantes.
- Mahmoudi, N., Axelos, M. a. V., & Riaublanc, A. (2011). Interfacial properties of fractal and spherical whey protein aggregates. *Soft Matter*, *7*(17), 7643.
- Mahmoudi, N., Gaillard, C., Boué, F., Axelos, M. A. V, & Riaublanc, A. (2010). Self-similar assemblies of globular whey proteins at the air-water interface: Effect of the structure. *Journal of Colloid and Interface Science*, *345*(1), 54–63.

Bibliographie

- Mahmoudi, N., Mehalebi, S., Nicolai, T., Durand, D., & Riaublanc, A. (2007a). Light-scattering study of the structure of aggregates and gels formed by heat-denatured whey protein isolate and β -lactoglobulin at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(8), 3104–3111.
- Mantovani, R. A., Cavallieri, Â. L. F., & Cunha, R. L. (2015). Gelation of oil-in-water emulsions stabilized by whey protein. *Journal of Food Engineering*, 1–9.
- Marangoni, A. G., Barbut, S., McGauley, S. E., Marcone, M., & Narine, S. S. (2000). On the structure of particulate gels - The case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, *14*(1), 61–74.
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *9*(5), 305–313.
- McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions, Principles, Practices, and Techniques*. (Boca Raton: CRC Press, Ed.) (Second edi).
- McClements, D. J., Monahan, F. J., & Kinsella, J. E. (1993a). Disulfide Bond Formation Affects Stability of Whey-Protein Isolate Emulsions. *Journal of Food Science*, *58*(5), 1036–1039.
- McClements, D. J., Monahan, F. J., & Kinsella, J. E. (1993b). Effect of Emulsion Droplets on the Rheology of Whey-Protein Isolate Gels. *Journal of Texture Studies*, *24*(4), 411–422.
- McGann, T. C. A., Donnelly, W. J., Kearney, R. D., & Buchhemm, W. (1980). Composition and size distribution of bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *630*(2), 261–270.
- McMahon, D. J., & Brown, R. J. (1984). Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review1. *Journal of Dairy Science*, *3*(67), 499–512.
- Mehalebi, S., Nicolai, T., & Durand, D. (2008). The influence of electrostatic interaction on the structure and the shear modulus of heat-set globular protein gels. *Soft Matter*, *4*(4), 893.
- Menard, O., Camier, B., & Guyomarc'h, F. (2005). Effect of heat treatment at alkaline pH on the rennet coagulation properties of skim milk. *Le Lait*, *85*(6), 515–526.
- Millqvist-Fureby, A., Elofsson, U., & Bergenståhl, B. (2001). Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *21*(1–3), 47–58.
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, *6*(7), 225–232.
- Monahan, F. J., McClements, D. J., & German, J. B. (1996). Disulfide-mediated Polymerization Reactions and Physical Properties of Heated WPI-stabilized Emulsions. *Journal of Food Science*, *61*(3), 504–509.
- Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1993). Critical Reviews in Food Science and Nutrition Whey protein concentrates and isolates : Processing and functional properties Whey Protein Concentrates and Isolates : Processing and Functional Properties, (August 2013), 37–41.

Bibliographie

- Müller-Buschbaum, P., Gebhardt, R., Roth, S. V., Metwalli, E., & Doster, W. (2007). Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophysical Journal*, *93*(3), 960–8.
- Murphy, R. W., Farkas, B. E., & Jones, O. G. (2016a). Dynamic and viscoelastic interfacial behavior of β -lactoglobulin microgels of varying sizes at fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, *466*, 12–19.
- Murphy, R. W., Farkas, B. E., & Jones, O. G. (2016b). Dynamic and viscoelastic interfacial behavior of β -lactoglobulin microgels of varying sizes at fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, *466*, 12–19.
- Murray, B. S. (1998). Interfacial rheology of mixed food protein and surfactant adsorption layers with respect to emulsion and foam stability. *Proteins at liquid interfaces*, 179–220.
- Nicolai, T., Britten, M., & Schmitt, C. (2011a). β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, *25*(8), 1945–1962.
- Nicolai, T., & Durand, D. (2013). Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *18*(4), 249–256.
- Norwood, E.-A., Chevallier, M., Le Floch-Fouéré, C., Schuck, P., Jeantet, R., & Croguennec, T. (2016). Heat-Induced Aggregation Properties of Whey Proteins as Affected by Storage Conditions of Whey Protein Isolate Powders. *Food and Bioprocess Technology*, *9*, 993–1001.
- Oakenfull, D.; Pearce, J., & Bruley, R. (1997). Protein Gelation. In Marcel dekker (Ed.), *Food proteins and their applications*. New York.
- Papiz, M.Z.; Sawyer, L., & Eliopoulos, (1986). The structure of β -lactoglobuline and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, *323*, 448–450.
- Patton, S., & Huston, G. E. (1986). a Method for Isolation of Milk-Fat Globules. *Lipids*, *21*(2), 170–174.
- Paulsson, M., & Dejmek, P. (1990). Thermal denaturation of whey proteins in mixtures with caseins studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Dairy Science*, *73*(3), 590–600.
- Payens, T. A. J. (1966). Association of caseins and their possible relation to structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, *49*(11), 1317–1324.
- Pettitt, D. J., Wayne, J. O. E. B., Nantz, J. J. R., & Shoemaker, F. (1995). Rheological properties of solutions and emulsions stabilized with xanthan gum and propylene glycol alginate. *Journal of food Sciences*, *60*(3), 528–531.
- Phan Xuan, M. T. (2013). *Elaboration of microgel protein particles by controlled self assembling of heat denatured beta lactoglobulin*. Thèse de doctorat en Chimie et Physico-chimie des Polymères. Université du Maine.
- Pitkowski, A., Nicolai, T., & Durand, D. (2008). Scattering and Turbidity Study of the Dissociation of Casein by Calcium Chelation. *Biomacromolecules*, *9*(1), 369–375.
- Quemada, D., & Berli, C. (2002). *Energy of interaction in colloids and its implications in rheological modeling*. *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 98).

Bibliographie

- Relkin, P. (1998). Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of α -lactoglobulin : their role in heat-induced sol – gel state transition. *Seven*, 22, 59–66.
- Robins, M. M., & Hibberd, D. J. (1998). Chapter 4. Emulsion Flocculation and Creaming. In *Modern Aspects of Emulsion Science* (pp. 115–144). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Robson, E. W., & Dalgleish, D. G. (1987). Interfacial composition of sodium caseinate émulsions. *Journal of Food Science*, 52(6), 1694–1698.
- Roefs, S. P. F. M., & De Kruif, K. G. (1994). A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry*, 226(3), 883–889.
- Rolland-Sabaté, A., Colonna, P., Mendez-Montealvo, M. G., & Planhot, V. (2007). Branching features of amylopectins and glycogen determined by asymmetrical flow field flow fractionation coupled with multiangle laser light scattering. *Biomacromolecules*, 8(8), 2520–2532.
- Roth, S., Roth, S., Murray, B. S., Murray, B. S., Dickinson, E., & Dickinson, E. (2000). Interfacial shear rheology of aged and heat-treated beta-lactoglobulin films: Displacement by nonionic surfactant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1491–1497.
- Ruffin, E., Schmit, T., Lafitte, G., Dollat, J. M., & Chambin, O. (2014). The impact of whey protein preheating on the properties of emulsion gel bead. *Food Chemistry*, 151, 324–332.
- Sawyer, W. H. (1969). Complex between β -lactoglobulin and κ -casein. A review. *Journal of Dairy Science*, 52(9), 1347–1355.
- Schmitt, C., Bovay, C., Vuillomenet, A. M., Rouvet, M., Bovetto, L., Barbar, R., & Sanchez, C. (2009). Multiscale characterization of individualized β -lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions. *Langmuir*, 25(14), 7899–7909.
- Schmitt, C., Moitzi, C., Bovay, C., Rouvet, M., Bovetto, L., Donato, L., ... Stradner, A. (2010). Internal structure and colloidal behaviour of covalent whey protein microgels obtained by heat treatment. *Soft Matter*, 6(19), 4876.
- Schokker, E. P., Singh, H., & Creamer, L. K. (2000). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 10(2000), 843–853.
- Schokker, E. P., Singh, H., Pinder, D. N., Norris, G. E., & Creamer, L. K. (1999). Characterization of intermediates formed during heat-induced aggregation of β -lactoglobulin AB at neutral pH. *International Dairy Journal*, 9(11), 791–800.
- Singh, H., & Creamer, L. K. (1991). Aggregation and Dissociation of Milk Protein Complexes in Heated Reconstituted Concentrated Skim Milks. *Journal of Food Science*, 56(1), 238–246.
- Singh, H., & Fox, P. F. (1986). Heat stability of milk: further studies on the pH-dependent dissociation of micellar κ -casein. *Journal of Dairy Research*, 53(2), 237.
- Singh, H., & Fox, P. F. (1987). Heat stability of milk: role of β -lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar κ -casein. *Journal of Dairy Research*, 54(4), 509–521.

Bibliographie

- Sliwinski, E. L., Roubos, P. J., Zoet, F. D., Van Boekel, M. a J. S., & Wouters, J. T. M. (2003). Effects of heat on physicochemical properties of whey protein-stabilised emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31(1–4), 231–242.
- Smits, P., & Van Brouwershaven, J. H. (1980). Heat-induced association of β -lactoglobulin and casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 47(1980), 313–325.
- Sok Line, V. L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2005). Cold gelation of β -lactoglobulin oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 269–278.
- Sullivan, R. A., Fitzpatrick, M. M., & Stanton, E. K. (1959). Distribution of κ -Casein in Skim Milk. *Nature*, 183(4661), 616–617.
- Surel, C., Foucquier, J., Perrot, N., Mackie, a., Garnier, C., Riaublanc, a., & Anton, M. (2014). Composition and structure of interface impacts texture of O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 34, 3–9.
- Thompson M.P., & Farrell H.M. (1973). The casein micelle-the forces contributing to its integrity. *Eastern Regional Research Laboratory*.
- Timms, R. E. (1980). The phase behaviour and polymorphism of milk fat, milk fat fractions and fully hardened milk fat. *Australian Journal of Dairy Technology*, 35(2), 47–53.
- van der Linden, E., & Venema, P. (2007). Self-assembly and aggregation of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4–5), 158–165.
- Veerman, C., Ruis, H., Sagis, L. M. C., & van der Linden, E. (2002a). Effect of electrostatic interactions on the percolation concentration of fibrillar β -lactoglobulin gels. *Biomacromolecules*, 3(4), 869–873.
- Veerman, C., Ruis, H., Sagis, L. M. C., & van der Linden, E. (2002b). Effect of electrostatic interactions on the percolation concentration of fibrillar beta-lactoglobulin gels. *Biomacromolecules*, 3(4), 869–73.
- Walstra, P. (1990). On the Stability of Casein Micelles. *Journal of Dairy Science*, 73(8), 1965–1979.
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: Do they exist? *International Dairy Journal*, 9(3–6), 189–192.
- Walstra, P. (2003). *Physical Chemistry of foods*. (Marcel Dekker, Ed.). New York.
- Zhao, H., Brown, P. H., & Schuck, P. (2011). On the distribution of protein refractive index increments. *Biophysical Journal*, 100(9), 2309–2317.
- Ziegler, G. R., & Foegeding, E. A. (1990). The gelation of proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 34, 203–298.

Thèse de Doctorat

Thibault LOISELEUX

Compétition interfaciale entre protéines solubles et agrégées: connectivité des gouttelettes et texture des émulsions laitières

Interfacial competition between soluble and aggregated proteins: droplets
connectivity and dairy emulsions texture

Résumé

La texture de nombreux produits laitiers gras, non fermentés, est généralement obtenue grâce à l'utilisation d'additifs alimentaires ajoutés dans un but purement technologique. De nos jours, la suppression de ces derniers dans les aliments est une réelle demande sociétale. Afin de répondre à cet enjeu, ce projet de thèse a pour ambition de trouver un mécanisme alternatif de texturation des émulsions en utilisant différents types d'agrégats de protéines laitières sans recours aux additifs. En effet, dans certaines conditions physico-chimiques, ces agrégats sont capables de connecter les gouttelettes de matière grasse pour former un réseau qui pourrait, une fois les conditions maîtrisées, contrôler la texture des émulsions. Pour cela, des émulsions ont été fabriquées en faisant varier la concentration en différents types d'agrégats, en protéines sériques natives et en caséines non micellaires. En maîtrisant la nature des protéines présentes à l'interface, il est possible de couvrir une large gamme de texture. De plus, suivant la concentration en agrégats à l'interface, il est également envisageable de contrôler les cinétiques de texturation des émulsions qui peuvent être texturées aussi bien durant l'homogénéisation qu'au cours du stockage. Ainsi, en contrôlant la compétition pour couvrir les interfaces et les interactions moléculaires, nous avons montré que la texture macroscopique des émulsions peut être directement corrélée à la composition interfaciale. Ce mécanisme de texturation utilisant des agrégats de protéines constitue une sérieuse piste pour la substitution des additifs dans les émulsions laitières afin de proposer aux consommateurs des produits plus naturels.

Mots clés

Interfaces huile/eau ; Emulsions laitières ; Agrégats de protéines laitières ; Texture

Abstract

The texture of many unfermented fat dairy products is generally obtained by using food additives added for purely technological purpose. Nowadays, the removal of these in foodstuffs is a real societal request. In order to provide an answer to this challenge, this thesis project aims to find an alternative texturing mechanism for emulsions by using different types of milk protein aggregates without using additives. Indeed, under some physicochemical conditions, these aggregates are able to connect the fat droplets in order to form network which, once the conditions had been understood, could control the texture of the emulsions. For this purpose, emulsions were produced by varying the concentration of different aggregate types, native whey proteins and non-micellar caseins. By controlling the nature of the proteins present at the interface, it allows to cover a wide range of texture. Moreover, depending on the aggregate concentration at the interface, it is also possible to control the texturing kinetics of the emulsions which can be textured both during the homogenization step and during storage. Thus, by controlling the competition to cover the interfaces and the interactions between proteins, we have shown that the macroscopic texture of the emulsions can be directly correlated with the interfacial composition. This texturing mechanism using protein aggregates is a serious way for the substitution of additives in dairy emulsions in order to offer consumers more natural products.

Key Words

Oil/water interfaces; Dairy emulsions; Milk protein aggregates; Texture