

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600  
*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*  
Spécialité : Sciences de l'aliment

Par

**Perrine GELEBART**

## **Modulation de la texture de gels acides laitiers par addition d'agrégats de protéines laitières**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 3 Avril 2019  
Unité de recherche : INRA UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Rémi SAUREL, Professeur, AgroSup Dijon  
Sylvie DESOBRY-BANON, Professeur, IUT Nancy-Brabois, Université de Lorraine

### **Composition du Jury :**

Président : Jack LEGRAND, Professeur, Université de Nantes  
Examineurs : Jack LEGRAND, Professeur, Université de Nantes  
Sylvie MARCHESSEAU, Professeur, Université de Montpellier

Dir. de thèse : Marc ANTON, Directeur de recherche, Institut National de Recherche Agronomique, Nantes  
Co-dir. de thèse : Catherine GARNIER, Chargée de recherche, Institut National de Recherche Agronomique, Nantes

### **Invité(s)**

Alain RIAUBLANC, Chargé de recherche, Institut National de Recherche Agronomique, Nantes  
Marie-Hélène FAMELART, Chargée de recherche, Institut National de Recherche Agronomique, Rennes  
Benoit GOLDSCHMIDT, Directeur de recherche, Fromagerie BEL, Vendôme

Au cours de trois années de thèse il y a énormément de gens à remercier pour de nombreuses raisons et j'espère avoir une pensée pour tout le monde et si ce n'est pas le cas, cela ne veut pas dire que je ne vous remercie pas très chaleureusement !

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury de thèse. Merci à Mme Sylvie Desobry-Banon, M. Rémi Saurel, Mme Sylvie Marchesseau et M. Jack Legrand d'avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Je remercie également mon directeur de thèse, Marc Anton, d'avoir accepté de diriger cette thèse ainsi que mes encadrants : Catherine Garnier, Alain Riaublanc et Marie-Hélène Famelart pour leur disponibilité et leur soutien durant ce doctorat. Merci à vous pour votre sympathie, j'ai apprécié de travailler avec vous. Merci à Benoit Goldschmidt et une seconde fois à Sylvie Marchesseau de m'avoir consacré du temps au cours de ces trois années en participant au comité de suivi de thèse et en participant à la soutenance.

Merci aux régions Bretagne et Pays de la Loire pour le financement du projet PROFIL dont cette thèse fait partie. Merci à Joëlle Léonil pour la coordination scientifique et à BBA pour la gestion du projet. Je remercie également Morgane Raison, Stéphan Rouverand et Karine Le Roux pour leur accompagnement et leur implication dans l'organisation du projet PROFIL et des comités techniques. Je remercie également tous les industriels et les partenaires académiques ayant participé à ce projet.

Je tiens à remercier l'INRA et plus particulièrement l'équipe ISD de BIA pour l'accueil et tous les moyens humains et matériels mis en œuvre pour mener à bien cette thèse. Je remercie Camille et Valérie pour leur aide pour de nombreuses expériences menées au cours de ma thèse et pour leur disponibilité. Je n'aurais pas pu acquérir l'ensemble de mes résultats sans vous. Je tiens également à remercier Bérénice, Véronique, Geneviève et Bruno pour leur aide ainsi que l'ensemble de l'équipe Interface et Systèmes Dispersés pour leur accueil, leur collaboration et leur sympathie.

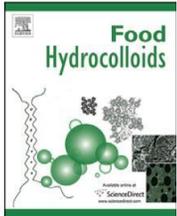
Je souhaite également remercier les doctorants PROFIL et plus particulièrement Thibault, dont l'aide a été précieuse notamment en début de thèse. Je remercie également un ancien doctorant de l'INRA William, qui m'aura apporté son aide pour les présentations orales et le début de la rédaction de l'article en anglais. Merci à mes collègues de mon premier bureau Bérénice, Camille et Adeline qui m'ont supporté les deux premières années et à mes nouvelles collègues de bureau de dernière année : Doina et Chloé qui m'ont supporté dans la dernière ligne droite. Merci à Marie, Alice, Line, Maude, Kevin, Thibault et Yves pour les échanges au travail et surtout les soirées indispensables pour décompresser. Merci à Yves une seconde fois pour ton aide concernant la rédaction et la relecture de l'article.

Je remercie tous mes proches, ma famille et mes amis très anciens ou plus récents présents ou non à la soutenance de thèse.

Enfin, je conclurai ces remerciements par mes parents qui ont été présente tout au long de ces trois ans et m'ont toujours soutenu, merci mille fois !!! Merci à tous...

# Communications

## Publication



P. Gélébart, A. Riaublanc, M-H. Famelart, C. Jonchère, V. Beaumal, M. Anton and C. Garnier, “Protein aggregates modulate the texture of emulsified and acidified acid milk gels”, *Food Hydrocolloids*, vol. 93, pp.176 - 188, 2019.

## Communications écrites



P. Gélébart, “Texturizing acidified and emulsified model systems by interface control”, *Rhéologie*, vol. 30, 2016.

## Poster



P. Gélébart, A. Riaublanc, M-H. Famelart, M. Anton et C. Garnier, “Modulation de la texture de systèmes modèles émulsifiés et acidifiés par addition d’agrégats de protéines laitières”, Colloque PROFIL : La plasticité des protéines du lait, Rennes, France, 21 septembre 2017.

## Communications orales



P. Gélébart, A. Riaublanc, M-H. Famelart, M. Anton et C. Garnier, “Texturizing acidified and emulsified model systems by interface control”, Journées Jeunes Rhéologue (Groupe Français de Rhéologie), Belle-Île-en-Mer, France, 30-31 Mai et 1<sup>er</sup> Juin 2016.



P. Gélébart, A. Riaublanc, M-H. Famelart, M. Anton and C. Garnier, “Modulation of the texture of emulsified and acidified model systems by the addition of protein aggregates”, Nantes, France, 29-30 November and 1<sup>st</sup> December 2017.



P. Gélébart, A. Riaublanc, M-H. Famelart, C. Jonchère, V. Beaumal, M. Anton and C. Garnier, “Protein aggregates modulate the texture of emulsified and acidified dairy model systems”, Leeds, United-Kingdom, 8-11 April 2018.



P. Gélébart, A. Riaublanc, M-H. Famelart, C. Jonchère, V. Beaumal, M. Anton and C. Garnier, “How protein aggregates can modulate the texture of emulsified and acidified dairy model systems”, Montreal, Canada, 3-6 June 2018.

# Table des matières

Liste des abréviations .....	15
Introduction générale.....	17
Chapitre 1 : Etat de l'art .....	25
I.1- Le lait .....	27
I.1.1- Composition générale .....	27
I.1.2- La matière grasse laitière .....	28
1.1.2.1- Composition lipidique .....	28
1.1.2.2- Propriétés physiques de la matière grasse .....	29
1.1.2.3- Globule gras et matière grasse laitière anhydre .....	30
I.2- Les protéines du lait .....	30
I.2.1- Les micelles de caséines.....	30
I.2.1.1- Modèle à structure ouverte .....	31
I.2.1.2- Modèle noyau-coque .....	32
I.2.1.3- Modèle éponge .....	32
I.2.1.4- Effet des traitements physiques sur les micelles de caséines.....	33
I.2.2- Les protéines du lactosérum .....	34
I.2.2.1- Généralité sur les protéines du lactosérum .....	34
I.2.2.2- Agrégation des protéines sériques ou de la $\beta$ -lactoglobuline.....	36
I.3- Formation d'agrégats protéiques.....	41
I.3.1- Les agrégats fractals.....	42
I.3.2- Les agrégats microgels .....	43
I.3.3- Les agrégats fibrillaires.....	44
I.3.4- Les agrégats mixtes .....	46
I.3.5- Stabilité des solutions de protéines et des agrégats de protéines laitières .....	48
I.4- Les émulsions laitières .....	50
I.4.1- Déstabilisation des émulsions.....	51
I.4.1.1- Le crémage .....	51
I.4.1.2- La coalescence.....	52
I.4.1.3- La floculation.....	52
I.4.2- Emulsification et tensioactifs .....	53

I.4.3- Stabilisation des émulsions par les protéines .....	54
I.4.4- Propriétés interfaciales des protéines laitières .....	56
I.5- Les yaourts .....	58
I.5.1- Fabrication des yaourts .....	60
I.5.1.1- Standardisation des teneurs des constituants du lait .....	60
I.5.1.2- Homogénéisation du lait .....	61
I.5.1.3- Traitement thermique du lait.....	61
I.5.1.4- Acidification du lait.....	65
I.5.2- Paramètres influençant la texture des yaourts.....	66
I.6- Influence des agrégats protéiques sur les gels acides laitiers.....	68
1.7- Conclusion .....	70
Chapitre 2 : Stratégie de l'étude .....	73
Chapitre 3 : Matériels et méthodes .....	79
III.1 - Matières premières laitières .....	81
III.1.1- Poudre de lait .....	81
III.1.2- Protéines sériques (WPI).....	81
III.1.3- Caséines micellaires (Cas) .....	81
III.1.4- Perméat de lait ultrafiltré (PUF).....	82
III.1.5- Matière grasse laitière anhydre (MGLA).....	82
III.2- Préparation des agrégats protéiques.....	83
III.2.1- Agrégats fractals.....	83
III.2.2- Agrégats fibrillaires .....	84
III.2.3- Agrégats microgels .....	84
III.2.4- Agrégats mixtes.....	85
III.3- Caractérisation des agrégats protéiques .....	86
III.3.1- Microscopie Electronique en Transmission (MET).....	86
III.3.2- Diffusion dynamique de la lumière .....	86
III.4- Préparation du lait reconstitué .....	88
III.4.1- Préparation du lait reconstitué avec ou sans matière grasse (protocole classique) .....	88
III.4.2- Modulation des conditions expérimentales .....	89
III.4.2.1- Augmentation de l'aire d'interface .....	89
III.4.2.2- Variation de la taille des agrégats fractals ajoutés .....	89

III.4.3- Interface contrôlée (ajout d'une émulsion à 30% MG).....	90
III.4.4- Contrôle de la formation de pont disulfure au cours du procédé .....	92
III.4.5- Systèmes laitiers enrichis en matière grasse et homogénéisés à différentes pressions .....	92
III.5- Caractérisations et analyses des systèmes laitiers.....	93
III.5.1- Quantification des protéines du lait par gel SDS PAGE après agrégation thermique.....	93
III.5.2- Taille des gouttelettes de matière grasse .....	94
III.5.3- Caractérisations rhéologiques.....	96
III.5.3.1- Analyse de la formation des gels acides laitiers (lait des paragraphes III.4.1 à III.4.5) .....	97
III.5.3.2- Analyse des émulsions laitières enrichies en matière grasse (lait du III.4.6) :.....	98
III.5.4- Microscopie confocale .....	99
III.5.5- Analyse de la synérèse .....	101
III.5.6- Détermination de la composition de l'interface .....	101
III.5.6.1- Concentration interfaciale .....	101
III.5.6.2- Composition de l'interface.....	104
III.6- Analyse en MET de l'interface.....	105
Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique.....	107
IV.1- Caractérisation des agrégats protéiques .....	110
IV.1.1- Agrégats fractals .....	110
IV.1.2- Agrégats microgels.....	111
IV.1.3- Agrégats mixtes.....	113
IV.1.4- Agrégats fibrillaires .....	113
IV.2- Quantification des protéines sériques natives résiduelles après traitement thermique.....	114
IV.2.1- Echantillons analysés .....	114
IV.2.2- Analyse des surnageants des laits témoins en SDS-PAGE .....	115
IV.2.3- Evaluation de la quantité de protéines sériques natives résiduelles des surnageants .....	116
IV.3- Conclusions .....	117
Chapitre 5 : Texturation des gels acides maigres par ajout d'agrégats protéiques .....	119
V.1- Propriétés rhéologiques des gels acides laitiers témoins.....	122
V.2- Ajout de protéines sériques natives .....	125
V.2.1- Propriétés rhéologiques des gels acides maigres avec ajout de PS.....	125
V.2.1.1- Gels acides maigres avec ajout de PS et sans traitement thermique.....	125

V.2.1.2- Gels acides maigres avec ajout de PS et traitement thermique .....	126
V.2.2- Synérèse des gels acides maigres avec ajout de PS .....	129
V.2.2- Microstructure des gels acides maigres avec ajout de PS .....	130
V.3- Ajout d'agrégats fibrillaires .....	131
V.4- Ajout d'agrégats fractals .....	133
V.4.1- Propriétés rhéologiques des gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals .....	134
V.4.1.1- Gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals (S1) sans traitement thermique .....	134
V.4.1.2- Gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals (S1) et traitement thermique .....	134
V.4.1.3- Gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals (S2) et traitement thermique .....	137
V.4.2- Synérèse des gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals .....	140
V.4.2- Microstructure des gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals .....	140
V.5- Ajout d'agrégats microgels .....	141
V.5.1- Analyses rhéologiques des gels acides maigres avec ajout d'agrégats microgels .....	142
V.5.2- Synérèse des gels acides maigres avec ajout d'agrégats microgels .....	143
V.6- Ajout d'agrégats mixtes .....	144
V.6.1- Propriétés rhéologiques des gels acides maigres en présence d'agrégats mixtes .....	144
V.6.2- Synérèse des gels acides maigres avec ajout d'agrégats mixtes .....	145
V.7- Conclusions sur les systèmes laitiers maigres .....	146
Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques .....	149
VI.1- Gels acides gras laitiers témoin à 3,5% de matière grasse .....	152
VI.2- Ajout de protéines sériques .....	153
VI.2.1- Propriétés rhéologiques des gels acides gras avec ajout de PS .....	153
VI.2.2- Analyse de la synérèse sur les gels acides gras avec ajout de PS .....	156
VI.2.3- Microstructure d'un gel acide gras avec ajout de 1% de PS .....	157
VI.2.4- Augmentation de la teneur en protéines : comparaison des propriétés d'un gel acide avec 1% de PS et d'un gel acide à 4,5% de protéines, provenant de la poudre de lait .....	158
VI.3- Influence de l'ajout d'agrégats fractals .....	159
VI.3.1- Propriétés rhéologiques des gels acides gras + agrégats fractals .....	159
VI.3.2- Analyse de la synérèse sur les gels acides gras avec ajout d'agrégats fractals .....	161
VI.2.3- Microstructure d'un gel acide gras avec ajout de 1% d'agrégats fractals .....	162
VI.4- Ajout d'agrégats microgels .....	163

VI.4.1- Propriétés rhéologiques des gels acides gras avec ajout d'agrégats microgels .....	163
VI.4.2- Evolution de la synérèse sur les gels acides gras avec ajout d'agrégats microgels .....	165
VI.4.3- Analyse en microscopie confocale d'un gel acide gras avec ajout de 1% d'agrégats microgels .....	165
VI.5- Ajout d'agrégats mixtes .....	166
VI.5.1- Propriétés rhéologiques des gels acides gras avec ajout d'agrégats mixtes .....	166
VI.5.2- Evolution de la synérèse sur les gels acides gras avec ajout d'agrégats mixtes .....	168
VI.5.3- Microstructure d'un gel acide gras avec ajout de 1% d'agrégats mixtes .....	168
VI.6- Détermination de la composition interfaciale de gels acides gras laitiers .....	170
VI.7- Conclusions sur les gels acides gras laitiers .....	172
Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ? .....	175
VII.1- Variation de la pression d'homogénéisation pour des gels acides laitiers à 3,5% de matière grasse .....	179
VII.2- Propriétés rhéologiques des gels acides laitiers à 10% matière grasse homogénéisés à 100 ou 500 bars .....	183
VII.3- Variation de la taille des agrégats fractals ajoutés dans des laits à 3,5 ou 10% de MG et homogénéisés à 100 ou 500 bars .....	185
VII.4- Composition interfaciale des laits à 10% de MG et homogénéisé à 100 bars .....	190
VII.5- Microstructure des gels acides à 10% de MG et homogénéisés à 100 bars .....	192
VII.6- Etudes des interactions se mettant en place au cours de la formation des gels acides laitiers contenant de la matière grasse .....	194
VII.7- Gels laitiers à 3,5% de MG (à interface contrôlée) .....	199
VII.8- Systèmes laitiers à 15% de matière grasse avec variation de la pression d'homogénéisation ...	207
VII.9- Conclusions sur la variation de la surface interfaciale .....	213
Chapitre 8 : Discussion générale .....	215
8.1- Structuration du réseau protéique des gels acides laitiers sans matière grasse .....	218
8.2- Structuration du réseau protéique et formation de l'interface des gouttelettes de matière grasse des gels acides laitiers à 3,5% de MG .....	220
8.3- Forcer les agrégats à aller à l'interface dans des systèmes laitiers .....	222
Conclusions .....	225
Perspectives .....	233
Bibliographies .....	237



## Table des figures

<b>Figure 1</b> : Composition globale du lait en g/L de lait (d'après Cayot & Lorient, 1998) .....	27
<b>Figure 2</b> : Composition minérale du lait avec les valeurs entre parenthèse en mg/L (Cayot & Lorient, 1998; Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989).....	28
<b>Figure 3</b> : Modèle à structure ouverte d'une micelle de caséines (HOLT et HORNE, 1996) .....	32
<b>Figure 4</b> : Modèle éponge de la micelle de caséines (BOUCHOUX et al, 2010) .....	33
<b>Figure 5</b> : Comparaison de la taille des protéines du lactosérum avec une micelle de caséines de taille moyenne (rayon : 50 nm). $\alpha$ -LA : 1,8 nm ; dimère de $\beta$ -LG : 3,5 nm ; BSA : 4 nm; tétrade d'IgG : 6 nm. (de Wit, 1998).....	36
<b>Figure 6</b> : Etape de l'agrégation thermique de la $\beta$ -lactoglobuline (d'après Roefs & De Kruif, 1994) .....	38
<b>Figure 7</b> : Représentation schématique du comportement thermique de la $\beta$ -lactoglobuline à un pH > 6,8 entre 20 °C et 150 °C (de Wit, 2009) .....	39
<b>Figure 8</b> : Modèle de dissociation et d'association des monomères et dimères de $\beta$ -lactoglobuline en fonction de la température (RELKIN, 1998) .....	40
<b>Figure 9</b> : Observation MET de différents agrégats de $\beta$ -lg obtenus par chauffage à une concentration de 1% et à différents pH : (A) fibrilles à pH 2 ; (B) agrégats sphériques (microgels) à pH 5,8 ; (C) agrégats fractals à pH 7 (Jung et al., 2008) .....	41
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique du processus d'agrégation de la $\beta$ -lg à pH 7 (d'après Aymard, Gimel, Nicolai, & Durand, 1996; Nicolai et al., 2011).....	42
<b>Figure 11</b> : Mécanisme de la conversion des protéines globulaires en fibrilles amyloïdes (Adamcik & Mezzenga, 2012) .....	45
<b>Figure 12</b> : Effet du pH (inférieur ou supérieur à 6,7) et de la température (inférieure ou supérieure à 70 °C) sur la formation des agrégats mixtes (Anema & Li, 2000).....	47
<b>Figure 13</b> : Hypothèses possibles du mécanisme de formation des agrégats mixtes (Donato & Guyomarc'h, 2009).....	48
<b>Figure 14</b> : Stabilité des agrégats en solution au cours d'un traitement thermique à 120 °C (Chevallier, 2017).....	49
<b>Figure 15</b> : Déstabilisation des émulsions huile-eau (d'après Surel, 2012).....	53
<b>Figure 16</b> : Représentation schématique de la conformation d'une protéine flexible et d'une protéine globulaire à une interface huile-eau (d'après Surel, 2012) .....	56
<b>Figure 17</b> : Etapes de l'adsorption des protéines à l'interface (SUREL, 2012) .....	56
<b>Figure 18</b> : Etapes de fabrication des yaourts (d'après Lucey & Singh, 1998) .....	60
<b>Figure 19</b> : Interactions entre micelles de caséines et protéines du lactosérum après un traitement thermique (10 min/80 °C) à des pH allant de 6,35 à 6,9. Petits cercles = protéines du lactosérum dénaturées, grands cercles = micelles de caséines. Les protéines de lactosérum natives ne sont pas incluses sur la figure (Vasbinder & De Kruif, 2003).....	63
<b>Figure 20</b> : Système Couette (Entrefer : 5 mm ; hauteur : 13,5 cm ; rayon interne : 2,5 cm) .....	84
<b>Figure 21</b> : Etapes de préparation d'un yaourt avec matière grasse .....	89
<b>Figure 22</b> : Schéma récapitulatif des tests spécifiques sur la modulation de la surface interfaciale et l'utilisation d'une interface contrôlée.....	92
<b>Figure 23</b> : Rhéomètre AR2000 équipé d'un système Couette et couplé à une électrode pH .....	97

<b>Figure 24</b> : Cinétique thermique pour visualiser le comportement des émulsions au court du traitement thermique.....	99
<b>Figure 25</b> : Schéma du fonctionnement de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL).....	100
<b>Figure 26</b> : Technique de caractérisation des films interfaciaux (d'après Patton & Huston, 1986) .....	103
<b>Figure 27</b> : Dispersion de tailles en intensité pour les solutions d'agrégats fractals (50 g/l, pH 7) selon la quantité de chlorure de sodium ajoutée .....	111
<b>Figure 28</b> : Micrographies en MET d'agrégats fractals avec une concentration variable de chlorure de sodium (A : sans chlorure de sodium, B : 20 mM et C : 45 mM) échelle : 0,2 $\mu$ m .....	111
<b>Figure 29</b> : Dispersion de tailles en intensité pour des solutions d'agrégats microgels (50 g/l, pH 5,8) ..	112
<b>Figure 30</b> : Micrographies en MET d'agrégats microgels (échelle : 1 $\mu$ m).....	112
<b>Figure 31</b> : Micrographies en MET d'agrégats mixtes) (échelle : 0,2 $\mu$ m).....	113
<b>Figure 32</b> : Micrographies en MET d'agrégats fibrillaires (échelle : 0,2 $\mu$ m) .....	114
<b>Figure 33</b> : Electrophorèse de la composition des surnageants des laits témoins non traité thermiquement (NT) et traité thermiquement 11 min (11') et 20 min (20') en condition réductrice .....	115
<b>Figure 34</b> : Evolution des modules G' et G'' et du pH lors de l'acidification à 40 °C d'un gel acide maigre témoin à J0 .....	122
<b>Figure 35</b> : Evolution de tan $\delta$ en fonction du pH (A) et balayage en fréquence (B) de 4 gels acides maigres témoins à J0 .....	124
<b>Figure 36</b> : Evolution des modules G' et G'' lors de l'acidification à 40 °C de gels acides maigres avec l'ajout de 0,2 à 0,6% PS .....	126
<b>Figure 37</b> : Evolution du G' final en fonction de la quantité de protéines sériques ajoutée (fréquence de 1 rad/s) .....	128
<b>Figure 38</b> : Evolution de tan $\delta$ en fonction du pH (A) et balayage en fréquence (B) pour un gel acide de lait témoin à J1 et des échantillons avec de 0,2 à 0,6% PS ajouté avant le traitement thermique .....	128
<b>Figure 39</b> : Analyse du pourcentage de synérèse en fonction du temps de stockage à 4 °C et de la quantité de protéines sériques ajoutées .....	130
<b>Figure 40</b> : Photographies en microscopie confocale de gels acides maigres (témoin, 0,2% ; 0,4% et 0,6% PS) x20 et x40 zoom 5 .....	130
<b>Figure 41</b> : Evolution des modules G' et G'' et du pH lors de l'acidification à 40 °C d'un gel acide maigre contenant 0,6% d'agrégats fibrillaires.....	132
<b>Figure 42</b> : Agrégats fibrillaires analysés en microscopie électronique en transmission à pH 2 (gauche) et pH 6,7 (droite) .....	132
<b>Figure 43</b> : Dispersion de tailles en intensité pour deux suspensions d'agrégats fractals (50 g/L, pH 7, 45 mM de NaCl).....	133
<b>Figure 44</b> : Evolution du G' final en fonction de la quantité d'agrégats fractals (S1) ajoutée et des conditions expérimentales : jour de mesure et ajout des agrégats avant ou après le traitement thermique.....	136
<b>Figure 45</b> : Evolution du G' final en fonction de la quantité d'agrégats fractals (S2) ajoutée .....	139
<b>Figure 46</b> : Evolution du pourcentage de synérèse en fonction de la quantité d'agrégats fractals ajoutée .....	140
<b>Figure 47</b> : Photographies en microscopie confocale de gels acides maigres (témoin, 0,2% ; 0,4% et 0,6% d'agrégats fractals) x20 et x40 zoom 5.....	141

<b>Figure 48</b> : Evolution du G' final en fonction de la quantité de microgels ou de protéines sériques ajoutée .....	142
<b>Figure 49</b> : Evolution du pourcentage de synérèse en fonction de la quantité d'agrégats microgels ajoutée.....	143
<b>Figure 50</b> : Evolution du G' final en fonction de la quantité d'agrégats mixtes ou de protéines sériques ajoutée.....	145
<b>Figure 51</b> : Evolution du pourcentage de synérèse en fonction de la quantité d'agrégats mixtes ajoutée .....	145
<b>Figure 52</b> : Dispersion de taille des gouttelettes de matière grasse d'un lait témoin à 3,5% MG (100 bars) .....	152
<b>Figure 53</b> : Evolution du G' final en fonction de la quantité de protéines sériques natives ajoutée (gels acides maigres ou gras) .....	154
<b>Figure 54</b> : Analyse de la synérèse dans le temps des gels acides gras (3,5% MG) avec ajout de protéines sériques natives.....	156
<b>Figure 55</b> : Photographies en microscopie confocale de gels acides gras (3,5% MG) témoin et contenant 1% de PS .....	157
<b>Figure 56</b> : Comparaison de l'analyse de la synérèse dans le temps des gels acides gras (3,5% MG) avec ajout de 1% PS et 4,5% de protéines de poudre de lait .....	159
<b>Figure 57</b> : Evolution du G' final en fonction de la quantité d'agrégats fractals dans des gels acides gras laitiers .....	160
<b>Figure 58</b> : Analyse de la synérèse dans le temps des gels acides gras (3,5% MG) avec ajout d'agrégats fractals Fa45 .....	161
<b>Figure 59</b> : Photographies en microscopie confocale de gels acides gras (3,5% MG) témoin et avec 1% d'agrégats fractals Fa45 .....	162
<b>Figure 60</b> : Evolution du G' final en fonction de la quantité d'agrégats microgels ajoutée dans des gels acides gras .....	164
<b>Figure 61</b> : Analyse de la synérèse dans le temps des gels acides gras (3,5% MG) avec ajout d'agrégats microgels .....	165
<b>Figure 62</b> : Photographies en microscopie confocale de gels acides gras (3,5% MG) témoin et avec 1% d'agrégats microgels .....	165
<b>Figure 63</b> : Evolution du G' final en fonction de la quantité d'agrégats mixtes ajoutés dans les gels acides gras .....	167
<b>Figure 64</b> : Analyse de la synérèse dans le temps des gels acides gras (3,5% MG) avec ajout d'agrégats mixtes .....	168
<b>Figure 65</b> : Photographies en microscopie confocale de gels acides gras (3,5% MG) témoin et avec 1% d'agrégats mixtes .....	168
<b>Figure 66</b> : Représentation schématique des 3 phases (crème, phase tampon et culot) séparées par la méthode de Patton & Huston (1986).....	170
<b>Figure 67</b> : Gel d'électrophorèse en condition non réductrice (droite) et réductrice (gauche) pour des laits à 3,5% MG et homogénéisé à 100 bars (témoin et avec 1% d'agrégats fractals Fa45) .....	171

<b>Figure 68</b> : Schéma représentant les hypothèses de structure des gels acides laitiers contenant des agrégats fractals : les caséines sont en rouge, les agrégats fractals en bleu foncé et le réseau de protéines continu en bleu clair .....	174
<b>Figure 69</b> : Dispersion de taille des gouttelettes de matière grasse d'un lait témoin à 3,5% MG et homogénéisé à 50, 100 ou 500 bars .....	179
<b>Figure 70</b> : Dispersion de taille des gouttelettes de matière grasse d'un lait témoin à 10% MG et homogénéisé à 100 ou 500 bars .....	183
<b>Figure 71</b> : Module élastique final après 6h d'acidification pour des gels d'acides contenant 3,5 ou 10% de MG témoins et avec l'ajout de 1% de PS et 1% d'agrégats fractals de tailles différentes (Fa45, Fa20 ou Fa0) homogénéisés à 100 ou 500 bars.....	188
<b>Figure 72</b> : (A) Electrophorèse de la composition interfaciale du lait témoin contenant 10% de MG en condition non réductrice. (B) SDS-PAGE de la composition interfaciale de la phase crème du lait témoin à 10% de MG et des laits contenant 1% de PS ou d'agrégats fractals ou mixtes en condition non réductrice et réductrice.....	190
<b>Figure 73</b> : Observation en MET des gels acides à 10% de MG et homogénéisé à 100 bars (A) gel acide témoin, (B) avec 1% d'agrégats mixtes (C) avec 1% de PS (D) avec 1% d'agrégats fractals Fa0 .....	192
<b>Figure 74</b> : Module élastique final pour des gels d'acides contenant 3,5% de matière grasse témoins et avec l'ajout de 1% d'agrégats fractals Fa45 ou Fa0 homogénéisés à 100 bars et avec ou sans ajout de NEM avant l'homogénéisation .....	196
<b>Figure 75</b> : Photographies en microscopie confocale de gels acides à 3,5% de MG témoin sans ajout de NEM et avec ajout de NEM dans des gels acides à 3,5% de MG témoin et avec 1% de PS ou d'agrégats Fa45 .....	198
<b>Figure 76</b> : Dispersion de taille des gouttelettes de matière grasse pour deux émulsions (A) : Emulsion différée seule, diluée dans le lait, diluée dans le lait et homogénéisation à 50 bars et diluée dans du SDS ; (B) : Emulsion ferme seule, diluée dans le lait, diluée dans le lait et homogénéisation à 50 bars et diluée dans du SDS .....	200
<b>Figure 77</b> : Observation en microscopie confocale d'une émulsion à 30% MG : Em ferme (échelle : 10 µm) et des systèmes laitiers contenant l'émulsion et homogénéisés ou non à 50 bars (échelle : 20 µm) puis acidifié à 40 °C (échelle : 20 µm) .....	204
<b>Figure 78</b> : Analyse du pourcentage de synérèse en fonction du temps de stockage à 4 °C et du type d'émulsion ajouté au lait (Em différée et Em ferme) et avec ou sans homogénéisation (50 bars) .....	205
<b>Figure 79</b> : Balayage en fréquence réalisé avant (initial) et après (final) traitement thermique sur le rhéomètre à une déformation de 1% pour des gels homogénéisés à 500 bars contenant 15% de matière grasse et 1% d'agrégats Fa0 (A) et d'agrégats Fa45 (B) .....	211
<b>Figure 80</b> : Schéma représentant les connexions entre les gouttelettes de matière grasse avec des interfaces non saturé en caséines et les agrégats fractals des systèmes contenant 15% matière grasse et 1% de Fa45 (gauche) ou Fa0 (droite) .....	212
<b>Figure 81</b> : Schéma représentant les hypothèses de structure des gels acides laitiers avec une interface non saturé en caséines contenant des agrégats fractals (gauche) ou des agrégats mixtes (droite) .....	213
<b>Figure 82</b> : Schéma représentant les hypothèses de structure des gels acides laitiers avec une interface non saturé en caséines (rouge) contenant des agrégats fractals (gauche) ou des agrégats mixtes (droite) .....	231

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Composition de la matière grasse du lait de vache (Mathieu, 1998) .....	29
<b>Tableau II</b> : Principales caractéristiques des fractions BPF, MPF et HPF de la matière grasse laitière (d'après Deroanne, 1976; Drelon, 2006; Timms, 1980) .....	29
<b>Tableau III</b> : Caractéristiques physiques et physicochimiques des principales protéines du lactosérum (d'après Bryant & McClements, 1998; Farrell et al., 2004) .....	35
<b>Tableau IV</b> : Impact des différentes techniques de traitement thermique sur les propriétés du lait et du yaourt affectant la saveur et la texture (Sfakianakis & Tzia, 2014).....	64
<b>Tableau V</b> : Caractéristiques de la poudre de lait Low heat (en g pour 100 g de poudre) .....	81
<b>Tableau VI</b> : Tableau récapitulatif de la composition en protéines des lots de poudres .....	82
<b>Tableau VII</b> : Récapitulatif des conditions de production des différents agrégats protéiques .....	85
<b>Tableau VIII</b> : Récapitulatif des conditions de production des émulsions à 30% MG.....	90
<b>Tableau IX</b> : Récapitulatif des conditions de production des laits enrichis en MG et homogénéisés à haute pression .....	93
<b>Tableau X</b> : Valeurs moyennes et écart-type des concentrations en protéines sériques natives résiduelles obtenues en spectrophotométrie dans les surnageants des laits témoins (NT, 11 min et 20 min) et des laits avec ajout de 0,2 ; 0,4 et 0,6% de protéines sériques natives ou d'agrégats fractals.....	116
<b>Tableau XI</b> : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers témoins à J0 et J1 .....	123
<b>Tableau XII</b> : Mesures rhéologiques et de pH d'un gel acide maigre laitier témoin et de gels acides maigres laitiers avec ajout de 0,2 et 0,6% de PS sans traitement thermique.....	125
<b>Tableau XIII</b> : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers avec ajout de différentes concentrations de protéines sériques natives avant le traitement thermique.....	127
<b>Tableau XIV</b> : Mesures rhéologiques et de pH d'un gel acide maigre laitier avec ajout de 0,6% d'agrégats fractals (S1) sans traitement thermique .....	134
<b>Tableau XV</b> : Récapitulatif des modalités des essais réalisés avec l'ajout d'agrégats de la suspension 1 et nom des essais.....	135
<b>Tableau XVI</b> : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers avec ajout de différentes concentrations d'agrégats fractals (S1) avant et après le traitement thermique .....	135
<b>Tableau XVII</b> : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers avec ajout de différentes concentrations d'agrégats fractals (S2) avant le traitement thermique .....	138
<b>Tableau XVIII</b> : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers avec ajout de différentes concentrations d'agrégats microgels avant le traitement thermique .....	142
<b>Tableau XIX</b> : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers avec ajout de différentes concentrations d'agrégats mixtes avant le traitement thermique .....	144
<b>Tableau XX</b> : Moyenne et écart-type des mesures rhéologiques et de pH réalisés sur des gels acides gras et maigres laitiers témoins à 3,5% matière grasse (acidification par GDL à 40 °C).....	152
<b>Tableau XXI</b> : Résultats moyens et écart-types pour les mesures rhéologiques et de pH sur des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout de protéines sériques (acidification par GDL à 40 °C) .....	153
<b>Tableau XXII</b> : Comparaison des résultats rhéologiques et de pH sur des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout de 1% PS et 4,5% de protéines de poudre de lait.....	158

<b>Tableau XXIII</b> : Résultats moyens et écart-types pour les mesures rhéologiques et de pH des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout d'agrégats fractals (acidification par GDL à 40 °C) .....	160
<b>Tableau XXIV</b> : Résultats moyens et écart-types pour les mesures rhéologiques et de pH des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout d'agrégats microgels (acidification par GDL à 40 °C) .....	163
<b>Tableau XXV</b> : Résultats moyens et écart-types pour les mesures rhéologiques et de pH des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout d'agrégats mixtes (acidification par GDL à 40 °C) .....	166
<b>Tableau XXVI</b> : Concentration protéique des différentes phase (crème, tampon, culot) d'un lait témoin et avec 1% fractals .....	172
<b>Tableau XXVII</b> : Conclusions sur les gels acides gras à 3,5% MG avec protéines sériques ou agrégats protéiques .....	173
<b>Tableau XXVIII</b> : Variation de la surface spécifique (SSp) et de la surface totale à 3,5% de matière grasse en fonction de la pression d'homogénéisation .....	180
<b>Tableau XXIX</b> : Mesures rhéologiques et de pH sur des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout de protéines sériques, d'agrégats fractals Fa45 ou d'agrégats mixtes, homogénéisation à 50, 100 ou 500 bars (acidification par GDL à 40 °C) .....	181
<b>Tableau XXX</b> : Variation de la surface spécifique (SSp) et de la surface totale à 10% de matière grasse en fonction de la pression d'homogénéisation .....	184
<b>Tableau XXXI</b> : Mesures rhéologiques et de pH sur des gels acides gras laitiers (10% MG) avec ajout de protéines sériques, d'agrégats fractals Fa45 ou d'agrégats mixtes, homogénéisation à 100 ou 500 bars (acidification par GDL à 40 °C) .....	184
<b>Tableau XXXII</b> : Taille moyenne des suspensions d'agrégats fractals en fonction de la quantité de NaCl déterminée par mesure en diffusion dynamique de la lumière .....	186
<b>Tableau XXXIII</b> : Valeurs moyennes des mesures rhéologiques et de pH sur des gels acides gras laitiers (3,5% et 10 % MG) avec ajout d'agrégats fractals de différentes taille, homogénéisation à 100 ou 500 bars (acidification par GDL à 40 °C) .....	187
<b>Tableau XXXIV</b> : Mesures rhéologiques et de pH des gels acides gras laitiers témoin à 3,5% MG et avec l'ajout de 1% de PS ou d'agrégats fractals Fa45 ou Fa0, sans ajout de NEM et avec un ajout de NEM avant l'homogénéisation à 100 bars et après le traitement thermique (acidification par GDL à 40 °C) .....	194
<b>Tableau XXXV</b> : Mesures rhéologiques et de pH des gels acides gras laitiers témoin à 10% MG et avec l'ajout de 1% de PS ou d'agrégats fractals Fa45 ou Fa0, sans ajout de NEM et avec un ajout de NEM avant l'homogénéisation à 100 bars et après le traitement thermique (acidification par GDL à 40 °C) .....	199
<b>Tableau XXXVI</b> : Résultats des analyses réalisées sur des laits à 3,5% MG par incorporation d'une émulsion à 30% MG .....	201
<b>Tableau XXXVII</b> : Résultats des analyses réalisées sur des laits à 3,5% MG contenant 1% d'agrégats fractals Fa45 ou Fa0 par incorporation d'une émulsion à 30% MG .....	203
<b>Tableau XXXVIII</b> : Présentation de la distribution de taille des gouttelettes de matière grasse après homogénéisation à 400 ou 500 bars des émulsions à 15% MG (bleu : sans SDS, rouge : avec SDS) et photographie de l'aspect des émulsions à J1 après une conservation à 4 °C .....	208
<b>Tableau XXXIX</b> : Valeurs du module $G'$ des émulsions à 15% de MG avant traitement thermique (initial) et après traitement thermique (final) sur le rhéomètre à 1 rad/s et une déformation dépendante du système .....	210
<b>Tableau XL</b> : Bilan des intérêts majeurs des PS et des différents agrégats selon le système étudié .....	224

## Liste des abréviations

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

AGL : Acide Gras Libre

BSA : Albumine Sérique Bovine

BLG : Beta Lactoglobuline Davisco

BPF : Bas Point de Fusion

Cas : caséines micellaires

CNM : Caséines Non Micellaires

D : diamètre hydrodynamique

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

E-H : Eau-Huile

Fa0, Fa20 et Fa45 : agrégats fractals avec 0, 20 ou 45 mM de NaCl

G' : Module conservatif

G'' : Module dissipatif

GDL : glucono- $\delta$ -lactone

HCl : acide chlorhydrique

H-E : Huile-Eau

HPF : Haut Point de Fusion

HTST : High-Temperature Short Time (pasteurisation éclair)

IgG : immunoglobulines

LB : *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*

MCBL : Microscope confocal à balayage laser

MET : Microscope électronique en transmission

MG : Matière Grasse

MGLA : Matière Grasse Laitière Anhydre

MPF : Moyen Point de Fusion

$M_w$  : Masse molaire

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

NEM : N-éthylmaléimide

NT : non traité thermiquement

PMMA : polyméthacrylate de méthyle

PS : Protéines Sériques

PSN : Protéines Sériques Natives

PUF : (perméat de lait ultrafiltré)

rpm : rotation par minute

SDS : dodécylsulfate de sodium

SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium

SNG : solides non-gras

-SH : groupement thiols libres

SSp : Surface Spécifique

ST : *Streptococcus salivarius subsp. Thermophiles*

$\tan \delta$  : tangente  $\delta$

UHT : Ultra Haute Température

WPI : Whey Protein Isolate (protéines sériques)

$\alpha$ -lac :  $\alpha$ -lactalbumine

$\beta$ -lg :  $\beta$ -lactoglobuline

$\gamma$  : déformation et la

$\tau$  : contrainte

# Introduction générale



## Introduction générale

---

Les produits laitiers formulés, comme les yaourts, sont des aliments utilisés par l'homme depuis des siècles pour leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Cependant, les consommateurs souhaitent en permanence la création de produits innovants du point de vue de la texture, du goût, mais également de la santé, ce qui implique des développements continus des industriels pour améliorer leurs formulations. En particulier, l'utilisation d'additifs tels que des gélifiants, des épaississants ou encore des stabilisants, n'est pas autorisée en France pour améliorer les propriétés fonctionnelles des yaourts. Pour obtenir la dénomination spécifique de yaourt, seuls des ingrédients purement laitiers doivent être utilisés. Ainsi, moduler la texture des yaourts pour générer des produits innovants, sans l'aide d'additifs et par une meilleure utilisation d'ingrédients protéiques laitiers pourrait à la fois répondre aux attentes des consommateurs souhaitant de plus en plus des produits « clean label », tout en valorisant les protéines du lait pour la création de produits nouveaux et spécifiques.

Le projet PROFIL (Assemblages **PRO**téiques multi-Fonctionnels pour l'Innovation en industrie Laitière) dans lequel s'insère cette thèse a démarré en janvier 2014 pour une durée de 6 ans. Il a pour objectif l'innovation dans le domaine des produits laitiers. Pour mener le projet PROFIL, un consortium d'industriels laitiers incluant : Sill, La Laiterie de Montaigu, Sodiaal, Laïta, Isigny S<sup>te</sup> Mère, Bel, Eural, Compagnie des Fromages & RichesMonts, Savencia et Lactalis, ainsi que des équipes de recherches scientifiques appartenant à l'INRA, ONIRIS, l'Agro Campus Ouest, l'UBO, l'Université du Mans et l'IPR travaillent et construisent ensemble l'avenir des produits laitiers du Grand-Ouest.

Le projet PROFIL a pour objectif de renforcer l'innovation et la compétitivité de la filière laitière dans un marché mondial grandissant mais fortement concurrentiel. Les principaux objectifs du projet sont :

- De répondre aux attentes des consommateurs avec des produits laitiers « **à base d'ingrédients 100% naturels** » et portant la mention « **clean label** » (suppression des texturants, conservateurs, colorant...) en exploitant les propriétés multifonctionnelles des protéines lactiques.
- D'augmenter la valeur ajoutée des **protéines lactiques** qui sont à même de remplacer la plupart des additifs ou de générer des **textures innovantes** pour créer de nouveaux produits.



Pour cela les recherches menées dans le cadre du projet PROFIL sont divisées en 4 grands axes principaux et un axe transversal :

- **Axe 1 : Propriétés antifongiques** : l'objectif est la suppression des conservateurs en sélectionnant des souches bactériennes ou en développant par fermentation des ingrédients antifongiques à partir des composants du lait.
- **Axe 2 : Propriétés émulsifiantes et moussantes** : le but est de supprimer l'utilisation d'agents émulsifiants et gélifiants en les remplaçant par des assemblages de protéines pour obtenir de nouvelles propriétés émulsifiantes et moussantes.
- **Axe 3 : Propriétés texturantes** : l'objectif est d'obtenir des produits gélifiés avec des comportements technologiques et culinaires spécifiques apportés par l'utilisation des assemblages de protéines laitières.
- **Axe 4 : Propriétés encapsulantes** : le but de cet axe est de développer des vecteurs protéiques pour protéger et véhiculer les molécules d'intérêt nutritionnel comme des composants actifs.
- **Axe transversal : plateforme d'innovation** : ce dernier axe a pour objectifs d'évaluer et de tester en phase pilote les procédés technologiques et les qualités organoleptiques de certains produits développés dans les axes précédents.

Cette thèse débutée en Octobre 2015 porte sur la : « Modulation de la texture de gels acides laitiers par addition d'agrégats de protéines laitières ». Elle est menée en interaction avec les résultats obtenus dans les axes 2 et 3. En effet, les différents agrégats de protéines laitières utilisés au cours de ce travail ont été étudiés dans les thèses précédentes de Marie Chevallier, Thibault Loiseleux et Anna Kharlamova. Ces doctorants ont montré que différents types d'agrégats de protéines laitières peuvent texturer efficacement des émulsions à pH neutre et sont stables vis-à-vis de certains traitements technologiques.

Le but de ma thèse est de comprendre l'influence de la structure des différents assemblages protéiques dans des systèmes de type yaourt en évaluant la texture et les propriétés des gels acides contenant ou non de la matière grasse. Elle vise à comprendre les interactions se mettant en place entre les différents éléments entrant dans la composition des gels acides laitiers : protéines sériques, agrégats, caséines, matière grasse... La retombée principale est d'arriver à moduler la texture des yaourts et générer ainsi des produits laitiers formulés innovants et spécifiques.

Les caséines et protéines sériques sont déjà largement utilisées en industrie agroalimentaire pour leur haute valeur nutritionnelle et leurs propriétés physicochimiques et fonctionnelles polyvalentes : gélifiantes, émulsifiantes et foisonnantes (Bryant & McClements, 1998; de Wit, 1998; Mathieu, 1998; Nicolai & Durand, 2013). De plus, ces protéines ont été classifiées comme « Generally Recognized as Safe » (GRAS). Les caséines présentes dans le lait sous forme de micelles ont un point isoélectrique (pHi) de 4,6 et précipitent à ce pH, mais elles ne sont pas sensibles aux variations de température (Dickinson, 1996). C'est la déstabilisation des micelles de caséines au cours de l'acidification du lait qui est primordiale dans la fabrication des yaourts par la mise en place d'un réseau protéique (Lucey & Singh, 1998; Walstra, 1990). En revanche, les protéines sériques sont stables à l'acidification mais pas aux traitements thermiques, qui induisent des réactions de dénaturation et d'agrégation qui impactent leurs propriétés (de Wit, 2009; Nicolai, Britten, & Schmitt, 2011; Relkin, 1998; Roefs & De Kruif, 1994). Ces réactions modifient leurs propriétés physico-chimiques, nutritionnelles et fonctionnelles et peuvent jouer un rôle majeur dans la stabilité des produits laitiers chauffés (Thompson, Boland, & Singh, 2009).

Les principales étapes de la fabrication des yaourts sont tout d'abord la standardisation de la teneur en matière grasse et en protéines du lait. Augmenter la concentration en protéines permet notamment d'obtenir des gels laitiers plus stables et plus fermes (Andoyo, Guyomarc'h, Burel, & Famelart, 2015; Cheftel & Lorient, 1982) et une concentration en matière grasse plus importante entraîne également une augmentation de la fermeté des gels laitiers, ainsi qu'une diminution du temps de gélification (Aguilera, Xiong, & Kinsella, 1993). Ces deux points seront essentiels au cours de ce travail. Nous ferons varier la concentration de ces deux éléments ainsi que la structure des protéines ajoutées pour moduler les interactions se mettant en place entre les différents éléments et donc la texture des systèmes.

Ensuite viennent les différentes étapes de traitement physique du lait pour obtenir un yaourt. Tout d'abord, l'étape d'homogénéisation permet la bonne répartition de la matière grasse dans le lait ainsi que l'augmentation de la surface interfaciale de la matière grasse obtenue en modulant la pression appliquée au lait contenant de la matière grasse (Jost, Baechler, & Masson, 1986). La modulation de la surface interfaciale fera l'objet d'une attention particulière au cours de ce travail.

Puis un traitement thermique est appliqué au lait, qui permet à la fois la conservation des produits par l'élimination des bactéries pathogènes et l'augmentation de la texture des produits par la dénaturation des protéines du lait (Lucey & Singh, 1998; Sfakianakis & Tzia, 2014; Tamime & Robinson, 2007).

Enfin, l'étape d'acidification permet la dissociation des micelles de caséines et la mise en place d'un réseau protéique donnant au produit sa texture de gel.

Ce travail se concentre donc sur deux leviers principaux : (i) la composition des systèmes notamment par l'ajout de différents agrégats protéiques et (ii) le rôle de la surface interfaciale des gouttelettes de matière grasse dans les gels acides laitiers.

Des études récentes ont montré que des agrégats de protéines laitières, obtenus par chauffage, et ajoutés avant l'étape d'homogénéisation dans des émulsions laitières, sont capables de connecter les gouttelettes de matière grasse entre-elles et d'entraîner une texturation et la gélification de l'émulsion, soit immédiatement ou de façon différée (Loiseleux, 2017; Surel et al., 2014). De plus, l'étude d'Andoyo, Guyomarc'h, Cauty, & Famelart (2014) a montré qu'une teneur plus élevée en agrégats de protéines sériques permettait une gélification plus rapide et conduisait à des gels acides plus élastiques avec des pores plus petits et une meilleure rétention du lactosérum. Les travaux de Loiseleux (2017) ont également montré que selon le type d'agrégats ajouté, des textures variables sont obtenues pour des émulsions à **pH neutre**. Les travaux de thèse de Chevallier (2017) et Loiseleux (2017) ont également montré qu'il existe une compétition à l'interface des différentes protéines composant les émulsions : caséines, protéines sériques et agrégats. Dans le lait, les caséines représentent la majorité des protéines (75-80%), et il est connu qu'elles s'adsorbent préférentiellement à la surface des gouttelettes de matière grasse (Srinivasan, Singh, & Munro, 1996; Ye, 2008). Elles peuvent ainsi potentiellement recouvrir entièrement les gouttelettes de matière grasse (Chevallier et al., 2016, 2018).

**L'enjeu scientifique** de cette thèse est de comprendre le comportement des différents types d'agrégats de protéines dans les **gels acides laitiers** contenant ou non de la matière grasse et de comprendre le mécanisme d'action des agrégats ajoutés. Les travaux précédents ont mis en évidence des fonctionnalités différentes et dépendantes du type d'agrégats utilisé dans des systèmes contenant peu de caséines et à pH neutre. Leur fonctionnalité doit maintenant être démontrée dans le cas de systèmes plus complexes et acidifiés. Cela peut permettre d'obtenir un panel de texture en fonction des agrégats ajoutés dans le lait lors de sa préparation. Un point important de ce travail portera sur la comparaison des résultats obtenus avec ou sans matière grasse.

**Pour cela, nous avons fait l'hypothèse que les agrégats de protéines peuvent avoir un rôle dans la formation du réseau protéique en systèmes maigres ou interagir avec l'interface des gouttelettes de matière grasse dans les systèmes gras et moduler ainsi la texture.**

**L'enjeu industriel** de cette thèse est d'obtenir une grande variété de textures dans des **produits acidifiés** de type yaourt par l'utilisation de différents types d'agrégats de protéines laitières. L'objectif est également de pouvoir créer de nouveaux produits avec des textures innovantes et spécifiques, par exemple des produits enrichis en matière grasse et/ou protéines tout en gardant une texture peu ferme, qui pourraient convenir à certains types de population comme les personnes âgées ou dénutries.

Afin de répondre au mieux aux enjeux présentés et à la problématique, ce manuscrit de thèse sera divisé en 8 chapitres :

- Le chapitre 1 sera consacré à l'état de l'art : le début du chapitre concerne la composition du lait en insistant surtout sur la matière grasse et les protéines laitières ainsi que la formation des différents agrégats qui seront étudiés au cours de ce travail. La suite de ce chapitre sera consacrée aux émulsions laitières et aux propriétés des protéines les composant. Enfin, la fabrication des yaourts sera présentée ainsi que les paramètres influençant leur texture et l'impact des agrégats protéiques sur celle-ci.
- Le chapitre 2 décrira la stratégie adoptée tout au long de cette thèse.
- Le chapitre 3 présentera le matériel et les méthodes utilisées tout au long de ce travail.
- Les chapitres 4 à 7 seront consacrés à la présentation des résultats obtenus.
  - Le chapitre 4 est consacré à la caractérisation des agrégats protéiques et à la quantification des protéines natives résiduelles après le traitement thermique.
  - Le chapitre 5 concerne les résultats obtenus sur les gels acides maigres avec l'ajout de différentes concentrations d'agrégats protéiques pour comprendre leur rôle dans le réseau protéique se mettant en place au cours de l'acidification.
  - Les chapitres 6 et 7 regroupent les résultats obtenus sur les gels acides contenant de la matière grasse. Le chapitre 6 est consacré à l'influence de la variation de concentration des différents agrégats ajoutés sur les fonctionnalités des gels et comprendre le mécanisme d'action des agrégats. Le chapitre 7 est centré sur la modulation de la surface interfaciale des systèmes en jouant sur certains paramètres comme la concentration en matière grasse ou la pression d'homogénéisation.
  - Pour finir, le chapitre 8 est consacré à la discussion générale des résultats en s'appuyant sur la bibliographie existante.
- Le manuscrit se terminera par les conclusions générales ainsi que les perspectives de travail.



# Chapitre 1 : Etat de l'art



### I.1- Le lait

#### I.1.1- Composition générale

Le lait est défini comme étant une suspension colloïdale aqueuse de pH proche de la neutralité (6,7). Le lait de vache est constitué de nombreux composés dont le plus abondant est l'eau (87%), dans laquelle sont dispersés tous les autres éléments (Mathieu, 1998). Le lait contient des globules de matière grasse (environ 35 g/L) et des micelles de caséines (environ 30 g/L) en suspension dans la phase aqueuse formant un système composé de deux phases dispersées (Dickinson, 1996), de type émulsion huile dans eau (H-E). La composition globale du lait est résumée dans la Figure 1 :

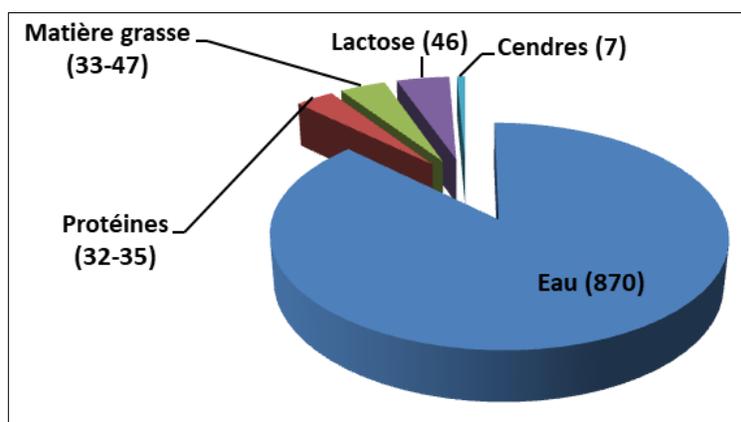


Figure 1 : Composition globale du lait en g/L de lait (d'après Cayot & Lorient, 1998)

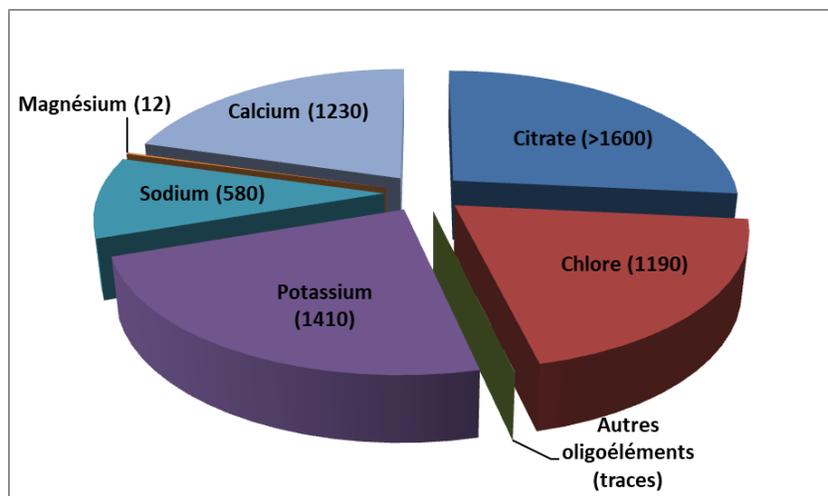
La phase aqueuse, appelée lactosérum, comprend tous les éléments solubles du lait :

- des glucides (50 g/L, principalement du lactose : 46 g/L). Il s'agit d'un oside réducteur composé de deux oses : le glucose et le galactose.

- de nombreuses protéines solubles dont la plus abondante est la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) environ 60% des protéines solubles, suivie de l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -lac) environ 22%, de l'albumine sérique bovine (BSA) et des immunoglobulines (IgG) (de Wit, 1981; Farrell et al., 2004; Mathieu, 1998),

- des vitamines hydrosolubles,

- et des sels minéraux : le chlore, le potassium, le phosphore, le citrate et le calcium qui pour les 3 derniers peuvent être retrouvés libre ou lié aux micelles de caséines afin de maintenir leur intégrité (Cayot & Lorient, 1998; Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989). Les proportions des différents minéraux sont présentées dans la Figure 2 :



**Figure 2** : Composition minérale du lait avec les valeurs entre parenthèse en mg/L (Cayot & Lorient, 1998; Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989)

La composition du lait de vache n'est pas fixe et dépend de plusieurs paramètres notamment de la race et de l'individu, et elle est également fonction de nombreux facteurs tels que : le stade de lactation, l'alimentation, la saison et l'état de santé de l'animal, ainsi que des facteurs environnementaux. Les teneurs en certains éléments sont plus variables que d'autres : le taux de matière grasse par exemple peut montrer des écarts de près de 20%. En revanche, les protéines et le lactose ont des variations nettement moins importantes, d'environ 2,5% (Mathieu, 1998).

### I.1.2- La matière grasse laitière

#### 1.1.2.1- Composition lipidique

La matière grasse laitière est dispersée dans la phase aqueuse du lait sous forme de globules gras de diamètre compris entre 2 et 12  $\mu\text{m}$  avec un diamètre moyen de 4  $\mu\text{m}$  (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989). Les gouttelettes de matière grasse sont formées d'un cœur de triglycérides enveloppé d'une membrane composée principalement de protéines et de phospholipides (Mathieu, 1998). La matière grasse laitière contient essentiellement des triglycérides (esters de glycérol, formés par condensation de trois molécules d'acides gras sur une molécule de glycérol, 96%) et également d'autres glycérides partiels (diglycérides et monoglycérides) et des acides gras libres (AGL), qui sont considérés comme des constituants mineurs. D'autres composés comme les phospholipides et les stérols sont également présents en faible quantité. La composition en lipides du lait de vache est résumée dans le Tableau I suivant :

**Tableau I** : Composition de la matière grasse du lait de vache (Mathieu, 1998)

Matière grasse		g/100g des matières grasses totales
<b>Glycérides</b>	<b>Triglycérides</b>	<b>96</b>
	Diglycérides	2
	Monoglycérides	0,1
<b>Glycérophospholipides et sphingolipides</b>		<b>1</b>
Acides gras libres		0,6
Cholestérol		0,15
Autres composés		0,4

### 1.1.2.2- Propriétés physiques de la matière grasse

La matière grasse laitière se caractérise par une plage de fusion qui s'étend de -40 °C à +40 °C ce qui est unique parmi l'ensemble des lipides végétaux et animaux. Dans cette gamme de température, il y a coexistence entre des triglycérides à l'état liquide et d'autres à l'état solide (Drelon, 2006) ce qui lui confère une texture unique. Les propriétés physiques de la matière grasse laitière sont fortement dépendantes des propriétés de cristallisation des triglycérides qui dépendent de la composition en acides gras et de leur position sur la molécule. Deux caractéristiques importantes des acides gras (AG) peuvent influencer de façon antagoniste leurs propriétés physicochimiques : la longueur des chaînes (nombre d'atomes de carbone) et le degré d'insaturation. La matière grasse laitière contient une très grande diversité d'acides gras avec des longueurs de chaîne variant de 4 à 20 carbones et de 0 à 3 insaturations.

Sur les thermogramme de fusion de la matière grasse, on peut identifier trois pics de fusion, correspondant à 3 fractions, dont les enthalpies et les températures varient suivant l'histoire thermique de la matière grasse (Drelon, 2006; Drelon et al., 2006; Timms, 1980) : fraction à Bas Point de Fusion (BPF), fraction à Moyen Point de Fusion (MPF) et fraction à Haut Point de Fusion (HPF). Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces fractions sont résumées dans le Tableau II.

**Tableau II** : Principales caractéristiques des fractions BPF, MPF et HPF de la matière grasse laitière (d'après Deroanne, 1976; Drelon, 2006; Timms, 1980)

Fraction	T° fusion dans matière grasse	T° fusion dans fraction	Quantité dans la matière grasse	Composition en acide gras
HPF	30 °C	> 50 °C	5%	AG à longues chaînes saturées
MPF	20 °C	35 – 40 °C	25%	AG monoinsaturés cis ou 1 chaîne courte
BPF	10 °C	> 15 °C	70%	2 chaînes AG insaturées ou courtes

### **1.1.2.3- Globule gras et matière grasse laitière anhydre**

Dans le globule gras natif, les lipides membranaires, qui représentent 25% de la membrane, sont des lipides neutres : mono et diglycérides, esters et cholestérols ainsi que des lipides polaires : glycolipides et phospholipides qui sont majoritaires (Deeth, 1997). La membrane a une épaisseur inférieure à 10 nm et est composée d'une tri-couche de phospholipides dans lesquelles s'insèrent des glycoprotéines. Elle permet la dispersion de la matière grasse dans la phase aqueuse du lait (rôle d'émulsifiant naturel) et empêche son agrégation et sa coalescence. Elle protège également les lipides des dégradations enzymatiques comme la lipolyse (Lopez, 2005).

La matière grasse peut être séparée du lait industriellement par écrémage (spontané ou centrifuge), ce qui permet d'obtenir une crème 10 fois plus concentrée que le lait, où la matière grasse se trouve toujours sous forme de globules. Ensuite, le barattage de la crème permet de rompre leurs membranes et de séparer leur contenu riche en triglycérides en différentes fractions : le beurre, le babeurre contenant le sérum de la crème, et des débris de la membrane riches en phospholipides. Enfin, la déshydratation de la fraction beurre permet d'obtenir un beurre concentré appelé matière grasse laitière anhydre (MGLA). La MGLA contient au minimum 99,8% de matière grasse, majoritairement sous forme de triglycérides. Elle est également très riche en acides gras saturés (environ 65%), et contient environ 30% d'acides gras mono-insaturés et 4% d'acides gras polyinsaturés, des vitamines ainsi que du cholestérol (FAO, 2003b).

## **1.2- Les protéines du lait**

Les protéines du lait (caséines et protéines sériques), dont la concentration est de 32 à 35 g/L, sont bien connues pour leur haute valeur nutritionnelle et leurs propriétés physicochimiques et fonctionnelles polyvalentes dans les produits alimentaires, ainsi que leur rôle dans la stabilité du lait (Bryant & McClements, 1998; de Wit, 1998; Mathieu, 1998). De plus, ces protéines ont été classifiées comme « Generally Recognized as Safe » (GRAS).

### **1.2.1- Les micelles de caséines**

Les caséines sont les protéines majoritaires du lait (75-80%). Celles-ci sont de 4 types :  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ . Les plus abondantes sont la caséine  $\alpha_{s1}$  : 37% et la caséine  $\beta$  : 34%. Les caséines ont un point isoélectrique (pHi) de 4,6 à 20 °C et précipitent à ce pH, mais elles ne sont pas sensibles aux variations de température. Ces protéines possèdent une structure spatiale peu ordonnée (peu de structure tertiaire et pas de structure quaternaire) et adoptent plutôt un comportement collectif. La plupart d'entre elles

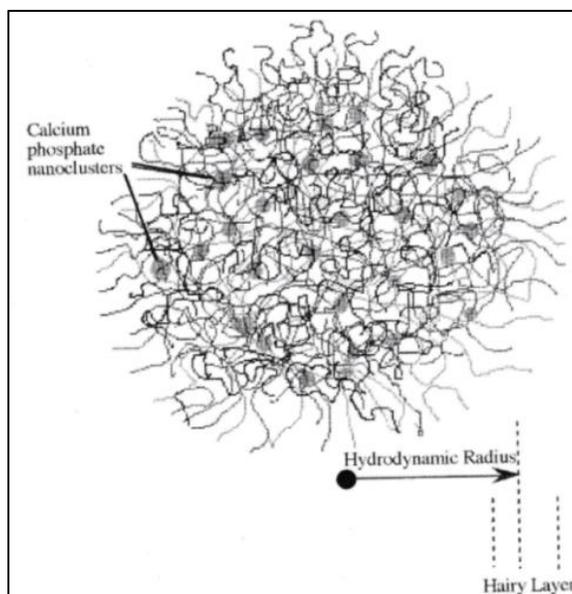
(environ 95%) sont présentes sous forme de micelles de caséines qui sont des assemblages constitués de plusieurs milliers de molécules.

Les micelles sont des assemblages supramoléculaires insolubles dont la taille est très variable, entre 100 et 200 nm de diamètre (Holt, 1992; Schmidt, 1982), et qui donnent au lait son aspect blanc et opaque caractéristique (Dickinson, 1996). En plus des caséines, les micelles contiennent également environ 7% de composants minéraux dont principalement du phosphate et du calcium (Walstra, 1999). Elles jouent un rôle central dans la transformation du lait en fromage, et en la plupart des produits laitiers ; leurs propriétés structurales et physiques font l'objet de recherches depuis de nombreuses années.

Plusieurs modèles sont proposés pour décrire leur structure. Un des premiers modèles proposés dans la littérature est qui est maintenant écarté des possibilités est le modèle submicellaire. Dans ce modèle la micelle de caséines est décrite comme un ensemble de particules : sub-micelles d'un diamètre d'environ 14 nm, formant une structure à peu près sphérique d'environ 100 nm de diamètre avec une couche extérieure « chevelue » composée de l'extrémité C-terminale de la caséine- $\kappa$  (Morr, 1967; Schmidt, 1982; Walstra, 1999). D'autres modèles sont considérés par la communauté scientifique comme plus probables ceux sont le modèle à structure ouverte, le modèle noyau-coque ou encore le modèle éponge qui seront décrit plus en détail dans la suite de cette partie. Les faits largement établis sont que : la micelle de caséines est une structure quasi-sphérique, couverte d'une couche diffuse de caséines- $\kappa$  (de Kruif & Zhulina, 1996). La partie C-terminale hydrophile des caséines- $\kappa$  assure la stabilité et le maintien des micelles de caséines par des répulsions électrostatiques et stériques (Bouchoux et al., 2009) et cette couche de caséines- $\kappa$  forme une couverture d'une épaisseur d'environ 12 nm (Holt & Horne, 1996).

### *1.2.1.1- Modèle à structure ouverte*

Le modèle à structure ouverte de Holt & Horne (1996) suggère que les micelles de caséines sont constituées d'un réseau caséinique « cimenté » par des nanoclusters de phosphate de calcium. Le pontage entre caséines et nanoclusters se ferait par l'intermédiaire des centres phosphates. Ceux-ci correspondent aux résidus sérines phosphorylés regroupés au sein des molécules de caséines. Ce modèle est présenté sur la Figure 3. Le modèle à structure ouverte semble plus probable que le modèle submicellaire. En effet, l'utilisation des rayons X et de la diffusion de neutrons aux petits angles ont donné des résultats qui vont à l'encontre d'une structure comprenant des sub-micelles (de Kruif, Huppertz, Urban, & Petukhov, 2012).



**Figure 3** : Modèle à structure ouverte d'une micelle de caséines (HOLT et HORNE, 1996)

### *1.2.1.2- Modèle noyau-coque*

Le modèle noyau-coque de Shukla, Narayanan, & Zanchi (2009) décrit la micelle de caséines comme une matrice homogène de caséines, mais il suggère que les nanoclusters de phosphate de calcium sont préférentiellement situés près de la surface de la micelle. Dans ce modèle, les tailles moyennes des micelles de caséines ont été déterminées en utilisant la diffusion de rayons X aux petits angles et sont comprises entre 70 et 120 nm, tandis que l'épaisseur de l'enveloppe diffuse de caséines- $\kappa$  est comprise entre 10,5 nm et 11,8 nm. Ces valeurs correspondent bien à la théorie des micelles « chevelues », qui représentent les chaînes macropeptidiques C-terminales des caséines- $\kappa$  étendues vers l'extérieur de la micelle sur une distance moyenne de 12 nm (Holt & Horne, 1996).

### *1.2.1.3- Modèle éponge*

Enfin, le modèle éponge de Bouchoux, Gésan-Guiziou, Pérez, & Cabane (2010) présente la micelle de caséines comme une structure protéique hétérogène qui serait composée de régions denses et de régions creuses représentées sous forme de cellules de Voronoï d'environ 25 nm (Figure 4). Dans ce modèle, les régions creuses contiennent principalement du solvant et les régions denses (dont la taille varie entre 10 et 40 nm) contiennent tous les nanoclusters de phosphate de calcium et le matériel protéique (caséines). Les régions denses sont connectées et/ou partiellement fusionnées les unes avec les autres, formant ainsi un matériau continu et poreux. La structure générale de la micelle de caséine contiendrait selon ce modèle environ 30 régions denses, avec une polydispersité considérable.

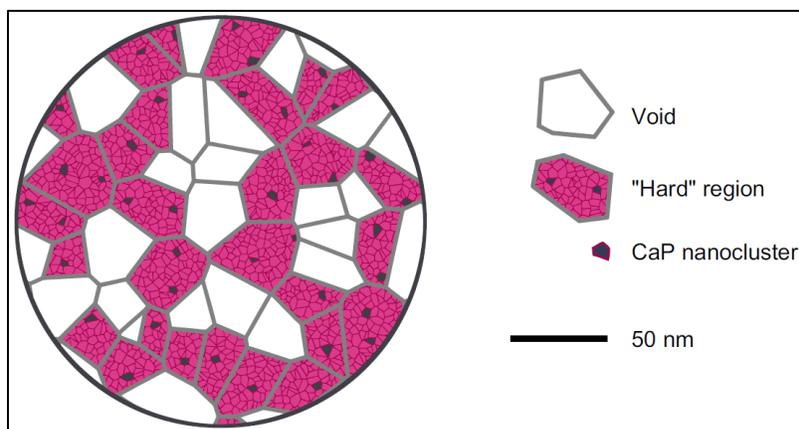


Figure 4 : Modèle éponge de la micelle de caséines (BOUCHOUX et al, 2010)

#### 1.2.1.4- Effet des traitements physiques sur les micelles de caséines

L'ensemble des modèles présentés précédemment propose différentes versions de la structure de la micelle de caséines, et cette structure n'est à ce jour pas encore totalement établie. De plus, la structure interne de la micelle de caséine est composée d'un assemblage de plusieurs composants qui sont en équilibre complexe avec leur environnement. Les interactions entre les composants, et entre les micelles elles-mêmes, peuvent varier en fonction des conditions ioniques, de la température et de la concentration en protéine. La micelle est un système complexe et dynamique non figé difficile à observer dans des conditions qui sont représentatives de l'état natif du lait. Ainsi si la composition des micelles de caséines est bien établie, il subsiste encore des controverses quant à la structure exacte de celles-ci.

Le changement de différents paramètres comme la température, le pH, la force ionique, l'activité de l'eau, etc., peuvent conduire à des changements dans la composition et donc dans la taille des micelles de caséines. Différents types d'interactions participent à la cohésion des caséines entre elles comme des interactions hydrophobes, les liaisons ioniques *via* le phosphate de calcium, des liaisons hydrogène (H) et interactions électrostatiques. En particulier, les répulsions stériques dues à l'existence de la couche « chevelue » de caséines- $\kappa$  participent à la stabilité des micelles. Ces types de cohésion et de répulsions ont pour conséquence que le lait peut supporter des conditions de traitement sévères, tels que des températures élevées de pasteurisation et de fortes vitesses de cisaillement lors de l'homogénéisation sans pour autant que cela impacte fortement la structure des micelles de caséines.

En revanche, une diminution de pH (jusqu'au point isoélectrique) ou l'exposition à des températures élevées pendant un temps long peuvent provoquer l'agrégation d'une dispersion de micelles de caséines (Dickinson, 1996). En effet, la température d'un traitement thermique peut jouer sur la stabilité des micelles de caséines et cela est dépendant du pH du milieu. Des études ont mis en évidence que les

micelles de caséines d'un lait reconstitué peuvent se dissocier partiellement au cours d'un chauffage à environ 70-80 °C pour des pH supérieurs à 6,7 (Anema, 2007; Anema & Klostermeyer, 1997). L'étude d'Anema (2007) a montré qu'au fur et à mesure que le pH augmente avant le chauffage, le taux de caséine- $\kappa$  dans le lactosérum augmente ce qui peut expliquer la diminution de taille des micelles de caséines. Par contre, à des pH légèrement inférieurs à 6,7 (environ 6,5), l'intégrité des micelles est maintenue et aucune dissociation n'est observée (Anema & Li, 2000). De plus, les nanoclusters de phosphate de calcium ne sont pas les seuls responsables du maintien de l'intégrité des micelles de caséines, des interactions hydrophobes interviennent également. Il a été montré que la solubilité de la caséine- $\beta$  augmentait lorsque la température diminuait sur toute la plage de pH de 3,9 à 5,2. La solubilité était maximale entre 5 et 15 °C ce qui permet à la caséine- $\beta$  de quitter la micelle (Bingham, 1971). Un abaissement de la température diminue l'intensité des interactions hydrophobes, ce qui peut également induire des variations de la structure et de la taille des micelles.

L'effet des variations de pH sur la stabilité des micelles de caséines est également bien connu. Une diminution de pH légèrement inférieure au point isoélectrique peut provoquer l'agrégation d'une dispersion de micelles de caséines due à une diminution des répulsions électrostatiques remplacées par des interactions hydrophobes, hydrogènes et électrostatiques, jusqu'à entraîner la formation d'un réseau (Darling & Dickson, 1979; Dickinson, 1996). Si la concentration en caséines est suffisamment élevée, un gel ferme se forme (Anema & Li, 2000; Famelart, Lepasant, Gaucheron, Le Graet, & Schuck, 1996; Le Graet & Brulé, 1993; Lucey & Singh, 1998; Vasbinder, Van Mil, Bot, & De Kruif, 2001). De plus, lors de la diminution du pH, entre 6,7 et 5,8, le phosphate de calcium présent au sein des micelles se solubilise (Dalglish & Law, 1988, 1989). Ensuite, à un pH situé entre 5,3 et 5,1, le phosphate de calcium est entièrement solubilisé, les interactions au sein de la micelle sont donc affaiblies et une partie des caséines est libérée dans le sérum, ce qui conduit à une perte de structure des micelles de caséines (Anema & Li, 2000; Famelart et al., 1996; Le Graet & Brulé, 1993; Walstra, 1990). Les caséines individuelles peuvent être redispersées en remontant le pH du lait. Par contre, la structure initiale de la micelle n'est pas retrouvée.

### **I.2.2- Les protéines du lactosérum**

#### ***I.2.2.1- Généralité sur les protéines du lactosérum***

Les protéines du lactosérum ou protéines sériques constituent la fraction soluble des protéines du lait. Ce sont des protéines globulaires essentiellement composées d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ . La  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) est la protéine majoritaire (60%). Elle est composée de 162 acides aminés et

contient deux ponts disulfures et un groupement sulfhydryle libre (Papiz et al., 1986). La structure secondaire de la  $\beta$ -lg est composée d'environ 15% d'hélices  $\alpha$ , de 51% de feuillets  $\beta$  et 30% de pelotes statistiques (Creamer, Parry, & Malcolm, 1983). L' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -lac) est la deuxième protéine la plus abondante (20%) ; elle est constituée de 123 acides aminés et possède un site de fixation du calcium qui permet de stabiliser sa conformation. L'albumine sérique bovine (BSA) représente 5,5% des protéines sériques et est constituée de 582 acides aminés et les immunoglobulines sont présentes à environ 9% (Bryant & McClements, 1998; de Wit & Klarenbeek, 1984; Farrell et al., 2004; Kinsella & Whitehead, 1989; Thompson et al., 2009). Les principales caractéristiques physiques et physicochimiques des protéines du lactosérum sont regroupées dans le Tableau III.

**Tableau III** : Caractéristiques physiques et physicochimiques des principales protéines du lactosérum (d'après Bryant & McClements, 1998; Farrell et al., 2004)

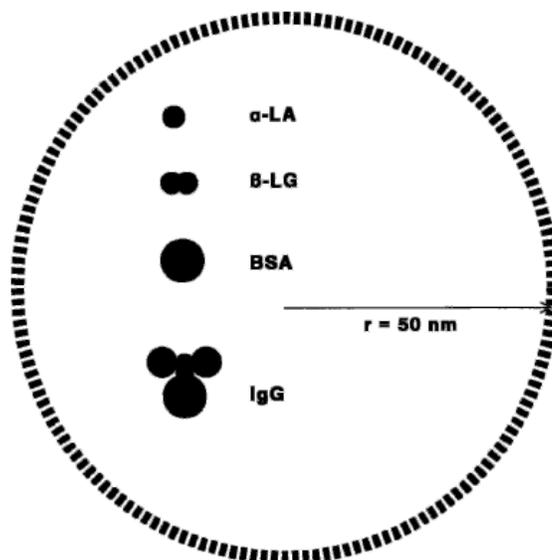
Protéine	%	g/L (lait écrémé)	Poids moléculaire	Point isoélectrique	T° de dénaturation	Ponts disulfures
$\beta$ -lactoglobuline	60	2-4	18400	5,2	78 °C	2
$\alpha$ -lactalbumine	22	0,6-1,7	14200	4,2-5,1	62 °C	4
Albumine sérique bovine	5,5	0,4	66000	4,7-5,1	64 °C	17
Immunoglobulines	9,1	/	15-96 X 10 <sup>4</sup>	5,5-6,8	72 °C	/

Sous leur forme native, les protéines du lactosérum présentent un cœur hydrophobe et une surface hydrophile. La  $\beta$ -lg peut exister sous forme de monomère, de dimère ou d'octamère en fonction du pH, de sa concentration, de la force ionique et de la température. Cependant, dans les conditions natives du lait, elle est présente sous forme de dimère (Gaucheron, 2004). La  $\beta$ -lg, comme la BSA, possède un groupement thiol libre alors que l' $\alpha$ -lac en est dépourvue. Le point isoélectrique des trois protéines sériques majoritaires est situé autour de pH 5 avec de petites variations en fonction de la protéine concernée (Tableau III).

Un traitement thermique suffisant peut entraîner la dénaturation puis l'agrégation de ces protéines. La dénaturation d'une protéine correspond à la désorganisation de sa structure spatiale sans rupture des liaisons covalentes, la protéine est partiellement ou totalement dépliée, et les groupements hydrophobes sont exposés. Le groupement -SH de la  $\beta$ -lg et les ponts disulfures des  $\beta$ -lg et  $\alpha$ -lac sont les précurseurs du phénomène d'agrégation pouvant se produire au cours d'un traitement thermique. La température de dénaturation des protéines varie en fonction du type de protéine sérique. Ainsi, la  $\beta$ -lg a une température de dénaturation de 78 °C (Bryant & McClements, 1998). Les autres protéines sériques

commencent à se dénaturer à partir de 60 °C (Chen & Dickinson, 1998; Kinsella & Whitehead, 1989; Paulsson & Dejmek, 1990). Les protéines du lactosérum sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire car elles possèdent d'excellentes propriétés nutritionnelles et fonctionnelles.

Sur la Figure 5 sont représentées les tailles des différentes protéines du lait :  $\beta$ -lg,  $\alpha$ -lac, BSA, IgG et une micelle de caséines de petite taille (100 nm de diamètre), pour permettre une comparaison des tailles des diverses espèces protéiques en présence.



**Figure 5 :** Comparaison de la taille des protéines du lactosérum avec une micelle de caséines de taille moyenne (rayon : 50 nm).  
 $\alpha$ -LA : 1,8 nm ; dimère de  $\beta$ -LG : 3,5 nm ; BSA : 4 nm ; tétrade d'IgG : 6 nm. (de Wit, 1998)

En contrôlant différentes conditions physico-chimiques et physiques (pH, concentrations en protéines et en sel de la solution, taux de cisaillement, durée et température du traitement thermique), il est possible d'obtenir différents types d'agrégats de protéines sériques.

### *1.2.2.2- Agrégation des protéines sériques ou de la $\beta$ -lactoglobuline*

Au cours du traitement thermique, de nombreuses réactions influent sur les propriétés des protéines. Il peut notamment se produire une dénaturation et agrégation des protéines du lactosérum seules ou en présence des micelles de caséines. Ces réactions modifient les propriétés physico-chimiques, nutritionnelles et fonctionnelles des protéines et peuvent jouer un rôle majeur dans la stabilité des produits laitiers chauffés (Thompson et al., 2009). Il est essentiel d'avoir une bonne compréhension de ces réactions pour utiliser les bonnes conditions expérimentales et ainsi obtenir les bonnes propriétés fonctionnelles, afin d'éviter au maximum les réactions indésirables (Anema & McKenna, 1996).

De nombreuses études présentent le processus de dénaturation et agrégation de la  $\beta$ -lg (de Wit, 2009; Nicolai et al., 2011; Relkin, 1998; Roefs & De Kruif, 1994). Lors du chauffage cette protéine subit une dénaturation qui se traduit par un déploiement des molécules. Ce déploiement entraîne l'exposition de parties situées à l'intérieur des molécules et des interactions électrostatiques et hydrophobes peuvent se mettre en place entre les parties nouvellement exposées, ce qui conduit à l'agrégation des molécules dénaturées.

Roefs & De Kruif (1994) ont décrit de manière précise le mécanisme de formation des ponts disulfures durant les phases d'agrégation de la  $\beta$ -lactoglobuline au cours du traitement thermique. Ce mécanisme contient 3 étapes, l'initiation, la propagation et une étape de terminaison :

- L'initiation ( $K_1$ ) est constituée de plusieurs réactions réversibles, suivie d'une réaction irréversible, ce qui correspond à l'initiation réelle. Il s'agit d'une réaction de premier ordre, dans laquelle le groupe sulfhydryle libre de la  $\beta$ -lactoglobuline native (B) est transformé et devient réactif ( $B^*$ )
- Le groupe sulfhydryle réactif du  $B^*$  réagit par une réaction d'échange de liaison sulfhydryle/disulfure avec l'un des deux ponts disulfures intramoléculaires d'un monomère non-dénaturé (B) pour former un dimère  $B_2^*$ . Un pont disulfure intermoléculaire est formé et un nouveau groupe sulfhydryle libre réactif est maintenant disponible sur la molécule à l'origine non dénaturée. Le dimère réactif peut réagir à son tour (de la même façon) avec un monomère non dénaturé et cette étape peut être répétée plusieurs fois, c'est la propagation ( $K_2$ ).
- Enfin, compte tenu de la conformation de la  $\beta$ -lg et des changements de conformation qui se produisent au cours de la réaction de propagation, il est supposé que seul l'un des deux ponts disulfures intramoléculaires et un seul groupe sulfhydryle/monomère est réactif. En conséquence, des agrégats linéaires seront formés. Le procédé de polymérisation s'arrête quand un intermédiaire réactif multimère  $B_i^*$  réagit avec un autre intermédiaire  $B_j^*$  (réaction de terminaison) formant un polymère sans groupe sulfhydryle réactif, il s'agit de la terminaison ( $K_3$ ).

La Figure 6 schématise les 3 étapes de l'agrégation thermique :

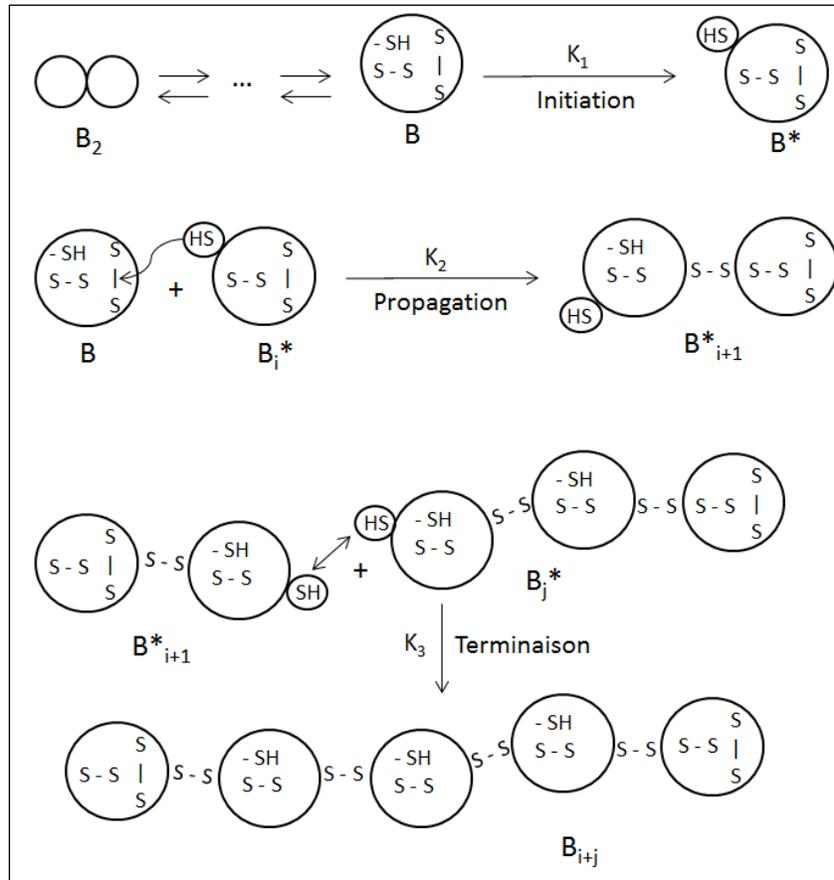


Figure 6 : Etape de l'agrégation thermique de la  $\beta$ -lactoglobuline (d'après Roefs & De Kruif, 1994)

Le modèle proposé par de Wit (2009) montre l'évolution de structure de la  $\beta$ -lactoglobuline en fonction de la température appliquée lors d'un traitement thermique (de 20 à 150 °C) à un pH de 6,8 proche de celui du lait. D'après cette étude, le comportement thermique de la  $\beta$ -lg est complexe et varie avec la température et le temps de chauffage. Il est représenté sur la Figure 7 :

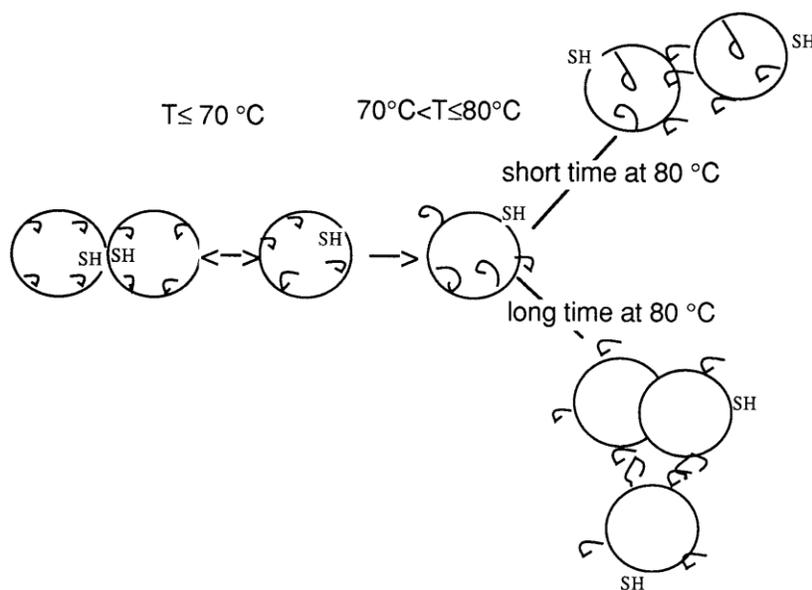
Structure	Temperature	Time	Result
	20°C	-----	Native dimer
			Dissociation at conc. $\leq 25$ mg/ml
2x 	55°C	-----	Monomers
			
	60-70°C	$\geq 15$ min	Molten globule $\Delta H^1 = 142$ kJ/mol
			
	65-75°C	5-10 min	Partial unfolding $\Delta H^1 = 280$ kJ/mol Dimerization by thiol-oxidation
			
	75-85°C	5-10 min	Disulphide and hydrophobic aggregation
			
	85-105°C	$\approx 10$ min and fast cooling	Only disulphide aggregation
			
	$> 125^\circ\text{C}$	5-10 min	Disulphide beakdown and complete unfolding

**Figure 7** : Représentation schématique du comportement thermique de la  $\beta$ -lactoglobuline à un pH  $> 6,8$  entre 20 °C et 150 °C (de Wit, 2009)

On peut voir sur la figure que la dissociation des dimères et de faibles changements de conformation peuvent se produire jusqu'à 55 °C à des concentrations en protéines  $\leq 25$  mg/ml, et qu'ils sont réversibles après refroidissement. Le dépliage partiel de la  $\beta$ -lg dans un "état de globule fondu" ainsi que des modifications irréversibles des monomères sont observées entre 60 et 70 °C. Des petits oligomères sont formés entre 65 et 75 °C, induits par des réactions d'oxydation thiol/thiol, et, dans une moindre mesure par des réactions d'échange disulfure. Un déroulement supplémentaire de la  $\beta$ -lg a lieu, et il reste une structure résiduelle en-dessous de 100 °C. Les oligomères sont étendus par des associations non-covalentes (hydrophobes et induites par le sel) qui se produisent essentiellement entre 75 et 85 °C.

Globalement les 2 modèles présentent un même mode de dissociation des  $\beta$ -lg. Les études ont également montré que le pourcentage de protéines dénaturées augmente avec l'augmentation de la durée du traitement thermique.

Relkin (1998) a également proposé un modèle pour la dénaturation et agrégation des  $\beta$ -lactoglobulines qui suggère que, après la dissociation des dimères de  $\beta$ -lg en monomères, les groupes thiols libres et certains groupes hydrophobes sont exposés à la surface à une température  $> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sur le modèle de la Figure 8, les dissociations survenant après un traitement thermique  $\leq 70\text{ }^{\circ}\text{C}$  sont réversibles. Après un chauffage de courte durée (10 min) à une température de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , des associations intermoléculaires hydrophobes ont lieu et la dénaturation des  $\beta$ -lg est irréversible. Pour un long temps de chauffage à une température de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , des réactions d'échanges thiol-disulfure intermoléculaires et des liaisons hydrophobes peuvent être formées permettant la formation d'agrégats protéiques.



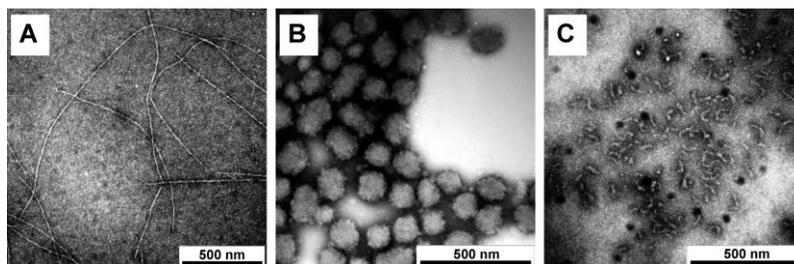
**Figure 8 :** Modèle de dissociation et d'association des monomères et dimères de  $\beta$ -lactoglobuline en fonction de la température (RELKIN, 1998)

En résumé, la dénaturation résulte de la dégradation des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes ou de Van der Waals) qui stabilisent les structures secondaires et tertiaires des protéines (Cayot & Lorient, 1998). Pendant la dénaturation, les résidus hydrophobes qui étaient initialement dans le cœur de la structure globulaire native sont exposés à l'extérieur. Cette exposition de résidus hydrophobes et de groupes sulfhydryle permet d'établir des interactions entre protéines et induit ainsi une agrégation à une concentration suffisante. Pour l' $\alpha$ -lactalbumine, il n'y a pas d'agrégation suite à un traitement thermique lorsqu'elle est seule, en revanche en présence de  $\beta$ -lactoglobuline les deux types de protéines peuvent coagérer.

### I.3- Formation d'agrégats protéiques

Selon le pH, la force ionique et la concentration protéique, différents types d'agrégats peuvent être produits lors du chauffage d'une solution de protéines du lactosérum (Jung, Savin, Pouzot, Schmitt, & Mezzenga, 2008; Nicolai et al., 2011; Nicolai & Durand, 2013). Lorsque le pH est proche de 7, les protéines du lactosérum sont chargées négativement et des agrégats fractals sont obtenus (Nicolai et al., 2011). Dans ces conditions de pH, l'ajout de NaCl permet de diminuer les répulsions électrostatiques et provoque la formation d'agrégats fractals de plus grande taille et de dimension fractale plus élevée (Mahmoudi, Mehalebi, Nicolai, Durand, & Riaublanc, 2007). Par contre, lorsque le pH est proche du point isoélectrique, les protéines sont faiblement chargées et s'agrègent facilement pour former des agrégats denses et sphériques appelés microgels (Donato, Schmitt, Bovetto, & Rouvet, 2009). Les agrégats microgels peuvent également être obtenus en présence de calcium et à un pH proche de la neutralité (Phan-Xuan et al., 2014). En dessous du point isoélectrique, lorsque les protéines sériques sont chargées positivement, un traitement thermique à pH 2 de plusieurs heures à faible force ionique induit la formation d'un autre type d'agrégats : les fibrilles (Aymard, Nicolai, Durand, & Clark, 1999). Un dernier type d'agrégats peut être obtenu en chauffant une solution de protéines sériques en présence de micelles de caséines. Dans ce cas, les protéines du lactosérum se fixent aux micelles pour former des agrégats appelés agrégats mixtes (Anema & Li, 2000, 2003).

Tous ces types d'agrégats diffèrent non seulement par leur taille et morphologie, mais aussi par leur structure interne (Jung et al., 2008). Sur la Figure 9 sont présentés différents types d'agrégats obtenus en fonction du pH :

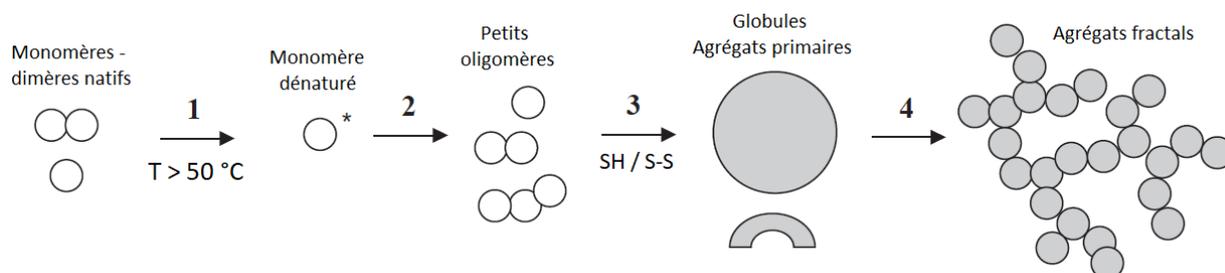


**Figure 9** : Observation MET de différents agrégats de  $\beta$ -Ig obtenus par chauffage à une concentration de 1% et à différents pH : (A) fibrilles à pH 2 ; (B) agrégats sphériques (microgels) à pH 5,8 ; (C) agrégats fractals à pH 7 (Jung et al., 2008)

La taille des agrégats peut augmenter avec le temps de chauffage jusqu'à ce que l'état d'équilibre soit atteint et qu'il ne reste plus de protéines natives. Elle augmente également avec la concentration en protéines. Le système obtenu est habituellement une dispersion stable d'agrégats ou un gel si la concentration est supérieure à une valeur critique (Nicolai et al., 2011; Nicolai & Durand, 2013).

### I.3.1- Les agrégats fractals

Comme expliqué précédemment, il est possible d'obtenir des agrégats fractals à pH proche de 7 dans des conditions de répulsion électrostatique relativement élevées, c'est-à-dire à faible force ionique  $\leq 20$  mM (Nicolai et al., 2011). Le processus de formation de ces agrégats a été décrit en 4 étapes (Figure 10) :



**Figure 10** : Représentation schématique du processus d'agrégation de la  $\beta$ -Ig à pH 7 (d'après Aymard, Gimel, Nicolai, & Durand, 1996; Nicolai et al., 2011)

- **Etape 1** : dans un premier temps, suite au traitement thermique de la solution de protéines sériques, les dimères naturellement présents dans la solution de  $\beta$ -lactoglobuline native se dissocient et les monomères sont dénaturés.
- **Etape 2** : ceux-ci s'associent de manière irréversible en petits oligomères (principalement des dimères et des trimères) par formation de ponts disulfures.
- **Etape 3** : au-dessus d'une concentration d'association critique, les oligomères forment des agrégats primaires plus grands avec différentes formes et tailles (rayon hydrodynamique entre 15 et 150 nm) en fonction du pH et de la concentration en sel. La concentration d'association critique est d'autant plus basse que la force ionique de la solution est élevée ou que le pH est proche du point isoélectrique.
- **Etape 4** : lorsque la concentration protéique est plus élevée, les agrégats primaires peuvent former des agrégats (fractals) ramifiés de plus grande taille et polydisperses. Leur structure est maintenue par la formation de ponts disulfures, d'interactions hydrophobes, de liaisons hydrogène et de forces électrostatiques. Leur taille augmente avec le temps de chauffage. Ces agrégats précipitent ou gélifient au-dessus d'une concentration critique.

Mahmoudi et al. (2011) ont montré que lors du traitement thermique, la quantité de protéines natives diminue au profit d'une augmentation de celle des agrégats. Ceci est d'autant plus marqué que la température est élevée, ce qui conduit à des agrégats de poids moléculaire plus élevés. De plus, une concentration élevée en sel favorise l'agrégation, les agrégats formés à haute force ionique étant environ

deux fois plus grands que ceux formés à faible force ionique (Mahmoudi et al., 2007; Phan-Xuan et al., 2011).

Il a également été montré que la formation d'agrégats du même type peut être obtenue à partir d'un mélange de protéines sériques (Havea, Singh, & Creamer, 2000). Les agrégats sont formés par co-agrégation des différentes protéines présentes ( $\beta$ -lg,  $\alpha$ -lac et BSA). Dans un mélange contenant les 3 types de protéines, le processus d'agrégation est gouverné par la  $\beta$ -lg, qui est la protéine majoritaire et celle possédant un -SH libre actif. Cependant, les 2 autres types de protéines jouent un rôle non négligeable car elles peuvent former des co-agrégats avec la  $\beta$ -lg. Dans un mélange des différentes protéines sériques, il peut donc se former des homopolymères de chaque protéine ainsi que des copolymères.

### **I.3.2- Les agrégats microgels**

Dans des conditions de répulsions électrostatiques faibles, il est possible d'obtenir des agrégats microgels denses et sphériques avec un rayon hydrodynamique proche de 150 nm par deux méthodes :

- En présence de calcium et à un pH proche de la neutralité, des agrégats microgels peuvent être formés, la présence de l'ion divalent calcium permettant de réduire la densité de charge des protéines (Phan-Xuan, 2013; Phan-Xuan et al., 2014).
- En se plaçant dans un milieu légèrement acide c'est-à-dire à un pH proche du point isoélectrique des protéines et à faible force ionique, les répulsions électrostatiques sont diminuées et les protéines faiblement chargées s'agrègent facilement pour former des microgels (Donato et al., 2009; Schmitt, Bovay, Vuillomenet, Rouvet, & Bovetto, 2011).

Il a été montré qu'un paramètre essentiel pour la formation de microgels est la charge nette des protéines natives qui peut être contrôlée, soit par le pH, soit en ajoutant des ions divalents comme le calcium (Phan-Xuan, 2013; Phan-Xuan et al., 2014). Ainsi, la taille et la densité des microgels augmentent avec l'augmentation de la concentration en calcium, alors que lorsque la charge nette devient fortement négative, ceux-ci ne peuvent plus être formés. De plus, si le calcium libre est en excès, les microgels peuvent s'agréger ce qui conduit à la précipitation ou à la gélification de la solution de protéines. En absence de calcium, l'impact du pH sur la formation des microgels a été largement étudié (Donato et al., 2009; Jung et al., 2008; Kharlamova, Inthavong, Nicolai, & Chassenieux, 2016; Mehalebi, Nicolai, & Durand, 2008).

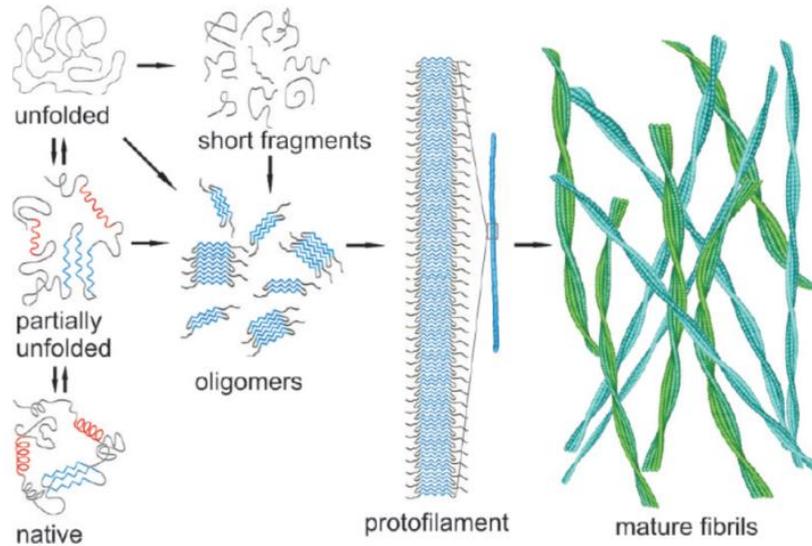
Le contrôle du pH est plus important pour la formation des microgels que pour celle des agrégats fractals (Kharlamova et al., 2016). En l'absence de sel, il a été constaté que le pH optimal de formation de microgels était entre 5,7 et 5,9 pour un traitement thermique à 85 °C (Donato et al., 2009). De plus, la formation de microgels à partir de protéines de lactosérum par chauffage est conduite par la composition en protéines et la composition minérale. La présence d' $\alpha$ -lactalbumine dans le mélange est néfaste pour leur formation car elle induit la formation d'agrégats solubles au détriment des microgels (Schmitt et al., 2011). Ceci a été expliqué par une diminution de l'hydrophobie de surface des agrégats primaires contenant une plus grande quantité d' $\alpha$ -lactalbumine.

Le mécanisme de formation des microgels se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, une dénaturation des protéines sériques est nécessaire permettant la formation de petits agrégats primaires denses et sphériques qui serviront d'unité de base pour la formation des microgels (Nicolai et al., 2011; Schmitt et al., 2010). Les agrégats primaires vont ensuite s'associer par 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 élevées c'est-à-dire supérieures à 10, les ponts disulfures sont rompus et une dissociation des microgels est observée (Schmitt et al., 2010).

### **I.3.3- Les agrégats fibrillaires**

Les fibrilles sont de longs filaments insolubles et hautement ordonnés composées de protéines et/ou de peptides issus des protéines mises en œuvre (Adamcik & Mezzenga, 2012; Akkermans, Venema, et al., 2008; Gosal, Clark, Pudney, & Ross-Murphy, 2002; Veerman, Ruis, Sagis, & van der Linden, 2002). Les fibrilles ont une épaisseur d'environ 4 nm et une longueur comprise entre 1 et 10  $\mu$ m. La formation des fibrilles est induite par un traitement thermique à pH 2 de plusieurs heures à faible force ionique et avec l'application d'un cisaillement (Aymard et al., 1999). Leurs dimensions particulières font des fibrilles un matériel intéressant pour de nombreuses applications, notamment comme épaississants pour les produits alimentaires (Akkermans, Venema, et al., 2008).

Après chauffage à pH 2, les protéines sont dénaturées et subissent une hydrolyse acide, ce qui entraîne la formation de peptides (Akkermans, Venema, et al., 2008). La seconde étape consiste en une agrégation de certains des peptides formés précédemment. Seule une partie des peptides, les plus faiblement chargés et les plus hydrophobes s'assemblent sous forme de protofilament, *via* la formation de feuillets  $\beta$  intermoléculaires. Enfin, les protofilaments vont s'assembler pour donner des fibrilles dites matures comme schématisé sur la Figure 11 (Adamcik & Mezzenga, 2012).



**Figure 11** : Mécanisme de la conversion des protéines globulaires en fibrilles amyloïdes (Adamcik & Mezzenga, 2012)

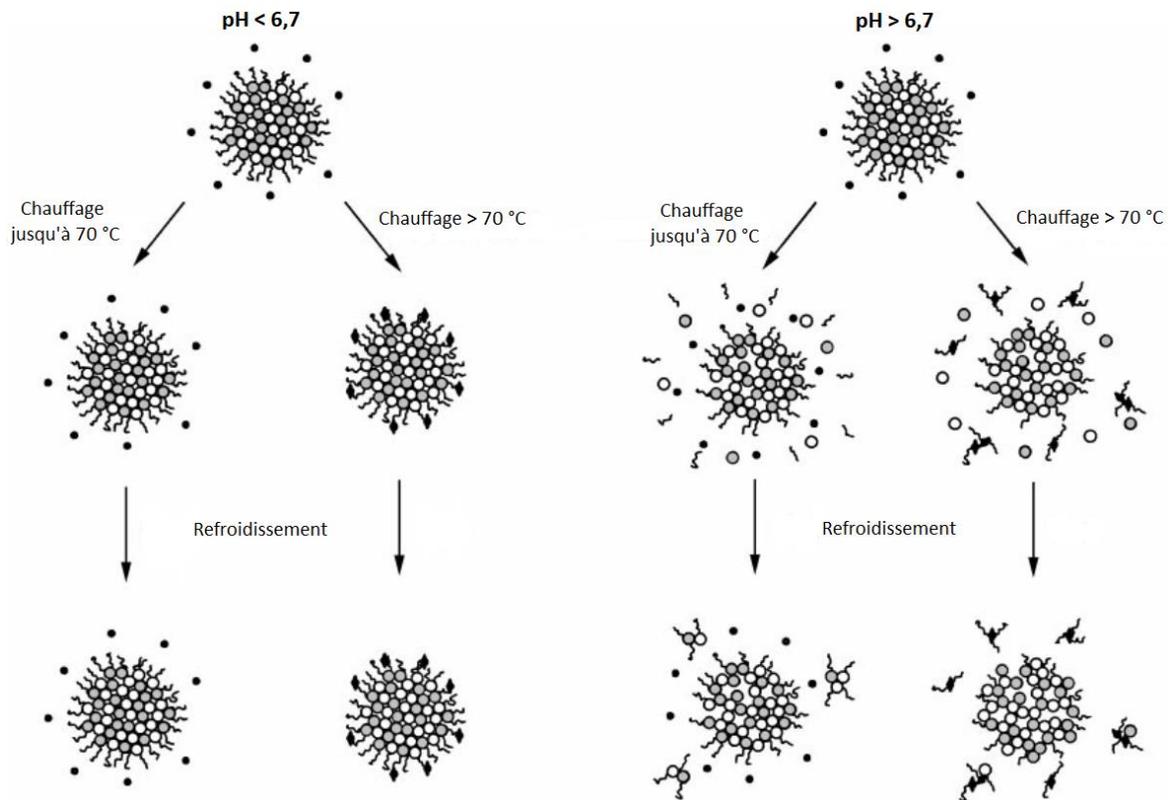
Un paramètre important pour la fabrication des agrégats fibrillaires et améliorer le rendement est le taux de cisaillement appliqué, en effet il peut influencer la quantité de fibrilles formées lorsque la concentration en protéines est suffisamment élevée : supérieure à 3% (p/p) Whey Protein Isolate (WPI) (Akkermans, van der Goot, Venema, van der Linden, & Boom, 2008). A faible concentration en protéines, le taux de cisaillement n'influence pas la quantité de fibrilles produites, en revanche, des taux de cisaillement trop élevés à une concentration suffisante en protéines peuvent provoquer la rupture de liaisons non matures à l'intérieur des fibrilles et diminuer le rendement.

Akkermans et al. (2008) ont identifié 55 peptides produits par l'hydrolyse au cours du traitement thermique à pH 2 de la  $\beta$ -lactoglobuline, et seulement 12 de ces peptides sont retrouvés dans la fraction contenant des fibrilles. L'absence de l'ensemble des peptides dans la formation des fibrilles explique le rendement limité de conversion des protéines en fibrilles. De plus, les expériences de Bolder, Vasbinder, Sagis, & van der Linden (2007) ont montré que la  $\beta$ -lg était la seule protéine de lactosérum capable de former des fibrilles. L' $\alpha$ -lac et la BSA seules ne forment pas de fibrilles, même si elles sont hydrolysées à pH acide et libèrent également des peptides en solution. Par contre, en présence de  $\beta$ -lg, il est possible que certaines fibrilles contiennent des peptides provenant de l'hydrolyse de chacune des protéines. En général, une conversion accrue a été observée pour une durée plus longue de chauffage et une augmentation de la concentration en protéines, soit une concentration supérieure à 3% (p/p) de WPI. L'étude a donné des valeurs de conversion au bout de 10 h de chauffage à pH 2 d'environ 5% pour des échantillons avec des concentrations inférieures à 3% (p/p) de WPI et 45% pour 5% (p/p) de WPI.

### I.3.4- Les agrégats mixtes

Le dernier type d'agrégats est formé par chauffage d'une solution de protéines de lactosérum en présence de micelles de caséines. Ces agrégats sont appelés agrégats mixtes et leur structure dépend principalement de deux paramètres : d'une part, du ratio micelles de caséines/protéines du lactosérum choisi, et également des conditions expérimentales utilisées (Anema & Li, 2000, 2003). Les protéines du lactosérum dénaturées au cours du traitement thermique se lient aux micelles de caséines. Cette liaison est réalisée par l'intermédiaire des caséines- $\kappa$ , positionnées à la surface des micelles et possédant un SH libre. Les protéines du lactosérum dénaturées s'y associent *via* des interactions hydrophobes et des ponts disulfures (Haque & Kinsella, 1988; Jang & Swaisgood, 1990). Par contre, la formation d'interactions hydrophobes n'a été prouvée qu'entre les caséines- $\kappa$  isolées et les protéines du lactosérum, mais pas réellement en présence de micelles de caséines. En effet, la partie hydrophobe de la caséine- $\kappa$  est orientée vers l'intérieur de la structure micellaire (Donato & Guyomarc'h, 2009).

La valeur du pH et la température sont des facteurs clés pour la fabrication des agrégats mixtes (Anema & Li, 2000). Pour une température inférieure à 70 °C, les protéines sériques sont très peu dénaturées et restent principalement dans leur état natif, ce qui ne conduit pas à la formation d'agrégats mixtes. Le pH a aussi un impact sur l'intégrité de la micelle de caséines au cours du chauffage. Le pH doit être inférieur à 6,7 pour éviter la dissociation de la micelle, ce qui permet aux agrégats de protéines sériques d'interagir avec les caséines- $\kappa$  présentes à la surface de la micelle (Anema, 2007; Anema & Klostermeyer, 1997). Les conditions optimales de formation de ce type d'agrégats sont donc : un traitement thermique au-dessus de 70 °C à un pH inférieur à 6,7, comme on peut le voir sur la Figure 12.



**Figure 12 :** Effet du pH (inférieur ou supérieur à 6,7) et de la température (inférieure ou supérieure à 70 °C) sur la formation des agrégats mixtes (Anema & Li, 2000)

Différents mécanismes présents dans la littérature tentent d'expliquer la formation des agrégats mixtes. Donato & Guyomarc'h (2009) ont proposé un modèle récapitulatif des 4 hypothèses possibles de formation des agrégats mixtes (Figure 13) :

- La première hypothèse (I.A) est que les agrégats de protéines sériques se formeraient d'abord dans le sérum avant de pouvoir interagir avec les caséines- $\kappa$  (Dalglish, Senaratne, & Francois, 1997; Dalglish, van Mourik, & Corredig, 1997; Elfagm & Wheelock, 1978, 1977; Guyomarc'h, Nono, Nicolai, & Durand, 2009; Haque, Kristjansson, & Kinsella, 1987).
- Dans la seconde hypothèse (I.B), il ne serait pas nécessaire que les protéines sériques soient préalablement agrégées avant d'interagir avec les caséines- $\kappa$ . Dans ce cas, l'agrégation des protéines sériques dénaturées se ferait directement sur les caséines- $\kappa$  des micelles de caséines lors du traitement thermique et non dans le sérum (Euber & Brunner, 1982).
- Enfin, les troisième et quatrième hypothèses (II.C et II.D) proposent que les caséines- $\kappa$  soient susceptibles de se dissocier avant ou après interaction avec les protéines sériques pour se retrouver dans la fraction soluble du lait (Anema, 2007; Anema & Klostermeyer, 1997; Ménard, Camier, & Guyomarc'h, 2005; Singh & Creamer, 1991; Singh & Fox, 1986, 1987).

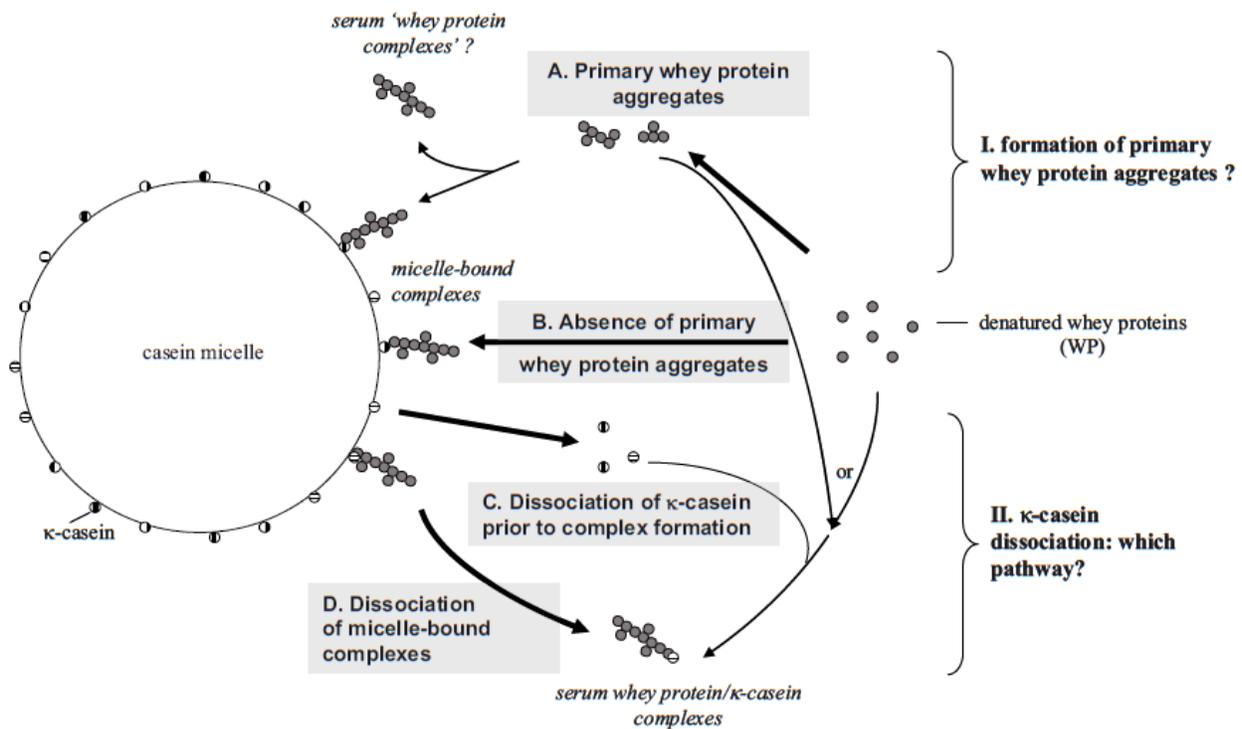


Figure 13 : Hypothèses possibles du mécanisme de formation des agrégats mixtes (Donato & Guyomarc'h, 2009)

A notre connaissance, aucune preuve expérimentale ne permet d'écarter l'une des 4 hypothèses proposées et il est également possible que plusieurs de ces mécanismes soient corrects et se déroulent de manière simultanée (Donato & Guyomarc'h, 2009).

Différents types d'agrégats de protéines sériques peuvent être produit selon les conditions expérimentales appliquées comme : des agrégats fractals, microgels, fibrillaires ou des agrégats mixtes. Le but d'obtenir des agrégats avec des tailles et morphologies différentes est de les utiliser dans la fabrication des gels acides laitiers de type yaourt afin d'accéder à des propriétés physiques et fonctionnelles variées et de modifier la texture des produits finis.

### I.3.5- Stabilité des solutions de protéines et des agrégats de protéines lactières

Différents paramètres peuvent modifier la stabilité des agrégats protéiques en solution comme des paramètres physiques tel que : le chauffage, le pH ou encore la force ionique. De plus, une concentration protéique trop importante peut entraîner une gélification d'une solution de protéines au cours du traitement thermique et une diminution importante du pH de la solution peut également produire cet effet. Plusieurs études ont évalué l'influence des variations de ces paramètres sur la stabilité des agrégats en solution.

En ce qui concerne la stabilité des agrégats au traitement thermique, les travaux de thèse de Chevallier (2017) ont mis en évidence que les agrégats microgels et fractals testés sont plus stables au traitement thermique que les protéines sériques natives (PSN). La stabilité des suspensions d'agrégats est également dépendante de la concentration des protéines en solution. En effet, les suspensions d'agrégats sont stables à des concentrations plus importantes que les PSN. Les travaux ont mis en évidence que la stabilité après un chauffage à 120 °C d'une solution de PSN diminue à partir d'une concentration de 30 g/L alors que cette valeur se situe autour de 45 g/L pour les agrégats fractals. Les agrégats microgels sont encore plus stables au chauffage, même à une concentration de 65 g/L. La stabilité des agrégats après un traitement thermique à 120 °C est présentée sur la Figure 14.

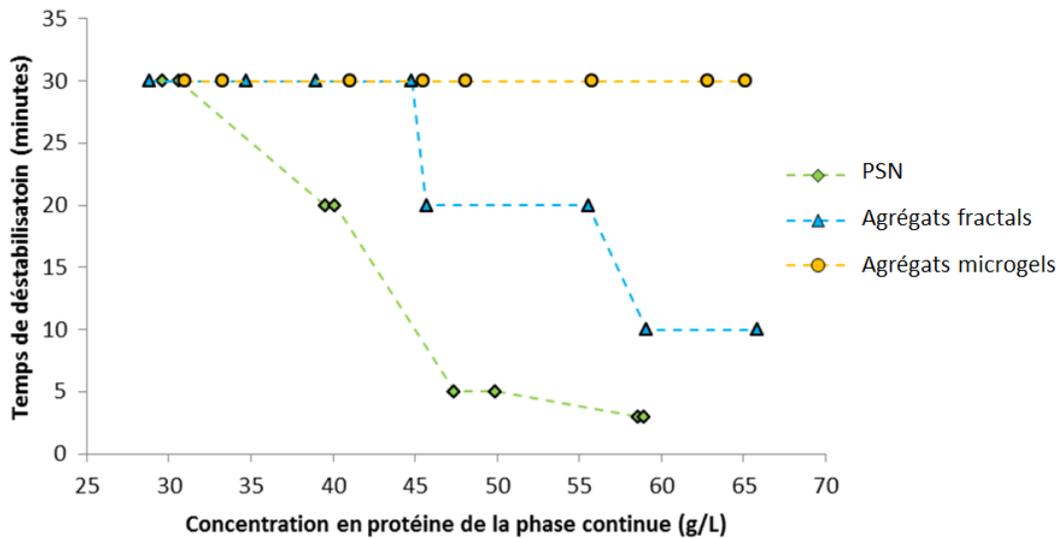


Figure 14 : Stabilité des agrégats en solution au cours d'un traitement thermique à 120 °C (Chevallier, 2017)

D'autre part, il est connu que les variations de pH ont un fort impact sur les protéines lactières notamment les caséines. Par exemple, Darling & Dickson (1979) ont montré que le lait à 40 °C peut précipiter à un pH de 5,2. La diminution du pH peut provoquer l'agrégation d'une dispersion de micelles de caséines (Darling & Dickson, 1979; Dickinson, 1996). En revanche, les micelles de caséines peuvent être redispersées en remontant le pH. Lorsque le pH atteint 4,6, les répulsions électrostatiques diminuent et des interactions hydrophobes et hydrogène se mettent en place, permettant aux caséines de former un réseau (Alting, De Jongh, Visschers, & Simons, 2002; Alting, Hamer, De Kruif, & Visschers, 2000). Si la concentration en micelles est suffisamment élevée, un gel ferme se forme (Anema & Li, 2000; Famelart et al., 1996; Le Graet & Brulé, 1993; Lucey & Singh, 1998; Vasbinder et al., 2001).

Enfin, il est également possible de dissocier des agrégats de protéines laitières à des pH élevés. Il a été montré que pour des valeurs de pH supérieures à 10, les ponts disulfures présents dans les agrégats microgels peuvent être rompus et une dissociation des microgels est observée (Schmitt et al., 2010).

Il a été présenté précédemment qu'une concentration élevée en sel favorise l'agrégation des protéines du lactosérum, les agrégats fractals formés à haute force ionique atteignant une taille plus élevée que ceux formés à faible force ionique (Mahmoudi et al., 2007; Phan-Xuan et al., 2011). L'augmentation de la concentration en sel peut également favoriser la gélification de la solution protéique en réduisant la concentration limite de gélification.

Ainsi, ces travaux montrent qu'il est essentiel de choisir correctement les conditions expérimentales testées au cours de la fabrication des systèmes laitiers (température, pH, concentration protéique...), car modifier certains paramètres peut jouer sur la nature et le comportement des agrégats de protéines et ainsi changer leur fonctionnalité.

### I.4- Les émulsions laitières

Comme expliqué précédemment, le lait est une émulsion de type huile dans eau (H-E), naturellement stable quelques heures sans traitement particulier. En revanche, dans les produits laitiers industriels, la matière grasse est souvent ajoutée en complément ou en remplacement des globules gras natifs. Dans ce cas, il est nécessaire d'utiliser différentes stratégies pour améliorer la stabilisation de ces émulsions. Ces émulsions H-E sont composées de 3 phases différentes qui vont particulièrement nous intéresser :

- Les **gouttelettes de matière grasse** qui correspondent à la phase dispersée. Certains paramètres comme la concentration en matière grasse, la taille des gouttelettes, la distance inter-gouttelette sont essentiels pour contrôler la stabilité des émulsions.
- La partie aqueuse correspond à la **phase continue**. Ses caractéristiques physico-chimiques (pH force ionique...) et sa composition (concentration en protéines, sucre, sels...) peuvent varier et avoir un rôle important sur la stabilité du système.
- L'**interface** correspondant à la surface des gouttelettes de matière grasse, couverte par des molécules amphiphiles comme les protéines laitières, jouant le rôle d'émulsifiant. La nature et la concentration en émulsifiants peuvent moduler les propriétés interfaciales et la stabilité des émulsions (McClements, 1999).

### **I.4.1- Déstabilisation des émulsions**

Une émulsion est un système thermodynamiquement instable car l'augmentation de la surface d'interface entre les phases continue et dispersée s'accompagne d'une augmentation de l'énergie libre du système (Dickinson, 1996). Il règne à l'interface H-E un déséquilibre des forces d'interactions entre les molécules des deux phases. Ce déséquilibre est dû aux propriétés physico-chimiques très différentes entre les molécules d'eau et de lipides. Le système tend à réduire la surface d'interface afin de diminuer cette énergie libre. Ainsi, les gouttelettes ont tendance à se rapprocher, s'accoler, puis fusionner jusqu'à la séparation complète des deux phases. Différents mécanismes de déstabilisation d'une émulsion peuvent se produire. Les principaux mécanismes sont le crémage, la floculation et la coalescence (Dickinson, 1996).

#### ***I.4.1.1- Le crémage***

Le crémage consiste en un mouvement des gouttelettes d'huile, sous l'effet de la gravité ou d'une force centrifuge, pour former une couche concentrée au-dessus d'une émulsion H-E, sans changement de la distribution de taille des gouttelettes. Pour commencer, il s'établit un gradient vertical de concentration des gouttelettes puis une limite distincte peut apparaître entre une couche supérieure de crème et une couche inférieure appauvrie en gouttelettes. Le crémage est réversible ; la distribution initiale des gouttelettes peut en général être restaurée par une agitation douce. Durant le crémage, deux forces vont s'exercer et s'opposer sur les gouttelettes de matière grasse. La première est la force gravitationnelle qui va entraîner les gouttelettes vers le haut de l'émulsion et la seconde est la force de friction qui va ralentir le phénomène.

La vitesse de crémage est dépendante de la taille des gouttelettes, de la différence de masse volumique entre les deux phases et de la viscosité de la phase continue. En modulant ces trois paramètres, il est possible de diminuer la vitesse de crémage d'un système. De plus, le mécanisme de crémage entraîne une diminution de la distance inter-gouttelettes par concentration des gouttelettes de matière grasse dans la partie supérieure de l'émulsion pouvant entraîner l'apparition d'une couche de matière grasse pure à la surface du système. La diminution de la distance inter-gouttelettes peut favoriser la floculation, la coalescence ou encore le relargage de matière grasse, les deux derniers étant des déstabilisations irréversibles du système (McClements, 1999).

Généralement même avec des conditions d'homogénéisation sévères, un léger crémage est inévitable, puisqu'il n'est jamais possible d'éliminer complètement la faible proportion de gouttelettes dont la taille

est de l'ordre du micromètre. De faibles taux de crémage sont tolérables dans le lait tant qu'ils ne sont pas accompagnés d'un changement de texture ou d'aspect.

### *1.4.1.2- La coalescence*

Il s'agit de la fusion irréversible de deux ou plusieurs gouttelettes d'émulsion pour en former une seule de taille plus importante. Quand elle est perçue par le consommateur, elle est presque toujours considérée comme inacceptable.

Quand deux gouttelettes se rapprochent, leur coalescence dépend de la stabilité du mince film de phase continue : le film interstitiel qui les sépare. Généralement, la coalescence se produit quand les gouttelettes ont été proches pendant un laps de temps prolongé (Dickinson, 1996). Ce n'est que quand le film interstitiel de phase continue s'est aminci en dessous d'une certaine épaisseur critique que la probabilité de rupture du film est réelle. Cette rupture du film est favorisée par un diamètre important des gouttelettes, une faible répulsion entre celles-ci et une faible tension interfaciale.

Les protéines conviennent particulièrement pour stabiliser des émulsions H-E contre la coalescence car elles sont suffisamment tensioactives pour donner de petites gouttes. Elles induisent une forte répulsion électrostatique et stérique entre les gouttelettes à une distance assez grande, mais elles n'abaissent que peu la tension interfaciale. De plus, les films protéiques sont fortement viscoélastiques, ce qui tend à amortir les variations de surface, et par conséquent inhibe le mécanisme responsable de la rupture du film (McClements, 1999).

### *1.4.1.3- La floculation*

La floculation est l'agrégation de deux ou plusieurs gouttelettes d'huile dans une émulsion mais avec conservation de leur intégrité individuelle (Dickinson, 1996; McClements, 1999). Ce phénomène est généralement réversible par dilution, changement de pH ou agitation. La réversibilité est possible car il n'y a pas de rupture des films interfaciaux et les agrégats de gouttelettes sont souvent maintenus par des liaisons de faibles énergies. En revanche, toute perturbation du système émulsionné (chauffage, ajout d'émulsifiants de faible masse molaire, d'ions calcium...) qui rend les protéines adsorbées insolubles ou agrégées ou bien qui les désorbent, risque d'induire la floculation des gouttelettes de matière grasse.

La floculation peut être considérée comme un avantage ou un inconvénient en fonction de la texture souhaitée pour le produit. Dans un premier temps, la floculation entraîne une augmentation de la taille effective des particules dispersées et la formation d'agrégats de gouttelettes. Cette augmentation de

taille a pour effet d'accélérer le crémage de l'émulsion. La floculation peut également induire une augmentation de la viscosité du système et dans certaines conditions conduire à la formation d'un gel, car les gouttelettes de matière grasse floculées peuvent former un réseau tridimensionnel dans l'ensemble du volume. Ceci empêche dans ce cas le crémage des gouttelettes et peut augmenter la stabilité du produit (Demetriades, Coupland, & McClements, 1997a, 1997b). Ce phénomène peut être une stratégie pour contrôler la texture du produit.

Les trois phénomènes majeurs de déstabilisation des émulsions sont représentés dans la Figure 15 :

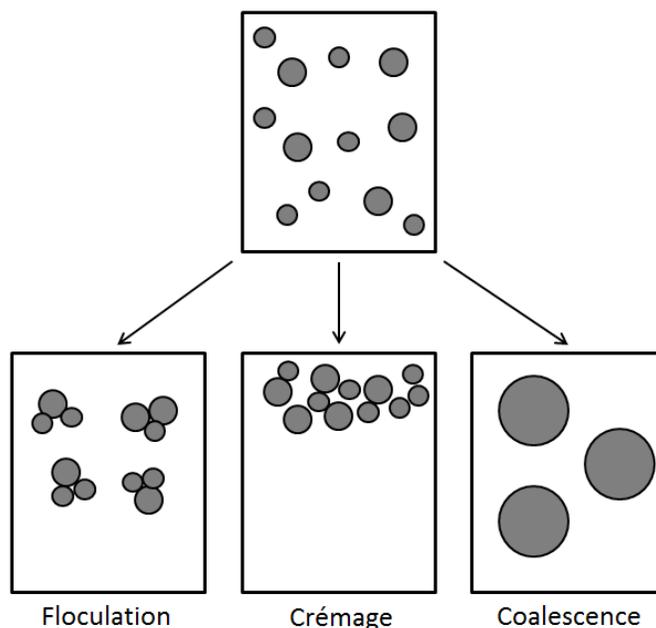


Figure 15 : Déstabilisation des émulsions huile-eau (d'après Surel, 2012)

### I.4.2- Emulsification et tensioactifs

Il est possible de former des émulsions stables de quelques heures à plusieurs mois, notamment en apportant une énergie suffisante pour forcer les deux liquides non miscible à entrer en contact et former une interface : c'est le rôle de l'émulsification (McClements, 1999). Il est également nécessaire que des molécules tensioactives s'adsorbent rapidement et durablement à l'interface pour abaisser la tension interfaciale et ainsi stabiliser le système. Dans le cas de la fabrication des yaourts, c'est l'étape d'homogénéisation du lait qui joue ce rôle et permet d'éviter un crémage trop important par l'application d'un fort cisaillement. L'émulsification se fait généralement en deux étapes : l'homogénéisation primaire qui correspond à la fabrication d'une émulsion grossière à partir des deux liquides non miscibles et l'homogénéisation secondaire qui permet de réduire la taille des gouttelettes de matière grasse.

De plus, pour obtenir une émulsion stable, il est indispensable d'avoir une substance tensioactive c'est-à-dire un émulsifiant dans le milieu, permettant de protéger les gouttelettes de matière grasse nouvellement formées contre une re-coalescence immédiate (Dickinson, 1996). Le terme émulsifiant définit un composé chimique qui contribue à la stabilité de l'émulsion, par son action interfaciale. Pour être efficace, un émulsifiant doit faciliter la création d'une nouvelle interface en abaissant l'énergie libre interfaciale et conférer une certaine stabilité à la gouttelette en formant à sa surface une couche adsorbée protectrice. Les émulsifiants sont des molécules tensioactives qui abaissent la tension aux interfaces huile-eau et air-eau. Un émulsifiant est une molécule amphiphile ayant à la fois une partie polaire et une partie apolaire. Les tensioactifs tendent à s'orienter aux interfaces de sorte que leur tête polaire hydrophile se trouve dans la phase aqueuse et leur chaîne hydrophobe ou lipophile dans la phase non aqueuse. Ils possèdent également un effet stabilisateur sur les gouttelettes de matière grasse en créant à leur surface une barrière énergétique.

Les protéines peuvent jouer ce rôle de tensioactif dans une émulsion laitière. Il s'agit de macromolécules très intéressantes car elles possèdent généralement plusieurs domaines hydrophiles et hydrophobes et peuvent se replier pour minimiser les contacts de leurs zones hydrophobes avec l'eau. De plus, il s'agit de composés naturels, non toxiques, bon marché et facilement disponibles (Wilde, Mackie, Husband, Gunning, & Morris, 2004).

### **I.4.3- Stabilisation des émulsions par les protéines**

Les émulsions ne se forment pas spontanément et sont intrinsèquement instables. Une méthode classique pour stabiliser une émulsion est de créer une couche de protéines adsorbées à l'interface (Dickinson, 1996; Surel, 2012). Généralement dans un produit alimentaire la couche adsorbée n'est pas constituée d'une seule protéine pure mais d'un mélange de molécules protéiques. L'adsorption des protéines à une interface peut se décomposer en trois étapes :

#### **- La diffusion**

La diffusion correspond au transfert des protéines à partir des phases aqueuse ou grasse vers l'interface (Dickinson, 1996). Elle dépend notamment de la taille des protéines, de la viscosité de la solution et de la température. Le temps de diffusion est plus important dans le cas des protéines que dans celui de tensioactifs de faible masse moléculaire. En raison de leur masse moléculaire élevée, les protéines ont une mobilité réduite. De plus, elles doivent subir un changement de conformation au cours de l'adsorption.

### - **L'adsorption**

Les protéines qui sont des molécules amphiphiles, s'adsorbent spontanément à l'interface car elles présentent une forte affinité pour les surfaces hydrophobes. Les protéines ne peuvent pas être désorbées de l'interface par dilution avec le solvant. Par contre, elles peuvent être déplacées des interfaces fluides, soit partiellement, soit complètement en modifiant les caractéristiques du solvant (pH, force ionique...) ou en provoquant une compétition avec des molécules plus tensioactives (émulsifiants de faible masse moléculaire). Lors de l'adsorption, les protéines changent généralement de conformation : elles perdent leur structure tertiaire mais conservent l'essentiel de leur structure secondaire. Seule une partie de la protéine adsorbée est en contact avec l'interface, le reste est déployé dans la phase aqueuse (Dickinson, 1996).

### - **Les réarrangements structuraux**

La morphologie des protéines : globulaires ou flexibles a un fort impact sur la vitesse d'adsorption à l'interface. Les protéines flexibles sont caractérisées par une structure tridimensionnelle très mobile qui leur permet de s'adapter à l'aire interfaciale qu'elles doivent couvrir. La structure et la concentration en protéines du film interfacial dépend de la quantité de protéines disponibles par rapport à l'aire interfaciale créée. Les protéines globulaires, du fait de leur rigidité, conservent en partie leur structure secondaire et tertiaire à l'interface, du fait de liaisons intramoléculaires fortes. Ces protéines se déplient seulement partiellement et lentement pour optimiser les contacts énergétiquement favorables entre les résidus non polaires et l'interface. De plus, elles ont tendance à se dénaturer lorsque le temps d'exposition à l'interface est long, ce qui augmente le caractère irréversible de l'absorption (Graham & Phillips, 1979; McClements, 1999). A cause de leur rigidité, les protéines globulaires s'étalent peu à l'interface par rapport aux protéines flexibles. Leur temps de diffusion est négligeable par rapport à celui du réarrangement à l'interface qui constitue le facteur limitant pour ces protéines. En revanche, pour les protéines flexibles, c'est la vitesse de diffusion dans la phase aqueuse qui peut être le facteur limitant (Martin, Grolle, Bos, Stuart, & van Vliet, 2002). Cependant, dans une émulsion le cisaillement intense au sein de l'homogénéisateur et la distance très faible entre les gouttelettes de matière grasse limitent très fortement l'impact de la vitesse de diffusion. Sur la Figure 16 nous pouvons voir une représentation schématique de la conformation que peut prendre les protéines globulaires et flexibles à l'interface huile/eau.

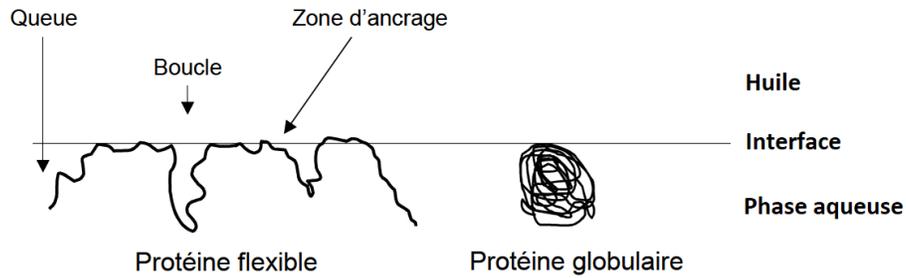


Figure 16 : Représentation schématique de la conformation d'une protéine flexible et d'une protéine globulaire à une interface huile-eau (d'après Surel, 2012)

Les trois étapes de l'adsorption des protéines à l'interface sont présentées sur la Figure 17, avec :

- 1- Diffusion ou transfert vers l'interface,
- 2- Adsorption,
- 3- Réarrangements structuraux (interactions protéine-protéine).

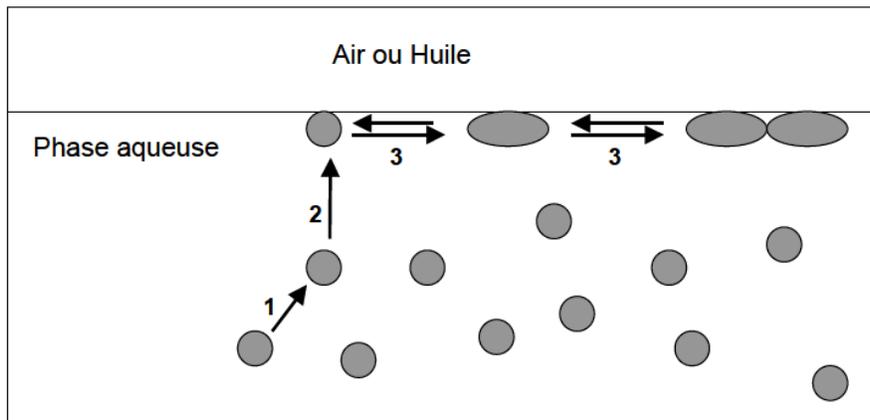


Figure 17 : Etapes de l'adsorption des protéines à l'interface (SUREL, 2012)

En résumé, pour qu'un émulsifiant protéique soluble soit considéré comme bon, il doit posséder un caractère hydrophobe suffisamment marqué et un squelette flexible. En effet, l'aptitude d'une protéine à donner une émulsion formée de petites gouttelettes est fortement corrélée à son aptitude à abaisser rapidement la tension à l'interface H-E. Lorsqu'une protéine s'adsorbe, les interactions hydrophobes s'établissent du côté non-aqueux de l'interface et la protéine perd sa structure tertiaire mais garde l'essentiel de sa structure secondaire.

#### I.4.4- Propriétés interfaciales des protéines lactières

Dans le lait, toutes les protéines n'ont pas les mêmes capacités de stabilisation de l'interface et différents paramètres peuvent influencer leurs propriétés.

Par exemple, l'activité interfaciale des protéines sériques natives (PSN) est faible par rapport à celle des caséines. Les PSN ne sont pas capables de former un film interfacial épais et celui-ci pourrait se rompre lors des phénomènes de déstabilisation comme la coalescence (Britten & Giroux, 1991). Cet effet est lié aux interactions fortes qui se forment entre les protéines sériques à l'interface et qui entraînent une augmentation de la viscoélasticité du film. En revanche, les micelles de caséines peuvent former des associations à l'interface et ainsi donner un film davantage chargé en protéines (Dickinson, Rolfe, & Dalgleish, 1988). L'épaisseur du film interfacial va dépendre notamment de la surface de matière grasse disponible. Lorsque la concentration en protéine est faible par rapport à la surface de matière grasse développée, les micelles de caséines vont avoir tendance à s'étaler pour former un film d'environ 5 nm d'épaisseur et lorsque la concentration en micelles de caséines est en excès, les caséines micellaires à l'interface conservent une certaine structure et peuvent atteindre une épaisseur d'environ 10 nm. De plus, l'épaisseur du film interfacial peut également être contrôlée par l'ajout de calcium, qui entraîne une diminution des répulsions électrostatiques du fait de la plus faible densité de charge des micelles de caséines. Les caséines micellaires vont s'étaler à l'interface diminuant l'épaisseur de film interfacial (Dalgleish, 1996).

Nous avons vu précédemment que les propriétés physiques des protéines sériques peuvent être modifiées par différents traitements. Par exemple, la dénaturation induite par la chaleur, la modification du pH ou la réduction des ponts disulfures peuvent rendre les protéines globulaires plus flexibles et ainsi induire l'exposition de nouveaux résidus hydrophobes. A condition que leur solubilité ne soit pas diminuée, les capacités émulsifiantes sont généralement améliorées par la dénaturation. En revanche, Kiokias & Bot (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 permettent la formation de 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 qu'en présence d'agrégats.

Les différents types d'agrégats protéiques décrits précédemment possèdent des propriétés interfaciales différentes. Par exemple, Jung et al. (2010) ont montré que les fibrilles (mélange de fibrilles et de peptides) s'adsorbent plus rapidement à l'interface que les protéines sériques natives entraînant une diminution de la tension interfaciale. Le mélange fibrilles + peptides donne un film interfacial plus rigide et plus fragile que celui obtenu en présence de protéines sériques natives, à cause de la présence des peptides. Les fibrilles purifiées ont quant à elles des propriétés interfaciales très proches des PSN.

De plus, Mahmoudi et al. (2011) ont étudié les propriétés interfaciales de 2 types d'agrégats de protéines de lactosérum : fractals et microgels. Ils ont montré que les propriétés interfaciales dépendent de la structure des agrégats et des conditions de concentration en sel et du pH. Les variations de composition et les changements structuraux peuvent donner lieu à des comportements rhéologiques des interfaces différents. Le taux d'adsorption et la quantité totale adsorbée sont plus élevés à des pH proches du point isoélectrique où les protéines ne portent pas de charge nette. En revanche, le pH induit des changements dans la structure des protéines globulaires. Mahmoudi et al. (2010) ont également montré que des agrégats denses et rigides ont de moins bonnes capacités d'étalement à l'interface que des protéines plus flexibles. Les propriétés d'étalement dépendent entre autre du degré d'association et de cohésion des agrégats. Pour des temps de chauffage importants, les agrégats sont généralement stabilisés par un plus grand nombre de ponts disulfures et s'étaient moins facilement à l'interface (Mahmoudi et al., 2011). Par contre, une interface composée d'agrégats est plus compacte qu'une interface constituée uniquement de PSN. Dans le cas d'un mélange de PSN et d'agrégats, les premières accèdent plus facilement à l'interface en raison de leur coefficient de diffusion supérieur à celui des agrégats et de leur nombre plus important. Notons cependant qu'en conditions dynamiques les phénomènes de diffusions ne sont pas majeurs, en effet ce sont au contraire les objets les plus denses qui sont projetés à l'interface par les mouvements de cisaillement dû à l'homogénéisation.

### I.5- Les yaourts

Le lait et les produits laitiers sont consommés depuis la domestication des mammifères ; le yaourt et les produits laitiers fermentés seraient originaires du Moyen-Orient et découlent de la nécessité de prolonger la durée de conservation du lait (Tamime & Robinson, 2007). Depuis de très nombreuses années sa fabrication s'est industrialisée et les processus ont été standardisés. L'intérêt pour la fabrication des yaourts a considérablement augmenté pour des raisons scientifiques et commerciales, et de nombreuses recherches ont prouvé leur intérêt bénéfique pour la santé. D'autres recherches portent également sur les caractéristiques sensorielles des yaourts, en particulier leur propriétés texturales (Sfakianakis & Tzia, 2014).

Le Codex Alimentarius, norme n°A-11 (a) (1975) définit le yaourt comme : « Un produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus Bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus* à partir du lait frais ainsi que du lait pasteurisé ou concentré, ou partiellement écrémé, ou enrichi en extrait sec avec ou sans addition de lait en poudre, poudre de lait écrémé, etc. Les micro-organismes du produit final doivent être viables et abondants. »

Les yaourts sont principalement produits à partir de lait bovin, mais le lait d'autres mammifères peut également être utilisé. Les yaourts produits avec du lait provenant d'autres espèces que les bovins présentent des caractéristiques sensorielles et physicochimiques différentes, en raison des différences de composition du lait (Tamime & Robinson, 2007). Par exemple, les yaourts produits avec du lait à haute teneur en matière grasse comme les laits de mouton, chèvre et buffle ont une texture plus crémeuse que ceux produits avec du lait à faible teneur en matière grasse comme les laits de bovin, jument et âne.

Les yaourts sont des produits acides, à pH environ = 4,6, obtenus à partir d'un lait homogénéisé et traité thermiquement et ayant subi une fermentation lactique avec l'ensemencement de deux bactéries à une température d'environ 43 °C. La bactérie *Lactobacillus Bulgaricus* produit essentiellement de l'acide lactique à partir du lactose, ce qui donne le goût acide du yaourt tandis que *Streptococcus thermophilus* produit à la fois de l'acide lactique et de l'acide formique. Les bactéries lactiques doivent être ensemencées simultanément et présente à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme, et ce jusqu'à la date limite de consommation. La quantité d'acide lactique libre ne doit pas être inférieure à 0,8 g/100 g lors de la vente au consommateur. Au laboratoire, pour éviter les problèmes de reproductibilité engendrés par l'utilisation de souches bactériennes, on peut réaliser un gel acide laitier par ajout de glucono- $\delta$ -lactone (GDL), qui s'hydrolyse lentement dans le lait pour produire un acide faible, l'acide gluconique. Ceci permet d'obtenir des cinétiques d'acidification lentes, proches de celles obtenues avec des ferments lactiques, et de former des gels acides laitiers modèles.

Il existe sur le marché français et mondial une très grande diversité de yaourts, de différentes textures : yaourts fermes, brassés ou liquides et également sucrés, naturels, édulcorés, aromatisés ou aux fruits. Certains yaourts peuvent être allégés en matière grasse ou enrichis en crème. Cette très grande diversité de produits a pour but de répondre aux attentes des consommateurs. Le yaourt contient relativement peu de calories : en moyenne 60 kcal pour un pot de 125 g de yaourt nature classique. Il couvre seulement 2 à 5% d'un besoin énergétique moyen de 2200 kcal. Dans la réglementation française, le yaourt ne doit pas contenir d'additifs alimentaires. Pour pouvoir moduler leur texture, les producteurs de yaourts doivent donc travailler sur les procédés de fabrication comme le traitement thermique ou l'homogénéisation du lait ou sur la composition du lait, en modulant par exemple la teneur en matière grasse (produit avec ou sans matière grasse) ou en jouant sur la structure des protéines (incorporation d'agrégats de taille et forme variées). C'est l'ensemble de ces éléments qui seront étudiés au cours de ce travail de thèse.

### I.5.1- Fabrication des yaourts

La fabrication des yaourts est un processus qui comprend plusieurs étapes de préparation présentées dans la Figure 18 suivante :

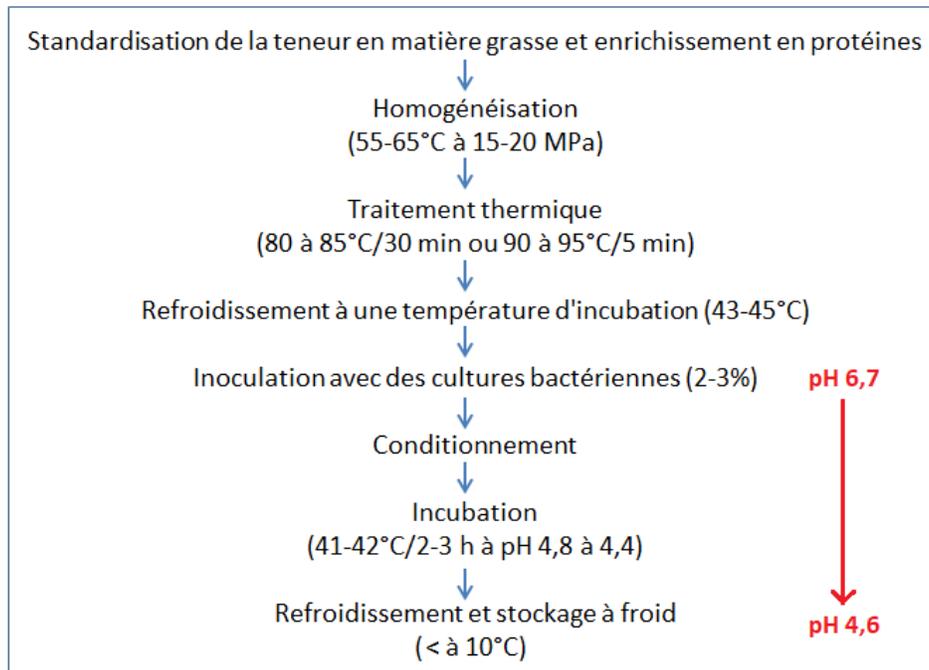


Figure 18 : Etapes de fabrication des yaourts (d'après Lucey & Singh, 1998)

#### I.5.1.1- Standardisation des teneurs des constituants du lait

La première étape de fabrication des yaourts est la standardisation de la teneur en matière grasse (MG) et en protéines du lait. La teneur en MG du lait est ajustée à < 0,5%, pour le lait écrémé, entre 1,5% et 2%, pour le lait demi-écrémé, et à 3,5% pour le lait entier. Dans le yaourt final, cette teneur varie de 0,1% à 10% selon les attentes des consommateurs. Pour atteindre la teneur souhaitée, les industriels procèdent soit à l'ajout de lait écrémé ou de MG laitière, soit à la séparation des MG du lait par centrifugation et mélange de crème au lait écrémé (Tamime & Robinson, 2007). La standardisation de la teneur en MG est un élément primordial du procès de fabrication, car cette teneur joue sur les caractéristiques texturales et aromatiques du yaourt (Shaker, Jumah, & Abu-Jdayil, 2000). De plus, elle a un impact sur la vitesse maximale de diminution du pH pendant la fermentation du produit et sur la texture (Soukoulis, Panagiotidis, Koureli, & Tzia, 2007).

La deuxième variable est la teneur en solides non gras (SNG). Les composants du SNG du lait sont : le lactose, les protéines et les minéraux, et leur teneur peut varier et être modifiée pour obtenir les caractéristiques désirées du coagulum. A une teneur élevée en SNG, la fermeté du yaourt augmente. Le lait pour la production des yaourts peut être enrichi en poudre de lait, en concentrés de protéines de

lactosérum ou en poudre de caséines, pour obtenir la teneur désirée et augmenter la fermeté du yaourt. De plus, une augmentation de la teneur en SNG peut allonger la durée du processus de fermentation en modifiant le pouvoir tampon du lait (Kristo, Biliaderis, & Tzanetakis, 2003).

### *1.5.1.2- Homogénéisation du lait*

Après la standardisation des teneurs en matière grasse et protéines, le lait subit une étape d'homogénéisation. Elle est réalisée pour empêcher notamment la séparation de la matière grasse au cours du stockage, diminuer la taille des gouttelettes de matière grasse et accroître la blancheur du lait (Lucey & Singh, 1998). L'homogénéisation du lait peut être réalisée par l'application d'une pression, d'un écoulement à grande vitesse du lait ou de vibrations à haute fréquence (> 10 kHz). L'application d'une pression, permet de réduire le diamètre des gouttelettes de matière grasse de 2-10  $\mu\text{m}$  à 0,1-1  $\mu\text{m}$  et de modifier la composition de la membrane des gouttelettes. La surface de la phase lipidique augmente de façon inverse à la taille, et l'interface avec la phase aqueuse est principalement couverte par des caséines, ce qui permet de stabiliser les globules nouvellement formés (Cano-Ruiz & Richter, 1997). De plus, il a été montré que la réduction de la taille des gouttelettes de matière grasse et les altérations de la membrane suite à l'homogénéisation contribuent à la stabilité du lait (Aguilera & Kinsella, 1988). Cela facilite l'incorporation de la matière grasse dans le réseau protéique en favorisant les interactions entre caséines et interface de la matière grasse lors de l'acidification (Cho, Lucey, & Singh, 1999).

### *1.5.1.3- Traitement thermique du lait*

Ensuite, le lait est soumis à un traitement thermique qui peut être réalisé avec une durée variable et à une température située au-dessus de la température de dénaturation des protéines sériques. Les effets recherchés sont surtout l'élimination des microorganismes pathogènes et de la plus grande partie de la flore banale, ainsi que la dénaturation thermique d'une part importante des protéines du lactosérum et leur agrégation entre-elles ou sur les micelles de caséines. Le Tableau IV présenté à la fin de ce paragraphe, regroupe les caractéristiques des traitements thermiques les plus couramment appliqués après l'homogénéisation ainsi que leurs effets sur le lait et les yaourts. Ils sont classés en fonction de la durée et de la température et des effets sur le lait et le yaourt, parfois non bénéfiques dépendent surtout de ces deux paramètres technologiques (Sfakianakis & Tzia, 2014; Tamime & Robinson, 2007).

Les agents pathogènes qui peuvent se développer dans le lait, en raison de mauvaises pratiques d'hygiène ou de défaillance matérielle au cours des étapes préalables de traitement peuvent facilement être tués par un traitement thermique léger, garantissant que le lait est sans danger pour la consommation. La plupart des agents pathogènes résistants à la chaleur ne se retrouvent pas dans le lait

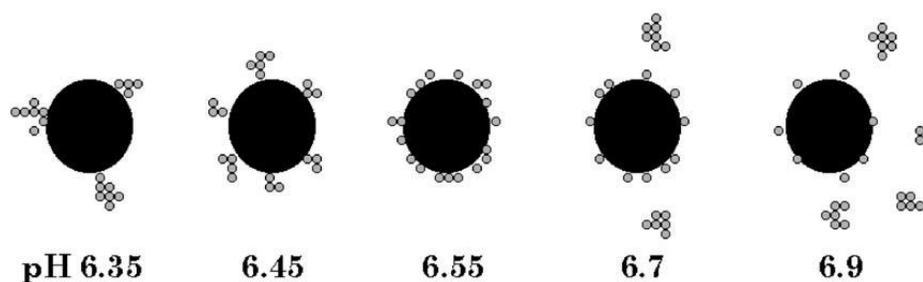
ou sont moins nombreux que d'autres microorganismes endogènes ou encore sont détériorés avant que leur quantité soit suffisante pour causer des problèmes de santé pour le consommateur (Sfakianakis & Tzia, 2014).

Il a été expliqué précédemment que le traitement thermique du lait peut engendrer des modifications des protéines de lactosérum, comme la  $\beta$ -lg et l' $\alpha$ -lac, qui peuvent perdre leur structure native et s'agréger entre-elles ou, pour la  $\beta$ -lg s'associer avec la caséine- $\kappa$  en périphérie de la micelle *via* des ponts disulfures modifiant ainsi les propriétés initiales du lait (Donato & Guyomarc'h, 2009; Mahmoudi et al., 2011, 2010; Vasbinder et al., 2001; Vélez-Ruiz, Barbosa Cánovas, & Peleg, 1997). Les interactions des protéines du lactosérum avec les caséines augmentent le caractère hydrophobe de la surface micellaire, ce qui favorise la gélification (Lucey, Munro, & Singh, 1998). De plus, lorsqu'il y a une agrégation des protéines de lactosérum sur les micelles, la gélification démarre plus tôt et à un pH plus élevé (Guyomarc'h, Jemin, Tilly, Madec, & Famelart, 2009; Lucey & Singh, 1998; Vasbinder et al., 2001), car les protéines du lactosérum dénaturées ont des pH isoélectriques légèrement plus élevés que les caséines (Ozcan, Horne, & Lucey, 2015). De plus, la dénaturation des protéines a pour conséquence d'augmenter la capacité de rétention d'eau du yaourt et d'augmenter sa fermeté et sa stabilité (Guyomarc'h, Jemin, et al., 2009; Lucey, Munro, et al., 1998; Lucey & Singh, 1998; Lucey, Teo, Munro, & Singh, 1998; Mottar, Bassier, Joniau, & Baert, 1989; Vasbinder et al., 2001). Ces phénomènes modifient les propriétés rhéologiques du coagulum acide, ce qui est largement recherché dans la fabrication des gels acides laitiers.

Cependant, les taux de  $\beta$ -lg et  $\alpha$ -lac dénaturées diffèrent grandement selon la durée et le type de traitement thermique appliqué au lait, ce qui indique que l'agrégation est dépendante des conditions de chauffage du lait. Le traitement thermique du lait résulte en un mélange complexe de protéines du lactosérum natives ou dénaturées et de micelles de caséines. Les protéines de lactosérum dénaturées peuvent être soit agrégées entre elles, soit associées aux micelles de caséines *via* la caséine- $\kappa$  (Jang & Swaisgood, 1990; Vasbinder et al., 2001).

De plus, le pH d'un système laitier au moment du traitement thermique a un effet important sur la dénaturation des protéines du lactosérum. Il a été démontré que le pH peut affecter la dénaturation pour des températures de traitements thermiques modérés, c'est-à-dire 80 °C avec généralement un taux de dénaturation inférieur à un pH plus faible à 6,5 que pour un pH de 7,1 (Anema & Li, 2015; Vasbinder & De Kruif, 2003).

Le pH au moment du chauffage du lait a également des effets considérables sur le comportement de distribution des protéines entre les phases micellaire et soluble. Un traitement thermique à un pH plus élevé (6,7 à 6,9) conduit à la formation de plus d'agrégats solubles de protéines de lactosérum, alors qu'un traitement thermique avec un pH inférieur (6,35 à 6,55) entraîne plus d'associations des protéines sériques avec les micelles de caséines (Vasbinder & De Kruif, 2003). Une représentation schématique des interactions entre les micelles de caséines et les protéines du lactosérum en fonction du pH à 80 °C est présentée sur la Figure 18 :



**Figure 19** : Interactions entre micelles de caséines et protéines du lactosérum après un traitement thermique (10 min/80 °C) à des pH allant de 6,35 à 6,9. Petits cercles = protéines du lactosérum dénaturées, grands cercles = micelles de caséines. Les protéines de lactosérum natives ne sont pas incluses sur la figure (Vasbinder & De Kruif, 2003).

Le traitement thermique du lait entraîne également des modifications de la microstructure du réseau par rapport à un gel de lait non chauffé. En effet, les gels acides de lait chauffé ont une structure plus ramifiée que ceux obtenus sans traitement thermique du lait, due à la présence des protéines dénaturées interconnectées (Lucey, Teo, et al., 1998). Les protéines sériques dénaturées associées aux micelles de caséines peuvent agir comme matériaux de liaison et interagissent avec d'autres agrégats en surface d'autres micelles. Ceci augmente le nombre et la force des liaisons du réseau de protéines formé. Suite au traitement thermique, les protéines sériques participent donc de façon active à la formation du gel laitier (Lucey & Singh, 1998).

En plus des effets déjà cités du traitement thermique comme : l'élimination des agents pathogènes et la dénaturation et l'agrégation des protéines. Celui-ci permet également une libération de CO<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub>, une augmentation de la quantité de phosphate de calcium colloïdal insoluble, une diminution des ions calciques et il entraîne l'isomérisation du lactose, ainsi que sa dégradation et la réaction de Maillard. Le traitement thermique peut également affecter le pH du lait et la saveur. Ces modifications sont résumées dans le Tableau IV.

## Chapitre 1 : Etat de l'art

**Tableau IV** : Impact des différentes techniques de traitement thermique sur les propriétés du lait et du yaourt affectant la saveur et la texture (Sfakianakis & Tzia, 2014)

Traitement du lait	Description du traitement	Effet sur le lait	Effet sur le yaourt
Thermisation	Chauffage à 60-69 °C pendant 20-30 s	Destruction/élimination de bactéries résistantes à la chaleur. Inactivation de plusieurs enzymes.	Aucun effet significatif.
Pasteurisation à basse température	Chauffage à 63-65 °C pendant 20 min ou 72-75 °C pendant 15-20 s (HTST : pasteurisation éclair)	Destruction/élimination de la plupart des bactéries pathogènes et végétatives, levures et moisissures. Dénaturation de plusieurs enzymes et protéines du lactosérum.	Légère augmentation de la viscosité et de la fermeté.
Pasteurisation à haute température	Chauffage à 85 °C pendant 20-30 min ou 90-95 °C pendant 5 min	Destruction/élimination de la plupart des microorganismes végétatifs, sauf les spores. Désactivation de la plupart des enzymes et dénaturation de la plupart des protéines de lactosérum. Développement de saveur "cuite".	Forte augmentation de la viscosité et de la fermeté.
Stérilisation	Chauffage à 110 °C pendant 30 min ou 130 °C pendant 40 s	Extermination des micro-organismes. Désactivation de la plupart des enzymes et dénaturation des protéines de lactosérum et agrégation des micelles de caséines et des globules gras. Diminution de la saveur "douce". Brunissement (réaction de Maillard).	Incorporation de protéines de lactosérum dans la matrice de caséine. Forte augmentation de la viscosité et de la fermeté. Brunissement.
UHT (Ultra-Haute Température)	Chauffage à 145 °C pendant 1-2 s	Extermination des micro-organismes. Détérioration de la saveur douce. Dénaturation des protéines de lactosérum ( $\beta$ -lg, BSA, plusieurs immunoglobulines). Développement de "off-flaveurs". Brunissement.	Augmentation de la viscosité et de la fermeté. Brunissement.

### *1.5.1.4- Acidification du lait*

Après le traitement thermique, le lait est refroidi à une température d'environ 43 °C pour permettre l'inoculation des bactéries lactiques et l'incubation du produit. Cette étape permet l'acidification du produit pour atteindre un pH de 4,6. Au cours de cette étape, les caractéristiques du yaourt comme la texture et la saveur se développent. L'étape d'incubation dure plusieurs heures selon la quantité de bactéries ajoutées et l'aptitude du mélange des deux bactéries, le streptocoque (ST) et le lactobacille (LB), à acidifier rapidement le lait. La bactérie ST est une bactérie Gram-positif avec une température optimale de croissance de 35-53 °C, tandis que la LB est une bactérie anaérobie Gram-positif dont la température optimale de croissance est de 40-44 °C. LB peut produire de très grandes quantités d'acide lactique en métabolisant le lactose, ce qui entraîne l'acidification et la prise en masse du lait due à la précipitation des caséines et à la formation d'un gel lisse homogène, le coagulum (FAO, 2003a). Les deux espèces bactériennes présentent une synergie dans le lait. Lorsque le pH approche 5, l'activité de ST diminue et LB domine progressivement le processus de fermentation jusqu'à ce que la valeur de pH souhaitée soit atteinte et que le processus de fermentation cesse. La fermentation peut s'arrêter en abaissant la température à 4 °C. À cette température, les bactéries sont encore vivantes, mais leur activité est considérablement limitée (Lucey & Singh, 1998).

La croissance bactérienne induit des changements dans les composants natifs du lait qui sont responsables des caractéristiques physico-chimiques et sensorielles du yaourt. Pendant la fermentation, le lactose, les protéines du lait, ainsi que plusieurs composés carbonés subissent des changements majeurs, tandis que des changements mineurs surviennent pour les vitamines et les minéraux (Sfakianakis & Tzia, 2014).

Avec l'utilisation de la glucono- $\delta$ -lactone (GDL) pour la fabrication de système modèle, le pH final est fonction de la quantité de GDL initialement ajoutée au lait, de la température d'acidification et du pouvoir tampon du lait que l'on acidifie. Plus la concentration en GDL est importante, plus le temps de gélification est réduit (Fly, Clarke, Du Parquet, Toyne, & Augustin, 1997) et plus la valeur finale du pH diminue.

Pendant l'acidification du lait réalisée soit avec de la GDL, soit avec des bactéries lactiques, le pH baisse progressivement entraînant de nombreuses modifications physico-chimiques des micelles de caséines : la protonation des fonctions acides de certains acides aminés, l'annulation progressive de la charge négative des caséines, la solubilisation des minéraux qui stabilisaient la micelle, comme le phosphate de

calcium colloïdal, et la formation de liaisons hydrophobes et électrostatiques entre les caséines individuelles, ce qui mène à la mise en place d'un réseau (Walstra, 1990).

Les yaourts, après leur conditionnement, peuvent être refroidis et stockés entre 0 °C et 6 °C plusieurs semaines (FAO, 2003a; Lucey & Singh, 1998). Les produits acidifiés comme le yaourt sont très appréciés pour leur texture, leur goût et les bénéfices pour la santé (Vasbinder, Alting, Visschers, & De Kruif, 2003).

### **I.5.2- Paramètres influençant la texture des yaourts**

Les gels acides laitiers obtenus par l'utilisation de la GDL ou les yaourts obtenus par fermentation lactique sont des systèmes colloïdaux dont le milieu de dispersion est liquide, mais possédant les propriétés globales d'un solide (Dickinson, 1996). Un gel peut être défini comme un solide partiellement déformable composé par un assemblage de particules colloïdales ou de macromolécules connectées les unes aux autres. Le composé dispersé ou solubilisé formant le réseau du gel est présent en quantité bien plus faible que le solvant constituant l'essentiel de la masse. A l'échelle macroscopique, le gel est solide car le réseau tridimensionnel formé par les particules ou les molécules de polymère est capable de conserver l'énergie mécanique lors d'une déformation et de retenir la phase liquide. Les yaourts sont composés d'un réseau constitué des protéines et de la matière grasse qui emprisonne la phase liquide (le lactosérum).

Comme il a été dit précédemment, la texture des yaourts peut être liée à la teneur en matière grasse et à la taille des gouttelettes de matière grasse. Chen & Dickinson (1998) expliquent que les gouttelettes de matière grasse font partie intégrante du réseau protéique notamment de par la présence des protéines à leur interface, ainsi que par des effets d'exclusion stérique. De ce fait, plus la fraction volumique de matière grasse est importante, plus l'émulsion sera texturée (Dickinson & Chen, 1999). De plus, la taille des gouttelettes peut être modulée par la pression d'homogénéisation appliquée (Jost et al., 1986). Celle-ci, diminue avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation. La concentration et la nature de l'agent émulsifiant peuvent également moduler la taille des gouttelettes (Dickinson, 2003). Dans le lait, les agents émulsifiants sont constitués essentiellement des protéines du lait. Kiokias & Bot (2006) ont démontré que les protéines sériques natives ont de meilleures propriétés émulsifiantes que les agrégats de protéines sériques, car elles couvrent davantage de surface et permettent ainsi de former des gouttelettes de matière grasse plus petites qu'en présence d'agrégats et qu'ainsi la distance inter-gouttelettes est plus faible. De plus, dans le lait, il y a une grande majorité de caséines (75-80%) parmi les protéines potentiellement émulsifiantes et il est connu qu'elles s'adsorbent préférentiellement à la surface des gouttelettes de matière grasse si on compare avec les protéines sériques (Srinivasan et al.,

1996; Ye, 2008). A haute concentration, les micelles de caséines peuvent recouvrir entièrement les gouttelettes de matière grasse (Chevallier et al., 2016, 2018).

Lucey, Munro, & Singh (1999) et Lucey et al. (1997) ont étudié les effets du traitement thermique sur les propriétés rhéologiques de gels acides laitiers. Ils ont montré que des laits chauffés à des températures  $\geq 80$  °C et acidifiés avec de la glucono- $\delta$ -lactone à 30 °C pendant 16 h, donnaient des gels présentant des modules élastiques beaucoup plus élevés (350 à 450 Pa) par rapport aux gels obtenus sans chauffer le lait (15 Pa), ce qui montre bien que la dénaturation des protéines sériques qui peuvent former des agrégats solubles et également se lier aux caséines micellaires renforce le gel. De plus, Lucey et al. (1999) ont montré que l'addition dans le lait de protéines sériques non chauffées provoque une réduction du module  $G'$ , ce qui signifie que les protéines natives ne contribuent pas à la formation du réseau protéique. Ceci suggère que les protéines sériques natives solubles dans la partie lactosérum ont un « rôle inerte » dans la formation des gels acides de lait.

Lucey, Munro, et al. (1998) ont également montré que le pH de gélification est d'environ 4,9 pour un lait non chauffé et de 5,3 pour un lait chauffé à 80 °C pendant 30 min. Ce décalage s'explique par la différence de points isoélectriques des protéines du lactosérum dénaturées qui sont plus élevés que celui des caséines (Ozcan et al., 2015). Lorsque le pH du milieu est proche de ce point, les interactions sont favorisées. De plus, en se fixant à la surface des micelles de caséines suite au traitement thermique, les protéines sériques augmentent leur hydrophobie de surface, diminuent leur barrière d'hydratation et les capacités de stabilisation stérique des caséines- $\kappa$ . L'ensemble de ces modifications permet aux micelles d'interagir à une charge négative plus grande et donc à un pH plus élevé. Cela explique l'élévation du pH de gélification ainsi que l'augmentation de fermeté et l'amélioration des propriétés élastiques des gels issus des laits traités thermiquement (Lucey, Teo, et al., 1997).

L'étude de Vasbinder et al. (2003) a également montré que la quantité de groupes thiols libres après chauffage semble être en corrélation avec la force du gel. Les propriétés rhéologiques de gels acides obtenus à partir de laits chauffés avec ou sans traitement au N-éthylmaléimide (NEM), un agent bloquant la formation des ponts disulfures, ont montré une contribution significative des ponts disulfures à la fois à l'augmentation du module élastique et à la force des gels après acidification. La formation de ponts disulfures pendant et après l'acidification du lait chauffé contribue fortement aux propriétés mécaniques du gel et à l'augmentation du module élastique. Le processus de formation des ponts disulfures peut continuer même après l'hydrolyse complète de la GDL en absence de NEM, alors qu'il est stabilisé en présence de NEM. L'augmentation de la force du gel pourrait ainsi être attribuée à la

formation de ponts disulfures supplémentaires, plutôt que par des changements dans le mécanisme d'agrégation ou dans la microstructure. La force du gel dépend ainsi de la quantité des groupes thiols libres réactifs des protéines présentes après le chauffage du lait.

Ensuite, la synérèse, qui correspond à la séparation du lactosérum du gel de lait, est un défaut commun dans les produits laitiers fermentés (Lucey & Singh, 1998). Elle peut se produire notamment si le réseau est endommagé ou si le gel subit une réorganisation structurelle importante. La synérèse spontanée peut être définie comme la contraction du gel sans l'application de forces externes, liée à la réorganisation du réseau protéique du gel qui entraîne la perte de la capacité à piéger tout le lactosérum.

Les fabricants de yaourts tentent d'empêcher cette synérèse, par exemple en augmentant la teneur totale en matières solides. Augmenter la concentration de matière grasse (Keogh & O'Kennedy, 1998) ou celle en protéines sont deux façons d'agir sur ce défaut (Delikanli & Ozcan, 2017; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006). La structuration du réseau protéique peut être améliorée avec une concentration protéique plus élevée. Dans ce cas, la taille des pores est réduite et les protéines sont mieux réparties dans le gel, ce qui conduit à une structure de gel plus homogène (Andoyo et al., 2015, 2014). Il existe de nombreuses causes possibles entraînant la synérèse du lactosérum dans un gel acide, telles que (Lucey & Singh, 1998) :

- Des températures d'incubation très élevées ou un traitement thermique excessif du mélange
- Une acidification trop rapide
- Une trop faible teneur en matières solides du mélange, protéines du lait et/ou matière grasse
- Un contenant à parois en pente ou avec un ratio hauteur sur largeur excessif
- Un mouvement ou une agitation durant ou juste après la formation du gel.

### **I.6- Influence des agrégats protéiques sur les gels acides laitiers**

Après ajout d'agrégats de protéines de différents types, les propriétés microstructurales des gels acides maigres de lait peuvent être améliorées (Liu, Buldo, et al., 2016). Par exemple, Andoyo et al. (2014) ont réalisé des gels acides modèles en présence de GDL à 35 °C pour atteindre un pH final de 4,5 après 6 h. Ils ont montré que le remplacement de 10 à 20% des micelles de caséine par des agrégats de protéines du lactosérum produits par traitement thermique à pH 7,5 et 68,5 °C pendant 2h permettait d'augmenter considérablement le module élastique d'un gel acide. Ces conditions sont proches de la

situation d'un lait traité thermiquement, où le rapport des caséines sur les protéines du lactosérum est de 80/20 et où les protéines du lactosérum sont transformées en agrégats par le traitement thermique. Les auteurs pensent qu'il y a un recouvrement partiel de la surface des micelles de caséines par des agrégats de protéines de lactosérum qui favorise des interactions fortes dans le gel, et cela même en absence de matière grasse. De plus, une teneur plus élevée en agrégats solubles de protéines sériques pouvant interagir avec les micelles de caséines provoque une gélification plus rapide à un pH plus élevé (Famelart, Guyomarc'h, Morand, & Novales, 2011). La gélification plus rapide s'explique par le fait que les agrégats de protéines de lactosérum solubles produits à pH 7,5 et 68,5 °C pendant 2h commencent à gélifier à un pH d'environ 5,6 ; ceci serait dû à leur valeurs de point isoélectrique (pI) et à leur hydrophobie de surface plus élevées que celles micelles de caséines (Morand, Dekkari, Guyomarc'h, & Famelart, 2012). Les micelles de caséines commencent à gélifier à un pH de 5,0 (Vasbinder, de Velde, & de Kruif, 2004). Lors de l'acidification, les agrégats de protéines sériques peuvent agir comme des ponts entre les micelles de caséines ce qui renforce le réseau protéique et donne des gels acides laitiers plus fermes en fin d'acidification (Andoyo et al., 2015). La microstructure des gels présente également des pores plus petits, ce qui conduit à une répartition plus homogène de la matière protéique dans le réseau, et donc une meilleure rétention du lactosérum.

Aguilera et al. (1993) ont étudié la formation de gels préparés uniquement à partir de lait écrémé en poudre et de gels mixtes, préparés à partir d'un isolat de protéine de lactosérum (WPI) et de lait écrémé en poudre. Les mélanges sont chauffés à 90 °C et acidifiés à un pH de 4,3 à 4,6, avec ou sans matière grasse. L'étude a montré que les gels contenant un ajout de WPI atteignaient des valeurs supérieures de G' et gélifiaient plus tôt. Les auteurs expliquent ces observations par une plus grande réactivité des groupes -SH des protéines sériques après dénaturation, et à l'interaction des protéines sériques avec les caséines. De plus, l'addition de matière grasse augmente la résistance à la compression des gels. Il faut également noter que la concentration et le type de protéines adsorbées à la surface des globules gras influencent les propriétés du yaourt (Cho et al., 1999). La nature des protéines à la surface des globules gras détermine les types d'interactions qui peuvent se produire entre les globules gras et la matrice de protéines.

Donato, Kolodziejczyk, & Rouvet (2011) ont étudié l'influence des agrégats solubles et des microgels sur la structure et les propriétés rhéologiques de gels acides de protéines produits par acidification à 40 °C avec de la GDL. Ils ont observé que lorsque le rapport microgels sur agrégats solubles diminue, le pH de gélification et la force du gel augmentent en raison de la différence de structure chimique des protéines

et de leur réactivité. Différents facteurs peuvent moduler la structure et les propriétés mécaniques du gel, y compris la forme et la taille des agrégats. Les auteurs ont montré que la force du gel diminue à mesure que la fraction des microgels augmente au sein du mélange et lorsque le pH diminue à un pH proche de 4,3-4,5. Les microgels ont une plus grande taille, une charge de surface légèrement inférieure, une hydrophobie de surface inférieure et une plus faible teneur en groupes thiols accessibles que les agrégats solubles formés à un pH proche de 7,0.

### 1.7- Conclusion

L'effet de la composition du lait, notamment sa composition en protéines laitières et les propriétés de ces protéines, sur la texture du yaourt, ainsi que les procédés technologiques mis en œuvre pour leur fabrication sont très étudiés depuis de nombreuses années. Toutefois, certains éléments restent incertains, comme la structure de la micelle de caséines. Pour obtenir un yaourt, le lait subit de nombreux traitements physiques comme l'homogénéisation, le traitement thermique et l'acidification du lait pour les principaux, qui modifient les propriétés des différentes protéines du lait, caséines et protéines sériques.

Suite au traitement thermique, les protéines sériques se dénaturent et s'agrègent, seules ou sur les micelles de caséines, pour former différents types d'agrégats en fonction des conditions expérimentales : agrégats fractals, microgels, fibrilles et agrégats mixtes. Les mécanismes de formation et la structure des agrégats ont fait l'objet de nombreux travaux. En revanche, la comparaison de l'effet de l'ajout de différents types d'agrégats sur les propriétés des yaourts est moins systématique. La structure et la taille des agrégats testés sont souvent non précisés et il manque une comparaison systématique des différents types d'agrégats.

Les recherches réalisées sur les agrégats de protéines sériques et leur fonctionnalité ont globalement montré qu'ils peuvent améliorer la formation et la texture d'émulsions laitières modèles contenant une faible proportion de caséines avec des concentrations de 5 et 30% de matière grasse et ils améliorent leur stabilité, notamment grâce à leur capacité à connecter les gouttelettes de matière grasse et à texturer le système (Loiseleux et al., 2018). Les différents agrégats protéiques sont donc des matériaux très intéressants et potentiellement innovants pour le développement de produits alimentaires. Par contre, l'utilisation de différents types d'agrégats protéiques pour moduler la texture des gels acides laitiers produits à partir de lait composé d'environ 80% de caséines et contenant ou non de la matière

grasse est très peu documentée. Il serait donc très intéressant d'étudier le comportement de ces assemblages protéiques dans des matrices laitières acidifiées.

Dans les émulsions laitières, les agrégats thermo-induits de protéines sériques, les protéines sériques natives et les caséines se retrouvent en compétition pour couvrir l'interface huile-eau (Surel et al., 2014). Le but de cette étude est donc de déterminer si l'addition de différents types d'agrégats de protéines peut moduler les propriétés rhéologiques des gels acides laitiers contenant ou non de la matière grasse. Si les propriétés rhéologiques sont modifiées, il est capital de déterminer les mécanismes qui expliquent ces modifications, et comment ils peuvent améliorer la structuration du réseau protéique.



## **Chapitre 2 : Stratégie de l'étude**



Moduler la texture de systèmes laitiers acidifiés contenant ou non de la matière grasse par l'utilisation d'agrégats de protéines laitières et comprendre le rôle de ces agrégats protéiques sur les mécanismes de formation des gels acides laitiers maigres et gras constituent des enjeux majeurs pour la formulation de produits innovants et seront les objectifs de ces travaux. Pour cela, nous allons tout d'abord fabriquer et caractériser les différents agrégats protéiques avant de les utiliser dans un premier temps à différentes concentrations dans des systèmes laitiers sans matière grasse puis dans des systèmes contenant de la matière grasse laitière.

Il est connu que la qualité des produits laitiers fermentés tels que le yaourt est principalement déterminée par la perception de la texture. Celle-ci est dépendante de la composition (protéines, teneur en matière grasse...), et des paramètres de traitement tels que l'homogénéisation, le traitement thermique, l'acidification... Certains paramètres seront étudiés au cours de cette thèse comme :

- le traitement thermique qui permet en élevant la température d'augmenter la fermeté du gel laitier ;
- la cinétique d'acidification qui permet la formation de gels fermes avec la diminution du pH jusqu'à un pH de 4,6 souhaité pour les yaourts ;
- une concentration élevée en protéines qui permet d'obtenir des gels plus stables et plus forts (Andoyo et al., 2015; Cheftel & Lorient, 1982) ;
- une concentration en matière grasse croissante qui entraîne une augmentation de la force des gels laitiers et une diminution du temps de gélification (Aguilera et al., 1993).

La nature des agrégats protéiques ajoutés est susceptible d'influencer la texture des gels acides, notamment en jouant un rôle sur la mise en place du réseau protéique au cours de l'acidification. Les différentes propriétés des gels acides maigres laitiers seront étudiées. Ensuite, le même travail sera effectué sur les systèmes avec matière grasse. La surface interfaciale sera modulée dans ces systèmes afin de permettre aux agrégats ajoutés d'y accéder et ainsi impacter la texture des systèmes par leur rôle sur l'interface. La concentration à l'interface de chaque type de protéine va dépendre d'un grand nombre de facteurs : concentration en protéines, surface interfaciale, état d'agrégation et protocole de fabrication. 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 différents types d'agrégats protéiques peuvent moduler la texture de gels acides laitiers maigres ou gras et de voir où se situe leur rôle dans la texturation des systèmes.**

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

- **Produire et caractériser les différents types d'agrégats et quantifier les protéines du lait après agrégation thermique** (Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique). En faisant varier différentes conditions expérimentales : compositions protéiques, pH, température et durée du traitement thermique, concentration en NaCl et cisaillement, nous allons obtenir quatre types d'agrégats. Ce sont les agrégats fractals (branchés et peu denses), les microgels (sphériques et denses), les fibrilles (longs et fins) et un dernier type d'agrégat, les agrégats mixtes, obtenus en chauffant un mélange de protéines sériques et de micelles de caséines. Dans la seconde partie de ce chapitre, en jouant sur le traitement thermique nous verrons l'influence de sa durée sur les concentrations en protéines sériques natives résiduelles présentes dans du lait témoin, c'est-à-dire sans addition de protéines supplémentaires. Le même travail sera réalisé après addition de protéines sériques natives supplémentaires ou d'agrégats protéiques.
- **Analyser l'influence des différents types d'agrégats sur les propriétés des gels acides maigres** (Chapitre 5 : Texturation des gels acides maigres par ajout d'agrégats protéiques). Le but de ce chapitre est d'étudier des systèmes maigres avec l'ajout de différents types d'agrégats de protéines laitières pour évaluer leur impact sur les propriétés physiques des gels acides maigres. Pour ce faire, des analyses de la texture, de la capacité de rétention du lactosérum ou encore des observations microscopiques du réseau protéique ont été réalisées. Pour cela, des laits témoins (sans ajout de protéines supplémentaires) et les laits contenant de 0,2 à 1% de protéines sériques natives ajoutées ou d'agrégats (fractals, microgels ou mixtes) ont été préparés et soumis à un traitement thermique de 11 min à 90 °C. Au cours de ce chapitre, en plus de la variation de la concentration en protéines ajoutée, certains paramètres seront étudiés, tel que le jour de mesure et le moment de l'ajout des agrégats fractals. Cela permettra de réaliser des comparaisons entre les différents éléments ajoutés et également par la suite avec les gels acides contenant de la matière grasse et les différents types d'agrégats protéiques.
- **Analyser l'influence des différents types d'agrégats sur les propriétés des gels acides gras** (Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques). L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'impact de l'ajout des différents types d'agrégats et de l'ajout de protéines sériques natives sur la texture des gels

acides gras par des analyses rhéologiques, des analyses de la synérèse et des observations en microscopie. Comme dans le chapitre précédemment, différentes concentrations de protéines sériques natives et d'agrégats (fractals, microgels et mixtes) sont ajoutés au lait reconstitué contenant 3,5% de matière grasse. Cela permettra de comparer l'effet de l'ajout des différents agrégats sur des systèmes avec matière grasse et également de voir si les différents agrégats ont des fonctions texturantes différentes. La composition interfaciale en protéines sera également analysé pour un lait témoin et un lait contenant des agrégats fractals.

- **Analyser l'impact de la surface interfaciale sur la texture des gels acides gras** (Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?). Le but de ce dernier chapitre de résultats est de moduler différents paramètres de formation des systèmes laitiers avec matière grasse pour jouer sur la surface interfaciale. Pour cela, la quantité de matière grasse des systèmes sera modulée ainsi que la pression d'homogénéisation dans le but d'augmenter la surface interfaciale. Dans ce cas, au-delà d'un certain seuil, la quantité de caséines, qui s'adsorbent préférentiellement à l'interface, devient limitante. De plus, des agrégats fractals de différentes tailles seront ajoutés aux systèmes. En effet, des études précédentes du projet PROFIL ont mis en avant la meilleure capacité des petits agrégats à texturer des émulsions. Ensuite, la composition interfaciale des laits à 10% de matière grasse sera analysée ainsi que la microstructure des gels acides gras à 10% de matière grasse et homogénéisés à 100 bars. De plus, toujours dans la volonté de mieux comprendre les systèmes laitiers et l'impact des agrégats, les interactions se mettant en place au cours du processus de fabrication des gels acides laitiers contenant de la matière grasse seront étudiées. Enfin, toujours dans le but de maîtriser la composition interfaciale des systèmes, des émulsions avec une interface contrôlée seront ajoutées au lait pour comprendre si cela influence la texture finale après acidification. Pour finir, des systèmes très enrichis en matière grasse et homogénéisés à haute pression seront étudié pour développer au maximum la surface interfaciale et amener les agrégats sur cette surface.

Enfin, une discussion générale sur l'ensemble des points marquants des résultats sera présentée ainsi que les conclusions générales et les perspectives à donner à ces travaux de recherches.



## **Chapitre 3 : Matériels et méthodes**



### III.1 - Matières premières laitières

#### III.1.1- Poudre de lait

Une poudre de lait écrémé « Low Heat » est utilisée pour toutes les expérimentations. Elle est produite par un industriel laitier dont les coordonnées sont confidentielles. Il s'agit d'une poudre de lait écrémé obtenue par atomisation. Lors de sa fabrication, cette poudre a subi un traitement thermique minimal. Les caractéristiques de la poudre de lait sont regroupées dans le Tableau V suivant :

**Tableau V** : Caractéristiques de la poudre de lait Low heat (en g pour 100 g de poudre)

Composition	Quantité
Humidité	3,4
Matière grasse	0,7
Protéines/ESD* (Nx6.38)	38,6
Lactose	56
Cendre	8,5

\*ESD : extrait sec dégraissé

#### III.1.2- Protéines sériques (WPI)

Nous avons utilisé deux lots de poudre de protéines solubles fournis par un industriel du projet PROFIL (origine confidentielle), ces poudres seront nommées poudre WPI dans la suite du manuscrit.

Le lot A contient 91,1% (p/p) de protéines, dont 88% de protéines sériques ( $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg),  $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -lac), albumine sérique bovine (BSA) et les immunoglobulines (IgG)) et 12% (p/p) de caséines non micellaires (CNM). Ce lot de poudre est conservé à 4 °C dans des sachets sous vide, et a servi à la fabrication des agrégats fibrillaires et mixtes et à la majorité des agrégats fractals.

Le lot B contient 88,8% (p/p) de protéines, principalement des protéines sériques et 21% (p/p) de caséines non micellaires. Ce second lot de poudre a servi uniquement à la fabrication de l'ensemble des agrégats microgels et de la première suspension d'agrégats fractals utilisée pour la préparation des laits sans ajout de matière grasse. Ce lot de poudre a été conservé à température ambiante.

#### III.1.3- Caséines micellaires (Cas)

La poudre enrichie en micelles de caséines utilisée au cours de ce travail (nommée poudre Cas) a également été fournie par un industriel laitier (coordonnées confidentielles). La poudre contient 81,7% (p/p) de protéines qui sont en grande majorité des caséines micellaires et une faible fraction de protéines sériques est également présente dans la poudre : 6,6% (p/p). Comme pour la poudre de protéines sériques, la poudre Cas est également conservée à 4 °C en sachets sous vide pendant toute la durée de la thèse.

### III.1.4- 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 et a été fournie par un industriel. Le PUF est utilisé comme source de minéraux et de lactose. Il contient notamment le calcium nécessaire pour maintenir l'intégrité des micelles de caséines. Le taux de calcium présent dans le PUF est de 0,32% (p/p). Le PUF est également conservée à 4 °C après conditionnement en sachet.

### III.1.5- Matière grasse laitière anhydre (MGLA)

La matière grasse laitière anhydre (MGLA) utilisée lors de la reconstitution du lait a été fournie par l'entreprise Corman (Corman, Limbourg, Belgique). Il s'agit d'un lot de MGLA TREX 32C avec un point de fusion à 32 °C (donné fournisseur). Le stockage a été effectué à 4 °C dans des bocaux en verre de 2 L. Cette matière grasse est composée d'acides gras saturés (environ 70%), d'acides gras insaturés (environ 28%) et d'acides gras polyinsaturés (environ 2%).

**Au cours de l'ensemble des expérimentations, les mêmes lots de poudres (poudre de lait, WPI, Cas et PUF) et le même lot de MGLA ont été utilisés pour éviter les variations de composition.**

La composition en protéines des différentes poudres est présentée dans le Tableau VI :

Tableau VI : Tableau récapitulatif de la composition en protéines des lots de poudres

Lot de poudre	Poudre de lait	Poudre WPI (lot A)	Poudre WPI (lot B)	Poudre Cas
Protéine totale % (p/p)	38,6	91,1	88,8	81,7
Taux de caséines % (p/p)	/	12	21	93,4
Taux de PS % (p/p)	/	88	79	6,6

### III.2- Préparation des agrégats protéiques

Différents types d'agrégats protéiques ont été préparés afin d'obtenir des propriétés fonctionnelles variées et utilisés pour la fabrication des gels laitiers acides avec ou sans matière grasse. Les agrégats sont produits soit à partir de poudre de protéines sériques mise en solution dans de l'eau millipore pour les fibrilles, les agrégats fractals et les microgels, soit à partir de poudre de protéines sériques et de micelles de caséines dispersées dans du perméat (PUF) pour les agrégats mixtes. Chaque type d'agrégats est produit dans des conditions expérimentales particulières présentées ci-après. Tous les agrégats ont été produits selon les protocoles mis en place et utilisés au cours de la thèse de Thibault Loiseleux (Loiseleux, 2017).

#### III.2.1- Agrégats fractals

Le protocole de fabrication des agrégats fractals utilisé a été mis au point à partir des résultats obtenus par Mahmoudi, Mehalebi, Nicolai, Durand, & Riaublanc (2007). Les agrégats fractals sont fabriqués à partir de poudre de protéines sériques (lot A ou B) hydratée à 80 g/L dans de l'eau millipore durant une nuit à 4 °C sous agitation magnétique. La concentration en protéines est déterminée par la mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-1800 Spectrophotometer, Shimadzu, Japon) en utilisant un coefficient d'extinction massique de 1,046 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Mahmoudi et al., 2007). La concentration protéique est ensuite ajustée à 50 g/L.

Différentes préparations d'agrégats fractals sont utilisés au cours de ce travail, deux suspensions d'agrégats sont utilisés pour la partir sur les gels acides laitiers sans matière grasse, elles sont produites à partir des lots de poudre de protéines sériques A et B, les deux suspensions sont préparés avec 45 mM de NaCl et ajusté à pH 7 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 6 M.

Pour la partie suivante sur les gels acides laitiers avec matière grasse, dans le but d'obtenir des agrégats fractals de différentes tailles, 0, 20 ou 45 mM de NaCl sont ajoutés à la solution de protéines sériques (lot A) avant d'ajuster le pH à 7. Dans la suite du manuscrit, les agrégats fractals utilisés pour la préparation des gels acides gras laitiers seront respectivement nommés : Fa0, Fa20 et Fa45 selon la quantité de NaCl ajoutée pour leur préparation. Pour l'ensemble des préparations d'agrégats fractals, des flacons contenant 200 ml de solution de protéines sériques (50 g/L ; pH 7) sont chauffés 2 h sans agitation dans un bain thermostaté à 80 °C, puis laissés refroidir pendant 1 h à température ambiante. Enfin, 0,02% (p/p) d'azoture de sodium a été ajouté aux suspensions d'agrégats fractals après le refroidissement pour éviter un développement bactérien, et les suspensions sont conservées à 4 °C.

### III.2.2- Agrégats fibrillaires

Les agrégats fibrillaires sont fabriqués à partir d'une solution protéique préparé à partir du lot A à 40 g/L dont le pH est ajusté à 2 par addition d'acide chlorhydrique 6 M. Un volume de 90 ml de la solution protéique à pH 2 est soumis à un traitement thermique de 7 h à 90 °C. Cette étape de traitement thermique est réalisée sous agitation à l'aide d'un système Couette (Figure 20) à un taux de cisaillement de  $300 \text{ s}^{-1}$  (400 rpm).



**Figure 20** : Système Couette (Entrefer : 5 mm ; hauteur : 13,5 cm ; rayon interne : 2,5 cm)

Le système Couette est composé d'un cylindre en polyméthacrylate de méthyle (PMMA, nom commercial : Plexiglas) contenant un barreau aimanté inclus dans le cylindre d'une hauteur de 13,5 cm et avec un rayon interne de 2,5 cm. Ce dernier est placé dans un récipient en verre sous agitation magnétique (grâce à l'hélice placé sous le cylindre) et l'entrefer entre le cylindre et le récipient fait 5 mm.

La suspension d'agrégats fibrillaires (pH 2) est ensuite stockée à 4 °C sans addition d'azoture de sodium car il réagit fortement avec les métaux et tous les acides (même faibles) et forme des explosifs.

### III.2.3- Agrégats microgels

Les agrégats microgels sont produits à partir d'une solution de protéines sériques préparée à partir du lot B à 50 g/L, et le pH est abaissé à 5,8 avec l'ajout une solution d'acide chlorhydrique 6 M (adaptation du protocole de fabrication décrit par Schmitt et al. (2010)). Un traitement thermique de 1 h à 85 °C sans agitation est réalisé sur 200 ml de solutions contenues dans des bouteilles en verre. Puis, la suspension d'agrégats microgels est laissée refroidir à température ambiante et stockée à 4 °C en présence de 0,02% (p/p) d'azoture de sodium.

### III.2.4- Agrégats mixtes

Les agrégats mixtes correspondent à des micelles de caséines sur lesquelles des PS dénaturées sont adsorbées. Pour leur préparation, il est important de préserver l'intégrité des micelles. Pour y parvenir, elles sont dispersées dans la phase aqueuse du lait pour maintenir les équilibres minéraux. Une solution de perméat (PUF) est préparée par réhydratation de la poudre à 56 g/L dans de l'eau millipore sous agitation magnétique pour se rapprocher de la concentration en minéraux et calcium du lait.

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. Les micelles sont laissées sous agitation à 20 °C pendant 30 min, puis le pH est ajusté à 6,3 avec de l'acide chlorhydrique 6 M. La dispersion est placée sous agitation magnétique pendant 45 min à 60 °C, puis pendant une nuit à 4 °C également sous agitation magnétique afin d'hydrater complètement la poudre. En parallèle, la poudre de protéines sériques est également dispersée dans la solution de PUF à 56 g/L pour atteindre une concentration de 50 g/L. Pour finaliser l'hydratation de la poudre, la solution est placée sous agitation magnétique pendant une nuit à 4 °C. Un mélange de ratio 80/20 est réalisé avec 80% de solution de micelles de caséines et 20% de solution de protéines sériques produite à partir du lot A. Le pH du mélange est ajusté à 6,3 et un traitement thermique de 1 h à 80 °C est réalisé. La suspension d'agrégats est stockée à 4 °C en présence de 0,02% (p/p) d'azote de sodium.

L'ensemble des paramètres de fabrication des agrégats sont regroupés dans le Tableau VII suivant.

Tableau VII : Récapitulatif des conditions de production des différents agrégats protéiques

Agrégats protéiques	Fibrilles	Fractals	Microgels	Mixtes
Poudre	WPI (lot A)	WPI (lot A)	WPI (lot B)	WPI (lot A) / Cas
Concentration protéique (g/L)	40	50	50	50 (ratio : 80 Cas/20 WPI)
Concentration perméat (g/L)	/	/	/	56
Représentation schématique				
pH de fabrication	2	7	5,8	6,3
Température/durée du traitement thermique	7h – 90 °C	2h – 80 °C	1h – 85 °C	1h – 80 °C
Concentration en NaCl	/	0 à 45 mM	/	/
Agitation (s <sup>-1</sup> )	300	/	/	/
Volume (ml)	90	200	200	200

Ces différents agrégats de protéines laitières ont toujours été préparés dans les mêmes conditions et ont ensuite été caractérisés et utilisés dans les différents systèmes laitiers préparés.

### III.3- Caractérisation des agrégats protéiques

Pour caractériser la morphologie des différents agrégats, des observations en microscopie électronique en transmission (MET) ont été réalisées sur les 4 types d'agrégats et, pour les suspensions d'agrégats fractals et de microgels, la dispersion de taille des agrégats a également été analysée par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Une caractérisation plus poussée de la structure des mêmes agrégats a déjà été réalisée dans une étude précédente (Loiseleux, 2017; Loiseleux et al., 2018).

#### III.3.1- Microscopie Electronique en Transmission (MET)

L'appareil de microscopie électronique en transmission est composé d'une source d'électron, un filament de tungstène, de lentilles électromagnétiques et d'un détecteur d'électrons. Grâce à un faisceau d'électrons, 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 pour permettre au faisceau électronique de le traverser. Ensuite, pour obtenir un contraste de bonne qualité, il est nécessaire de réaliser au préalable une coloration négative de l'échantillon par des sels de métaux lourds, dans notre cas de l'acétate d'uranyle. La coloration négative permet d'assombrir le fond sans colorer l'objet à observer et donc de le rendre visible sans le modifier, par simple contraste, contrairement à la coloration positive qui colore l'objet.

#### Dispositif de mesure

Le dispositif de mesure est un microscope électronique en transmission JEOL JEM-1230 (JEOL, Tokyo, Japon) fonctionnant à 80 kV.

#### Protocole expérimentale

Un volume de 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon (suspensions d'agrégats) dilué dans de l'eau millipore à 0,5 g/L a été déposé sur une grille en carbone (200 mailles) qui a préalablement été ionisée. L'échantillon est laissé pendant 2 min sur la grille avant d'éliminer le surplus avec un papier absorbant, puis l'échantillon est coloré avec une solution d'acétate d'uranyle à 2% (p/p) pendant 2 min (coloration négative) et le surplus est une fois de plus éliminé toujours à l'aide d'un papier absorbant. Les grilles en carbone contenant les échantillons sont ensuite séchées pendant 15 min à 50 °C dans une étuve avant observation.

#### III.3.2- Diffusion dynamique de la lumière

Le diamètre hydrodynamique  $D$  des agrégats de protéines sériques (microgels et fractals) 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<sup>-1</sup>)

T : température absolue (K)

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

D : coefficient de diffusion (m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>)

d : diamètre

La diffusion dynamique de la lumière permet de déterminer le coefficient de diffusion d'une particule, et connaissant les autres paramètres et en faisant une hypothèse de sphéricité des particules, on peut calculer le diamètre hydrodynamique des particules. L'appareil de mesure enregistre les variations d'intensité de la lumière diffusée par les protéines soumises au mouvement brownien sur une échelle de temps de la nano seconde à plusieurs secondes. Plus les particules sont petites, plus elles seront mobiles et plus l'intensité va fluctuer rapidement au cours du temps de mesure. Il existe donc une relation inversement proportionnelle entre la taille des particules et les variations d'intensité. Nous présenterons uniquement les distributions de taille en intensité de la lumière diffusée.

### **Dispositif de mesure**

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées à l'aide d'un appareil Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, UK).

### **Protocole expérimental**

Les suspensions d'agrégats sont diluées à 0,5 g/L dans de l'eau millipore et introduites dans une cuve de spectroscopie de 4 ml. Le diamètre hydrodynamique a été mesuré après un temps d'attente de 1 min en triple pendant 120 secondes en utilisant un indice de réfraction de 1,45 pour les particules de protéines (Zhang, Arrighi, Campbell, Lonchamp, & Euston, 2016). L'ensemble des mesures a été réalisé en rétrodiffusion (173°) à une température de 20 °C.

### III.4- Préparation du lait reconstitué

#### III.4.1- Préparation du lait reconstitué avec ou sans matière grasse (protocole classique)

Pour l'ensemble des expériences, le lait est reconstitué à 3,5% (p/p) de protéines (Vasbinder, Alting, Visschers, & De Kruif, 2003) par réincorporation de la poudre de lait écrémé dans un volume d'eau millipore sous agitation magnétique (500 trs/min – 1 h 30) à température ambiante. Le lait est préparé pour chaque expérience en fonction de la quantité de protéines sériques ou de solution d'agrégats ajoutés, c'est le volume d'eau qui varie selon les quantités ajoutées pour obtenir un lait après dilution toujours à 3,5% (p/p) de protéines (cette valeur ne prend pas en compte le pourcentage supplémentaire provenant des PS ou des agrégats ajoutés). Le lait est conservé à 4 °C pendant une nuit. Ensuite, sont additionnés au lait sous agitation magnétique de 0,2 à 1% (p/p) de poudre de protéines sériques ou des volumes de suspensions d'agrégats permettant d'obtenir des valeurs de 0,2 à 1,5% d'agrégats protéiques. Des systèmes maigres et des systèmes avec ajout de matière grasse ont été étudiés.

**Dans le cas des systèmes maigres**, 50 ml de lait préparé comme indiqué ci-dessus sont placés sous agitation magnétique et chauffés à 90 °C pendant 11 min (incluant la montée en température). L'échantillon est ensuite placé dans la glace pendant 15 min, puis pendant 5 min à 40 °C avant d'ajouter de la glucono- $\delta$ -lactone (GDL) en quantité suffisante pour obtenir un pH d'environ 4,6 en fin de cinétique. Dans le cas des systèmes avec ajout d'agrégats fractals, nous avons également testé leur ajout **après** le traitement thermique pour évaluer l'impact de ce paramètre.

**Dans le cas des systèmes gras**, la matière grasse laitière anhydre (MGLA) et le lait (avec ou sans ajout de protéines sériques ou d'agrégats) sont préchauffés séparément à 60 °C avant ajout de la MGLA (3,5% p/p) au lait. L'homogénéisation est ensuite réalisée en deux étapes sur 300 ml d'échantillon. Tout d'abord, une pré-émulsification est réalisée avec un homogénéisateur rotor-stator SilentCrusher M (Heidolph, Allemagne) équipé d'une tige d'un diamètre de 18 mm, pendant 3 min à 14000 tr/min, pour disperser la matière grasse dans le lait. Puis, un homogénéisateur haute pression Panda plus 1000 (GEA Niro Soavi, Italie) est utilisé pour réduire la taille des gouttelettes de matière grasse et limiter le crémage de la matière grasse, par recirculation pendant 5 min à 100 bars à 29 L/min (moyenne de 6 passages). Le traitement thermique et l'acidification sont effectués de la même manière que pour les systèmes maigres.

**La Figure 21** suivante résume les différentes étapes de fabrication d'un yaourt préparé à partir de lait reconstitué avec de la matière grasse suivant le protocole classique.

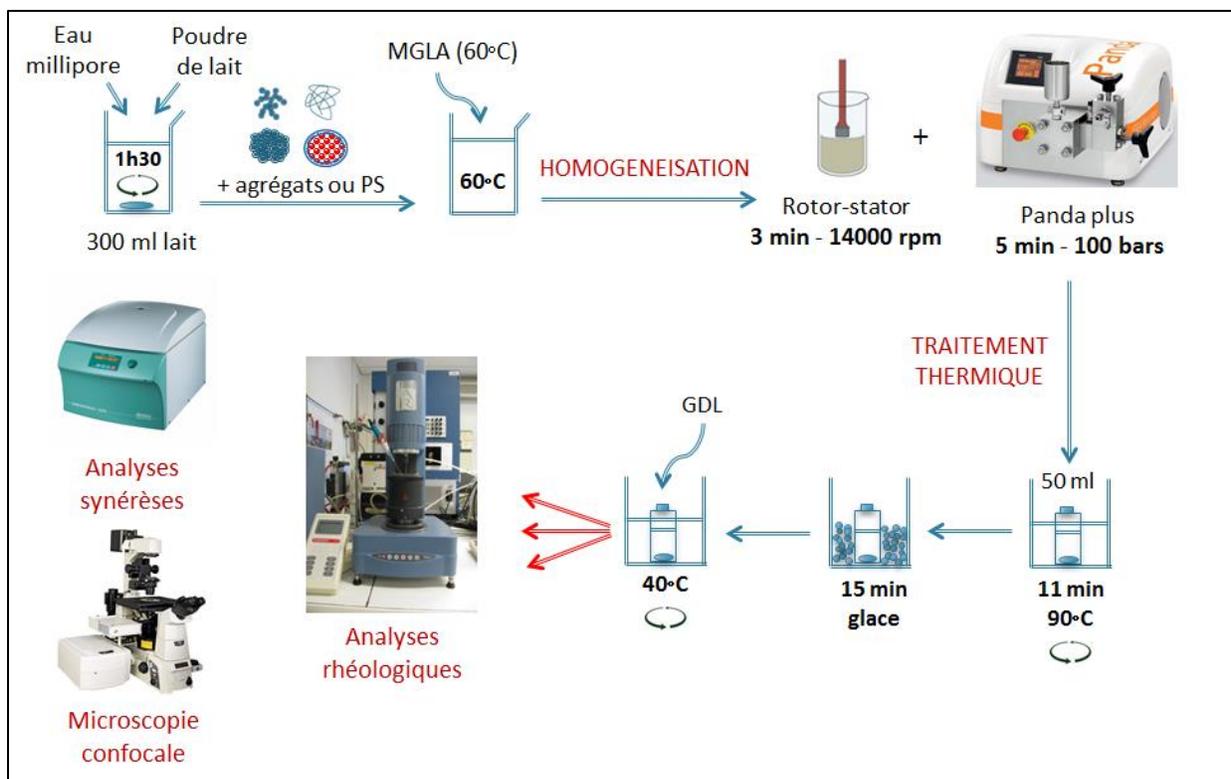


Figure 21 : Etapes de préparation d'un yaourt avec matière grasse

Pour évaluer notamment l'influence de la surface interfaciale sur les propriétés des gels acides laitiers, quelques modifications ont été apportées au protocole classique en présence de matière grasse.

### III.4.2- Modulation des conditions expérimentales

#### III.4.2.1- Augmentation de l'aire d'interface

Afin de modifier l'aire de l'interface, la teneur en matière grasse a été augmentée jusqu'à 10% (p/p) et l'étape d'homogénéisation a été réalisée à 50, 100 et 500 bars. L'influence de la pression d'homogénéisation a été testée sur les systèmes à 3,5% et 10% de MG.

#### III.4.2.2- Variation de la taille des agrégats fractals ajoutés

Il a déjà été montré au cours des thèses du projet PROFIL (Chevallier, 2017; Kharlamova, 2017; Loiseleux, 2017) que des agrégats fractals de petite taille pouvaient être plus efficaces pour texturer des systèmes laitiers à pH neutre. L'addition d'agrégats fractals de trois diamètres hydrodynamiques différents a été testée, en modulant la quantité de NaCl ajoutée au cours de leurs préparation (cf : III.2.1). Ces essais ont été réalisés sur des laits préparés à 3,5% et 10% de MG et homogénéisés à 100 ou 500 bars et contenant 1% d'agrégats fractals Fa0, Fa20 ou Fa45.

### III.4.3- Interface contrôlée (ajout d'une émulsion à 30% MG)

Enfin, dans le but de travailler sur une émulsion à interface contrôlée, des émulsions à 30% de MG ont été préparées selon les protocoles développés par Thibault Loiseleux au cours de sa thèse (Loiseleux, 2017). Les émulsions ont été produites à partir d'une solution de protéines sériques natives (PSN) à environ 75 g/l, une solution d'agrégats fractals à 50 g/l (solutions testées : Fa0 et Fa45), de l'eau millipore, 30% de MGLA et du NaCl.

Les émulsions à 30% de MG sont composées d'une phase dispersée : la matière grasse laitière anhydre (MGLA) et d'une phase continue. Le pH de la phase continue est ajusté à 7. Elle contient des protéines sous formes natives et agrégées dispersées dans une phase aqueuse contenant 80 mM de NaCl (force ionique du lait). Les deux phases sont placées pendant environ 10 min dans un bain marie à 60 °C, puis pesées. Le volume total de 150 ml est pré-émulsionné à 60 °C à l'aide d'un rotor-stator (SilentCrusher M, Heidolph, Allemagne) pendant 1 min 30 à 14000 tr/min. 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 2 min 30 à 500 bars.

Ces émulsions ont été préparées avec des quantités variables de protéines sériques natives pour moduler leur texture à la fin de l'étape d'homogénéisation et une quantité fixe d'agrégats fractals Fa45 ou Fa0 (Tableau VIII). Après homogénéisation, la texture des émulsions est immédiatement jugée de manière visuelle et classée en 2 catégories : lorsque l'émulsion a une texture très ferme, c'est-à-dire gélifiée directement en sortie d'homogénéisateur elle est nommée « Em ferme » et si l'émulsion s'écoule en sortie d'homogénéisateur et se texture dans le temps, l'émulsion est dite « Em différée ».

**Tableau VIII** : Récapitulatif des conditions de production des émulsions à 30% MG

Type d'émulsion	Emulsion 1	Emulsion 2
Phase continue	Eau millipore	Eau millipore
Quantité PSN	<b>1,8%</b>	<b>0,6%</b>
Quantité d'agrégats fractals	1,2 % Fa45	1,2 % Fa45 ou Fa0
Quantité MG (phase dispersée)	30%	30%
pH de fabrication	7	7
Concentration en NaCl	80 mM	80 mM
Volume (ml)	150	150
Aspect après homogénéisation	<b>Em différée</b>	<b>Em ferme</b>

Le lait est ensuite reconstitué dans les mêmes conditions que décrit précédemment. Dans un premier temps, les émulsions présentées dans le Tableau VIII à 30% de matière grasse ont été incorporées sous agitation magnétique au lait pendant environ 15 min pour obtenir une concentration finale en matière grasse de 3,5%. Dans le cas de l'incorporation de l'émulsion 2 dans le lait, une étape d'homogénéisation supplémentaire de 2 min à 50 bars a été réalisée avec le Panda plus 1000, pour 2 tests (avec des agrégats Fa45 et Fa0) pour permettre une dispersion optimale de l'émulsion dans le lait. Enfin, le lait a été traité thermiquement et la GDL a été ajoutée pour permettre l'acidification du système. Les tests réalisés sont les suivants :

- Lait + Em différé
- Lait + Em ferme (Fa45)
- Lait + Em ferme (Fa45) + étape d'homogénéisation (50 bars)
- Lait + Em ferme (Fa0) + étape d'homogénéisation (50 bars)

Ensuite, l'impact de l'ajout de 1% d'agrégats fractals de taille variable (Fa45 et Fa0) a été évalué dans des systèmes où la matière grasse a une interface contrôlée. Une étape d'homogénéisation supplémentaire au Panda plus 1000 de 2 min à 50 bars a également été réalisée dans certains cas. Pour finir, le lait a été traité thermiquement et la GDL a été ajoutée. Les tests réalisés sont les suivants :

- Lait + 1% Fa45 + Em ferme (Fa45) + étape d'homogénéisation (50 bars)
- Lait + 1% Fa0 + Em ferme (Fa45)
- Lait + 1% Fa0 + Em ferme (Fa45) + étape d'homogénéisation (50 bars)

**L'ensemble des tests réalisés sur la modulation des conditions expérimentales et l'utilisation d'une interface contrôlée est résumé dans la Figure 22 suivante :**

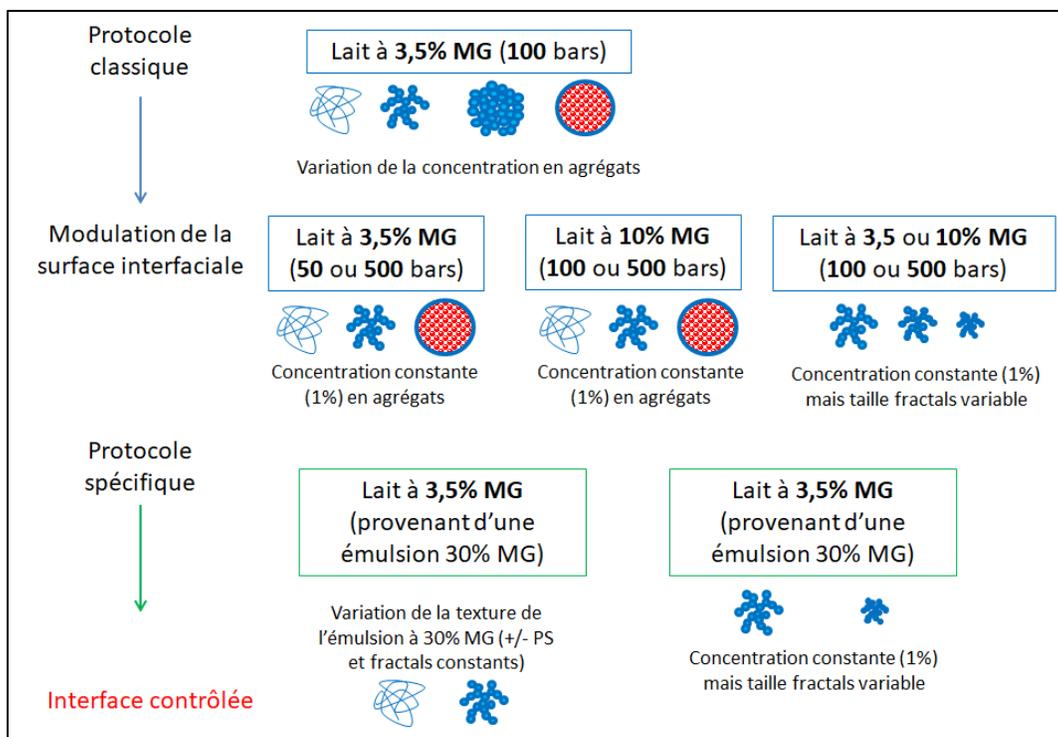


Figure 22 : Schéma récapitulatif des tests spécifiques sur la modulation de la surface interfaciale et l'utilisation d'une interface contrôlée

#### III.4.4- Contrôle de la formation de pont disulfure au cours du procédé

Dans le but de comprendre l'impact de la formation de ponts disulfures entre protéines sur la texturation des systèmes, nous avons utilisé du N-ethylmaléimide (NEM), un agent bloquant la formation de ces liaisons. Cet agent chimique réagit avec les groupements thiols libres (-SH) des protéines mais n'a aucun effet sur les ponts disulfures déjà présents avant son ajout. Lors de cette étude, le NEM (20 mM) a été dissous directement dans le lait, sous agitation magnétique pendant 45 minutes, **avant l'étape d'homogénéisation** à 100 bars ou, **après le traitement thermique** pour empêcher la formation des ponts disulfures à différentes étapes de la fabrication des systèmes laitiers. Les systèmes étudiés sont les systèmes témoin avec 3,5 et 10% de matière grasse et ceux avec addition de 1% de PS ou 1% d'agrégats fractals de taille variable (Fa0, Fa20 et Fa45).

#### III.4.5- Systèmes laitiers enrichis en matière grasse et homogénéisés à différentes pressions

Enfin, des expériences ont été réalisées sur des laits enrichis en matière grasse (15 %) et homogénéisés à hautes pressions pour développer la surface interfaciale. Le but est d'analyser les effets du traitement thermique sur ces systèmes. Le lait est reconstitué de la même façon que pour les autres analyses. Des laits témoin et avec l'ajout de 1% de PS ou 1% d'agrégats fractals sont étudiés. L'étape d'homogénéisation est comme pour les autres expérimentations réalisée en 2 étapes (une pré-émulsification au rotor-stator de 3 min et une homogénéisation au Panda Plus 1000 pendant 5 min).

Les paramètres testés dans cette partie sont :

- une quantité importante de matière grasse de 15%
- une haute pression d'homogénéisation, à 400 ou 500 bars

La texture des émulsions est analysée visuellement en suivant l'évolution des émulsions (non traitées thermiquement) dans le temps à J0, directement en sortie d'homogénéisation, et à J1 après stockage à 4 °C, pour voir si une texturation différée des émulsions se produit. De plus, un traitement thermique (de 40 à 90 °C puis de 90 à 40 °C) est réalisé directement sur le rhéomètre (protocole décrit par la suite dans le point : III.5.3.2) sans étape d'acidification. Une partie des systèmes sont trop texturés après l'étape d'homogénéisation et cela ne permet pas de réaliser une acidification homogène. Les conditions testées sont regroupées dans le Tableau IX suivant :

**Tableau IX** : Récapitulatif des conditions de production des laits enrichis en MG et homogénéisés à haute pression

Type de lait	Lait témoin	Lait + 1% PS	Lait + 1% fractals (Fa0 ou Fa45)
<b>Quantité MG</b>	15%	15%	15%
<b>Pression d'homogénéisation</b>	400 et 500 bars	400 et 500 bars	400 et 500 bars
<b>Traitement thermique</b>	40 à 90 °C puis 90 à 40 °C	40 à 90 °C puis 90 à 40 °C	40 à 90 °C puis 90 à 40 °C
<b>Aspect après homogénéisation</b>	J0 et J1	J0 et J1	J0 et J1
<b>Température de stockage</b>	4 °C	4 °C	4 °C

### III.5- Caractérisations et analyses des systèmes laitiers

#### III.5.1- Quantification des protéines du lait par gel SDS PAGE après agrégation thermique

L'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) est une technique qui consiste à faire migrer des protéines dans un gel sous l'influence d'un champ électrique qui permet leur séparation. En présence de SDS en excès qui se fixe sur les protéines, il n'y a plus de différence de charges entre les différentes protéines qui migrent uniquement en fonction de leur taille. Cette technique permet de séparer et de quantifier les protéines solubles du lactosérum et les protéines insolubles (caséines et agrégats protéiques) dans le lait écrémé avant et après traitement thermique.

### Protocole expérimental

Dans un premier temps, le lait sans matière grasse a été préparé avec l'ajout ou non de protéines sériques ou d'agrégats protéiques, puis il a été soumis à un traitement thermique à 90 °C pendant 11 min; un échantillon de lait témoin n'a pas été soumis à un traitement thermique et deux autres laits témoins ont été soumis à un traitement thermique de 11 ou 20 min à 90 °C. Une première partie des différents laits a été conservée pour réaliser une analyse complète des protéines en SDS-PAGE. Ensuite, les protéines insolubles de la seconde partie des différents laits ont été précipitées par acidification à pH 4,6 avec de l'acide chlorhydrique pendant environ 45 min.

Après acidification, le mélange a été centrifugé durant 15 min à 14000 g dans des micro-tubes de 2 ml. Puis, le surnageant qui contenait les protéines sériques non dénaturées a été analysé. La concentration protéique des surnageants a été déterminée par mesure d'absorbance à 280 nm. Une concentration de 0,02% d'azoture de sodium a été ajoutée dans chaque échantillon pour leur conservation à 4 °C.

Pour réaliser les électrophorèses SDS-PAGE, les échantillons (laits totaux : témoin non traité, témoins traités thermiquement et laits avec ajout de PS ou agrégats fractals traités thermiquement et les surnageants correspondants) ont tout d'abord été solubilisés dans un tampon de solubilisation réducteur (Tris 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, Glycérol 30%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 8%, bleu bromophénol 0,4 mg/ml). Le béta-mercapto est utilisé en tant que réducteur. Il permet la dénaturation des protéines par réduction des ponts disulfures. Puis, une dénaturation thermique a été réalisée pendant 5 min à 95 °C. La migration a été réalisée sur un gel SDS novex nuPAGE 4-12% bis-tris Invitrogen, 15 puits à 200 V constant dans un tampon de migration MES (50 mM MES, 50 mM Tris Base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,3).

Un marqueur de taille (Biorad Precision plus protein standard Unstained #161-0363) et les différents échantillons à analyser ont été déposés à la micropipette dans le gel (4  $\mu$ l de lait et 4  $\mu$ l puis 30  $\mu$ g des surnageants). Un témoin a également été déposé, la Beta lactoglobuline (Davisco) à des quantités croissantes (de 1 à 20  $\mu$ g) pour permettre une comparaison de l'intensité des bandes obtenues.

Une coloration des gels SDS-PAGE au bleu de Coomassie colloïdal a été réalisée.

### III.5.2- Taille des gouttelettes de matière grasse

La taille des gouttelettes de matière grasse a été déterminée par granulométrie laser. Le fonctionnement est basé sur la diffraction d'un rayon laser monochromatique par les gouttelettes en suspension dans l'émulsion. Plusieurs capteurs enregistrent 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 sont petites, plus l'angle de diffraction est important. A l'inverse, les particules de taille plus importante diffractent moins la lumière et la majorité de l'intensité est récupérée aux petits angles. A partir de l'intensité de lumière diffractée, le logiciel calcule par itérations successives, en utilisant la théorie de Mie (Mie, 1908), la distribution de tailles des gouttelettes de matière grasse pour corrélérer les valeurs expérimentales avec les données déterminées. Le diamètre moyen des particules ( $\mu\text{m}$ ) peut être pondéré en surface ( $d_{3.2}$ ) ou en volume ( $d_{4.3}$ ). La surface spécifique (SSp), exprimé en  $\text{m}^2/\text{g}$  de matière grasse, quant à elle, découle directement du diamètre pondéré en surface :

$$d_{3.2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$$

$$d_{4.3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

$$SS_p = \frac{6}{d_{3.2}}$$

Avec  $n_i$  : le nombre de gouttelettes de classe  $i$ ,

et  $d_i$  : le diamètre des gouttelettes de classe  $i$ .

### Dispositif de 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.

### Protocole expérimental

Après l'étape d'homogénéisation réalisée sur les différents systèmes contenant de la matière grasse, quelques  $\mu\text{l}$  de lait sont introduits directement dans la cuve du granulomètre contenant de l'eau jusqu'à atteindre une obscurité d'environ 10%. En parallèle, 240  $\mu\text{l}$  de lait sont dilués dans 3 ml d'une solution de SDS 1% (qui est un détergent et tensioactif ionique fort), l'ensemble est ensuite laissé 1 h à température ambiante afin de mettre en évidence de possibles phénomènes de floculation. Toutes les mesures ont été réalisées avec un indice de réfraction de 1,458 pour la phase dispersée (MGLA) et 1,331 pour la phase continue (Eau).

### III.5.3- Caractérisations rhéologiques

Les mesures rhéologiques en régime harmonique permettent de caractériser le comportement viscoélastique d'un système et donnent une indication quant à sa structure. Le principe des mesures rhéologiques en régime harmonique consiste à appliquer une faible contrainte sinusoïdale à l'échantillon ce qui induit une déformation. Dans le domaine viscoélastique linéaire, la déformation et la contrainte sont des fonctions sinusoïdales du temps de fréquence angulaire ( $\omega$ ) similaire, mais avec un déphasage  $\delta$ . La déformation ( $\gamma$ ) et la contrainte ( $\tau$ ) sont écrites sous forme de nombre complexe :

$$\begin{aligned}\tau^* &= \tau_0(\cos\omega t + i \sin\omega t) \\ \gamma^* &= \gamma_0(\cos(\omega t + \delta) + i \sin(\omega t + \delta))\end{aligned}$$

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

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

Avec :  $G' = (\tau_0/\gamma_0) \cos \delta$

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

- $G'$  mesure la composante élastique du système, il s'agit du module conservatif
- $G''$  mesure la dissipation d'énergie au sein du système et traduit son caractère visqueux, c'est le module dissipatif.

Les valeurs des deux modules sont exprimées en Pascal. Le tracé des modules  $G'$  et  $G''$  d'un système en fonction de la fréquence des oscillations (spectres mécaniques) donne des informations sur la structure de l'échantillon. De plus, la tangente delta ( $\tan \delta$ ) qui correspond au rapport de  $G''/G'$  peut également être analysée et tracée en fonction du temps ou du pH pour obtenir le temps et le pH de gélification des différents systèmes analysés. La déformation imposée sur l'échantillon doit être suffisamment faible pour rester dans le domaine viscoélastique linéaire de l'échantillon et ainsi être dans des conditions non-destructives.

#### Dispositif de mesure

Le rhéomètre utilisé est un rhéomètre à contrainte imposée AR 2000 (TA Instruments, Leatherhead, Royaume-Uni) équipé d'une géométrie Couette à cylindres coaxiaux (rayon intérieur du stator : 15 mm, rayon extérieur du rotor : 14 mm, hauteur immergée du cylindre : 42 mm et gap : 1 mm).

Les systèmes laitiers type yaourt se structurent au cours du temps lors de l'acidification. Nous avons suivi l'évolution des  $G'$  et  $G''$  en fonction du pH en installant une électrode pH directement dans la géométrie

Couette. La cinétique de pH est mesurée grâce à une électrode pH Mettler Toledo InLab® Micro (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) reliée à un pH mètre Consort P902 (Bioblock Scientific, Illkirch, France) qui enregistre les données au cours de l'acidification (Figure 23).



**Figure 23 :** Rhéomètre AR2000 équipé d'un système Couette et couplé à une électrode pH

L'échantillon est déposé environ 2 min après ajout de la GDL dans le stator thermostaté à 40 °C par un effet Peltier ( $t_0$  : moment de l'ajout de la GDL dans l'échantillon). Après dépôt et mise en place de l'électrode de pH, l'échantillon est recouvert d'huile de paraffine pour empêcher l'évaporation.

Pour les émulsions laitières à 15% de matière grasse, le même rhéomètre AR 2000 est utilisé, mais avec un autre système de mesure, une géométrie plan-plan de 4 cm de diamètre avec un entrefer de 1 mm est utilisée. L'échantillon est recouvert comme précédemment d'huile de paraffine pour empêcher l'évaporation.

### **Protocoles expérimentaux**

#### ***III.5.3.1- Analyse de la formation des gels acides laitiers (lait des paragraphes III.4.1 à III.4.5)***

L'échantillon (lait seul ou avec l'addition d'agrégats) est déposé à 40 °C dans le cylindre creux à l'aide d'une pipette 5 ml, le temps  $t_0$  correspondant au moment de l'ajout de la GDL. Le cylindre mobile est descendu jusqu'à être totalement immergé dans le système à analyser, puis l'électrode pH est placée sous la surface de l'échantillon. Enfin, l'ensemble est recouvert d'huile de paraffine pour empêcher l'évaporation.

Les caractérisations réalisées sur les gels laitiers acides sont successivement :

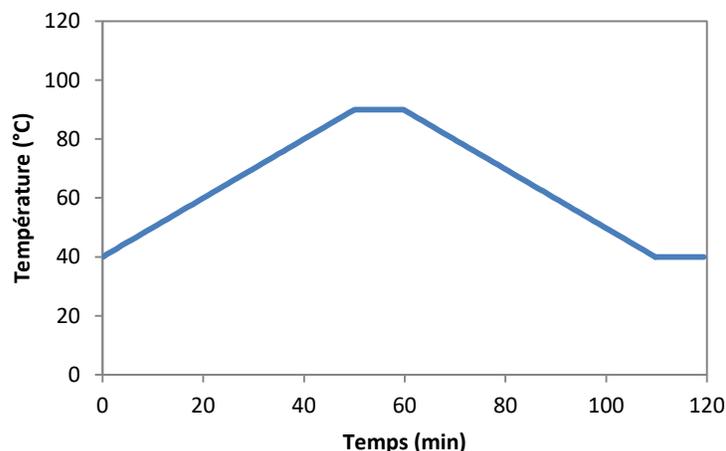
- Une cinétique d'acidification de 6 h avec une amplitude de déformation imposée de 1%. L'évolution de  $G'$  et  $G''$  à fréquence constante (1 rad/s) est enregistrée, le temps et le pH de gélification sont déterminés à partir de l'asymptote de  $\tan \delta (G''/G')$  en fonction du temps ou du pH à 40 °C.
- Un balayage en fréquence (0,01 à 100 rad/s) : mesure les variations de  $G'$  et  $G''$  en fonction de la fréquence de sollicitation à une température constante de 40 °C et à une déformation imposée de 1%. Il permet d'évaluer la structuration des différents systèmes en analysant la pente obtenus en traçant la courbe de tendance de  $G'$  en puissance.
- Un balayage en déformation (0,02 à 4% à 40 °C et 1 rad/s) qui permet de vérifier que les mesures ont bien été réalisées dans le domaine viscoélastique linéaire.
- Un balayage en déformation jusqu'à la rupture (0,02 à 100% à 40 °C et 1 rad/s) pour obtenir des informations sur la fragilité du gel acide laitier.

### *III.5.3.2- Analyse des émulsions laitières enrichies en matière grasse (lait du III.4.6) :*

Les laits enrichis en MGLA ont également été caractérisés pour leur comportement rhéologique mais avec un autre protocole de mesure. Les émulsions laitières sont déposées en sortie d'homogénéisateur sur le plateau du rhéomètre thermostaté à 40 °C. Pour cette série d'expériences, la déformation appliquée à l'échantillon a été adaptée en fonction de la texture de l'émulsion en sortie d'homogénéisateur (plus ou moins texturée selon les conditions testées : quantité de matière grasse, pression d'homogénéisation et ajout ou non de protéines sériques ou d'agrégats fractals).

Les expériences réalisées successivement sont :

- Un balayage en fréquence (0,01 à 100 rad/s) à une température constante de 40 °C et avec une déformation imposée. Il permet d'évaluer la structuration des différents systèmes avant le traitement thermique.
- Une cinétique de température (Figure 24) comprenant : une rampe de température de 40 à 90 °C à 1 °C/min et 1 rad/s (50 min), suivie d'un palier de 10 min à 90 °C, puis une rampe de température de 90 à 40 °C à 1 °C/min (50 min) et enfin un palier de 10 min à 40 °C.



**Figure 24** : Cinétique thermique pour visualiser le comportement des émulsions au court du traitement thermique

- Un second balayage en fréquence de 0,01 à 100 rad/s à une température constante de 40 °C et avec une déformation imposée. Il permet d'évaluer la structuration des différents systèmes après le traitement thermique.
- Un balayage en déformation (0,02 à 4%) qui permet de vérifier que les mesures ont été réalisées dans le domaine viscoélastique linéaire, à 40 °C et 1 rad/s.

### Observation macroscopique

Enfin, un suivi macroscopique de la texture (de liquide à texturé) des différentes émulsions est réalisé : les émulsions contenant 15% de matière grasse sont photographiées à J0 directement après la sortie de l'homogénéisateur. Ces mêmes émulsions riches en matière grasse sont également analysées à J1 après une conservation à 4 °C pour visualiser l'évolution de la texture des émulsions au cours du temps. Cette étape d'analyse est réalisée uniquement sur les émulsions qui n'ont pas été traitées thermiquement.

### III.5.4- Microscopie confocale

La microscopie confocale à balayage laser (MCBL) présentée sur la Figure 25 est une technique non invasive utilisée pour observer la microstructure de matériaux épais et permet de distinguer des objets dont la taille minimum est de l'ordre du micromètre. Cette technique permet de localiser différents composants grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques.

La longueur d'onde du laser sélectionné doit correspondre à la longueur d'onde d'excitation de la sonde fluorescente utilisée. Après excitation, la sonde fluorescente émet de la lumière à une longueur d'onde supérieure qui est captée par un photomultiplicateur qui convertit le signal lumineux en signal électrique. Le laser est focalisé sur un seul plan situé à l'intérieur de l'échantillon qu'il va balayer point

par point, appelé le plan focal. La technique MCBL permet de filtrer les photons qui proviennent des tranches optiques supérieures ou inférieures au plan focal grâce à un diaphragme (ou pinhole), placé avant le photomultiplicateur, qui va réduire la source à un point lumineux et va laisser passer principalement les photons provenant du plan focal. La lumière émise par les fluorochromes situés en-dehors du plan focal est ainsi éliminée à l'entrée du détecteur. Ainsi, le contraste et la résolution de l'image obtenue sont nettement améliorés par rapport à la microscopie de fluorescence classique. Il est également possible de déplacer le plan focal dans l'échantillon selon l'axe z pour obtenir une structure en trois dimensions (Figure 25).

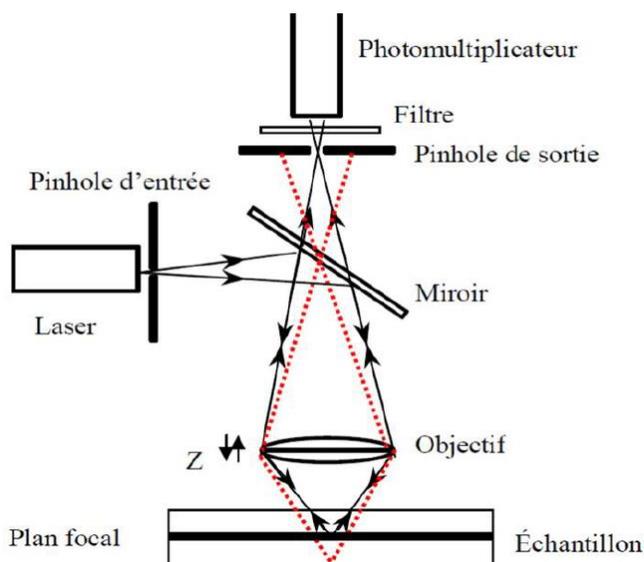


Figure 25 : Schéma du fonctionnement de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

### Dispositif de mesure

Les mesures en microscopie confocale à balayage laser sont réalisées à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse-TE2000-A1si en mode inversé (NIKON, Champigny-sur-Marne, France), équipé de 4 lasers : Diode laser 636 nm ; Diode laser 375 nm ; Laser Argon 457-477-488-514 nm et Diode laser 561 nm.

### Protocole expérimental

Une goutte d'échantillon préparé pour la rhéologie est placée sur une lame équipée d'un spacer. Puis quelques microlitres des deux colorants : Rouge de Nile dilué dans du diméthylformamide à 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (maxima d'excitation : 552 nm et d'émission : 636 nm) et Alexa 488 dilué dans du méthanol à 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (maxima d'excitation : 490 nm et d'émission : 525 nm) sont ajoutés et mélangés à l'échantillon. Le Rouge de Nile est utilisé pour le marquage des lipides et l'Alexa 488 permet de marquer les protéines. Le système est scellé par la pose d'une lamelle au-dessus du spacer.

Les systèmes lame-lamelle ont été recouverts d'aluminium afin de les protéger de la lumière, puis placés dans un four maintenu à une température stable de 40 °C pendant 6 h afin d'obtenir une acidification des gels similaire aux conditions utilisées pour les caractérisations rhéologiques. Ils sont observés à l'aide d'un objectif x20 (Plan APO 20X ; ouverture numérique : 0,75) zoom 1, 3 et 5 et d'un objectif à immersion dans l'eau x40 (Plan APO 40X ; ouverture numérique : 1,25) zoom 1, 3 et 5 avec l'utilisation des lasers Argon et de la Diode laser 561 nm.

### III.5.5- Analyse de la synérèse

La synérèse (expulsion du solvant d'un réseau gélifié) a été déterminée d'après la méthode de centrifugation de Keogh & O'Kennedy (1998) avec quelques modifications du protocole. Le lait est préparé dans les mêmes conditions que pour les autres analyses. La synérèse a été étudiée sur une période de 14 jours avec des mesures réalisées à J1, J7 et J14. Après l'ajout de la GDL, 10 ml d'échantillon sont placés dans des tubes de 15 ml préalablement tarés. Trois tubes sont préparés pour chaque temps d'observation (J1, J7 et J14). Les tubes contenant les échantillons sont pesés pour déterminer la quantité exacte d'échantillon dans chaque tube.

L'ensemble des tubes est placé à 40 °C pendant 6 h puis, à 4 °C durant une nuit (J1), 7 ou 14 jours (J7 et J14). Ensuite, une centrifugation de 15 min à 4 °C et à 3500 rpm est réalisée pour accélérer le phénomène de synérèse. Après 1 min de repos, le surnageant expulsé au cours de la centrifugation est récupéré et pesé. Le pourcentage de synérèse est calculé selon l'équation de Keogh & O'Kennedy (1998):

$$\text{Synérèse} = (\text{surnageant (g)} / \text{gel (g)}) \times 100\%$$

### III.5.6- Détermination de la composition de l'interface

#### III.5.6.1- Concentration interfaciale

Pour pouvoir analyser la composition du film interfacial dans une émulsion laitière, il faut dans un premier temps laver et séparer les gouttelettes de matière grasse de la phase continue aqueuse. La technique utilisée est celle décrite par Patton & Huston (1986) avec des modifications apportées par Surel et al. (2014). Elle permet de réaliser la séparation et le lavage des gouttelettes de matière grasse en une seule centrifugation. L'émulsion est diluée dans une solution de saccharose à 500 g/L, pour accroître la densité de la phase aqueuse. Elle est ensuite déposée au fond d'un tube à centrifuger sous un volume de solution de saccharose à 50 g/L (solution « tampon » permettant le lavage des gouttelettes de matière grasse).

Le tube est ensuite soumis à une centrifugation modérée (3000 g pendant 2 h) qui provoque le crémage des gouttelettes. Lors de la migration au travers de la solution, les gouttelettes sont lavées des constituants non adsorbés. La phase aqueuse de l'émulsion, plus dense, reste au fond du tube de centrifugation. Après centrifugation, on obtient trois phases dans le tube :

- Partie supérieure (1) : la crème qui contient les gouttelettes de matière grasse lavées
- Partie intermédiaire (2) : la solution « tampon » de saccharose
- Partie inférieure (3) : la phase aqueuse de l'émulsion contenant les constituants non adsorbés.

Les tubes sont ensuite congelés à -20 °C dans une position verticale pour éviter toute redispersion des différentes phases. Puis ils sont découpés pour récupérer chaque phase séparément et étudier leur composition. Pour chaque phase, la concentration interfaciale en protéine est déterminée par absorption à 280 nm et la composition protéique par électrophorèse SDS-PAGE.

### **Protocole expérimental**

Les laits sont préparés dans les mêmes conditions que décrites précédemment, avec ou sans ajout de PS ou d'agrégats et avec 3,5 ou 10% MGLA et une homogénéisation à 100 bars. La préparation s'arrête après le traitement thermique. Des solutions de saccharose à 500 g/L (pour diluer l'émulsion) et 50 g/L (solution « tampon ») sont préparées pour l'analyse. Deux ml d'émulsion sont dilués dans 2 ml de solution de saccharose à 500 g/L. Un tube de 15 ml est préparé avec 10 ml de solution tampon contenant 50 g/L de saccharose. L'émulsion diluée dans le saccharose (4 ml) est ensuite déposée délicatement à l'aide d'une seringue au fond du tube en prenant soin de ne pas la disperser dans la solution tampon. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 g pendant 2 h à 20 °C.

Après la centrifugation, ils sont congelés à -20 °C et conservés à cette température jusqu'aux analyses. Les trois phases congelées sont découpées et placées dans des pots pour permettre leur décongélation.

Les étapes de préparation des tubes pour l'analyse du film interfacial dans une émulsion laitière sont résumées dans la Figure 26 suivante :

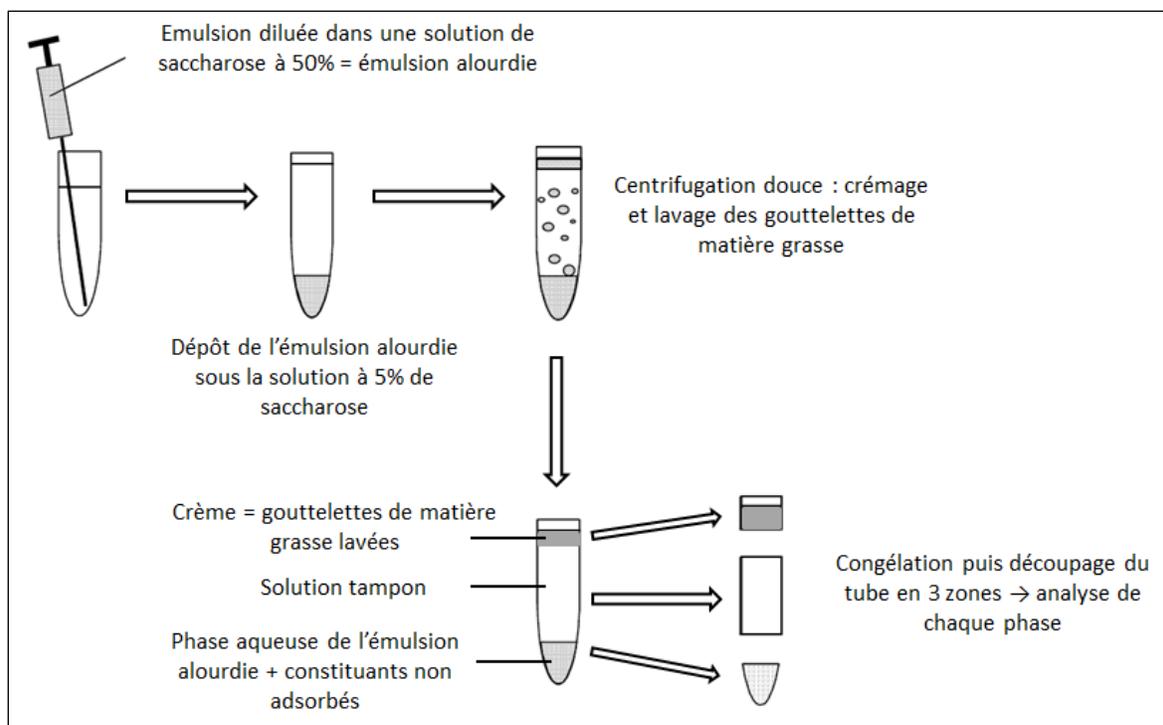


Figure 26 : Technique de caractérisation des films interfaciaux (d'après Patton & Huston, 1986)

Pour les protéines adsorbées à l'interface (phase crème (1)), une désorption préalable est nécessaire. La phase crème est récupérée et pesée puis, diluée au 1/3 dans une solution de SDS 1%. Le mélange est agité au vortex et laissé au repos 1 h à 40 °C. Il est ensuite centrifugé à 3000 g pendant 1 h à 10 °C et cela permet d'obtenir deux phases :

- Phase supérieure (4) : qui contient les gouttelettes de matière grasse stabilisées par le SDS
- Phase inférieure (5) (partie aqueuse) : qui contient les protéines désorbées de l'interface

La phase inférieure (5), contenant les protéines, est récupérée à l'aide d'une seringue en traversant délicatement la phase supérieure, puis diluée dans une solution dénaturante contenant 8 M d'urée, 5 g/L de SDS, 0,2 M de tris, 0,05 M de Trisodium citrate et 10 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol. La concentration en protéines à l'interface est ensuite mesurée au spectrophotomètre (UV-1800 Spectrophotometer, Shimadzu, Japon) à 280 nm. La partie intermédiaire (solution tampon (2)) et la partie inférieure (phase aqueuse (3)) après décongélation sont également diluées dans la solution dénaturante et leur concentration protéique est également mesurée au spectrophotomètre à 280 nm.

### *III.5.6.2- Composition de l'interface*

La composition en protéines du film interfacial est déterminée par SDS-PAGE. Cette méthode permet de séparer les protéines en fonction de leur masse molaire. La composition de chacune des phases (2, 3 et 5 : qui contient les protéines désorbées de l'interface) est déterminée. Les phases 3 et 5 sont diluées à une concentration de 2 mg/ml et un volume de cette solution est de nouveau dilué dans un volume de tampon de solubilisation. La phase 2 dont la concentration en protéines est inférieure à 2 mg/ml est directement diluée dans le tampon de solubilisation à 5/1 (v/v).

Le tampon de solubilisation est préparé en condition réductrice (Tris-HCl 0,125M, pH 6,8, SDS 4%, glycérol 20%, béta-mercaptoéthanol 10%, 0,1% bleu de bromophénol) ou non réductrice (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, SDS 4%, glycérol 10%, 0,1% bleu de bromophénol). Les échantillons sont ensuite placés 5 min à 100 °C. Le béta-mercaptoéthanol permet la dissociation des ponts disulfures en groupements thiol.

**Pour les laits à 3,5% de MG** témoins et contenant 1% d'agrégats fractals, les gels d'électrophorèse sont des gels de polyacrylamide à 10% (gel principal) et 3,5% (gel de dépôt/concentration) d'acrylamide. Une fois polymérisés, ils sont placés dans la cuve de migration contenant le tampon de migration MES-SDS 1X (Bolt MES SDS running buffer (20x), Novex, Life Technologie, Carlsbad, États-Unis) à ampérage constant pendant environ 1 h à l'aide d'un générateur power source 300V (VWR, Radnor, États-Unis). Après migration, une coloration au Bleu de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-rad Laboratories, Hercules, États-Unis) est réalisée en immergeant les gels dans une série de bains. Afin de connaître le poids moléculaire des protéines, un standard moléculaire (SDS Page Molecular Weight Standar low range, Bio-rad Laboratories, Hercules, États-Unis) est déposé dans le premier puits. Dans chaque puits du gel, 10 µl de standard ou 15 µl d'échantillon sont déposés.

**Pour les laits à 10% de MG** témoin et contenant 1% de PS ou 1% d'agrégats fractals ou mixtes, des gels pré-coulés (10 puits) avec un gradient de concentration en polyacrylamide de 4 à 12% (Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, États-Unis) sont utilisés. Les gels sont placés dans la cuve de migration contenant le tampon de migration et l'électrophorèse est réalisée à ampérage constant (60 mA) pendant 1 h 30. Pour connaître le poids moléculaire, un standard (Novex® Sharp Protein Standard Protein, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, États-Unis) a été déposé dans le premier puits. Les mêmes quantités d'échantillons sont déposées. Les gels ont été colorés avec de l'Instant Blue™ (Expedeon, Cambridgeshire, Royaume-Uni).

### III.6- Analyse en MET de l'interface

Des laits (10% de MGLA, 100 bars) sont préparés selon les conditions précédemment décrites avec ou sans ajout de PS ou d'agrégats fractals (Fa0) ou d'agrégats mixtes. Après une acidification de 6 h à 40 °C et un stockage à 4 °C pendant 2 jours, les gels acides ont été découpées en petits cubes (d'environ 1 mm<sup>3</sup>) à l'aide d'une lame de rasoir puis placées dans une solution liquide contenant 1,5% d'agar à 40 °C. Après refroidissement, les cubes de gels acides entourés d'agar ont été délicatement retirés du gel d'agar. L'excès d'agar est éliminé à la lame de rasoir.

Les échantillons sont ensuite placés 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 7,3 pour permettre la fixation de l'échantillon avant d'être rincés plusieurs fois avec le tampon phosphate puis à l'eau. Ensuite, les échantillons subissent une post fixation à l'osmium (0,01% d'osmium pendant 1 h sous hotte), puis sont rincés plusieurs fois à l'eau millipore.

Les échantillons sont ensuite déshydratés par trempage successif dans des bains éthanol/eau avec une concentration croissante en éthanol (30, 50, 70, 85, 95, 100% v/v) et des durées croissantes (de 30 min à 1 nuit pour le dernier bain). 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 concentrations croissantes (50 et 100% v/v). Enfin, les échantillons ont été inclus dans l'EPON pur et placés 3 jours à 55 °C, puis 2 jours à 72 °C, afin de permettre la polymérisation de 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 en transmission JEOL JEM-1230 (JEOL, Japon) fonctionnant à 80 kV.



# **Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique**



## Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique

---

Au cours de ce travail, différents types d'agrégats protéiques, à savoir les agrégats fractals, microgels, fibrilles et agrégats mixtes, ont été préparés afin de tester leurs capacités à moduler la texture des gels laitiers acides. En effet, en modulant différents paramètres comme le pH, la force ionique et la concentration en protéines, différents agrégats peuvent être produits par dénaturation et agrégation lors du chauffage d'une solution de protéines sériques (Jung et al., 2008; Nicolai et al., 2011). Tous les agrégats ont été produits selon les protocoles développés par Thibault Loiseleux au cours de sa thèse (Loiseleux, 2017). Les conditions physico-chimiques pour la préparation des quatre types d'agrégats de protéines laitières, détaillées dans la partie matériels et méthodes, sont rappelées brièvement :

- Les agrégats fractals sont produits à partir d'une solution de protéines sérique à pH 7 avec un traitement thermique de 2 h à 80 °C sans agitation avec des concentrations variables en NaCl pour moduler leurs tailles.
- Les agrégats microgels sont fabriqués à partir d'une solution de protéines sériques à pH 5,8 avec un traitement thermique de 1 h à 85 °C sans agitation.
- Les agrégats fibrillaires sont obtenus par un traitement thermique d'une solution de protéines sériques de 7 h sous cisaillement à 90 °C et à pH 2.
- Les agrégats mixtes sont produits à partir de deux solutions : une solution de protéines sériques et une solution de caséines micellaire les deux préparés dans du perméat de lait (PUF). Un mélange de ratio 80/20 est réalisé avec 80% de solution de micelles de caséines et 20% de solution de protéines sériques. Un traitement thermique à pH 6,3 sans agitation de 1 h à 80 °C est réalisé. Les agrégats mixtes sont composés de micelles de caséines et d'agrégats de protéines sériques adsorbés à leur surface.

**Le but de la première partie de ce chapitre est de caractériser les différentes suspensions d'agrégats protéiques. Des observations en microscopie électronique en transmission (MET) ont permis d'observer leur morphologie, tandis que leur distribution en taille a été caractérisée en diffusion dynamique de la lumière (DLS), lorsque la mesure était possible.**

Comme il a été expliqué dans le chapitre 1, au cours du traitement thermique, de nombreuses réactions de modification de la structure des protéines laitières se produisent : dénaturation, agrégation des protéines du lactosérum entre elles ou avec les micelles de caséines et dissociation partielle des micelles de caséines. Ces réactions modifient les propriétés physico-chimiques du lait et donc jouent un rôle majeur dans la stabilité des produits laitiers chauffés (Thompson et al., 2009).

## Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique

---

Les laits analysés dans ce chapitre sont des laits témoins sans matière grasse ayant subi ou non un traitement thermique de durée croissante, pour évaluer l'effet du traitement thermique sur la concentration en protéines sériques natives résiduelles dans l'échantillon. De plus, des laits traités thermiquement et contenant différentes concentrations de PS ou d'agrégats fractals (0,2-0,4 et 0,6%) ajoutés ont été analysés pour évaluer l'impact de cet ajout sur la dénaturation des protéines sériques.

**Le but de la seconde partie de ce chapitre est donc de quantifier l'influence de la durée du traitement thermique et de l'ajout d'agrégats protéiques ou de PS natives sur la concentration en protéines sériques natives résiduelle dans le lait. Pour ceci, les protéines du lait ont été quantifiées par SDS-PAGE. L'ajout des autres types d'agrégats n'a pas été testé dans ce chapitre.**

### IV.1- Caractérisation des agrégats protéiques

#### IV.1.1- Agrégats fractals

Deux première suspensions d'agrégats fractals ont été produit dans un premier temps à partir des lots de poudre A et B pour les utiliser dans les gels acides laitiers sans matière grasse. Les diamètres moyens, obtenues par DLS des agrégats fractals sont de 200 nm (25 à 2300 nm) pour la suspension 1 produite avec le lot de poudre B et de 188 nm (50 à 1280 nm) pour la suspension 2 produite avec le lot A.

Ensuite, pour obtenir des agrégats fractals de distributions de tailles différentes, le même traitement thermique a été appliqué aux différentes solutions de protéines sériques à 50 g/L en présence de concentrations de chlorure de sodium (NaCl) variables. En effet, une concentration élevée en sel réduit les répulsions électrostatiques et favorise donc l'agrégation, les agrégats formés à haute force ionique pouvant être jusqu'à deux fois plus grands que ceux formés à faible force ionique pour une même concentration protéique (Mahmoudi et al., 2007; Phan-Xuan et al., 2011). Les distributions de taille des agrégats obtenus dans cette étude sont présentés Figure 27. Elles dépendent de la concentration en NaCl et correspondent bien à celles attendues par rapport à la littérature (Mahmoudi et al., 2007). Les tailles, obtenues par DLS, des agrégats produits sont comprises entre quelques dizaines de nm et plus de 1  $\mu\text{m}$  pour la solution à 45 mM de NaCl, entre 20 nm et 400 nm pour celle avec 20 mM de NaCl, et enfin entre 20 nm et 250 nm pour celle sans NaCl. Un diamètre moyen en intensité de 228, 93 nm et 68 nm a été obtenu, respectivement.

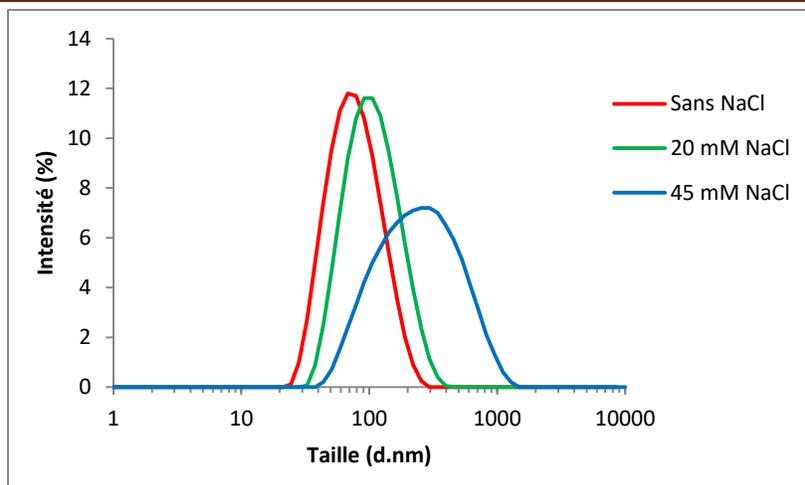


Figure 27 : Dispersion de tailles en intensité pour les solutions d'agrégats fractals (50 g/l, pH 7) selon la quantité de chlorure de sodium ajoutée

De plus, les observations réalisées en MET sur ces agrégats sont présentées Figure 28. Les clichés montrent qu'une structure plus ramifiée est obtenue pour les agrégats préparés en présence de 45 mM de NaCl (Figure 28C) qu'avec 20 mM de NaCl (Figure 28B) ou sans NaCl (Figure 28A). Les tailles des agrégats sont également plus polydisperses. En présence de sel, il semble également y avoir plus de sur-agrégation, c'est-à-dire que plusieurs agrégats fractals sont regroupés ensemble. La structure des agrégats fractals, ainsi que leur taille peut donc être différente selon la force ionique de la solution.

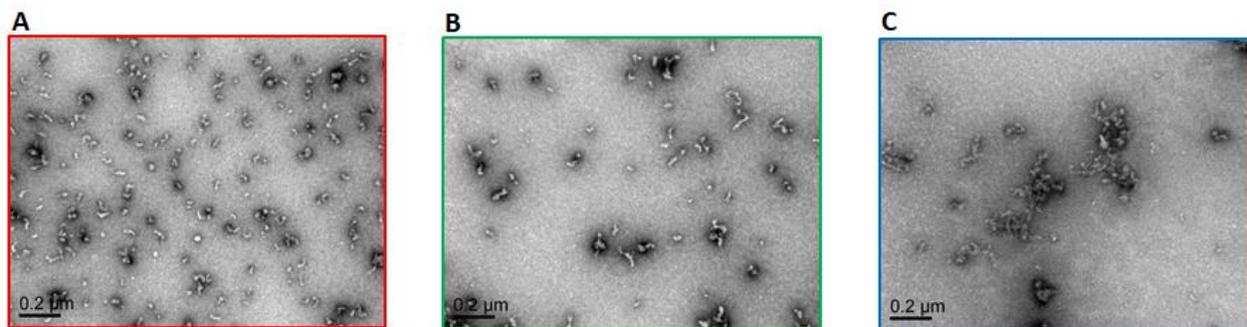


Figure 28 : Micrographies en MET d'agrégats fractals avec une concentration variable de chlorure de sodium (A : sans chlorure de sodium, B : 20 mM et C : 45 mM) échelle : 0,2 µm

#### IV.1.2- Agrégats microgels

Les recherches bibliographiques ont montré qu'avec des conditions de répulsions électrostatiques faibles, il est possible d'obtenir des agrégats microgels de deux façons, soit en présence de calcium et à un pH proche de la neutralité (Phan-Xuan, 2013; Phan-Xuan et al., 2014), soit en se plaçant à un pH proche du point isoélectrique (entre 5,7 et 5,9) et à faible force ionique (Donato et al., 2009; Schmitt et al., 2011). Les microgels utilisés dans ce travail ont été produits selon cette dernière condition, c'est-à-dire à pH 5,8 sans calcium.

## Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique

La distribution de taille des agrégats microgels a également été caractérisée en diffusion dynamique de la lumière. Les résultats ont été reportés sur la Figure 29. Les agrégats microgels formés après un traitement thermique de 1h à 85 °C ont un diamètre moyen de 450 nm avec une distribution de taille comprise entre 120 nm et 3 µm.

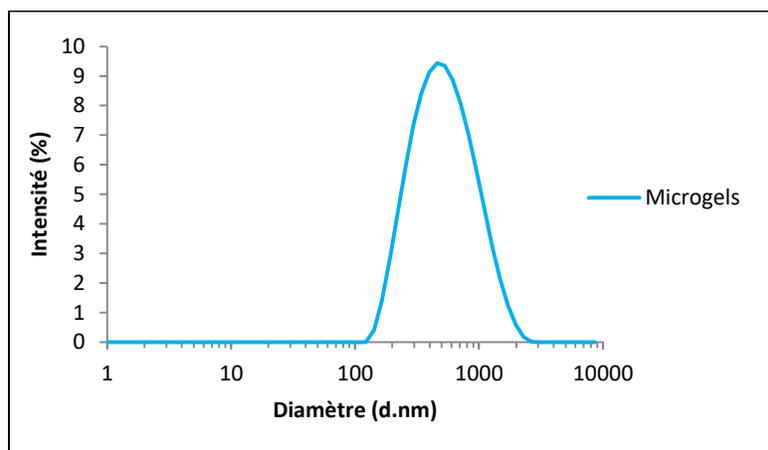


Figure 29 : Dispersion de tailles en intensité pour des solutions d'agrégats microgels (50 g/l, pH 5,8)

L'observation des agrégats en MET (Figure 30) montre des objets beaucoup plus denses que les agrégats fractals, et de forme circulaire. De plus, les agrégats sont généralement groupés, ce qui explique la taille importante des objets et la grande polydispersité observée en DLS. En effet, les objets de plus grande taille (3 µm) apparaissent plutôt comme des groupements de microgels. Les images TEM montrent plutôt des objets de diamètre moyen situé en dessous de 0,2 µm avec ce protocole de fabrication, ce qui est cohérent avec les résultats de la littérature (Donato et al., 2009; Phan-Xuan, 2013; Phan-Xuan et al., 2014; Schmitt et al., 2011).

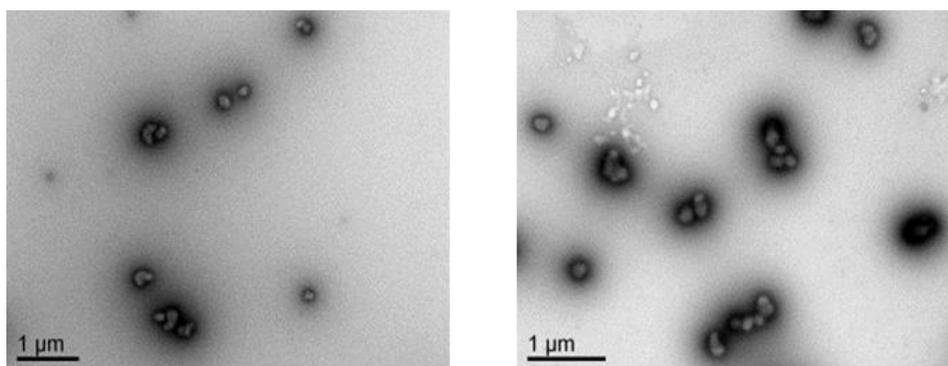


Figure 30: Micrographies en MET d'agrégats microgels (échelle : 1 µm)

### IV.1.3- Agrégats mixtes

Les agrégats mixtes ont été produits dans les conditions optimales de fabrication décrites dans la littérature, c'est-à-dire avec un traitement thermique au-dessus de 70 °C à un pH inférieur à 6,7 (Anema, 2007; Anema & Klostermeyer, 1997). Les conditions retenues comprenaient un traitement thermique à 80 °C pendant 1 h à pH 6,3.

Après chauffage, la suspension d'agrégats contient un mélange de micelles de caséines, d'agrégats mixtes et de petits agrégats de protéines sériques. La distribution de taille de ce mélange d'agrégat obtenue par DLS n'apporte pas d'information pertinente, car il n'est pas possible par cette technique d'identifier clairement les différents éléments présents dans la solution obtenue après le traitement thermique. Il est cependant possible de les caractériser par une méthode de fractionnement appelée Fractionnement Asymétrique Flux-Force (A4F) couplé à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angle et à un réfractomètre (A4F-MALLS-DRi), comme cela a été fait au cours de la thèse de Thibault Loiseleux (Loiseleux, 2017; Loiseleux et al., 2018). Nous n'avons pas jugé nécessaire de reproduire les expérimentations car les agrégats mixtes sont produits dans les mêmes conditions expérimentales et à partir des mêmes lots de poudre (poudre WPI lot A, poudre Cas et poudre PUF).

Les observations en MET réalisées sur les agrégats mixtes (Figure 31) montrent des structures composées de micelles de caséines de diamètre compris entre 100 et 200 nm et de protéines sériques agrégées en surface. On retrouve également des micelles de caséines seules et des petits agrégats de protéines sériques non liés aux micelles de caséines.

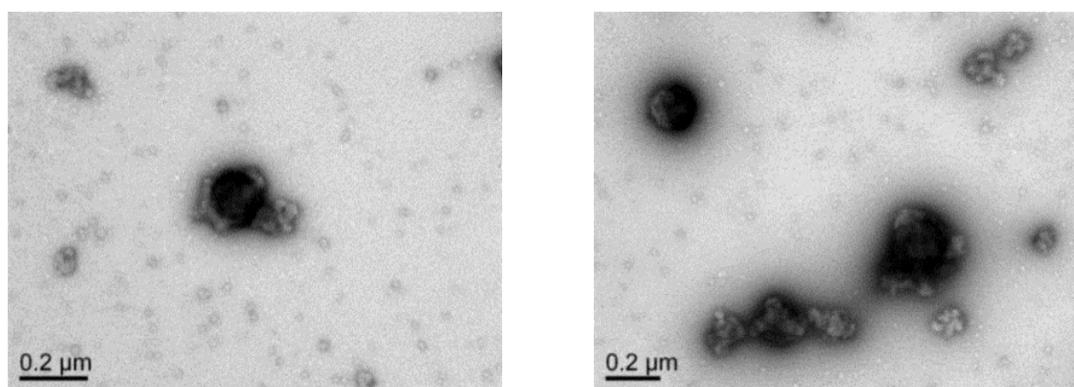


Figure 31 : Micrographies en MET d'agrégats mixtes) (échelle : 0,2 µm)

### IV.1.4- Agrégats fibrillaires

Les agrégats fibrillaires ont été produits en appliquant un traitement thermique à pH 2 de plusieurs heures à faible force ionique, comme décrit dans la littérature (Aymard et al., 1999).

## Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique

Leurs tailles n'ont pas été caractérisées par DLS car le diamètre hydrodynamique calculé n'est pas pertinent pour décrire des objets aussi longs et fins. Ces agrégats ont été visualisés par microscopie électronique en transmission (Figure 32).

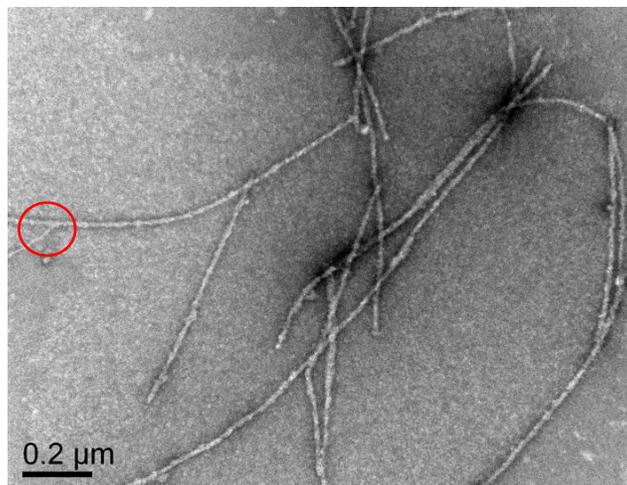


Figure 32 : Micrographies en MET d'agrégats fibrillaires (échelle : 0,2 µm)

Sur la Figure 32, on peut observer que la taille des fibrilles varie énormément et peut atteindre quelques micromètres de longueur pour une épaisseur très faible d'environ 20-25 nm. De plus, comme on peut le voir dans le cercle rouge, il semblerait que certaines fibrilles présentent des ramifications.

### IV.2- Quantification des protéines sériques natives résiduelles après traitement thermique

#### IV.2.1- Echantillons analysés

L'effet du traitement thermique sur les protéines sériques natives résiduelles (PNR) du lait a été évalué. Dans un premier temps, trois échantillons de lait témoin, c'est-à-dire sans ajout de protéines sériques ou d'agrégats fractals ont été considérés dans le but de vérifier que les protéines sont affectées par les traitements thermiques, et également de déterminer la durée minimale de traitement thermique pour la dénaturation des protéines sériques :

- le premier échantillon de lait n'est soumis à aucun traitement thermique,
- le second à un traitement thermique de 11 min à 90 °C,
- et le dernier à un traitement de 20 min à 90 °C.

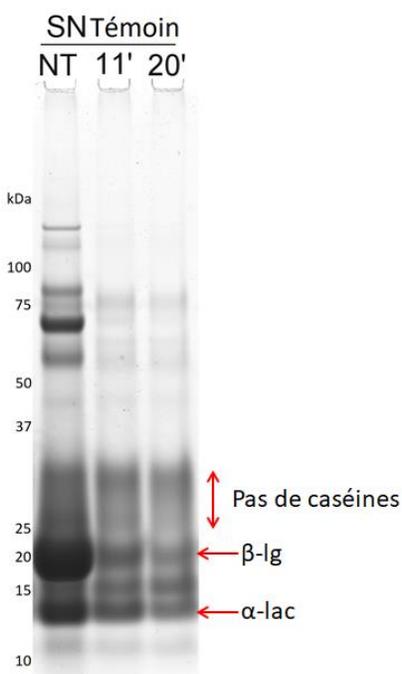
Ces analyses permettent de fixer la durée du traitement thermique à appliquer pour l'ensemble des expériences réalisées au cours de ce projet de thèse.

## Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique

Ensuite, trois échantillons de lait auquel 0,2, 0,4 ou 0,6% de protéines sériques ou d'agrégats fractals ont été ajoutés avant traitement thermique ont également été analysés pour évaluer si l'ajout de ces protéines sériques supplémentaire ou de ces agrégats entraîne des modifications sur les concentrations en protéines sériques natives résiduelles du lait après le traitement thermique.

### IV.2.2- Analyse des surnageants des laits témoins en SDS-PAGE

L'ensemble des laits ainsi que les surnageants des laits (témoin, avec ajout de PS ou d'agrégats fractals) obtenus après précipitation à l'acide chlorhydrique ont été analysés en SDS-PAGE en condition réductrice pour vérifier l'absence des caséines et comparer la quantité de protéines sériques natives résiduelles après traitement thermique. Seul le résultat des surnageants des laits témoins ayant subi les différents traitements thermiques sont présentés sur la Figure 33.



**Figure 33** : Electrophorèse de la composition des surnageants des laits témoins non traité thermiquement (NT) et traité thermiquement 11 min (11') et 20 min (20') en condition réductrice

Dans le surnageant du lait non traité thermiquement (NT) sont retrouvées les protéines sériques, la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine (désigné par les flèches rouges sur la figure), de plus, il n'y a plus les caséines qui étaient présentes dans les pistes des laits (non montré). Les surnageants des laits traité thermiquement 11 min et 20 min contiennent peu de PS en comparaison avec le témoin non traité. Cela signifie que le traitement thermique effectué sur les laits entraîne bien une diminution de la quantité de protéines sériques natives résiduelles au profit de la formation d'agrégats protéiques (de Wit, 2009; Relkin, 1998; Roefs & De Kruif, 1994).

## Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique

Les résultats des surnageants pour l'ajout de protéines sériques natives et d'agrégats fractals ne sont pas présentés car ils n'apportent pas d'informations nouvelles par rapport aux résultats de la quantité de protéines natives résiduelles des surnageants obtenus par mesure spectrophotométrique présentée dans le point suivant. Il faut seulement noter que dans les pistes lait pour l'ajout de protéines sériques, on constate une légère augmentation de l'intensité des bandes correspondant aux protéines sériques ce qui est en accord avec les résultats attendus et que la grande majorité des protéines sériques natives ajoutées sont absentes des surnageants et donc dénaturées au cours du traitement thermique appliqué au lait. Pour les laits avec ajout d'agrégats fractals, on constate la présence d'agrégats de haut poids moléculaire qui ne migrent pas dans le gel en fonction de l'augmentation de la quantité d'agrégats fractals ajoutée. L'analyse des surnageants des laits supplémentés avec 0,2% à 0,6% d'agrégats fractals montre globalement le même profil, aucune différence au niveau des bandes n'est observée, ce qui signifie que l'ajout d'agrégats fractals dans le lait avant traitement thermique n'entraîne pas de modification de la quantité de protéines sériques natives résiduelles.

### IV.2.3- Evaluation de la quantité de protéines sériques natives résiduelles des surnageants

Une approximation de la quantité des protéines sériques natives résiduelles encore présente dans les différents surnageants a été déterminée par spectrophotométrie UV. Les résultats des concentrations en PNR ont été obtenus par la mesure de l'absorbance à 280 nm en utilisant un coefficient d'extinction massique de 1,046 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Dans le Tableau X sont présentées les concentrations en g/L des PNR pour les trois surnageants des laits témoin (NT, 11 min et 20 min) ainsi que les résultats pour l'ajout de 0,2 à 0,6% de protéines sériques natives ou d'agrégats fractals.

**Tableau X :** Valeurs moyennes et écart-type des concentrations en protéines sériques natives résiduelles obtenues en spectrophotométrie dans les surnageants des laits témoins (NT, 11 min et 20 min) et des laits avec ajout de 0,2 ; 0,4 et 0,6% de protéines sériques natives ou d'agrégats fractals

Echantillons	Moyenne	Ecart-type
Témoin (NT)	9,23 g/L	0,15
Témoin (11 min)	5,98 g/L	0,04
Témoin (20 min)	5,59 g/L	0,05
0,2% PS	5,82 g/L	0,06
0,4% PS	6,23 g/L	0,19
0,6% PS	6,33 g/L	0,25
0,2% fractals	6,17 g/L	0,14
0,4% fractals	6,28 g/L	0,08
0,6% fractals	6,15 g/L	0,20

## Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique

---

Pour les différents échantillons de laits témoins ayant subi ou non un traitement thermique, les résultats sont cohérents avec les analyses en SDS-PAGE. En effet, on observe une diminution importante de la concentration en protéines sériques natives résiduelles après un traitement thermique par rapport au lait témoin non traité thermiquement (9,23 g/L), et il y a peu de différence dans les concentrations des témoins traité thermiquement à 90 °C durant 11 et 20 min. Nous avons donc considéré que pour les analyses suivantes un traitement thermique de 11 min est suffisant.

Ensuite, les concentrations obtenues en spectrophotométrie pour l'ajout de protéines sériques sont cohérentes avec les résultats attendus. En effet, on observe une légère augmentation de la concentration en protéines natives résiduelles avec l'augmentation de la quantité de PS ajoutées avant le traitement thermique. De plus, les valeurs moyennes des concentrations de PS natives obtenues pour les échantillons avec ajout de PS sont assez proches de la valeur obtenue pour le lait témoin traité thermiquement 11 min (5,98 g/L), ce qui confirme bien que la grande majorité des PS ajoutées dans le lait sont agrégées au cours du traitement thermique.

Enfin, pour l'ajout d'agrégats fractals à différentes concentrations on obtient environ la même valeur moyenne de protéines sériques natives résiduelles pour les trois échantillons et les résultats sont proches de ceux obtenus dans le cas de l'ajout de PS natives avant le traitement thermique. De plus, les valeurs moyennes obtenues pour les échantillons avec agrégats fractals sont également assez proches de la valeur obtenue dans le cas du lait traité thermiquement 11 min à 90 °C. Enfin, il n'y a pas de différence dans les concentrations en PNR quand on ajoute différentes concentration d'agrégats fractals, ce qui montre bien que les protéines sériques présentes dans la suspension d'agrégats fractals ajoutés dans le lait sont toutes dénaturées et agrégées.

### IV.3- Conclusions

La première partie de ce chapitre nous a permis de caractériser les différents types d'agrégats protéiques utilisés au cours de cette thèse. La quantité de NaCl (et le lot de poudre de WPI) utilisée au cours de la fabrication des agrégats fractals impacte leur morphologie et taille. En effet, les agrégats sont plus ramifiés et plus gros en présence de quantités croissantes de NaCl. Par la suite, l'influence des différences de morphologies des agrégats fractals sur la texture des gels acides laitiers maigres et gras sera évaluée.

## Chapitre 4 : Caractérisation des agrégats protéiques et quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique

---

Les résultats obtenus ont montré que les agrégats microgels étaient généralement regroupés en amas et rarement individuels, ce qui explique leur taille importante en DLS. Les analyses effectuées sur les solutions d'agrégats mixtes ont montré qu'elles contiennent un mélange de différentes structures : des agrégats mixtes (une micelle avec des protéines sériques en surface), des micelles individuelles et des petits agrégats de protéines sériques. Comme pour les agrégats fractals, l'impact des agrégats microgels et mixtes sur la texturation des gels acides laitiers maigres et gras sera évalué par la suite.

Enfin, les agrégats fibrillaires peuvent atteindre quelques micromètres de longueur pour une épaisseur très faible d'environ 20-25 nm. Il semblerait que certaines fibrilles présentent des ramifications.

Concernant la deuxième partie de ce chapitre, les expériences ont montré que le traitement thermique du lait entraîne effectivement une réduction du taux de protéines sériques natives résiduelles. Un temps de chauffage de 11 min à 90 °C est suffisant pour dénaturer une part importante des PNR. Cette durée sera donc utilisée pour l'ensemble des expérimentations réalisées sur les gels acides laitiers.

De plus, les analyses sur la quantification des protéines lactiques montrent bien que l'ajout de protéines sériques natives ou d'agrégats fractals n'a pas d'impact significatif sur la dénaturation des protéines présentes initialement dans le lait reconstitué. Dans le cas de l'ajout de PS natives, nous avons pu noter une légère augmentation de la quantité de protéines sériques natives résiduelles pour des concentrations croissantes ajoutées, mais la grande majorité des PS natives ajoutées sont dénaturées au cours du traitement thermique.

Enfin, nous avons montré que l'ajout d'agrégats fractals n'apporte pas de protéines sériques supplémentaires et n'a pas d'impact sur la dénaturation des protéines sériques présentes initialement dans le lait. Par analogie, il a été considéré que les résultats seraient similaires dans le cas de l'ajout des agrégats microgels et mixtes.

La capacité de ces différentes espèces protéiques (PS natives et agrégats) à modifier les propriétés de texture des gels laitiers acides avec et sans matière grasse fera l'objet de la suite de ce travail.

# **Chapitre 5 : Texturation des gels acides maigres par ajout d'agrégats protéiques**



La formation et la texture des gels acides maigres traités thermiquement, ainsi que l'effet de l'ajout de protéines sériques pour augmenter leur texture et leur capacité de rétention du lactosérum, ont déjà été largement étudiés (Guyomarc'h, Jemin, et al., 2009; Lucey, Munro, et al., 1998; Lucey & Singh, 1998; Lucey, Teo, et al., 1998; Vasbinder et al., 2001). En revanche, l'ajout d'agrégats préformés de protéines laitières, de types, formes et tailles variées, dans le but de moduler la texture des systèmes maigres est moins documenté.

**Ainsi le but de ce chapitre est de comprendre l'impact de l'ajout de différentes concentrations de protéines sériques ou d'agrégats de protéines laitières (fractals, microgels et agrégats mixtes), caractérisés précédemment, dans des systèmes maigres identiques pour évaluer leur impact sur les propriétés physiques des gels acides formés. Ce chapitre constitue une étude préalable nécessaire pour la compréhension des fonctionnalités des différents agrégats de protéines qui seront ensuite ajoutés à du lait contenant de la matière grasse laitière.**

Pour cela, des laits écrémés témoins c'est-à-dire sans ajout de protéines sériques et contenant 3,5% de protéines provenant de la poudre de lait et des laits écrémés contenant de 0,2 à 1% de protéines sériques natives (PS) ou d'agrégats fractals, microgels ou mixtes ajoutés, ont été préparés. Ils ont été soumis à un traitement thermique de 11 min à 90 °C afin d'assurer une dénaturation/agrégation des PS ajoutées. De plus, des tests ont également été réalisés sur des systèmes non traités thermiquement (lait témoin, avec ajout de PS et d'agrégats fractals) pour mieux comprendre l'impact de l'ajout d'agrégats préformés. Tous les systèmes sont acidifiés avec la quantité de GDL nécessaire pour que le pH atteigne une valeur d'environ 4,6. Différentes caractérisations ont été réalisées sur l'ensemble des systèmes en cours de gélification et sur les systèmes finaux :

- Des caractérisations rhéologiques en cours de gélification pour quantifier l'effet de l'ajout de concentrations variables de protéines sériques natives ou des différents agrégats (fractals, microgels et agrégats mixtes),
- Des analyses de la capacité de rétention du lactosérum après acidification des différents laits et au cours du temps : de J1 à J14,
- Et des observations microscopiques pour visualiser le réseau protéique après acidification des systèmes avec ajout de PS natives et d'agrégats fractals.

## V.1- Propriétés rhéologiques des gels acides laitiers témoins

Dans un premier temps, plusieurs échantillons de laits témoins chauffés 11 min à 90 °C, traitement thermique retenu suite aux résultats du chapitre précédent ont été caractérisés à J0 : le jour de la reconstitution du lait et à J1 : le jour suivant après conservation du lait à 4 °C. Un lait témoin non traité thermiquement a également été analysé. Le but étant d'évaluer l'impact du traitement thermique et d'évaluer si le temps de réhydratation des poudres a un impact sur les résultats. Les laits sont reconstitués à 3,5% (p/p) de protéines, puis traités thermiquement, avant l'ajout de 1,1% (p/p) de GDL. L'échantillon est ensuite déposé à 40 °C dans le cylindre creux de la géométrie Couette du rhéomètre préchauffé à la même température. La Figure 34 représente l'évolution classique des modules conservatif ( $G'$ ), dissipatif ( $G''$ ) et du pH obtenue au cours du temps lors de l'acidification de 6 h à 40 °C du lait.

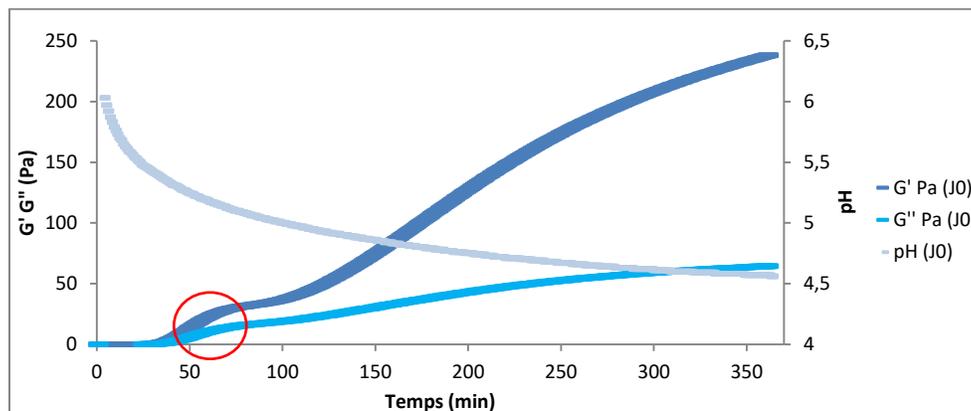


Figure 34 : Evolution des modules  $G'$  et  $G''$  et du pH lors de l'acidification à 40 °C d'un gel acide maigre témoin à J0

Après un court temps de latence, les modules  $G'$  et  $G''$  augmentent progressivement et le module  $G'$  est supérieur à  $G''$ . L'augmentation des modules est caractéristique de la transition sol-gel du système lactique en cours de gélification (Cobos, Horne, & Muir, 1995; Kim & Kinsella, 1989). De plus, on remarque en début de cinétique (cercle rouge sur la figure), un épaulement dans l'évolution des modules qui est retrouvé pour toutes les cinétiques des différents systèmes traités thermiquement : témoin, avec ajout de PS natives ou d'agrégats. Celui-ci est caractéristique de la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal des micelles, intervenant lorsque le pH diminue (Dalgleish & Law, 1988, 1989). A un pH situé entre 5,3 et 5,1, le phosphate de calcium est entièrement solubilisé, les interactions au sein de la micelle de caséine sont affaiblies ce qui conduit à une perte de structure des micelles de caséines (Anema & Li, 2000; Famelart et al., 1996; Le Graet & Brulé, 1993; Walstra, 1990).

## Chapitre 5 : Texturation des gels acides maigres par ajout d'agrégats protéiques

Dans le Tableau XI sont présentés les résultats obtenus sur 4 répétitions pour les laits témoins analysés à J0 et J1 ainsi que les résultats obtenus pour un lait témoin non traité thermiquement.

**Tableau XI** : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers témoins à J0 et J1

Echantillons	Temps gélification	pH gélification	Amplitude tan $\delta$	G' final (Pa)	Pente G' (BF)
<b>Moyenne témoin J0</b>	29,9 min	5,42	0,52	239	0,165
Ecart-type	1,2 min	0,02	0	2,8	0,002
<b>Moyenne témoin J1</b>	29,4 min	5,43	0,52	229	0,164
Ecart-type	1,6 min	0,01	0	7,9	0,0006
<b>Lait témoin non chauffé J1</b>	91 min	5,07	0,78	33	0,186

Comme on peut le voir dans le Tableau XI, les résultats obtenus sont très reproductibles pour l'ensemble des paramètres étudiés pour les laits témoins analysés à J0 et J1. Un temps de gélification toujours situé autour de 30 min est obtenu, à un pH de gélification d'environ 5,4 ce qui est typique de ce type de lait (Lucey, Teo, et al., 1998). Ces résultats sont largement inférieurs au temps de gélification d'un lait non traité thermiquement (91 min). Lucey, Teo, et al. (1998) ont déjà montré que le traitement thermique du lait réduit fortement le temps de gélification et augmente le pH de gélification. Cette augmentation du pH de gélification pour un lait traité thermiquement est due à la dénaturation des protéines sériques et à leur agrégation à la surface des micelles de caséines. Les protéines sériques ont des pH isoélectriques légèrement plus élevés que les caséines. La protéine majeure, la  $\beta$ -lactoglobuline a un pH isoélectrique d'environ 5,3 ; lorsque les  $\beta$ -lactoglobulines sont agrégées sur les micelles de caséines, cette modification permet une réduction plus rapide de la charge de surface des micelles et la déstabilisation de celles-ci peut se faire à un pH plus élevé, ce qui augmente le pH de gélification des laits chauffés et acidifiés (Ozcan et al., 2015). En revanche contrairement au traitement thermique, le temps de réhydratation des poudres ne semble pas influencer les caractéristiques rhéologiques des gels acides obtenus. En effet, les valeurs de G' obtenues en fin de cinétiques sont très proches (J0 : 239 Pa et J1 : 229 Pa) et très supérieures à celles obtenues pour le lait témoin non traité thermiquement (G' : 33 Pa), en accord avec la littérature (Lucey et al., 1997).

Pour l'ensemble des analyses rhéologiques, le temps et le pH de gélification ont été déterminés en représentant l'évolution de tan  $\delta$  qui correspond au rapport de G''/G' en fonction du temps et du pH, à partir de l'asymptote de tan  $\delta$  (Lucey, Munro, et al., 1998; Lucey, Teo, et al., 1998). Cela permet également d'obtenir l'amplitude de tan  $\delta$ . L'évolution des modules G' et G'' a également été analysé au cours du balayage en fréquence (Figure 35).

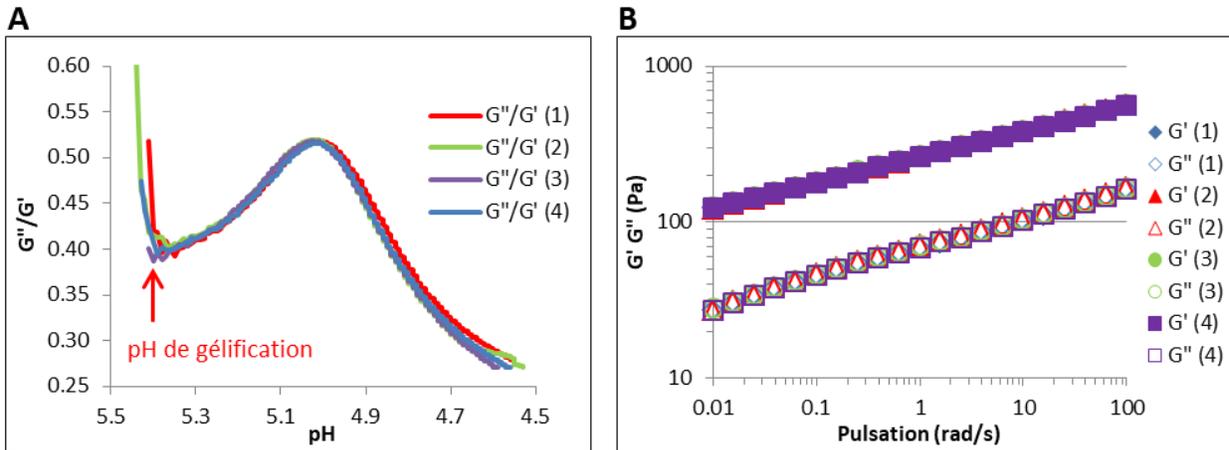


Figure 35 : Evolution de  $\tan \delta$  en fonction du pH (A) et balayage en fréquence (B) de 4 gels acides maigres témoins à J0

La Figure 35A, met en évidence la répétabilité des résultats obtenue sur 4 laits témoins analysés à J0. Pour ces laits témoins, on obtient un pH de gélification autour de  $5,4 \pm 0,03$  avec une amplitude de  $\tan \delta$  de 0,52. Cette valeur est très inférieure à celle du lait non traité thermiquement (0,78) témoignant d'une meilleure structuration du réseau protéique suite au traitement thermique. Sur la Figure 35B sont représentés les spectres mécaniques des 4 échantillons témoins acidifiés à J0. Les balayages en fréquence sont typiques d'un gel acide laitier. En effet, le module élastique est toujours supérieur au module dissipatif et ceux-ci augmentent de façon linéaire avec l'augmentation de la fréquence en représentation log-log (Steventon, Parkinson, Fryer, & Bottomley, 1990). Les pentes des modules  $G'$  obtenus à partir de la courbe de tendance en puissance des balayages en fréquence sont toujours situées autour de 0,165 ce qui est en accord avec la littérature. En effet, des valeurs comprises entre 0,13 et 0,16 ont été rapportées pour des gels acides obtenus avec de la GDL (Lucey, van Vliet, Grolle, Geurts, & Walstra, 1997; Lucey et al., 1997) ou par fermentation à 30 ou 42 °C (Lucey, Tamehana, Singh, & Munro, 1998). Les valeurs obtenues pour les gels après traitement thermique du lait sont également nettement inférieures à celle obtenue pour le gel réalisé sans traitement thermique du lait (0,186), ce qui montre que les systèmes formés suite à un traitement thermique sont plus structurés.

La répétabilité observée ainsi que l'accord des résultats obtenus avec la bibliographie permettent donc de valider notre protocole expérimental. Nous avons également mis en évidence que le temps de réhydratation de la poudre de lait ne semble pas impacter les résultats, dans la suite du travail, les analyses seront réalisées à J1 pour des raisons pratiques. En effet, l'ajout de protéines sériques natives nécessite un temps de réhydratation de la poudre de WPI plus important. En revanche, nous avons préféré tester l'influence du moment de l'ajout des agrégats fractals (J0 ou J1) pour plus de rigueur.

## V.2- Ajout de protéines sériques natives

L'effet de l'ajout de protéines sériques natives (PS) à différentes concentrations sur la texture et les propriétés des gels acides maigres a été analysé. Pour commencer, des analyses ont été réalisées sur des laits contenant des PS natives mais n'ayant subi aucun traitement thermique. Puis, de 0,2 à 1% de PS natives ont été ajoutés au lait écrémé le jour de sa fabrication pour permettre une bonne dispersion de la poudre de protéines et le traitement thermique a toujours été réalisé le jour suivant, ainsi que leur acidification.

### V.2.1- Propriétés rhéologiques des gels acides maigres avec ajout de PS

#### V.2.1.1- Gels acides maigres avec ajout de PS et sans traitement thermique

Pour les laits avec ajout de PS natives sans traitement thermique, deux essais ont été réalisés avec des concentrations de 0,2 et 0,6% de PS ajoutées (Tableau XII).

**Tableau XII** : Mesures rhéologiques et de pH d'un gel acide maigre laitier témoin et de gels acides maigres laitiers avec ajout de 0,2 et 0,6% de PS sans traitement thermique

Echantillon	Temps gélification	pH gélification	Amplitude $\tan \delta$	G' max (Pa)	Pente G' (BF)
<i>Témoin non traité</i>	91 min	5,07	0,78	33	0,186
0,2% PS (NT)	90 min	5,08	0,77	30	0,192
0,6% PS (NT)	91,3 min	5,08	0,73	22	0,192

Comme on peut le voir dans le tableau, le pH et le temps de gélification sont très proches de ceux obtenus pour le témoin non traité thermiquement. Cela montre bien que les protéines sériques non dénaturées n'ont pas d'impact sur la gélification même à 0,6% de PS. Une augmentation de leur concentration à l'état natif n'entraîne pas de modification de la gélification car les PS sont solubles dans une gamme de pH allant de 7 à 4,6 et elles sont également peu hydrophobes, par conséquent, elles n'interagissent pas avec les micelles de caséines.

Ensuite, si l'on regarde les autres données obtenues, on remarque que le module élastique G' en fin de cinétique d'acidification est très légèrement inférieur au témoin non traité thermiquement pour 0,6% de PS. Lucey et al. (1999) avaient déjà montré que l'addition dans le lait de concentré de protéines de lactosérum non chauffé peut provoquer une légère réduction du module G', ce qui signifie que les protéines natives ne renforcent pas le réseau protéique. De plus, dans ces conditions, les valeurs de pentes des balayages en fréquence sont plus élevées pour les systèmes contenant 0,2 et 0,6% de protéines sériques natives par rapport au témoin. Cette augmentation semble indiquer que le réseau

protéique est moins structuré lorsque l'on ajoute des PS natives. La formation du réseau protéique serait donc légèrement perturbée par cet ajout de protéines supplémentaires dans un lait qui n'est pas traité thermiquement.

### V.2.1.2- Gels acides maigres avec ajout de PS et traitement thermique

Des expériences ont été réalisées sur des laits avec ajout de 0,2 à 1% de PS natives et avec la réalisation d'un traitement thermique de 11 min à 90 °C. Les cinétiques de l'évolution de  $G'$  et  $G''$  en fonction du temps pour les systèmes acidifiés sont présentées sur la Figure 36.

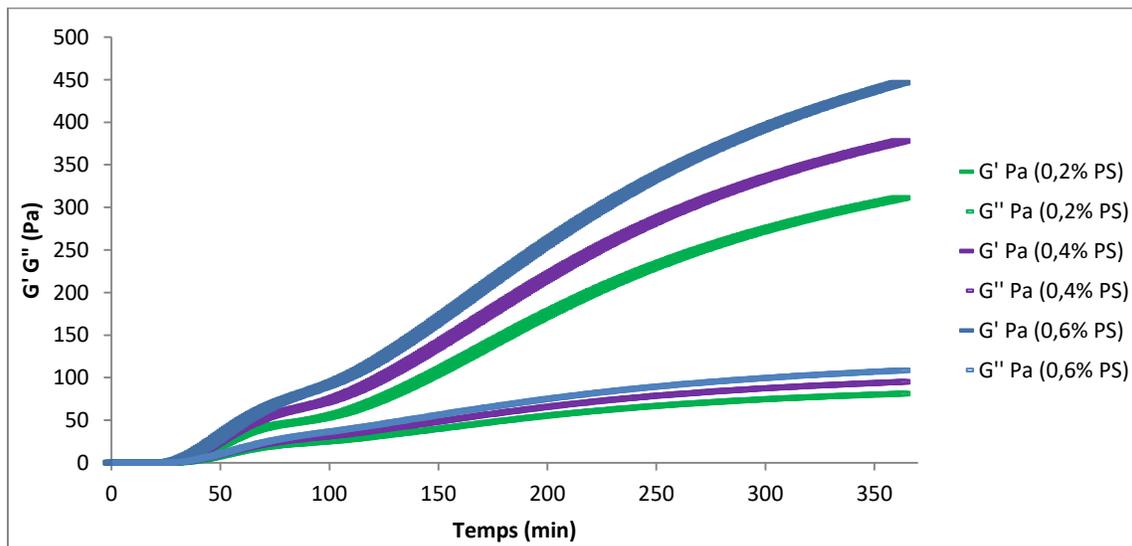


Figure 36 : Evolution des modules  $G'$  et  $G''$  lors de l'acidification à 40 °C de gels acides maigres avec l'ajout de 0,2 à 0,6% PS

Les cinétiques de l'évolution de  $G'$  et  $G''$  montrent une allure globale similaire à celle de l'acidification des laits témoins. Comme précédemment, après un court temps de latence, le module  $G'$  est supérieur au module  $G''$ . En revanche, l'augmentation du module élastique est légèrement plus rapide et la valeur de  $G'$  atteinte en fin de cinétique d'acidification est plus élevée et elle augmente lorsqu'on augmente la quantité de protéines sériques natives ajoutée dans le lait. Au cours des cinétiques d'acidification, comme avec les laits témoins, on retrouve également l'épaule caractéristique de la dissociation du phosphate de calcium colloïdal (Dalgleish & Law, 1988, 1989).

Les valeurs caractéristiques (moyennes et écart-types réalisés sur 3 échantillons) obtenues pour les systèmes sans matière grasse avec l'ajout de différentes concentrations de protéines sériques natives ont été regroupées dans le Tableau XIII et pour rappel, les valeurs moyennes obtenues pour les laits témoins à J1 ont également été indiquées.

## Chapitre 5 : Texturation des gels acides maigres par ajout d'agrégats protéiques

**Tableau XIII** : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers avec ajout de différentes concentrations de protéines sériques natives avant le traitement thermique

Echantillon		Temps gélification	pH gélification	Amplitude tan $\delta$	G' max (Pa)	Pente G' (BF)
<i>Moyenne témoin J1</i>		<i>29,4 min</i>	<i>5,43</i>	<i>0,52</i>	<i>229</i>	<i>0,164</i>
0,2% PS	Moyenne	<b>24,7 min</b>	<b>5,49</b>	<b>0,47</b>	<b>318</b>	<b>0,158</b>
	Ecart-type	0,9	0,02	0,01	6	0,001
0,4% PS	Moyenne	<b>24,4 min</b>	<b>5,50</b>	<b>0,44</b>	<b>350</b>	<b>0,155</b>
	Ecart-type	1,8	0,03	0,01	26	0,001
0,6% PS	Moyenne	<b>22,4 min</b>	<b>5,54</b>	<b>0,41</b>	<b>429</b>	<b>0,150</b>
	Ecart-type	0,3	0,02	0,01	15	0,001
1% PS	Moyenne	<b>22,4 min</b>	<b>5,55</b>	<b>0,37</b>	<b>547</b>	<b>0,142</b>
	Ecart-type	0,2	0,01	0,01	24	0,003

L'ensemble des résultats montre qu'il y a une diminution du temps de gélification et une augmentation du pH de gélification par rapport au gel de lait témoin pour tous les échantillons avec l'ajout de protéines sériques natives. De plus, le temps de gélification diminue légèrement avec l'ajout des plus fortes concentrations de PS (0,6 et 1%), ce qui est en accord avec les résultats de la littérature. Suite au traitement thermique en présence de PS natives ajoutées, davantage d'agrégats thermo-induits sont produits. Or, il est connu qu'une teneur plus élevée en agrégats protéiques entraîne une gélification plus rapide à un pH plus élevé (Lucey & Singh, 1998). Ces résultats étaient déjà observés dans le cas des gels acides maigres témoins ; en effet, la dénaturation des protéines sériques dans le lait témoin suite au traitement thermique permet d'obtenir des gels avec des modules plus élevés que ceux du gel du lait témoin non traité thermiquement (Tableau XI). Les protéines sériques dénaturées plus nombreuses dans les laits avec ajout de PS peuvent avoir un impact encore plus marqué sur la déstabilisation des micelles de caséines ce qui permet d'expliquer l'augmentation du pH de gélification et la diminution du temps de gélification par rapport au témoin. Un plus grand nombre d'interactions entre les protéines sériques dénaturées qui forment des agrégats et les caséines micellaires peut ainsi survenir (Lucey & Singh, 1998). De plus, les protéines sériques dénaturées associées aux micelles de caséines peuvent agir en tant que matériaux de liaison et ainsi augmenter encore le nombre d'interactions.

La Figure 37 présente l'évolution du module conservatif final (G') obtenu en fin de cinétique d'acidification à pH 4,6 pour des concentrations croissantes de PS (de 0 à 1%).

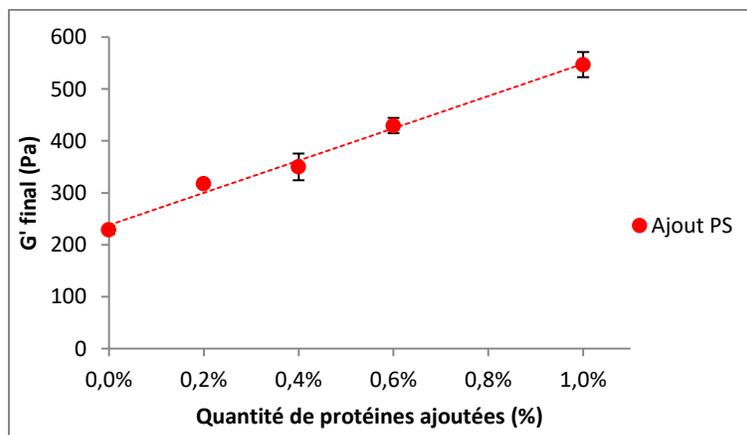


Figure 37 : Evolution du  $G'$  final en fonction de la quantité de protéines sériques ajoutée (fréquence de 1 rad/s)

Comme on peut le voir sur la Figure 37,  $G'$  augmente linéairement avec la concentration en protéines sériques ajoutées. Ce type de résultats avait déjà été mis en évidence ; Andoyo et al. (2014) ont montré que l'augmentation de la proportion d'agrégats de protéines sériques permet d'augmenter considérablement le module élastique d'un gel acide, en raison d'un plus grand nombre d'interactions fortes entre les micelles de caséines et les agrégats. Les auteurs suggèrent que cet effet est dû à un recouvrement partiel de la surface des micelles par des agrégats qui favorise des interactions fortes dans le gel. Les agrégats agissent comme des ponts entre les micelles de caséines, le nombre et la force des liaisons augmentent, ce qui renforce le réseau de gel acide et accélère la gélification (Andoyo et al., 2015; Famelart et al., 2011; Lucey & Singh, 1998). Suite au traitement thermique, les PS dénaturées peuvent participer de façon active à la formation du gel laitier et le renforcer (Lucey & Singh, 1998).

Sur la Figure 38 sont présentés l'évolution de  $\tan \delta$  en fonction du pH ainsi que les balayages en fréquence des systèmes analysés avec l'ajout de PS.

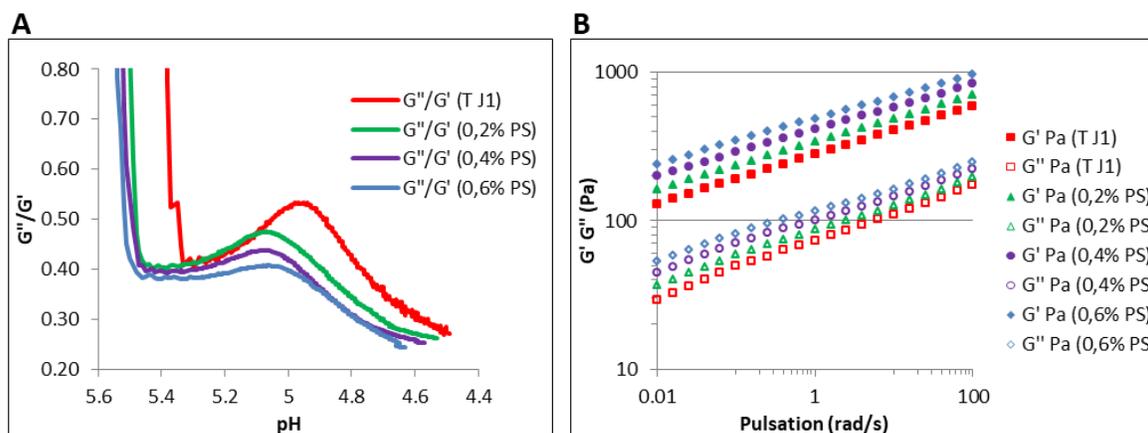


Figure 38 : Evolution de  $\tan \delta$  en fonction du pH (A) et balayage en fréquence (B) pour un gel acide de lait témoin à J1 et des échantillons avec de 0,2 à 0,6% PS ajouté avant le traitement thermique

L'évolution de  $\tan \delta$  en fonction du pH, montre une allure similaire pour tous les systèmes présentés ce qui confirme bien que la structuration des gels est comparable, en revanche on observe une diminution de l'amplitude du maximum de  $\tan \delta$  et un décalage du pH de gélification à une valeur plus élevée par rapport au témoin (en rouge). Cela montre que les systèmes avec ajout de PS gélifient à un pH plus élevé et la diminution de l'amplitude indique une structuration plus importante des gels avec l'augmentation de la concentration en protéines sériques.

Les balayages en fréquence des systèmes avec ajout de PS montrent une allure typique de gels acides laitiers comme déjà observée pour le lait témoin :  $G'$  est toujours supérieur à  $G''$  et les deux valeurs augmentent de façon linéaire (Steventon et al., 1990). En revanche, une augmentation des valeurs des modules avec l'ajout d'une quantité croissante de protéines sériques natives est observée, montrant que l'augmentation de la concentration en PS entraîne une augmentation de la fermeté des gels laitiers et une structuration plus importante. Ce renforcement du réseau est également mis en évidence dans nos résultats (Tableau XIII) avec la diminution de la pente des balayages en fréquence lorsque la quantité de protéines sériques augmente. Une pente plus faible signifie l'obtention d'un réseau sensiblement plus fort et davantage structuré.

### V.2.2- Synérèse des gels acides maigres avec ajout de PS

La synérèse, qui correspond à la séparation du lactosérum du gel acide, est un défaut commun dans les produits laitiers fermentés (Lucey & Singh, 1998). Les gels contenant de 0,2 à 0,6% de PS réalisés à partir de laits traités thermiquement 11 min à 90 °C et acidifiés ont été conservés jusqu'à 14 jours à 4 °C et la synérèse de ces gels a été analysée au cours du temps de stockage après 1 jour, 7 jours et 14 jours. Les résultats ont été comparés avec ceux des gels acides réalisés à partir de lait témoin, également traité thermiquement.

La Figure 39 représente l'évolution du pourcentage de sérum extrait par synérèse accélérée en fonction du temps de stockage, et selon la concentration de PS ajoutées. L'augmentation de la concentration en protéines sériques ajoutée avant le traitement thermique du lait, entraîne une légère diminution de la synérèse des gels acides maigres, mais sans variation significative avec le temps de stockage (mesure réalisée à J1, J7 et J14). Le renforcement du réseau protéique dû aux interactions établies entre les PS dénaturées et les caséines micellaires permet de freiner légèrement le relargage du lactosérum. Il a déjà été mis en évidence dans la littérature que l'augmentation de la concentration en protéines laitières peut réduire la synérèse (Delikanli & Ozcan, 2017; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006).

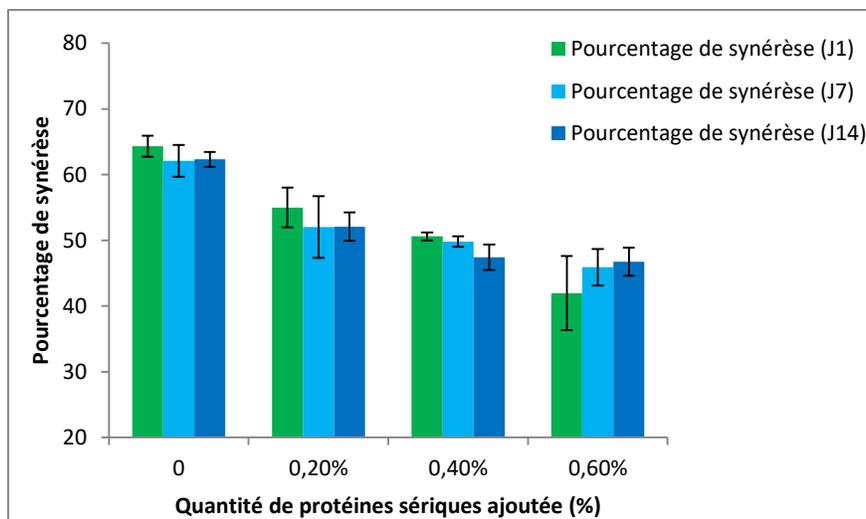


Figure 39 : Analyse du pourcentage de synérèse en fonction du temps de stockage à 4 °C et de la quantité de protéines sériques ajoutées

### V.2.2- Microstructure des gels acides maigres avec ajout de PS

La microstructure de gels acides réalisés à partir de lait témoin traité thermiquement et des gels contenant 0,2 ; 0,4 et 0,6% de PS ajoutées a été observée par microscopie confocale après 6 h à 40 °C, afin de relier leur structure finale à leurs propriétés rhéologiques. La Figure 40 présente une image de chaque échantillon à deux grossissements : x20 et x40.

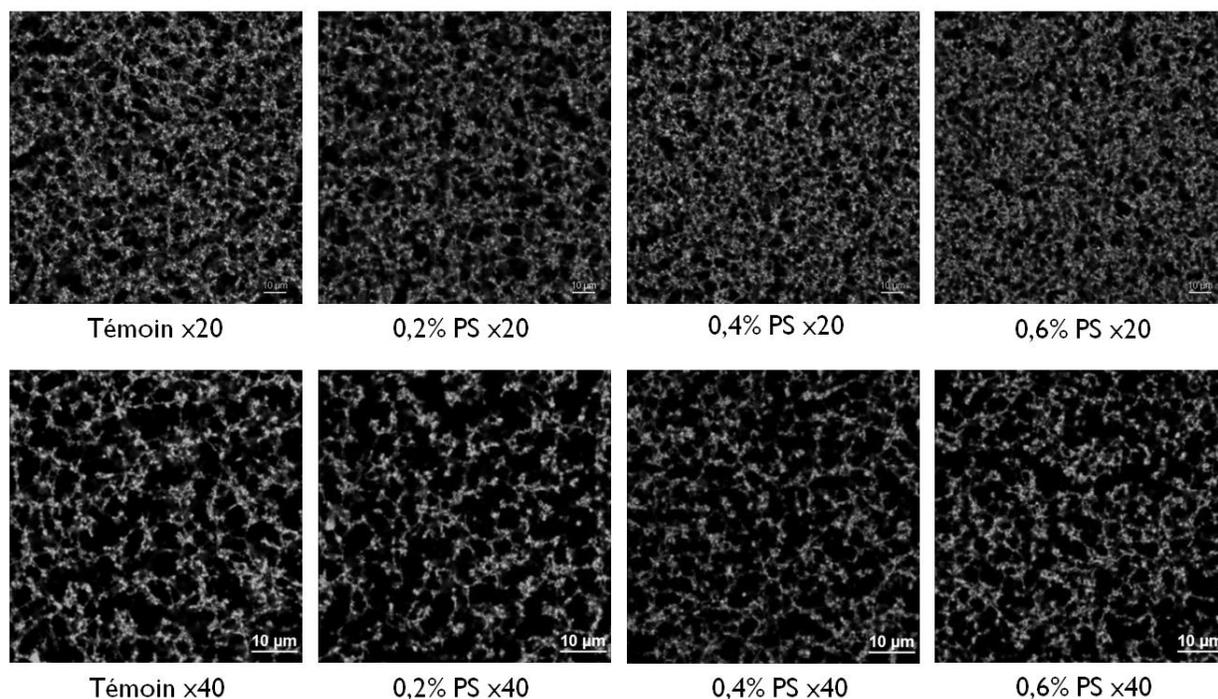


Figure 40 : Photographies en microscopie confocale de gels acides maigres (témoin, 0,2% ; 0,4% et 0,6% PS) x20 et x40 zoom 5

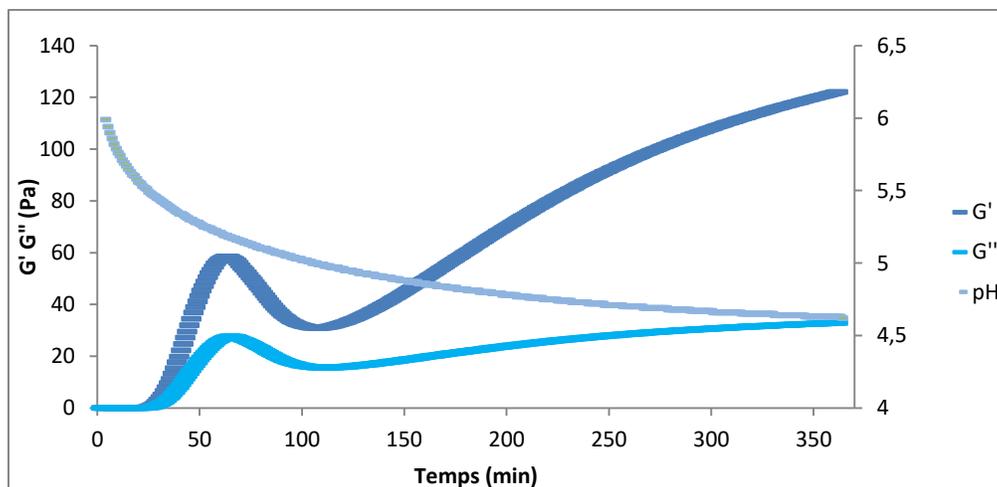
Les microstructures des réseaux protéiques très similaires sont obtenus pour tous les échantillons quel que soit le grossissement utilisé. On observe une légère densification du réseau avec l'augmentation de la concentration en protéines sériques ajoutées avant le traitement thermique. La taille des zones sombres, correspondant aux poches de sérum, diminue lorsque la concentration en PS augmente. Andoyo et al. (2014) ont également observé que la microstructure de gels contenant une concentration plus importante en matériel protéique présentait des pores plus petits, ce qui conduit à une répartition plus homogène de la matière protéique dans le réseau et donne une meilleure structuration de celui-ci. Ceci empêche aussi un relargage important du lactosérum (Andoyo et al., 2015, 2014).

Ces observations sont cohérentes avec l'évolution observée en rhéologie et les analyses de la synérèse ; en effet, les modules conservatifs des gels acides atteignent des valeurs plus élevées à de plus hautes concentrations en PS, ce qui indique un réseau plus structuré et plus dense avec une meilleure rétention du lactosérum.

### V.3- Ajout d'agrégats fibrillaires

Comme décrit précédemment, les agrégats fibrillaires sont produits à pH 2 et ils doivent être ajoutés dans le lait, dont le pH est d'environ 6,7. Plusieurs essais ont été effectués pour pouvoir les utiliser dans les systèmes laitiers.

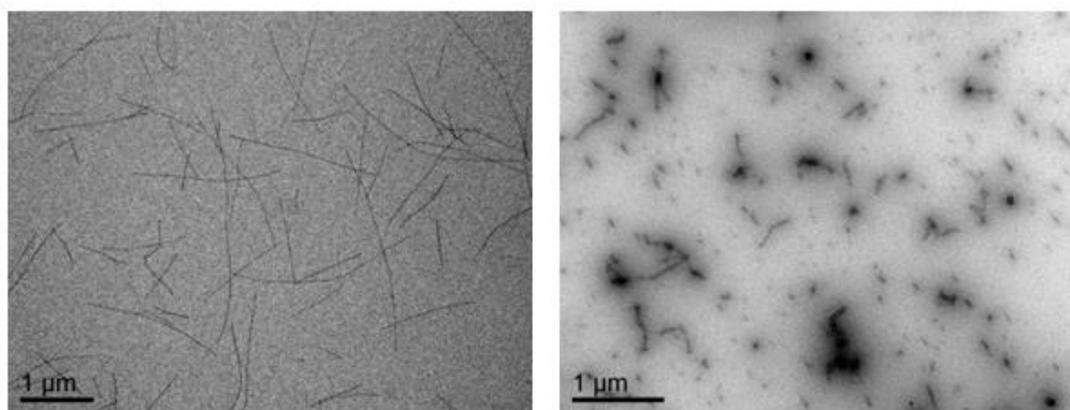
Dans un premier temps, la dispersion d'agrégats à pH 2 a été ajoutée directement dans le lait, mais la chute brutale du pH localement conduit à une gélification locale et inhomogène du mélange. Le système lait + fibrilles a alors été laissé une nuit sous agitation magnétique à 4 °C, puis le pH du lait a été ajusté à 6,7 par l'ajout d'hydroxyde de sodium (NaOH) 6 M. Le lait après l'ajustement du pH avait un aspect classique, c'est-à-dire un aspect liquide sans précipités visibles. La GDL a ensuite été ajoutée et des analyses rhéologiques ont été réalisées. Les modules augmentent lors de l'acidification, mais pour un pH inférieur à 5,2, c'est-à-dire au moment de la dissociation du phosphate de calcium colloïdal, ils chutent fortement avant de recommencer à croître pour des pH inférieurs à 5 mais n'atteignent que des valeurs faibles, comme on peut le voir sur la Figure 41. Pour un lait avec l'ajout de 0,6% d'agrégats fibrillaires, les  $G'$  montent plus haut en début de cinétique que pour le lait témoin : on atteint environ 60 Pa alors qu'avec le témoin l'épaule est à environ 25 Pa. En revanche, le  $G'$  final est de 120 Pa au lieu de 240 Pa pour le témoin. La chute brutale des  $G'$  signifierait une synérèse plus importante que pour les laits témoins lors de la formation du gel. Les agrégats fibrillaires provoquent donc une synérèse trop importante des gels et ils ne fonctionnent pas pour la structuration du gel.



**Figure 41** : Evolution des modules  $G'$  et  $G''$  et du pH lors de l'acidification à 40 °C d'un gel acide maigre contenant 0,6% d'agrégats fibrillaires

Dans un second temps, nous avons voulu dialyser la dispersion d'agrégats fibrillaires lentement contre du lait (pH 6,7) sous agitation magnétique, pour réaliser une remontée progressive et plus douce du pH, mais la dispersion d'agrégats fibrillaires gélifiait rapidement dans les boudins de dialyse et n'était donc plus utilisable dans le lait.

Nous avons également tenté de remonter le pH de la dispersion d'agrégats fibrillaires en y ajoutant de la soude gouttes à gouttes, mais la dispersion d'agrégats gélifiait très rapidement à partir d'un pH d'environ 5, puis redevenait liquide au-dessus du point isoélectrique des protéines sériques. La dispersion liquide d'agrégats obtenue (pH 6,7) a été observée en MET. La Figure 42 montre les longues fibrilles obtenues au pH de fabrication (pH 2). En revanche à pH 6,7, sur la seconde photographie, la déstructuration de ces agrégats fibrillaires due à leur neutralisation est mise en évidence par la présence de nombreux petits fragments de fibrilles.



**Figure 42** : Agrégats fibrillaires analysés en microscopie électronique en transmission à pH 2 (gauche) et pH 6,7 (droite)

Nous avons donc pris la décision de ne pas poursuivre nos études avec ce type d'agrégats car leur spécificité rend leur utilisation impossible dans le lait. De plus, les recherches bibliographiques ont montré que la matière protéique a un taux de conversion limité en fibrilles, car l'ensemble des peptides produits au cours de l'hydrolyse de la  $\beta$ -lactoglobuline n'est pas impliqué dans la formation de fibrilles (Akkermans, Venema, et al., 2008). Elles sont également très sensibles à l'homogénéisation qui a tendance à les déstructurer et rend leur utilisation compliquée dans les systèmes contenant de la matière grasse (Loiseleux, 2017).

### V.4- Ajout d'agrégats fractals

Le même type de caractérisations que pour l'ajout de PS a été réalisé sur des systèmes maigres auxquels des agrégats fractals ont été ajoutés.

Le diamètre hydrodynamique des agrégats fractals a été déterminé par diffusion dynamique de la lumière. Les distributions de taille des suspensions d'agrégats sont présentées dans la

Figure 43. Deux suspensions d'agrégats ont été préparées à partir de deux lots de poudre de protéines sériques (cf. : IV.1.1). Les agrégats fractals obtenus présentent une taille moyenne légèrement différente : suspension 1 = **200 nm** et suspension 2 = **188 nm**. Cette différence peut être expliquée par le fait que les 2 lots de poudre n'ont pas exactement la même composition protéique (cf : III.1.2). En revanche, pour des préparations de suspensions d'agrégats fractals réalisées avec le même lot de poudre, la taille moyenne des agrégats est très reproductible.

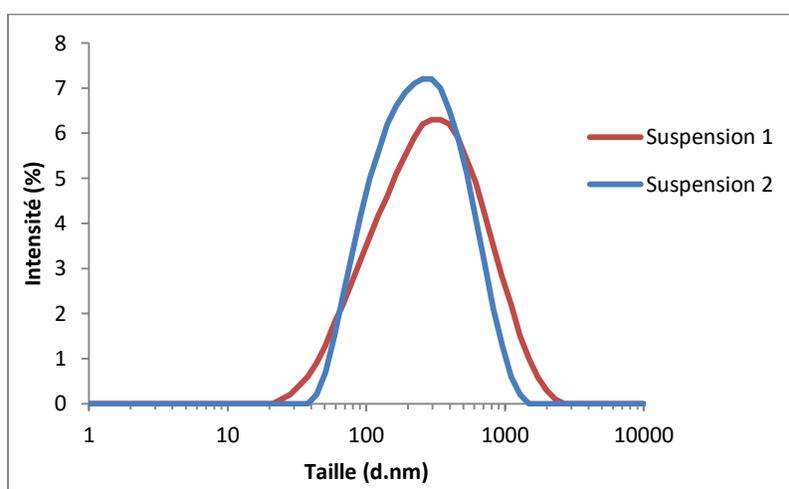


Figure 43 : Dispersion de tailles en intensité pour deux suspensions d'agrégats fractals (50 g/L, pH 7, 45 mM de NaCl)

Différentes analyses ont été réalisées en faisant varier la concentration d'agrégats fractals ajoutée provenant des suspensions 1 ou 2 appelées : S1 et S2.

### V.4.1- Propriétés rhéologiques des gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals

#### V.4.1.1- Gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals (S1) sans traitement thermique

L'ajout de 0,6% d'agrégats fractals S1 dans du lait non traité thermiquement a tout d'abord été testé, comme pour l'étude des laits témoins et des laits supplémentés en PS (Tableau XIV).

**Tableau XIV** : Mesures rhéologiques et de pH d'un gel acide maigre laitier avec ajout de 0,6% d'agrégats fractals (S1) sans traitement thermique

Echantillon	Temps gélification	pH gélification	Amplitude $\tan \delta$	G' max (Pa)	Pente G' (BF)
Témoin non traité	91 min	5,07	0,78	33	0,186
0,6% fractals (NT)	32 min	5,46	0,45	144	0,166

Les résultats ont montré une forte augmentation du module conservatif en présence d'agrégats fractals par rapport au gel réalisé avec du lait témoin non traité thermiquement (33 Pa) ou avec l'ajout de 0,6% de PS (22 Pa). Cela signifie que les agrégats fractals qui sont composés de protéines sériques dénaturées et agrégés sont capables d'interagir avec le réseau de caséines se formant au cours de l'acidification du lait. De plus, par rapport au témoin non traité thermiquement, le temps de gélification est réduit et le pH de gélification augmente, ce qui montre que les agrégats fractals préformés participent à la structuration de réseau protéique au cours de l'acidification. Enfin, la pente du balayage en fréquence pour le système non traité thermiquement contenant 0,6% d'agrégats fractals est nettement inférieure à la pente obtenue pour le gel témoin, ce qui confirme que le système est plus structuré.

#### V.4.1.2- Gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals (S1) et traitement thermique

Pour les gels acides maigres traité thermiquement et contenant des agrégats fractals plusieurs séries d'expériences ont été réalisées. La suspension 1 contenant des agrégats fractals plus grands et plus polydisperses a été utilisée à des concentrations de 0,2 à 0,6%.

Pour la préparation de gels acides laitiers différents protocoles ont été réalisés, la suspension d'agrégats S1 a été ajoutée au lait à différents moments : soit avant le traitement thermique à J0 (essai a), c'est-à-dire le jour de la reconstitution du lait ou soit à J1, après avoir laissé le lait une nuit à 4 °C (essai b). La suspension S1 a également été ajoutée à J0 après le traitement thermique, c'est-à-dire après que le lait ait été traité thermiquement à 90 °C puis refroidi à 40 °C (essai c) et enfin dans les mêmes conditions mais à J1 (essai d). Les différents protocoles réalisés sont regroupés dans le Tableau XV.

## Chapitre 5 : Texturation des gels acides maigres par ajout d'agrégats protéiques

**Tableau XV** : Récapitulatif des modalités des essais réalisés avec l'ajout d'agrégats de la suspension 1 et nom des essais

Modalités des essais	Nom de l'essai
Lait reconstitué → ajout S1 à J0 → puis traitement thermique (J0)	essai a
Lait reconstitué stockage à 4 °C → puis ajout S1 (J1) → traitement thermique (J1)	essai b
Lait reconstitué → puis traitement thermique (J0) → ajout S1 après (J0)	essai c
Lait reconstitué stockage à 4 °C → puis traitement thermique (J1) → ajout S1 (J1)	essai d

Le Tableau XVI présente l'ensemble des données rhéologiques obtenues avec l'ajout des agrégats fractals provenant de la suspension S1 utilisée à J0 et J1 dans les gels acides laitiers maigres avant ou après le traitement thermique (essai a, b, c et d).

**Tableau XVI** : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers avec ajout de différentes concentrations d'agrégats fractals (S1) avant et après le traitement thermique

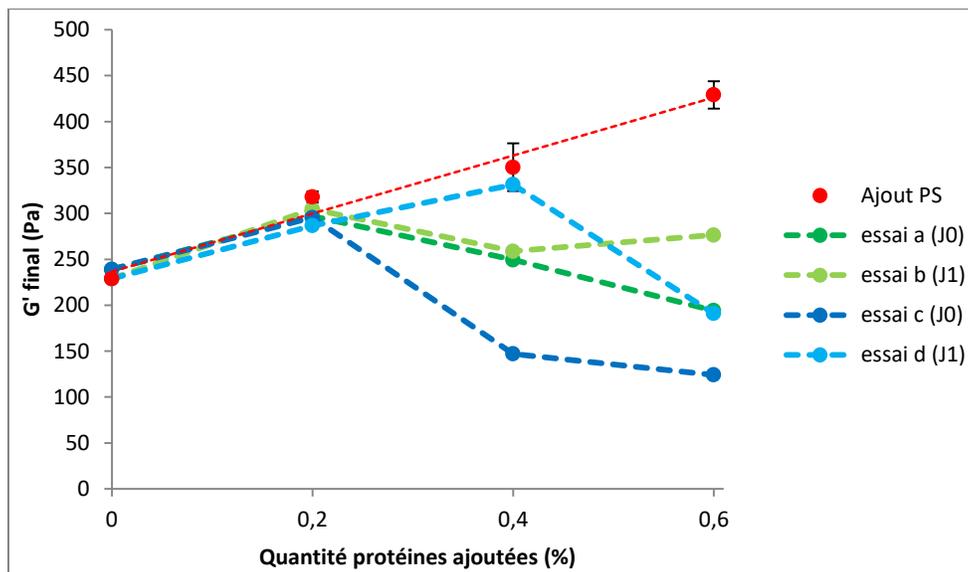
Echantillon		Temps gélification	pH gélification	Amplitude tan $\delta$	G' max (Pa)	Pente G' (BF)
<i>Moyenne témoin J1</i>						
		<i>29,4 min</i>	<i>5,43</i>	<i>0,52</i>	<i>229</i>	<i>0,164</i>
<b>Ajout des agrégats fractals avant le traitement thermique (essai a et b)</b>						
<b>0,2% Fractals</b>	J0 (a)	24 min	5,42	0,44	297	0,15
	J1 (b)	25 min	5,52	0,43	305	0,152
<b>0,4% Fractals</b>	J0 (a)	22,5 min	5,48	0,39	250	0,144
	J1 (b)	20 min	5,59	0,37	259	0,14
<b>0,6% Fractals</b>	J0 (a)	21 min	5,53	0,35	194	0,14
	J1 (b)	18 min	5,63	0,35	277	0,14
<b>Ajout des agrégats fractals après le traitement thermique (essai c et d)</b>						
<b>0,2% Fractals</b>	J0 (c)	26 min	5,48	0,47	296	0,158
	J1 (d)	23 min	5,51	0,46	287	0,158
<b>0,4% Fractals</b>	J0 (c)	26 min	5,52	0,44	147	0,156
	J1 (d)	19 min	5,60	0,42	331	0,153
<b>0,6% Fractals</b>	J0 (c)	21 min	5,56	0,40	124	0,149
	J1 (d)	19 min	5,59	0,40	191	0,152

Comme avec l'ajout de PS, une diminution du temps de gélification par rapport au témoin (29,4 min) et une augmentation du pH de gélification en présence d'agrégats fractals (témoin = 5,43) sont observées pour tous les essais réalisés avec l'ajout de la suspension S1.

De même, le temps de gélification a tendance à diminuer avec une concentration croissante en agrégats fractals et le pH de gélification a tendance à augmenter pour l'ensemble des conditions testées. Le temps de gélification diminue donc, que l'ajout de protéines soit réalisé par addition de PS avant le traitement

thermique, ou par addition d'agrégats fractals préformés composés de protéines dénaturées. Les agrégats fractals comme les protéines sériques dénaturées et agrégées par le traitement thermique semblent créer des connexions supplémentaires qui accélèrent la formation du réseau et entraînent une gélification plus rapide des systèmes laitiers.

La Figure 44 présente l'évolution du module conservatif final obtenu en fin de cinétique d'acidification à pH 4,6 pour des concentrations croissantes d'agrégats fractals (de 0 à 0,6%) ajoutés avant ou après le traitement thermique à J0 et J1 (essai a, b, c et d).



**Figure 44 :** Evolution du  $G'$  final en fonction de la quantité d'agrégats fractals (S1) ajoutée et des conditions expérimentales : jour de mesure et ajout des agrégats avant ou après le traitement thermique

Comme on peut le voir sur la Figure 44 et dans le Tableau XVI, on obtient une évolution différente du  $G'$  final avec l'augmentation de la concentration en agrégats fractals par rapport à l'ajout de PS. Le module  $G'$  augmente de la même façon avec l'ajout de 0,2% d'agrégats fractals pour toutes les conditions testées (résultats légèrement inférieurs à ceux obtenus avec l'ajout de PS). En revanche, les résultats sont très variables avec 0,4 et 0,6% d'agrégats selon les conditions testées (jour de mesure et moment de l'ajout des agrégats).

De plus, les différentes conditions testées modifient les tendances obtenues. Le module  $G'$  est toujours inférieur aux résultats obtenus avec l'ajout de protéines sériques natives, ce qui signifie que l'utilisation d'agrégats fractals préformés ne permet pas de renforcer la structuration de façon plus importante que l'ajout de PS avant traitement thermique dans le cas de gels acides maigres. Ce constat peut être dû à la

polydispersité de la suspension d'agrégats fractals ou à l'influence du traitement thermique sur la fonctionnalité des agrégats. En revanche, en présence de 0,2% d'agrégats fractals ajoutés dans toutes les conditions, les gels obtenus sont plus forts que les gels acides maigres témoins. Les résultats sont également différents selon le jour de mesure avec généralement de meilleurs résultats à J1, mais avec des résultats très variables et non reproduits plusieurs fois.

Les valeurs des pentes des balayages en fréquence ont cependant tendance à diminuer avec l'augmentation de la concentration d'agrégats fractals, comme c'était le cas pour l'ajout de PS et cela pour toutes les conditions testées. De plus, les valeurs d'amplitude de  $\tan \delta$  obtenues avec l'ajout d'agrégats fractals sont toujours inférieures à celles obtenues avec l'ajout de PS, et ces valeurs ont tendance à diminuer avec l'augmentation de la concentration en agrégats pour l'ensemble des conditions testées (jour de mesure et moment de l'ajout des agrégats fractals).

En revanche, l'augmentation de la concentration en agrégats fractals n'entraîne pas nécessairement une augmentation de la valeur finale de  $G'$  avec 0,4 et 0,6% d'agrégats fractals. Pourtant, les pentes des balayages en fréquence et les valeurs d'amplitude de  $\tan \delta$  diminuent avec l'augmentation de la concentration en agrégats, ce qui semble en contradiction avec les valeurs finales des modules  $G'$ . Cela signifierait un renforcement des systèmes lorsque la concentration d'agrégats fractals ajoutés augmente. Il est possible que l'ajout d'agrégats fractals modifie légèrement la structure du gel, établissant moins de connexions, mais plus pérennes. Enfin, on remarque que les valeurs obtenues pour ces deux paramètres lorsque l'on ajoute les agrégats avant le traitement thermique sont plus basses que celles obtenues avec l'ajout des agrégats après chauffage. Il n'y a donc pas d'intérêt pour la structure finale d'ajouter les agrégats fractals après le traitement thermique. C'est pourquoi, pour la suspension S2, les agrégats fractals ont été ajoutés uniquement avant le traitement thermique des systèmes laitiers.

### ***V.4.1.3- Gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals (S2) et traitement thermique***

La suspension S2 (composée d'agrégats moins polydispense que la première), pour laquelle le diamètre moyen des agrégats est situé autour de 188 nm, a été incorporée dans le lait pour la préparation de gels acides uniquement avant le traitement thermique à J0 ou à J1, c'est-à-dire dans les mêmes conditions que pour les essais a et b décrites précédemment. Le Tableau XVII présente l'ensemble des données rhéologiques obtenues dans ces conditions. Les analyses à J1 ont été répétées au minimum 2 fois pour vérifier leur reproductibilité.

**Tableau XVII** : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers avec ajout de différentes concentrations d'agrégats fractals (S2) avant le traitement thermique

Echantillon	Temps gélification	pH gélification	Amplitude $\tan \delta$	G' max (Pa)	Pente G' (BF)
<i>Moyenne témoin J1</i>	<i>29,4 min</i>	<i>5,43</i>	<i>0,52</i>	<i>229</i>	<i>0,164</i>
<b>0,2% Fractals (J0)</b>	30 min	5,41	0,45	282	0,154
<b>0,2% Fractals (J1)</b>	27 min	5,46	0,45	280	0,155
<b>0,2% Fractals (J1)</b>	27 min	5,47	0,45	257	0,154
<b>0,4% Fractals (J0)</b>	26 min	5,47	0,40	305	0,147
<b>0,4% Fractals (J1)</b>	28 min	5,46	0,41	311	0,150
<b>0,4% Fractals (J1)</b>	27,5 min	5,46	0,41	292	0,148
<b>0,6% Fractals (J0)</b>	24 min	5,52	0,37	355	0,143
<b>0,6% Fractals (J1)</b>	25 min	5,51	0,38	331	0,145
<b>0,6% Fractals (J1)</b>	26,7 min	5,49	0,37	273	0,141
<b>0,6% Fractals (J1)</b>	24,4 min	5,52	0,37	241	0,142
<b>0,6% Fractals (J1)</b>	23,7 min	5,54	0,37	264	0,144

Dans ces conditions, les résultats obtenus sont plus reproductibles que ceux obtenus avec la suspension S1. De plus, aucune variation majeure n'est observée entre les analyses réalisées à J0 et à J1.

Comme pour l'ajout de PS et de la première suspension d'agrégats fractals, on observe globalement une légère diminution du temps de gélification et une augmentation du pH de gélification par rapport au témoin lorsque la concentration en agrégats fractals augmente. Cependant, la diminution du temps de gélification est moins importante avec la seconde suspension d'agrégats ce qui révèle bien que la légère différence de distribution de taille des agrégats entre les deux suspensions entraîne des différences dans les résultats obtenus.

La Figure 45 présente l'évolution du module conservatif final (G') obtenu en fin de cinétique d'acidification à pH 4,6 pour des concentrations croissantes d'agrégats fractals de la suspension S2 (de 0 à 0,6%) ajoutés avant le traitement thermique à J0 et J1.

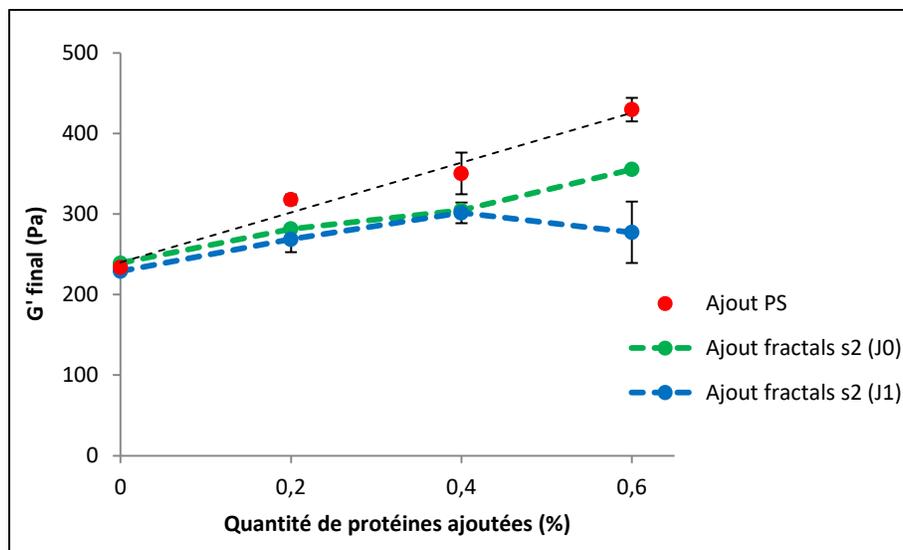


Figure 45 : Evolution du  $G'$  final en fonction de la quantité d'agrégats fractals (S2) ajoutée

Comme on peut le voir sur la Figure 45 et dans le Tableau XVII, une évolution différente du  $G'$  final avec l'augmentation de la concentration en agrégats fractals par rapport à l'ajout de PS est observée. En effet, les résultats obtenus en présence d'agrégats fractals issus de cette seconde suspension sont également toujours inférieurs à ceux obtenus avec l'ajout de protéines sériques natives. Aucune amélioration de la fermeté des gels acides sans matière grasse n'est donc obtenue avec l'ajout d'agrégats fractals (par rapport à l'ajout de PS avant le traitement thermique). En revanche, pour cette seconde suspension d'agrégats, on observe une augmentation du module conservatif avec 0,2% et 0,4% d'agrégats fractals. De plus, les résultats obtenus sont identiques à J0 et J1. Toutefois, les résultats obtenus avec 0,6% fractals sont plus variables notamment avec une diminution du module  $G'$  lorsque les agrégats sont ajoutés à J1.

En conclusion, dans les mêmes conditions expérimentales, des résultats variables selon la suspension d'agrégats utilisée sont obtenus, probablement à cause de la polydispersité de taille des agrégats.

De la même façon que pour les résultats obtenus en présence d'agrégats fractals S1, les amplitudes de  $\tan \delta$  et les pentes des balayages en fréquence diminuent avec une concentration croissante en agrégats fractals. Les valeurs obtenues sont moins importantes en présence d'agrégats fractals qu'avec l'ajout de PS, comme observé avec la première suspension d'agrégats. En revanche, l'ajout d'agrégats S2 donne des valeurs de  $\tan \delta$  et des pentes des balayages en fréquence supérieures à l'ajout d'agrégats S1. Cela signifie qu'avec les agrégats de taille légèrement inférieure et moins polydisperses (S2), les systèmes seraient plus fermes, mais que leur structuration serait légèrement moins fortes.

### V.4.2- Synérèse des gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals

Seuls les résultats de la synérèse des gels acides contenant de 0,2 à 0,6% d'agrégats fractals S2, ajoutés avant le traitement thermique ont été analysés, car les résultats obtenus en rhéologie étaient plus reproductibles, et les résultats ont été comparés avec les gels acides témoins.

La Figure 46 représente l'évolution du pourcentage de synérèse dans le temps en fonction de la concentration d'agrégats fractals ajoutés. L'augmentation de la concentration en agrégats fractals entraîne une légère diminution de la synérèse des gels acides maigres (moins marquée que pour l'ajout de protéines sériques natives), mais sans variation majeure dans le temps (analyse à J1, J7 et J14).

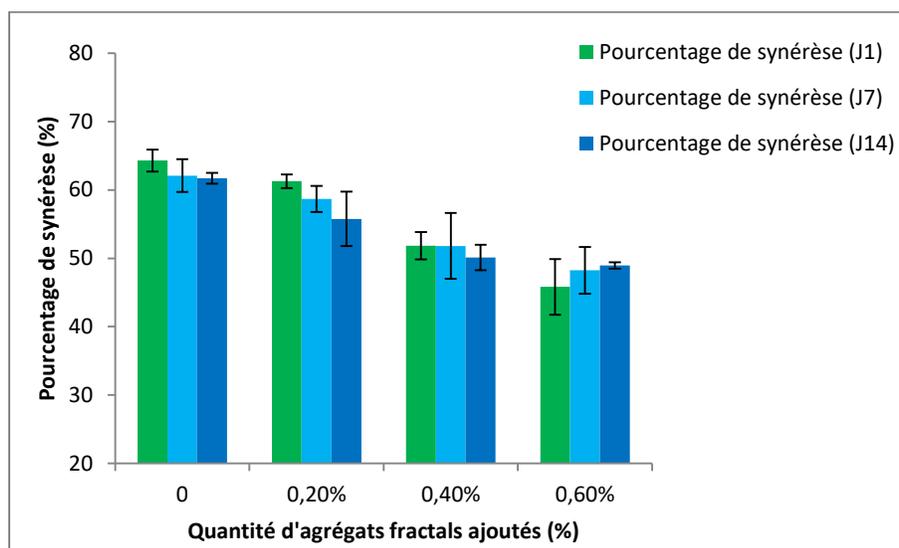
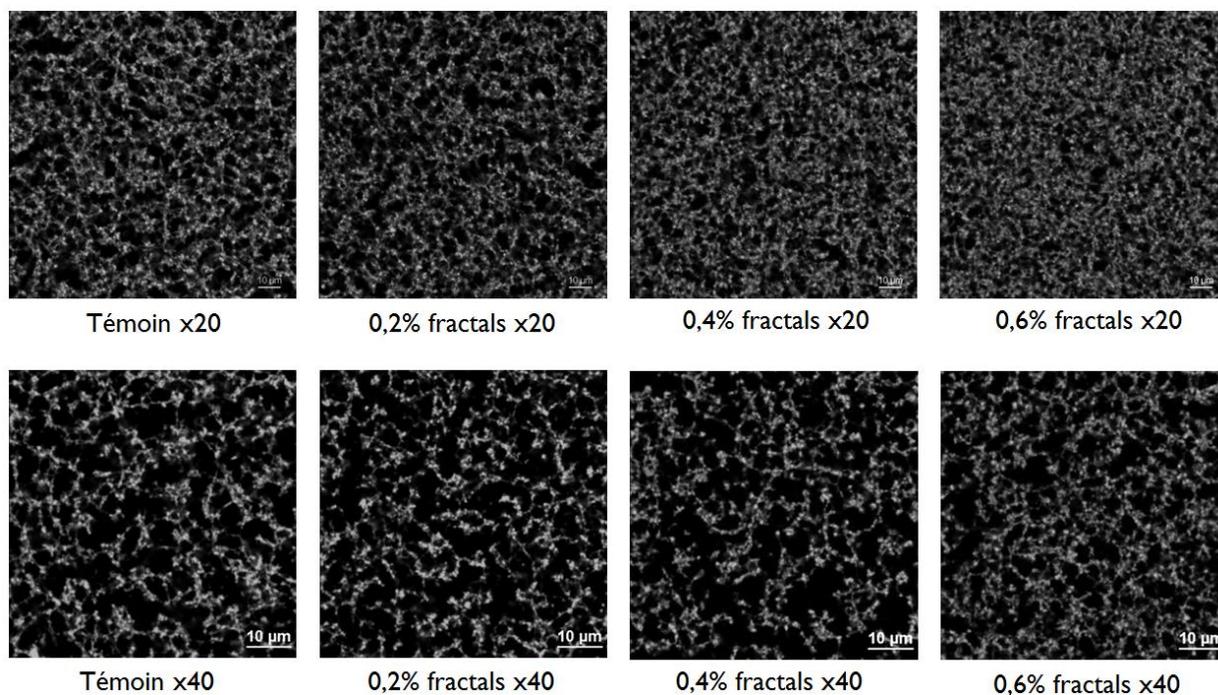


Figure 46 : Evolution du pourcentage de synérèse en fonction de la quantité d'agrégats fractals ajoutée

Comme dans le cas de l'ajout de PS, les agrégats fractals permettent d'obtenir un réseau protéique plus dense (cf. analyse en microscopie confocale), comme le suggère l'augmentation globale des modules conservatifs, permettant une meilleure rétention du lactosérum comme dans le cas de l'ajout de protéines sériques, en accord avec la littérature (Andoyo et al., 2015, 2014). En revanche, comme pour les résultats obtenus en rhéologie, les agrégats fractals sont légèrement moins efficaces que les PS pour réduire la synérèse.

### V.4.2- Microstructure des gels acides maigres avec ajout d'agrégats fractals

Un échantillon témoin et les échantillons auxquels 0,2 ; 0,4 et 0,6% d'agrégats fractals ont été ajoutés ont été observés après 6 h à 40 °C par microscopie confocale pour analyser la structure finale de ces systèmes. Toutes les images ont été réalisées avec l'ajout d'agrégats S2 avant le traitement thermique (J1). La Figure 47 présente une photographie de chaque échantillon aux grossissements x20 et x40.



**Figure 47** : Photographies en microscopie confocale de gels acides maigres (témoin, 0,2% ; 0,4% et 0,6% d'agrégats fractals) x20 et x40 zoom 5

On observe des microstructures de réseaux similaires pour tous les échantillons aux différents grossissements, comme pour les échantillons avec ajout de PS. Une légère densification du réseau se produit cependant avec l'augmentation de la concentration en agrégats fractals ajoutés, ainsi qu'une diminution de la taille des poches de sérum.

Les résultats obtenus en microscopie confocale sont cohérents avec ceux obtenus au cours des analyses rhéologiques et montrent une structuration plus importante lorsque la concentration en agrégats ajoutée augmente (diminution de la pente des balayages en fréquence et de l'amplitude de  $\tan \delta$ ).

Suite aux résultats obtenus sur la variation des conditions expérimentales testées en présence de protéines sériques natives et d'agrégats fractals, les agrégats microgels et mixtes ont par la suite toujours été ajoutés avant le traitement thermique à J1.

### V.5- Ajout d'agrégats microgels

L'effet de l'ajout d'agrégats microgels à différentes concentrations sur la texture et les propriétés des gels acides maigres a également été analysé. Pour cela, de 0,4 à 1% de microgels sont ajoutés au lait écrémé avant le traitement thermique afin d'évaluer leur impact sur la texture et l'intensité de la synérèse des gels acides en fonction de la concentration et du temps.

### V.5.1- Analyses rhéologiques des gels acides maigres avec ajout d'agrégats microgels

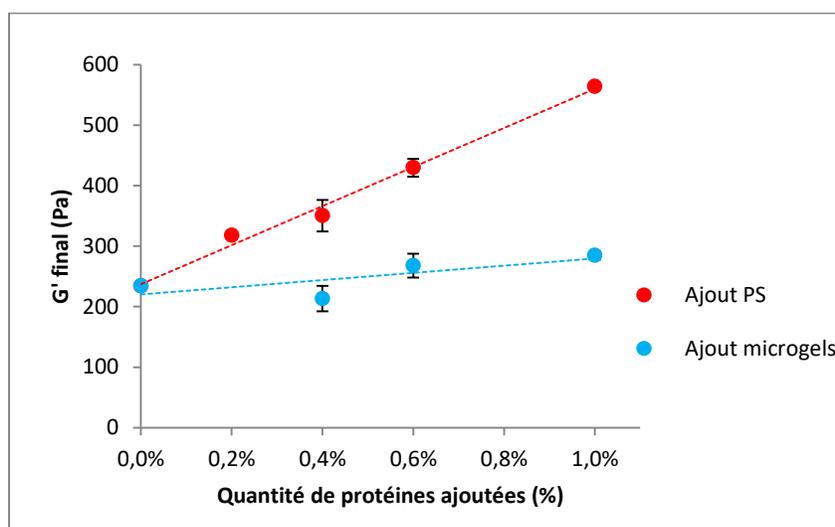
Le Tableau XVIII regroupe les données rhéologiques obtenues en présence d'agrégats microgels ajoutés à différentes concentrations.

**Tableau XVIII** : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers avec ajout de différentes concentrations d'agrégats microgels avant le traitement thermique

Echantillon		Temps gélification	pH gélification	Amplitude tan $\delta$	G' max (Pa)	Pente G' (BF)
Moyenne témoin J1		29,4 min	5,43	0,52	229	0,164
0,4% microgels	Moyenne	30,1 min	5,46	0,51	213	0,161
	Ecart-type	1,2	0,02	0,01	21	0,001
0,6% microgels	Moyenne	31 min	5,44	0,51	268	0,162
	Ecart-type	2,2	0,02	0	20	0,001
1% microgels	Moyenne	33,6 min	5,42	0,51	285	0,162
	Ecart-type	0,1	0	0	6	0,001

De façon surprenante, l'ajout de 0,4 à 1% d'agrégats microgels n'augmente que très peu la fermeté des gels. De plus, le temps ainsi que le pH de gélification ne sont pas très différents de ceux obtenus pour les systèmes témoin. Le temps de gélification a même tendance à augmenter légèrement avec la concentration en agrégats microgels.

La Figure 48 montre l'évolution du module G' en fonction de la concentration d'agrégats microgels ajoutés, comparée à celle obtenue en présence de PS.



**Figure 48** : Evolution du G' final en fonction de la quantité de microgels ou de protéines sériques ajoutée

La valeur finale de  $G'$  des gels acides évolue très peu, quelle que soit la concentration de microgels ajoutée. Cela signifie que, contrairement à l'ajout de PS et d'agrégats fractals, les microgels ne semblent pas établir de connections avec le réseau protéique de caséines se formant au cours de l'acidification et n'ont pas pu renforcer la texture. Cela peut être dû à leur plus grande taille (diamètre moyen de 450 nm) et à leur densité supérieure à celle des structures fractales. Les agrégats microgels semblent plutôt jouer un rôle inerte dans le réseau. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Liu et al. (2016), qui ont montré que des agrégats de plus petites tailles étaient plus efficaces pour texturer les gels laitiers acides sans matière grasse. Donato, Kolodziejczyk, & Rouvet (2011) ont également montré que la force d'un gel acide peut diminuer à mesure que la fraction des microgels augmente.

### V.5.2- Synérèse des gels acides maigres avec ajout d'agrégats microgels

L'évolution de la synérèse a également été étudiée pour des systèmes avec 0,4 et 0,6% de microgels ajoutés. La Figure 49 présente les résultats obtenus avec les agrégats microgels et montre une légère diminution du pourcentage de synérèse avec ces agrégats (environ 50%) par rapport au gel acide témoin (environ 60%).

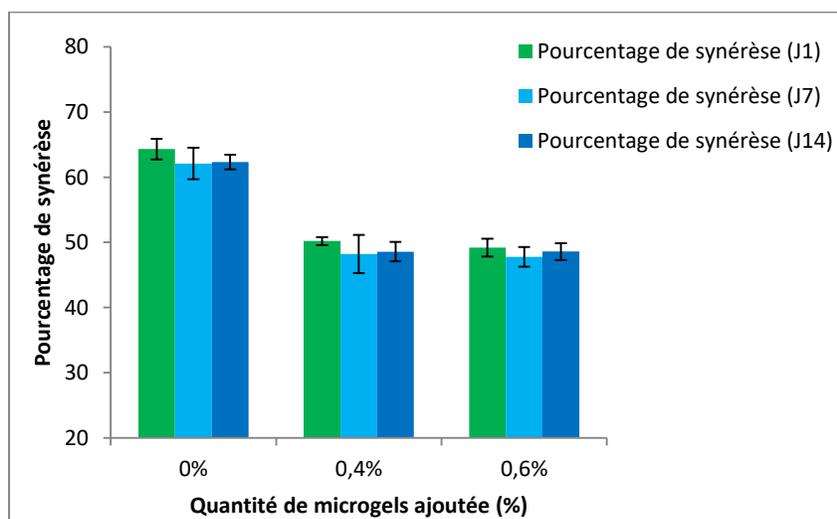


Figure 49 : Evolution du pourcentage de synérèse en fonction de la quantité d'agrégats microgels ajoutée

Ces niveaux de synérèse sont assez proches des résultats obtenus pour l'ajout de PS ou d'agrégats fractals dans les systèmes maigres. Les agrégats microgels par leur présence dans la phase continue des systèmes acidifiés réduisent légèrement le relargage du lactosérum. Ces agrégats ne jouent pas de rôle majeur dans la formation du réseau protéique et dans son renforcement mais leur présence permet une légère diminution de la synérèse. De plus, leur incorporation a permis d'augmenter la concentration en protéines des gels acides laitiers maigres, sans modification de leur fermeté, ce qui peut constituer un atout nutritionnel.

## V.6- Ajout d'agrégats mixtes

Enfin, l'effet de l'ajout d'agrégats mixtes à différentes concentrations sur la texture et les propriétés des gels acides maigres a été analysé. Pour cela, de 0,2 à 1% d'agrégats mixtes ont été ajoutés au lait écrémé avant le traitement thermique. La texture des gels acides a été caractérisée par rhéologie, ainsi que l'évolution de la synérèse dans le temps.

### V.6.1- Propriétés rhéologiques des gels acides maigres en présence d'agrégats mixtes

Le Tableau XIX regroupe les données rhéologiques obtenues avec l'ajout de différentes concentrations d'agrégats mixtes.

**Tableau XIX** : Récapitulatif des mesures rhéologiques et de pH des gels acides maigres laitiers avec ajout de différentes concentrations d'agrégats mixtes avant le traitement thermique

Echantillon		Temps gélification	pH gélification	Amplitude tan $\delta$	G' max (Pa)	Pente G' (BF)
<i>Moyenne témoin J1</i>		<i>29,4 min</i>	<i>5,43</i>	<i>0,52</i>	<i>229</i>	<i>0,164</i>
0,2% mixtes	Moyenne	<b>27,2 min</b>	<b>5,48</b>	<b>0,52</b>	<b>222</b>	<b>0,164</b>
	Ecart-type	2,2	0	0,01	38	0,002
0,4% mixtes	Moyenne	<b>30,1 min</b>	<b>5,45</b>	<b>0,51</b>	<b>254</b>	<b>0,164</b>
	Ecart-type	2,6	0,02	0	5	0,004
0,6% mixtes	Moyenne	<b>30,8 min</b>	<b>5,44</b>	<b>0,50</b>	<b>244</b>	<b>0,166</b>
	Ecart-type	2,5	0	0	26	0,005
1% mixtes	Moyenne	<b>27,3 min</b>	<b>5,41</b>	<b>0,49</b>	<b>348</b>	<b>0,158</b>
	Ecart-type	0,8	0	0	9	0

On observe une variation du temps de gélification selon la concentration d'agrégats mixtes ajoutés. On obtient un temps de gélification de 27 min à 0,2 et 1% d'agrégats mixtes ajoutés contre environ 30 min à 0,4 et 0,6%. On peut donc considérer que contrairement à l'ajout de protéines sériques ou d'agrégats fractals, le temps de gélification n'est pas modifié. En revanche, une faible diminution du pH de gélification par rapport au témoin est obtenue, ce qui n'était pas le cas avec l'ajout des agrégats microgels. Ces faibles variations signifient que le pouvoir tampon est très peu modifié, alors que dans le cas d'une solution de caséines seules, entrant dans la composition de ces agrégats, il augmenterait.

Sur la Figure 50 sont présentés les modules G' finaux après l'acidification obtenus pour l'ajout des agrégats mixtes et ils sont comparés aux résultats obtenus pour l'ajout de PS.

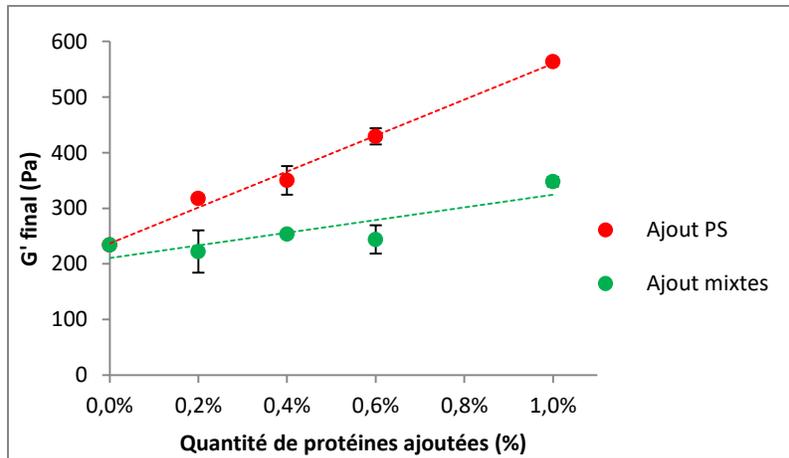


Figure 50 : Evolution du  $G'$  final en fonction de la quantité d'agrégats mixtes ou de protéines sériques ajoutée

On peut voir dans le Tableau XIX et sur la Figure 50 que pour l'ajout de 0,2 à 0,6% d'agrégats mixtes on ne peut pas affirmer qu'il y a une amélioration de la fermeté des gels par rapport au témoin, les valeurs de 254 et 244 Pa sont supérieures au témoin (229 Pa), mais les écart-types de 38 et 26 Pa ne permettent pas de conclure à une augmentation de la fermeté. En revanche, l'ajout de 1% d'agrégats mixtes entraîne une légère augmentation du module  $G'$ , mais cette augmentation est nettement inférieure au résultat obtenu pour l'ajout de la même concentration de PS. Les résultats sont assez similaires à ceux obtenus après l'ajout d'agrégats microgels, ces deux types d'agrégats ne permettant pas un renforcement marqué du réseau protéique et une augmentation de la fermeté des gels acides maigres.

#### V.6.2- Synérèse des gels acides maigres avec ajout d'agrégats mixtes

L'effet de l'ajout d'agrégats mixtes sur l'évolution de la synérèse a été analysé pour des systèmes contenant de 0,2 à 0,6% d'agrégats mixtes ajoutés (Figure 51).

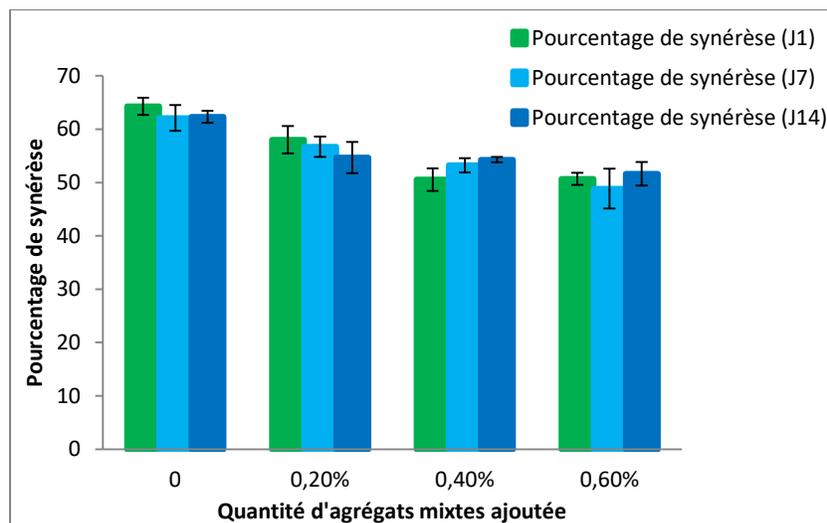


Figure 51 : Evolution du pourcentage de synérèse en fonction de la quantité d'agrégats mixtes ajoutée

Les résultats montrent une légère diminution du pourcentage de synérèse en présence d'agrégats mixtes par rapport aux gels acides témoins. Cependant, celle-ci évolue très peu avec l'augmentation de la concentration d'agrégats, ce qui montre que ce type d'agrégats n'a pas un impact très marqué sur la formation du réseau protéique.

### V.7- Conclusions sur les systèmes laitiers maigres

Dans ce chapitre, différents types d'agrégats ont été ajoutés à du lait écrémé. Les conditions les plus intéressantes pour obtenir les meilleurs résultats avec l'ajout des agrégats dans le lait ont été définies : ils seront toujours ajoutés avant le traitement thermique à J1.

L'ajout de PS natives dans du lait écrémé avant traitement thermique conduit à l'obtention de systèmes acides davantage structurés. De plus, par rapport à un gel acide maigre témoin, le temps de gélification est diminué et le pH de gélification augmente avec la concentration de PS ajoutées. Lors de l'acidification, les protéines sériques dénaturées supplémentaires peuvent se fixer à la surface des micelles de caséines, ou former des agrégats solubles, ce qui peut accélérer la déstabilisation des micelles et entraîner une diminution du temps de gélification. Par ailleurs, les protéines sériques dénaturées associées aux micelles de caséines et les agrégats solubles peuvent agir en tant que nœuds de liaison et créer des connexions supplémentaires entre les protéines du réseau protéique, ce qui peut faciliter la gélification et améliorer la texture (Lucey & Singh, 1998). Cette amélioration de la texture est mise en évidence dans nos résultats avec la diminution de la pente des balayages en fréquence et de l'amplitude de  $\tan \delta$ . Des valeurs plus faibles pour ces paramètres signifient l'obtention d'un réseau protéique plus structuré.

Les agrégats fibrillaires ne sont pas utilisables dans ce genre de système, car leur pH de fabrication (pH 2) rend leur utilisation très difficile. Toutes les méthodes pour remonter le pH à 6,7 (pH du lait), ajout de soude ou dialyse contre du lait, entraînent une gélification de la suspension de fibrilles ou la destruction de celles-ci. De plus, les fibrilles ont un très faible taux de conversion (< 40%) et sont très sensibles à l'homogénéisation qui a tendance à les déstructurer, rendant leur utilisation encore plus difficile. Nous avons donc pris la décision d'abandonner ce type d'agrégats pour la suite de l'étude.

Une diminution du temps de gélification par rapport au témoin et une augmentation du pH de gélification sont observées avec l'ajout d'une concentration croissante en agrégats fractals, ce qui est comparable à ce qui a été observé après ajout de PS. Le pH plus élevé de gélification des agrégats

protéiques entraîne une diminution du temps de gélification, qu'ils soient constitués par ajout de PS thermo-dénaturés et agrégés ou par addition d'agrégats fractals préformés et ajoutés au lait. Les agrégats fractals comme les PS semblent créer des connexions supplémentaires qui améliorent la formation du réseau protéique et entraînent une gélification plus rapide. Cela est d'autant plus marqué que la concentration d'agrégats fractals ajoutée est importante. L'ajout d'agrégats fractals conduit à des résultats variables pour la structure finale des gels acides maigres selon leur taille et les conditions d'addition. Cela peut être dû au nombre d'agrégats ou encore, leur morphologie différente pourrait entraîner la formation de plus ou moins de connexion avec le réseau protéique, ce qui pourrait influencer la fermeté des gels finaux. De manière générale, l'utilisation d'agrégats fractals n'est pas plus efficace que l'ajout de protéines sériques pour des systèmes maigres.

Enfin, l'utilisation d'agrégats microgels ou mixtes dans nos systèmes ne présente pas d'intérêt pour le renforcement de la texture des gels laitiers acides. En effet, on n'observe pas de réelle amélioration de la fermeté même en ajoutant 1% des deux types d'agrégats. Ces agrégats ne semblent donc pas prendre part à la formation du réseau. De plus, le temps et le pH de gélification ne sont pas très différents des résultats obtenus pour les gels acides maigres témoin. Ils pourraient néanmoins être intéressants dans une optique d'enrichissement en protéines des produits tout en conservant une texture peu ferme.

Pour la suite du travail, les protéines sériques natives et les différents agrégats : fractals, microgels et mixtes seront ajoutés à différentes concentrations dans des systèmes contenant 3,5% la matière grasse laitière, dans le but de voir si ces structures protéiques ont les mêmes fonctionnalités dans des systèmes plus complexes et s'ils peuvent avoir un impact sur l'interface des gouttelettes de matière grasse. De plus, il sera également intéressant de vérifier si les résultats variables obtenus en rhéologie et en analyse de la synérèse selon le type d'agrégats ajoutés sont les mêmes dans des produits contenant de la matière grasse.



## **Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques**



## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

---

Un des objectifs de ce travail de thèse est d'utiliser les agrégats protéiques caractérisés dans le chapitre 4 pour texturer des systèmes de type yaourt contenant de la matière grasse (MG) *via* les interfaces des gouttelettes. En se basant sur les résultats obtenus dans les systèmes maigres, nous avons dans ce chapitre étudié des systèmes acides laitiers contenant en plus de la matière grasse. En effet, les recherches antérieures réalisées dans le cadre du projet PROFIL sur les agrégats de protéines sériques et leur fonctionnalité ont globalement montré qu'ils peuvent permettre la formation d'émulsion laitière modèle et accroître leur stabilité, notamment grâce à leur capacité à connecter les gouttelettes de matière grasse et à ainsi texturer le système (Chevallier, 2017; Loiseleux, 2017; Loiseleux et al., 2018). De la même façon que dans le chapitre précédent, les fonctionnalités des agrégats seront évaluées par des études rhéologiques, des analyses de la synérèse et des observations en microscopie confocale dans des gels laitiers acides contenant de la matière grasse. De plus, la composition interfaciale des gouttelettes de matière grasse sera également déterminée.

Pour cela, nous avons modulé la quantité d'agrégats protéiques ajoutée (0,2 à 1,5%) dans des systèmes contenant 3,5% de matière grasse (teneur en MG du lait entier), tous homogénéisés à 100 bars. Nous avons pu mettre en évidence dans le chapitre précédent que l'utilisation des protéines sériques natives et des agrégats fractals dans les systèmes maigres permettait une amélioration de la texture tandis que les agrégats mixtes et microgels permettaient plutôt un enrichissement en protéines des produits sans augmentation de la force des gels acides laitiers. Ces nouvelles conditions permettront d'évaluer si les différents agrégats entraînent de nouvelles fonctionnalités en présence de MG.

Les pourcentages de synérèse des systèmes ont également été mesurés avec les différents types d'agrégats protéiques pour évaluer l'efficacité de chacun à diminuer la synérèse dans des systèmes contenant de la matière grasse. Les gels acides gras laitiers ont été observés en microscopie dans le but de caractériser les réseaux protéiques formés et de visualiser la localisation de la matière grasse et du réseau protéique dans les systèmes. Enfin, la composition du film interfacial de certaines émulsions a été déterminée dans le lait témoin et avec ajout d'agrégats fractals, dans le but d'identifier les types de protéines présentes à la surface des gouttelettes de matière grasse : caséines, protéines sériques, agrégats protéiques.

**Le but de ce chapitre est d'évaluer l'impact de l'ajout de PS et des différents types d'agrégats sur des gels acides laitiers de type yaourt contenant de la matière grasse, et de comparer leurs fonctionnalités dans ces conditions avec celles obtenues en système maigre.**

### VI.1- Gels acides gras laitiers témoin à 3,5% de matière grasse

Les conditions « témoin » de la fabrication des gels acides laitiers ont été testées. Pour l'ensemble des systèmes analysés contenant 3,5% de matière grasse, l'homogénéisation a été effectuée en 2 étapes : une pré-émulsification au rotor-stator de 3 min à 1400 tr/min, suivie d'une homogénéisation de 5 min à 100 bars. Le même traitement thermique (11 min à 90 °C) que précédemment a été réalisé le jour suivant la préparation. Le diamètre moyen ( $d_{4,3}$ ) des gouttelettes de matière grasse de l'ensemble des systèmes a été déterminé par granulométrie laser. La Figure 52 présente les résultats obtenus pour un lait témoin contenant 3,5% de matière grasse et homogénéisé à 100 bars. Dans ces conditions expérimentales, le diamètre moyen est toujours de 0,8  $\mu\text{m}$ . La surface spécifique (SSp) exprimée en  $\text{m}^2/\text{g}$  de matière grasse, correspondant à la surface interfaciale est déterminée à partir du diamètre moyen ( $\mu\text{m}$ ) pondéré en surface ( $d_{3,2}$ ) (cf. : III.5.2). La valeur obtenue est de 8,4  $\text{m}^2/\text{g}$  pour une homogénéisation à 100 bars donnant une surface totale à 3,5% de matière grasse de 0,29  $\text{m}^2/\text{g}$ .

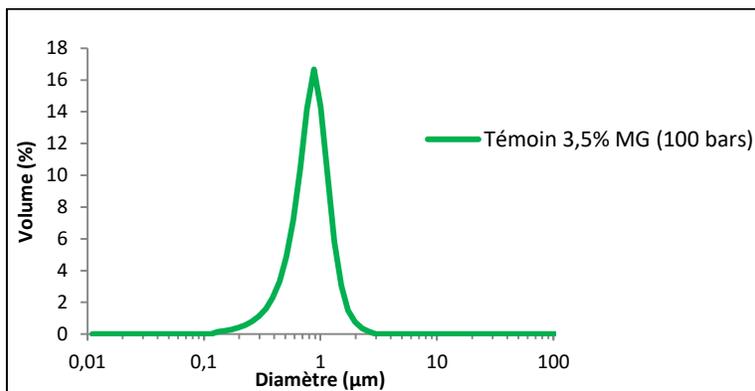


Figure 52 : Dispersion de taille des gouttelettes de matière grasse d'un lait témoin à 3,5% MG (100 bars)

Le Tableau XX présente les résultats des analyses rhéologiques, obtenus pour les laits témoins contenant 3,5% de matière grasse, ainsi que les résultats obtenus pour les systèmes maigres témoins pour comparaison. Les analyses rhéologiques réalisées sur ces gels acides gras témoin montrent une bonne reproductibilité pour l'ensemble des paramètres étudiés.

Tableau XX : Moyenne et écart-type des mesures rhéologiques et de pH réalisés sur des gels acides gras et maigres laitiers témoins à 3,5% matière grasse (acidification par GDL à 40 °C)

Echantillons	Temps gélification	pH gélification	Amplitude $\tan \delta$	G' final (Pa)	Pente G' (BF)
<b>Moyenne témoin gras</b>	<b>29,4 min</b>	<b>5,45</b>	<b>0,53</b>	<b>340</b>	<b>0,150</b>
Ecart-type	2,3 min	0,03	0,04	6,4	0,003
<b>Moyenne témoin maigre</b>	<b>29,4 min</b>	<b>5,43</b>	<b>0,52</b>	<b>229</b>	<b>0,164</b>
Ecart-type	1,6 min	0,01	0	7,9	0,0006

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

Les valeurs obtenues pour le temps et le pH de gélification sont très similaires à celles obtenues pour les gels acides maigres. En revanche, l'ajout de matière grasse entraîne une augmentation de la force des gels, avec une valeur du module élastique supérieure d'un peu plus de 100 Pa par rapport aux gels acides maigres. De plus, la pente du module  $G'$  relevée sur le balayage en fréquence en fin de cinétique est inférieure pour les gels acides gras (0,150) à celle des gels acides maigres (0,164). Cela révèle une meilleure structuration du réseau protéique, concentré autour des gouttelettes de matière grasse. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui avait déjà mis en évidence que la matière grasse permettait de renforcer les systèmes laitiers acidifiés (Aguilera & Kinsella, 1991; Aguilera et al., 1993; Xiong, Aguilera, & Kinsella, 1991).

### VI.2- Ajout de protéines sériques

L'effet de l'ajout de protéines sériques à différentes concentrations sur la texture et les propriétés des gels acides gras à 3,5% de matière grasse a été analysé. Pour cela, de 0,2 à 1% de protéines sériques natives ont été ajoutés au lait le jour de sa préparation pour évaluer leur impact. L'homogénéisation est toujours réalisée à 100 bars et il a été vérifié que le diamètre moyen des gouttelettes de matière grasse était toujours de 0,8  $\mu\text{m}$ .

#### VI.2.1- Propriétés rhéologiques des gels acides gras avec ajout de PS

Les résultats des analyses rhéologiques et de pH réalisés en présence de différentes concentrations de PS dans les systèmes contenant 3,5% de matière grasse sont présentés dans le Tableau XXI.

**Tableau XXI** : Résultats moyens et écart-types pour les mesures rhéologiques et de pH sur des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout de protéines sériques (acidification par GDL à 40 °C)

Echantillons		Temps gélification	pH gélification	Amplitude $\tan \delta$	$G'$ final (Pa)	Pente $G'$ (BF)
<i>Moyenne témoin</i>		<i>29,4 min</i>	<i>5,45</i>	<i>0,53</i>	<i>340</i>	<i>0,150</i>
0,2% PS	Moyenne	<b>25,1 min</b>	<b>5,52</b>	<b>0,48</b>	<b>416</b>	<b>0,149</b>
	Ecart-type	0,7	0,01	0	27	0,003
0,4% PS	Moyenne	<b>23,4 min</b>	<b>5,55</b>	<b>0,45</b>	<b>498</b>	<b>0,148</b>
	Ecart-type	1,4	0,01	0	11	0,001
0,6% PS	Moyenne	<b>23 min</b>	<b>5,55</b>	<b>0,43</b>	<b>564</b>	<b>0,146</b>
	Ecart-type	0,8	0	0,01	1	0,001
1% PS	Moyenne	<b>18,7 min</b>	<b>5,62</b>	<b>0,37</b>	<b>721</b>	<b>0,140</b>
	Ecart-type	0,1	0,01	0	41	0,001

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

Les résultats montrent que l'ajout de PS natives avant le traitement thermique entraîne une diminution du temps de gélification par rapport au système témoin, comme dans le cas des systèmes maigres. Le temps de gélification diminue également avec l'augmentation de la concentration en PS ajouté : de 40% entre le système sans PS ajouté et le système avec 1% de PS. En parallèle, le pH de gélification augmente de façon légèrement plus marquée que pour les systèmes maigres, notamment à la concentration la plus élevée en PS (1%). Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature obtenus sur des systèmes avec ou sans matière grasse (Andoyo et al., 2015; Lucey & Singh, 1998; Ozcan et al., 2015).

La dénaturation des protéines sériques induite par le traitement thermique du lait (Anema & Li, 2015; Cayot & Lorient, 1998; Chen & Dickinson, 1998; Paulsson & Dejmek, 1990), permet aux PS de s'agréger entre-elles et avec la caséine- $\kappa$  des micelles de caséines *via* des ponts disulfures, modifiant ainsi les propriétés de gélification acide du lait (Donato & Guyomarc'h, 2009; Mahmoudi et al., 2011, 2010; Vasbinder et al., 2001; Vélez-Ruiz et al., 1997). Lors de l'acidification, les agrégats protéiques fixés à la surface des micelles de caséines peuvent accélérer la déstabilisation des micelles en raison de leur pHi et leur hydrophobie plus élevés (Morand et al., 2012; Vasbinder et al., 2004), et ainsi entraîner une diminution du temps de gélification (Ozcan et al., 2015). Ce phénomène est d'autant plus marqué que la quantité de PS ajouté est importante.

La Figure 53 présente l'évolution du module  $G'$  obtenue selon la concentration de PS ajoutée pour les systèmes maigres et gras. Dans les deux cas, une augmentation linéaire du module élastique en fin de cinétique d'acidification est constatée avec l'augmentation de la concentration en protéines sériques ajoutée dans le lait avant le traitement thermique.

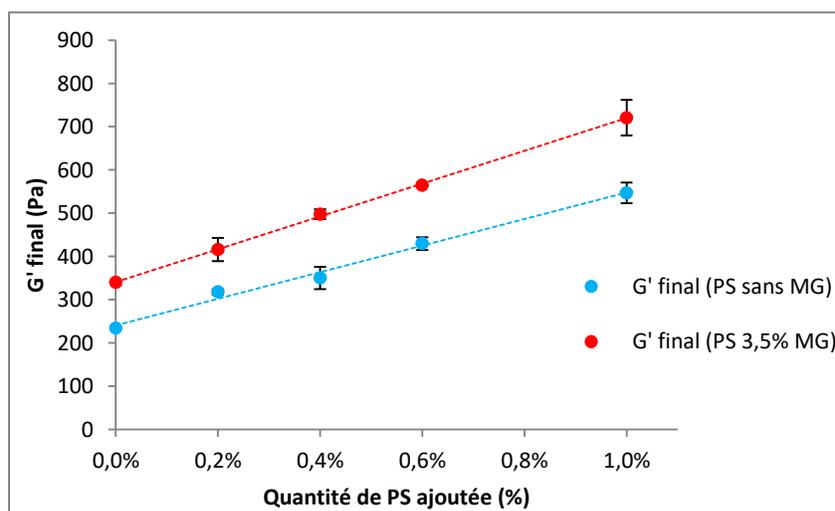


Figure 53 : Evolution du  $G'$  final en fonction de la quantité de protéines sériques natives ajoutée (gels acides maigres ou gras)

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

---

En présence ou non de matière grasse, le module conservatif évolue de la même manière avec l'augmentation de la concentration. L'augmentation est linéaire, les deux droites étant pratiquement parallèles avec des modules toujours supérieurs pour les gels acides gras. Ces résultats montrent un effet d'exclusion volumique/stérique dû à la présence de la matière grasse conduisant à une augmentation de la concentration en protéines dans la phase continue. Il est également possible que des connexions se mettent en place entre le réseau de caséines et les protéines recouvrant l'interface des gouttelettes de matière grasse au cours de l'acidification (Jost, Dannenberg, & Rosset, 1989). La présence de matière grasse améliore donc les propriétés rhéologiques des gels acides avec une augmentation de la fermeté/élasticité des gels et un raccourcissement du temps de gélification (Aguilera & Kinsella, 1988, 1991; Aguilera et al., 1993).

La similarité de l'évolution des  $G'$  finaux des gels acides maigres ou gras semble indiquer que l'ajout des PS supplémentaires n'affecterait pas les interactions entre les protéines adsorbées à l'interface des globules gras et le réseau protéique. Ceci pourrait être due au fait que les PS ajoutées ne s'adsorbent pas à l'interface. Les protéines majoritaires du lait, les caséines (75-80% des protéines totales) sont connues pour s'adsorber préférentiellement à la surface des gouttelettes de matière grasse (Srinivasan et al., 1996; Ye, 2008). Si leur concentration est suffisante, les micelles de caséines peuvent recouvrir entièrement les gouttelettes de matière grasse (Chevallier et al., 2016, 2018). Les protéines sériques natives supplémentaires joueraient donc un rôle principalement dans la phase continue et renforceraient le réseau de caséines. On suppose donc que dans les conditions expérimentales testées : 3,5% de MG et 100 bars, l'interface des gouttelettes de matière grasse serait saturée par les caséines présentes initialement dans le lait.

Une diminution de l'amplitude de  $\tan \delta$  et de la pente des balayages en fréquence est également obtenue lors de l'ajout de PS par rapport aux systèmes témoins. Le même effet avait également été observé dans les systèmes maigres avec addition de PS. La diminution est d'autant plus importante que la concentration en protéines ajoutées augmente. Toutes ces observations confirment qu'un réseau protéique plus structuré avec davantage de connexions ou des connexions plus fortes est produit en présence d'une concentration plus élevée en protéines sériques. Lucey & Singh (1997) et van Vliet, van Dijk, Zoon, & Walstra (1991) considèrent que l'amplitude de  $\tan \delta$  est liée à la possibilité de relaxation des liaisons pendant la période initiale suivant la formation du gel. Une plus faible amplitude de  $\tan \delta$ , peut donc être expliquée par un moindre niveau de relaxation dans les systèmes, c'est-à-dire par une structuration plus importante.

### VI.2.2- Analyse de la synérèse sur les gels acides gras avec ajout de PS

La synérèse a été déterminée sur des gels acides gras témoins et des gels acides gras contenant de 0,2 à 1% de protéines sériques natives ajoutées avant le traitement thermique. L'ensemble des résultats pour les gels acides gras avec ajout de PS est présenté dans la Figure 54 :

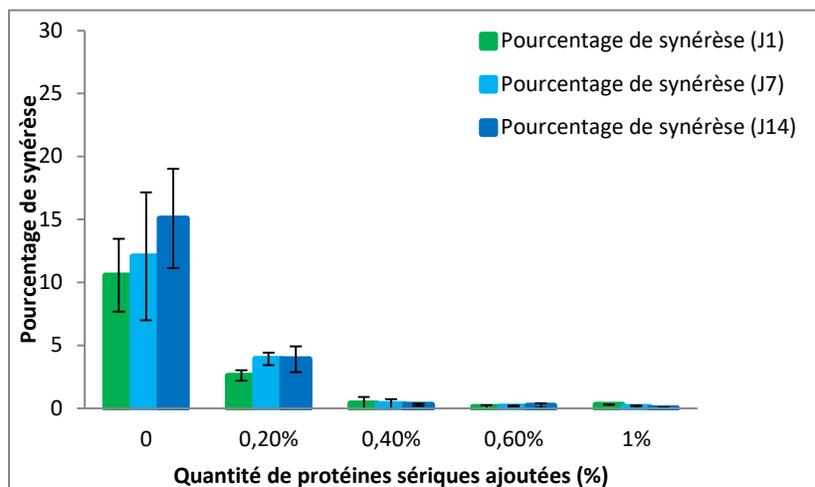


Figure 54 : Analyse de la synérèse dans le temps des gels acides gras (3,5% MG) avec ajout de protéines sériques natives

Dans un premier temps, on peut observer que les gels acides gras présentent beaucoup moins de synérèse (autour de 15%) que les gels acides maigres (autour de 60-65%). Aguilera et al. (1993) et Keogh & O'Kennedy (1998) avaient également montré que la présence de matière grasse entraînait une diminution de la synérèse, probablement comme expliqué précédemment en raison d'un effet d'exclusion volumique/stérique de la matière grasse conduisant à une concentration en protéines dans la phase continue. La matière grasse permet donc un remplissage du réseau, qui contribue à augmenter la fermeté du réseau et sa capacité à immobiliser le lactosérum dans le gel.

Lorsque des PS supplémentaires sont ajoutées, la synérèse diminue fortement, atteignant des valeurs proche de 0% à partir de 0,4% et jusqu'à 1% de protéines sériques ajoutées, en accord avec la littérature (Delikanli & Ozcan, 2017; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006). L'ajout de PS améliore la structuration du réseau protéique en créant plus de connexions avec le réseau de caséines comme dans les gels acides maigres. Toutefois, le pourcentage de synérèse a tendance à augmenter dans le temps à la fois pour les gels témoins et dans une moindre mesure pour les gels avec 0,2% de PS, probablement en raison d'une contraction du réseau protéique dans le temps. En revanche, pour les autres concentrations testées, il n'y a pas de différence visible selon le jour de mesure. Le renforcement du réseau est alors suffisant pour retenir le lactosérum.

### VI.2.3- Microstructure d'un gel acide gras avec ajout de 1% de PS

Un gel acide témoin (3,5% de MG) et un échantillon auquel 1% de PS ont été ajoutées ont été observés après 6 h à 40 °C en microscopie confocale pour analyser la structure finale de ces systèmes (Figure 55).

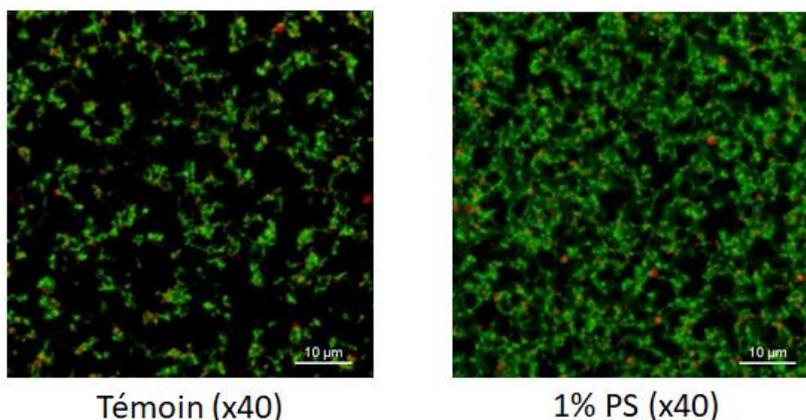


Figure 55 : Photographies en microscopie confocale de gels acides gras (3,5% MG) témoin et contenant 1% de PS

L'observation du gel acide gras témoin met en évidence un réseau de protéines (apparaissant en vert) assez hétérogène, avec de larges cavités ou poche de sérum en noir sur les photographies. La matière grasse (en rouge) est difficilement visible en raison de la taille moyenne des gouttelettes de matière grasse à la limite de la résolution à ce grossissement, mais elle apparaît distribuée de façon homogène dans le gel et elle semble connectée au réseau de protéines car on ne retrouve pas de matière grasse dans les poches de sérum mais uniquement au niveau du réseau. La structure observée explique les résultats rhéologiques et de synérèse pour ce type de système : des modules conservatifs relativement faibles et surtout une synérèse significative.

En présence de 1% de PS, le gel acide montre une densification du réseau protéique nettement visible par rapport au témoin. La taille des cavités est fortement diminuée. D'autres études ont déjà mis en évidence que des gels avec une concentration plus importante en protéines avaient des pores plus petits et une répartition plus homogène de la matière protéique ce qui donnait une structure globale également plus homogène et résistante (Andoyo et al., 2015, 2014). L'ajout de protéines sériques a donc un impact sur la mise en place du réseau protéique et sur la texture finale. Les résultats de microscopie confocale sont en accord avec les analyses précédentes qui montrent une augmentation des propriétés rhéologiques et une diminution de la synérèse avec l'augmentation de la concentration en protéines sériques natives ajoutées.

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

### VI.2.4- Augmentation de la teneur en protéines : comparaison des propriétés d'un gel acide avec 1% de PS et d'un gel acide à 4,5% de protéines, provenant de la poudre de lait

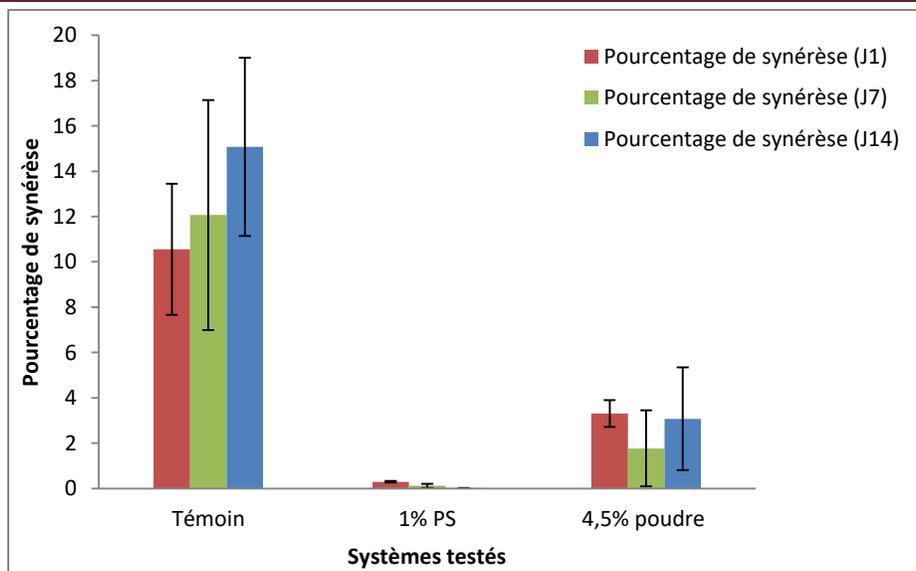
Pour évaluer l'intérêt de l'ajout spécifique de protéines sériques dans le lait contenant 3,5% de matière grasse, nous avons également réalisé des expérimentations sur un lait traité thermiquement contenant 4,5% de protéines provenant de la poudre de lait, c'est-à-dire environ 20% de protéines sériques et 80% de caséines à la même concentration totale en protéines que lorsque l'on ajoute 1% de PS dans le lait. Le lait est préparé dans les mêmes conditions expérimentales d'homogénéisation et de traitement thermique que pour les autres systèmes. Le Tableau XXII présente les résultats rhéologiques obtenus pour les deux systèmes acidifiés.

**Tableau XXII** : Comparaison des résultats rhéologiques et de pH sur des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout de 1% PS et 4,5% de protéines de poudre de lait

Echantillons	Temps gélification	pH gélification	Amplitude $\tan \delta$	G' final (Pa)	Pente G' (BF)
Moyenne témoin	29,4 min	5,45	0,53	340	0,150
1% PS	18,7 min	5,62	0,37	721	0,140
Lait 4,5% protéines (poudre de lait)	29,9 min	5,43	0,48	582	0,149

Les résultats obtenus pour le gel acide contenant 4,5% de protéines sont très différents de ceux avec l'ajout de 1% de PS. En effet, le temps de gélification est plus long pour le système contenant les protéines provenant de la poudre de lait. Les résultats pour le temps et le pH de gélification sont cependant proches de ceux obtenus pour les laits témoins à 3,5% de matière grasse (29,4 min et pH de 5,45), en raison de la proportion constante entre caséines et PS. En revanche, le module conservatif en fin de cinétique d'acidification est plus élevé que pour le témoin, à cause de la concentration supérieure en protéines constituant le réseau. Les résultats sont moins bons que ceux obtenus à partir du lait pour lequel 1% de PS a été ajouté, le module G' en fin de cinétique est de 582 Pa avec 4,5% de poudre de lait contre 721 Pa avec 1% de PS, ce qui montre que les protéines sériques sont plus efficaces que les caséines pour renforcer le réseau. De plus, l'amplitude de  $\tan \delta$  est supérieure avec 4,5% de poudre de lait que pour l'ajout de 1% de PS montrant une moins bonne structuration du réseau protéique.

Une comparaison de l'évolution de la synérèse a également été réalisée sur ces systèmes (Figure 56).



**Figure 56** : Comparaison de l'analyse de la synérèse dans le temps des gels acides gras (3,5% MG) avec ajout de 1% PS et 4,5% de protéines de poudre de lait

On remarque que les pourcentages de synérèse obtenus sont corrélés avec les valeurs de modules conservatifs obtenus en fin d'acidification. Cela montre bien que les caséines sont moins efficaces pour limiter l'expulsion du lactosérum que les PS, mais que l'augmentation de la concentration en protéines est bénéfique pour diminuer la synérèse et renforcer le réseau protéique.

### VI.3- Influence de l'ajout d'agrégats fractals

Des agrégats fractals avec un diamètre moyen d'environ 228 nm ont été ajoutés aux systèmes contenant de la matière grasse. Il s'agit des agrégats fractals de plus grande taille produits avec 45 mM de NaCl et appelés Fa45 (cf. : IV.1.1). Les mêmes conditions expérimentales permettent d'obtenir comme précédemment des gouttelettes de matière grasse avec un diamètre moyen de 0,8  $\mu\text{m}$ , la présence d'agrégats ne modifie donc pas la distribution en tailles des gouttelettes.

#### VI.3.1- Propriétés rhéologiques des gels acides gras + agrégats fractals

Le Tableau XXIII présente les résultats des analyses rhéologiques et de pH de gélification obtenus pour les gels acides gras contenant de 0,2 à 1% d'agrégats fractals Fa45.

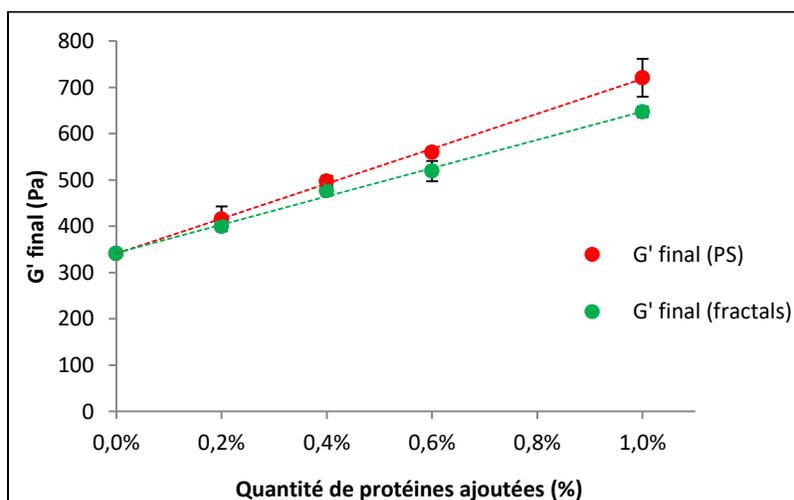
## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

**Tableau XXIII** : Résultats moyens et écart-types pour les mesures rhéologiques et de pH des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout d'agrégats fractals (acidification par GDL à 40 °C)

Echantillons		Temps gélification	pH gélification	Amplitude $\tan \delta$	G' final (Pa)	Pente G' (BF)
<i>Moyenne témoin</i>		<i>29,4 min</i>	<i>5,45</i>	<i>0,53</i>	<i>340</i>	<i>0,150</i>
0,2% fractals	Moyenne	<b>26,1 min</b>	<b>5,50</b>	<b>0,46</b>	<b>400</b>	<b>0,145</b>
	Ecart-type	0,6	0,02	0	5	0,001
0,4% fractals	Moyenne	<b>24,7 min</b>	<b>5,53</b>	<b>0,42</b>	<b>477</b>	<b>0,140</b>
	Ecart-type	0,1	0	0	11	0,001
0,6% fractals	Moyenne	<b>23,3 min</b>	<b>5,55</b>	<b>0,39</b>	<b>519</b>	<b>0,140</b>
	Ecart-type	1	0,03	0,01	22	0,003
1% fractals	Moyenne	<b>20,7 min</b>	<b>5,60</b>	<b>0,35</b>	<b>647</b>	<b>0,133</b>
	Ecart-type	0,9	0,01	0,01	12	0,001

Comme pour l'ajout de PS, une diminution du temps de gélification, liée à une augmentation du pH de gélification est observée avec l'augmentation de la concentration en agrégats. En revanche, contrairement aux résultats obtenus sur les systèmes maigres avec ajout d'agrégats fractals, les résultats sont reproductibles. Cela peut probablement être attribué à l'étape d'homogénéisation, qui permet la dispersion de la matière grasse, et qui entraîne en parallèle une diminution de la polydispersité de taille des agrégats (Loiseleux, 2017).

La Figure 57 présente l'évolution du module G' obtenu en fin de cinétique d'acidification en fonction de la concentration d'agrégats fractals ajoutée pour les systèmes gras ainsi que les résultats précédemment obtenus pour les systèmes avec ajout de PS.



**Figure 57** : Evolution du G' final en fonction de la quantité d'agrégats fractals dans des gels acides gras laitiers

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

Les gels obtenus sont plus forts que les gels acides gras témoins avec des valeurs de  $G'$  qui augmentent en fonction de la concentration d'agrégats Fa45 ajoutés. De plus, l'addition d'agrégats fractals conduit à une augmentation linéaire du  $G'$  final, assez similaire aux résultats obtenus avec l'ajout de PS. Les agrégats fractals Fa45 permettent donc de renforcer le réseau protéique mais de façon un peu moins efficace que les protéiques sériques.

De plus, l'amplitude de  $\tan \delta$  et la pente des balayages fréquences diminuent avec l'augmentation de la concentration en agrégats fractals ce qui indique que le réseau protéique est de plus en plus structuré. Ces diminutions sont légèrement plus prononcées que pour l'addition de PS ce qui signifierait de façon paradoxale une meilleure structuration des systèmes, malgré des modules conservatifs plus faibles. Cela indique des différences dans le processus de structuration du réseau protéique ou dans le type d'interactions se mettant en place entre les agrégats fractals et le réseau de caséines. On suppose que ces agrégats préformés, de grandes tailles, peuvent créer des connexions sur des distances plus importantes, ce qui renforcerait le réseau, mais que les connexions sont probablement en nombre moins important que pour l'ajout de PS.

### VI.3.2- Analyse de la synérèse sur les gels acides gras avec ajout d'agrégats fractals

La Figure 58 présente les résultats du pourcentage de synérèse dans le temps pour l'ajout de différentes concentrations d'agrégats fractals Fa45 allant de 0,2 à 1% ainsi que les résultats obtenus pour les systèmes témoins.

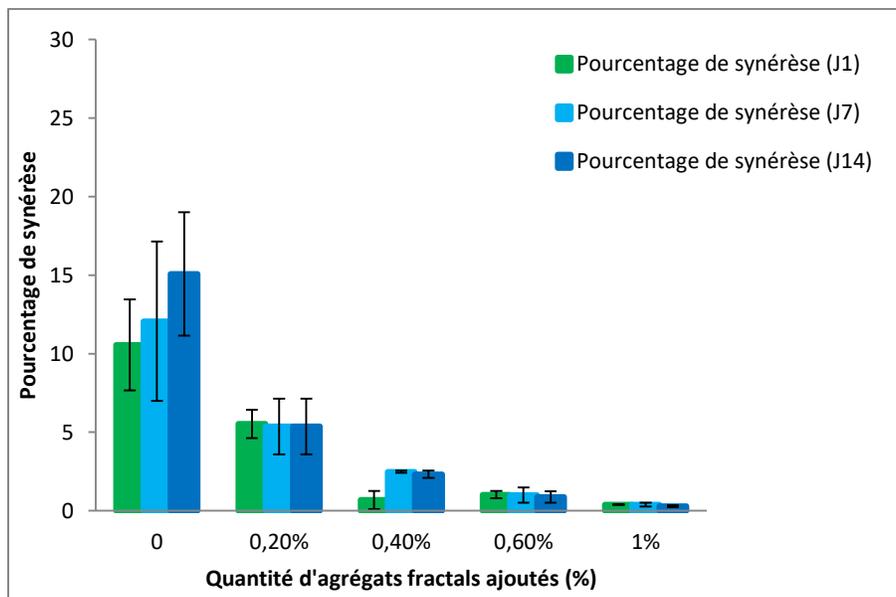


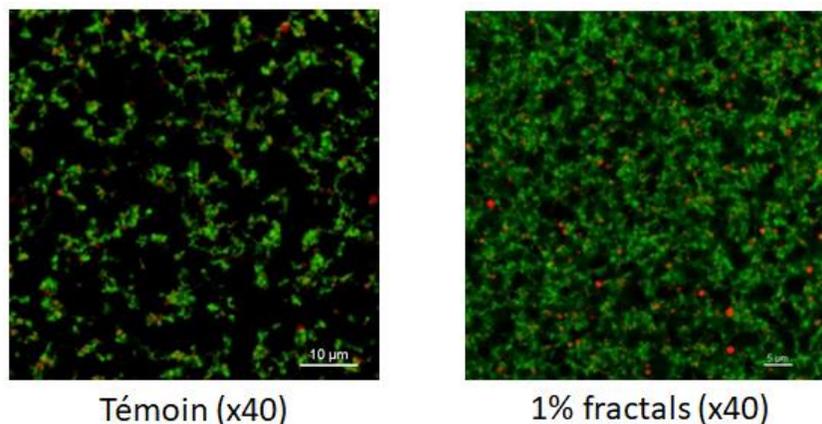
Figure 58 : Analyse de la synérèse dans le temps des gels acides gras (3,5% MG) avec ajout d'agrégats fractals Fa45

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

Dès 0,6% d'agrégats fractals ajoutés, le pourcentage de synérèse devient très faible et globalement stable dans le temps (J1, J7 et J14). La synérèse est largement inférieure à celle observée pour les systèmes maigres, ce qui est en accord avec la littérature (Aguilera et al, 1993; Keogh & O'Kennedy, 1998). Un réseau protéique renforcé et davantage de liens établis entre les éléments du système peuvent expliquer la diminution de la synérèse. L'ajout d'agrégats fractals est cependant légèrement moins efficace que l'ajout de PS, même si le comportement global est similaire. Ces résultats conduisent à l'hypothèse que les interactions avec la matrice ou l'interface des gouttelettes de matière grasse sont certainement assez similaires en présence de PS ou d'agrégats fractals Fa45. Le renforcement du réseau protéique avec l'augmentation de la concentration en protéines dans des systèmes laitiers a déjà été démontré (Delikanli & Ozcan, 2017; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006). Enfin, on remarque qu'il n'y a pas de modification du pourcentage de synérèse dans le temps, donc pas d'effet de la contraction du réseau protéique sur la libération du lactosérum.

### VI.2.3- Microstructure d'un gel acide gras avec ajout de 1% d'agrégats fractals

La microstructure du réseau protéique obtenu avec l'ajout d'agrégats fractals Fa45 a également été observée en microscopie confocale. Un échantillon témoin et un échantillon contenant 1% d'agrégats fractals et 3,5% de MG ont été observés après 6 h à 40 °C (Figure 59).



**Figure 59** : Photographies en microscopie confocale de gels acides gras (3,5% MG) témoin et avec 1% d'agrégats fractals Fa45

Comme précédemment, la matière grasse apparaît bien répartie au sein du gel et semble connectée au réseau protéique. Le réseau protéique obtenu est plus dense et plus connecté en présence d'agrégats fractals que pour le système témoin, en accord avec les propriétés rhéologiques obtenues ainsi qu'avec les analyses de la synérèse.

## VI.4- Ajout d'agrégats microgels

De la même façon, l'influence de l'ajout d'agrégats microgels (de 0,6 à 1,5%) a également été analysée. Comme les résultats sur les systèmes maigres ne montraient pas de variations aux plus faibles concentrations (0,2 et 0,4%), l'ajout de faibles quantités de microgels n'a pas été testé sur les systèmes gras, alors que la gamme de concentration a été étendue jusqu'à 1,5%. Comme pour les systèmes avec ajout de PS et d'agrégats fractals les propriétés rhéologiques, des mesures de la synérèse et des observations en microscopie confocale ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales (homogénéisation à 100 bars et traitement thermique de 11 min à 90 °C à J1). En présence de microgels, il a été vérifié que les gouttelettes de matière grasse ont également un diamètre moyen de 0,8 µm.

### VI.4.1- Propriétés rhéologiques des gels acides gras avec ajout d'agrégats microgels

Le Tableau XXIV présente les résultats des analyses rhéologiques et les pH de gélification obtenus pour des laits avec 3,5% de MG contenant 0,6, 1 et 1,5% d'agrégats microgels.

**Tableau XXIV** : Résultats moyens et écart-types pour les mesures rhéologiques et de pH des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout d'agrégats microgels (acidification par GDL à 40 °C)

Echantillons		Temps gélification	pH gélification	Amplitude tan $\delta$	G' final (Pa)	Pente G' (BF)
<i>Moyenne témoin</i>		<i>29,4 min</i>	<i>5,45</i>	<i>0,53</i>	<i>340</i>	<i>0,150</i>
0,6% microgels	Moyenne	30,5 min	5,42	0,52	364	0,168
	Ecart-type	1,3	0,01	0,007	5	0,001
1% microgels	Moyenne	33,6	5,42	0,50	366	0,152
	Ecart-type	0	0,01	0	11	0
1,5% microgels		33,7 min	5,42	0,49	371	0,156

Le temps de gélification augmente par rapport aux témoins comme déjà observé pour les systèmes maigres, avec une augmentation plus importante pour les deux plus hautes concentrations testées : environ 33,6 min contre 29,4 min pour le témoin. Le pH de gélification obtenu est identique (5,42) pour tous les systèmes contenant des microgels et très légèrement inférieur à celui obtenu pour le gel acide témoin. Ces résultats signifient que contrairement aux PS et aux agrégats fractals, les agrégats microgels n'interagissent pas avec les caséines micellaires au cours de l'acidification en accélérant leur déstabilisation. Au contraire, il semblerait que ce type d'agrégat produise un effet inverse, ralentissant légèrement la gélification du système mais toujours à un pH de 5,42. Cela signifie que le pouvoir tampon augmente légèrement avec la quantité d'agrégats ajoutée.

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

Les résultats des modules élastiques obtenus en fin de cinétique d'acidification sont comparés à ceux obtenus avec l'ajout de PS et d'agrégats fractals (Figure 60).

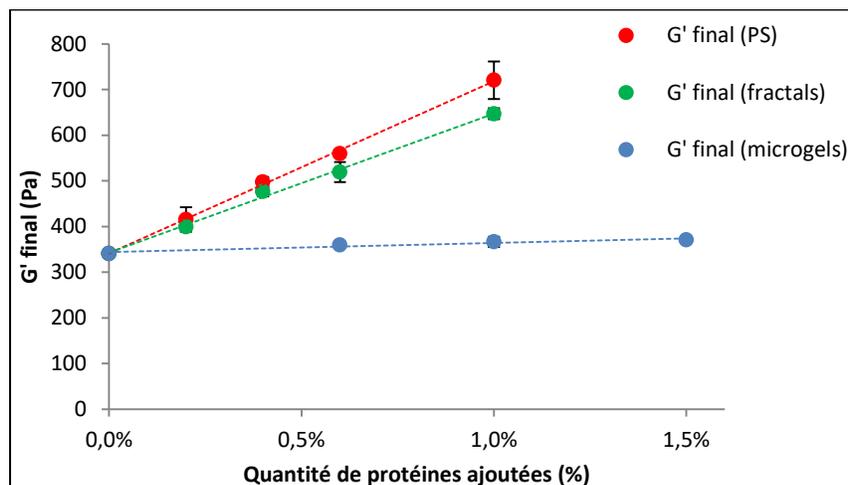


Figure 60 : Evolution du  $G'$  final en fonction de la quantité d'agrégats microgels ajoutée dans des gels acides gras

Quelle que soit la concentration d'agrégats microgels ajoutée, les valeurs sont proches des résultats obtenus sur les gels acides gras témoins, et bien inférieures à celles obtenues en présence de PS et d'agrégats fractals. Il est donc probable que les agrégats microgels ne se connectent à aucun composant du système pour renforcer et influencer la texture, comme c'est le cas dans les systèmes maigres. De la même façon, leur taille plus grande et leur densité plus élevée par rapport aux PS et aux agrégats fractals, les conduisent à avoir un rôle inerte dans le réseau protéique, en accord avec les résultats obtenus par Liu, Buldo, et al. (2016).

Ces résultats sont cependant différents de ceux rapportés par Torres et al. (2018), qui montrent une augmentation de la texture des yaourts lors de l'ajout de tels agrégats, ce qui a été attribué à un remplissage actif des agrégats établissant des connexions avec le réseau de protéines. Les auteurs ont souligné que des protéines sériques natives résiduelles persistaient dans les agrégats utilisés, expliquant leur effet fonctionnel plus important après traitement thermique. Dans notre cas, très peu de protéines sériques natives résiduelles sont présentes dans les échantillons (Loiseleux et al., 2018) et l'augmentation des quantités d'agrégats microgels qui entraîne une faible augmentation des PS natives résiduelles, n'entraîne pas de modification des propriétés rhéologiques. De plus, les agrégats utilisés dans cette étude sont produits à une température plus élevée que ceux utilisés par Torres et al. (2018), ce paramètre étant potentiellement à l'origine des différences de fonctionnalité. Les agrégats microgels qui sont ajoutés dans nos systèmes semblent être des structures très stables et incapables de créer des connexions avec les autres éléments du système.

#### VI.4.2- Evolution de la synérèse sur les gels acides gras avec ajout d'agrégats microgels

La Figure 61 présente les résultats du pourcentage de synérèse dans le temps pour l'ajout de 0,6 à 1,5% d'agrégats microgels ainsi que les résultats obtenus pour les systèmes témoins.

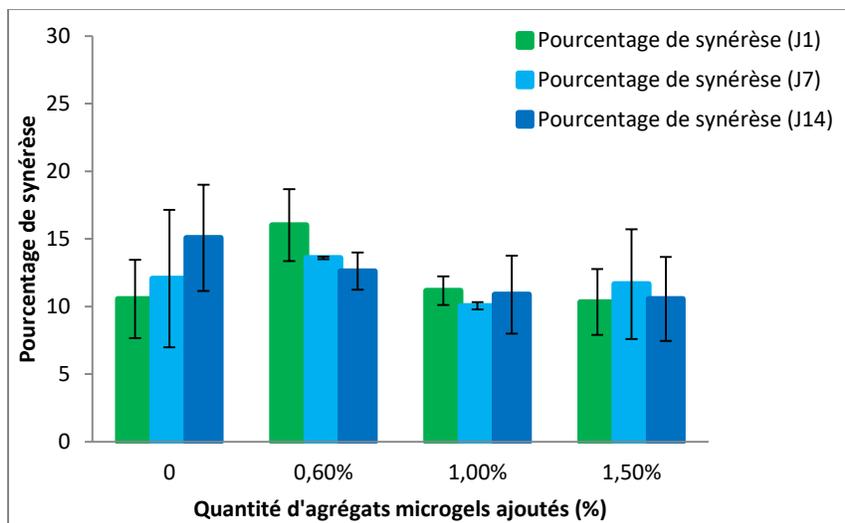


Figure 61 : Analyse de la synérèse dans le temps des gels acides gras (3,5% MG) avec ajout d'agrégats microgels

Les résultats montrent peu de variation de la synérèse selon la concentration et également peu de différence par rapport au témoin : entre 10 et 15% de synérèse. Cela confirme l'hypothèse que ce type d'agrégat présente plutôt un rôle passif et ne participe pas à la structuration du réseau protéique, contrairement aux agrégats fractals et aux PS. Cependant, leur incorporation dans le lait permet d'augmenter la concentration protéique des gels acides gras sans augmenter la force des gels.

#### VI.4.3- Analyse en microscopie confocale d'un gel acide gras avec ajout de 1% d'agrégats microgels

Un échantillon témoin et un échantillon contenant 1% d'agrégats microgels et 3,5% de matière grasse ont été observés après 6 h d'acidification à 40 °C (Figure 62).

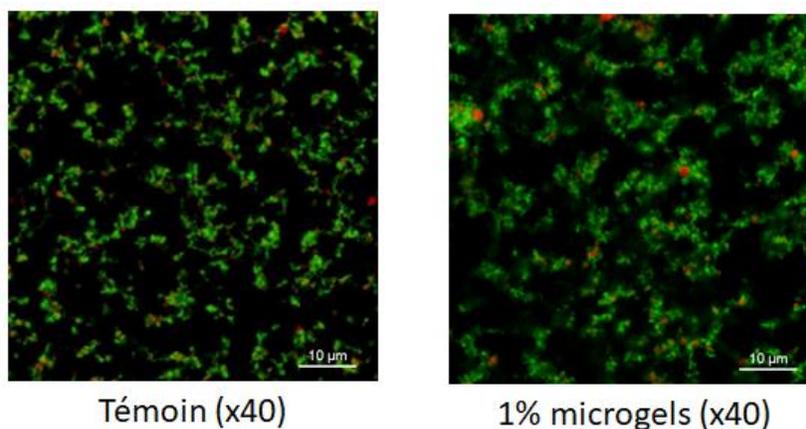


Figure 62 : Photographies en microscopie confocale de gels acides gras (3,5% MG) témoin et avec 1% d'agrégats microgels

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

En présence d'agrégats microgels, la structure du réseau protéique apparaît assez proche de celle observée pour le gel témoin. Le réseau protéique semble très légèrement plus épais avec des pores plus larges. Les gouttelettes de matière grasse comme pour les autres gels acides sont bien réparties dans le réseau. Ces observations peuvent expliquer les résultats rhéologiques qui donnent un module élastique final proche de la valeur obtenue pour les systèmes témoins. Les agrégats microgels étant denses et moins nombreux, ils occupent une fraction volumique moindre dans le lait et sont moins en mesure de se connecter au réseau de protéines pour participer à sa structuration, peut-être en raison de leur mode de production.

### VI.5- Ajout d'agrégats mixtes

Les mêmes concentrations ont été testées pour les agrégats mixtes : de 0,6 à 1,5%. Suite aux différents traitements appliqués sur le lait, des gouttelettes de matière grasse similaires aux autres systèmes avec un diamètre moyen de 0,8  $\mu\text{m}$  ont été obtenus.

#### VI.5.1- Propriétés rhéologiques des gels acides gras avec ajout d'agrégats mixtes

Le Tableau XXV présente les résultats des analyses rhéologiques et les pH de gélification obtenus pour des laits avec 3,5% de MG contenant de 0,6 à 1,5% d'agrégats mixtes, les résultats étant toujours comparés aux résultats obtenus pour les gels acides gras témoins.

**Tableau XXV** : Résultats moyens et écart-types pour les mesures rhéologiques et de pH des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout d'agrégats mixtes (acidification par GDL à 40 °C)

Echantillons		Temps gélification	pH gélification	Amplitude $\tan \delta$	G' final (Pa)	Pente G' (BF)
<i>Moyenne témoin</i>		<i>29,4 min</i>	<i>5,45</i>	<i>0,53</i>	<i>340</i>	<i>0,150</i>
0,6% mixtes	Moyenne	29,7 min	5,45	0,50	369	0,158
	Ecart-type	1,6	0,02	0	4	0,001
1% mixtes	Moyenne	31,4 min	5,41	0,49	358	0,163
	Ecart-type	0,8	0,02	0,01	10	0,002
1,5% mixtes	Moyenne	32,4	5,35	0,47	362	0,168
	Ecart-type	0,7	0,01	0	11	0,001

Les analyses rhéologiques montrent une augmentation du temps de gélification par rapport au témoin, ce qui signifie que ce type d'agrégat n'entraîne pas la déstabilisation précoce des caséines micellaires. Ces résultats sont très similaires à ceux obtenus avec l'ajout d'agrégats microgels. En revanche, une diminution du pH de gélification est obtenue avec l'augmentation de la concentration d'agrégats mixtes

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

ajoutée, ce qui montrerait moins d'interactions avec les micelles et une diminution du pouvoir tampon. Ces résultats montrent que l'ajout d'agrégats mixtes freine la gélification des systèmes et la mise en place du réseau protéique. Les modules conservatifs obtenus en fin de cinétique d'acidification avec ajout d'agrégats mixtes ainsi que ceux des autres systèmes sont présentés dans la Figure 63 :

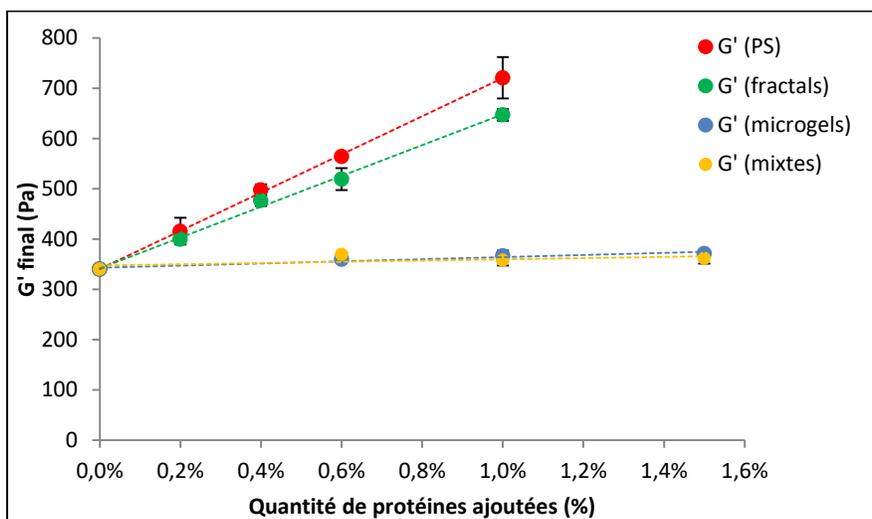


Figure 63 : Evolution du G' final en fonction de la quantité d'agrégats mixtes ajoutés dans les gels acides gras

Les modules conservatifs des gels acides gras n'évoluent pas en fonction de la concentration en agrégats mixtes ajoutés, comme en présence de microgels. Le même comportement avait été observé lors de l'étude des systèmes maigres. Ce comportement peut s'expliquer par une non interaction non seulement avec la matière grasse du système, mais également par un rôle inerte vis-à-vis du réseau protéique, en accord avec les résultats obtenus par Liu, Buldo, et al. (2016).

La stabilité du module élastique lors de l'ajout de concentrations croissantes d'agrégats mixtes est surprenante, sachant que des agrégats assez similaires sont formés *in situ* via la mise en place de ponts disulfure entre les caséines micellaires et les protéines sériques lors du traitement thermique d'un lait classique (Anema & Li, 2000; Haque & Kinsella, 1988; Jang & Swaisgood, 1990). Dans le cas d'un lait classique, les agrégats mixtes ainsi que les agrégats fractals se forment au cours du traitement thermique (généralement réalisé entre 85 et 95 °C durant 5 à 15 min à un pH d'environ 6,7) induisant une augmentation de la force du gel (Donato & Guyomarc'h, 2009; Mahmoudi et al., 2011, 2010; Vasbinder et al., 2001). En revanche dans notre cas, l'ajout des agrégats mixtes préformés n'augmente pas la force du gel ; le traitement thermique appliqué (1 h à 80 °C) lors de leur formation initiale en solution à pH 6,3 est peut être responsable de cette inertie. Cela signifie qu'il s'agit de structures très stables avec des fonctionnalités différentes des agrégats mixtes formées *in situ* dans le lait.

### VI.5.2- Evolution de la synérèse sur les gels acides gras avec ajout d'agrégats mixtes

La Figure 64 présente les résultats du pourcentage de synérèse dans le temps pour l'ajout de 0,6 à 1,5% d'agrégats mixtes ainsi que les résultats obtenus pour les systèmes témoins.

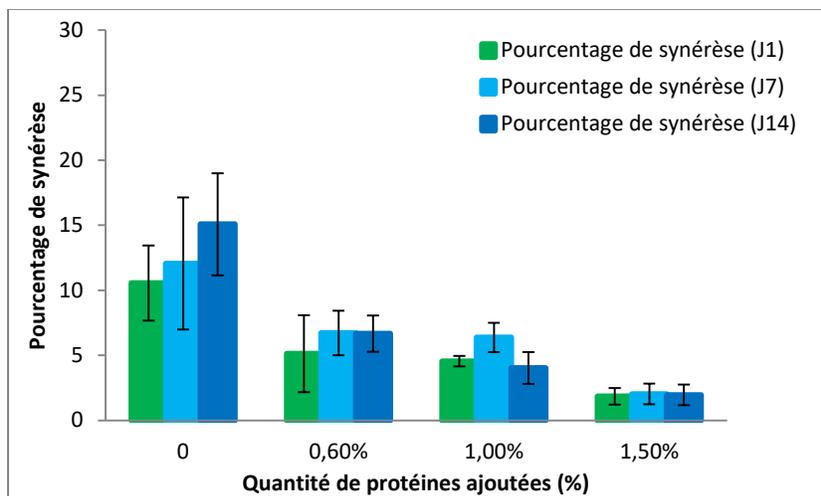


Figure 64 : Analyse de la synérèse dans le temps des gels acides gras (3,5% MG) avec ajout d'agrégats mixtes

Les agrégats mixtes permettent une diminution de la synérèse par rapport au témoin, contrairement aux microgels. Cependant, cette diminution est bien moins forte qu'en présence d'agrégats fractals ou de PS. La libération du lactosérum est gênée, probablement en raison de leur capacité de rétention d'eau ou par un effet sur la taille des pores du gel, et les résultats sont globalement stables dans le temps. Ce type d'agrégats permet donc d'obtenir des gels avec une fermeté stable quelle que soit la concentration ajoutée mais en diminuant le phénomène de synérèse aux plus fortes concentrations testées : le pourcentage de synérèse est d'environ 2% avec l'ajout de 1,5% d'agrégats mixtes.

### VI.5.3- Microstructure d'un gel acide gras avec ajout de 1% d'agrégats mixtes

Un échantillon témoin et un échantillon contenant 1% d'agrégats mixtes et 3,5% de MG ont été observés après 6 h d'acidification à 40 °C (Figure 65).

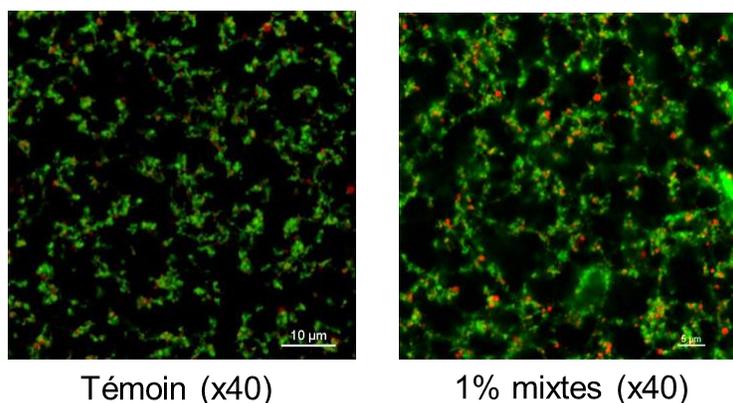


Figure 65 : Photographies en microscopie confocale de gels acides gras (3,5% MG) témoin et avec 1% d'agrégats mixtes

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

---

On observe un réseau également plus hétérogène que pour l'ajout de PS ou d'agrégats fractals. En revanche, le réseau semble un peu plus structuré que pour le gel témoin et que pour l'ajout de microgels. Cela peut être mis en corrélation avec les résultats précédant de l'analyse du pourcentage de synérèse. Les agrégats mixtes semblent pouvoir jouer un rôle dans le réseau de protéines, car la synérèse est réduite, mais il ne s'agit probablement que d'un rôle de remplisseur inerte avec une capacité de rétention d'eau. Les modules élastiques finaux obtenus sont toujours proche de la valeur du témoin. La préparation *ex situ* d'agrégats mixtes et leur addition au lait n'ont pas conduit aux mêmes résultats que lorsque ces agrégats sont formés *in situ*, ce qui laisse penser qu'ils ont des structures différentes, donnant des fonctionnalités différentes. Cela serait dû à leur pH de formation (6,3). Lorsque le traitement thermique du lait est réalisé à pH 6,7, il conduit à la formation de davantage d'agrégats solubles de PS que lorsqu'il est réalisé à un pH inférieur à environ 6,3 (Anema, Lee, Lowe, & Klostermeyer, 2004; Lucey, Tamehana, et al., 1998b; Vasbinder & De Kruif, 2003).

Dans cette partie sur l'utilisation de différents types d'agrégats protéiques à différentes concentrations dans des systèmes contenant de la matière grasse, nous pouvons conclure que l'ensemble des résultats est dépendant du type d'agrégats ajoutés. Les PS et les agrégats fractals donnent :

- des gels acides avec une fermeté plus élevée,
- une gélification plus rapide,
- une séparation du lactosérum plus faible,
- une microstructure plus dense.

En revanche, les agrégats mixtes et les microgels :

- n'interagissent pas ou très faiblement avec les protéines présentes dans le lait,
- entraînent la formation d'un réseau de protéines à faible connectivité,
- n'augmentent pas la fermeté des gels.

Liu et al. (2016) obtenaient les mêmes conclusions, dans leurs travaux portant sur l'impact de différents types d'agrégats de protéines de tailles variables sur les propriétés texturales et microstructurales de systèmes modèles de lait acidifiés sans matière grasse. Ce qui veut dire qu'il n'y a probablement pas d'interactions avec les protéines adsorbées sur les gouttelettes de matière grasse et que les variations de texture sont seulement dues aux interactions des différents agrégats dans la phase continue.

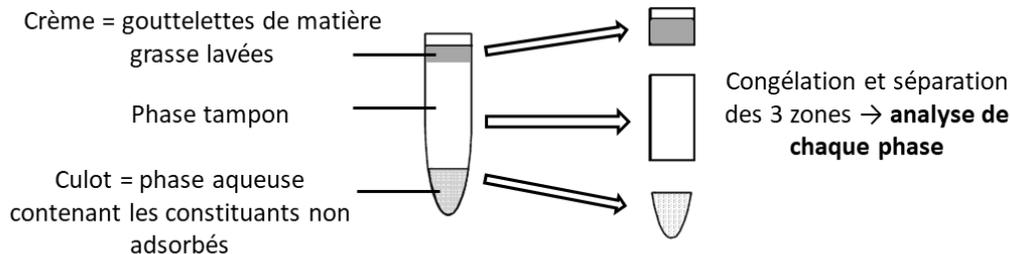
**La nature des agrégats ne semble pas être le seul paramètre à prendre en compte : leur taille semble également être un paramètre clé de la modulation des propriétés rhéologiques des gels laitiers acides.**

## VI.6- Détermination de la composition interfaciale de gels acides gras laitiers

Pour vérifier l'hypothèse que les agrégats n'interagissent pas avec la surface des gouttelettes de matière grasse, la composition de l'interface a été analysée par la méthode décrite par Patton & Huston (1986). Les échantillons analysés sont un lait témoin et un lait contenant 1% d'agrégats fractals Fa45 contenant chacun 3,5% de matière grasse et homogénéisés à 100 bars. Pour cette partie les analyses ont été réalisées seulement en présence d'agrégats fractals, car c'est uniquement avec eux que l'on observe une réelle influence sur les propriétés rhéologiques. La composition de chacune des phases a été déterminée en réalisant une électrophorèse SDS-PAGE en condition réductrice et non réductrice. Sur les gels d'électrophorèse ont été déposés le lait témoin et le lait contenant 1% d'agrégats fractals et les trois phases correspondant aux laits analysés obtenues par la méthode de séparation qui sont :

- La crème : phase contenant les gouttelettes de matière grasse lavées
- La phase tampon : solution tampon de saccharose (non montré)
- Le culot : phase aqueuse contenant les constituants non adsorbés.

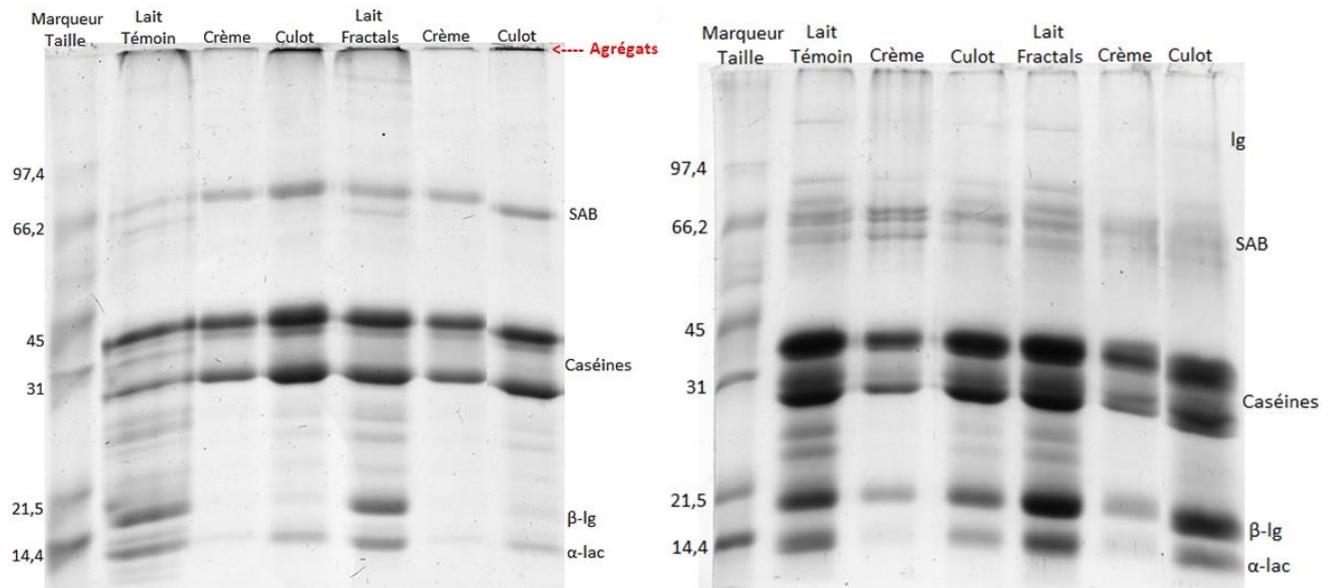
Les trois phases sont représentées sur la Figure 66 :



**Figure 66** : Représentation schématique des 3 phases (crème, phase tampon et culot) séparées par la méthode de Patton & Huston (1986)

Les Figure 67 présentent les gels d'électrophorèse réalisés avec le lait témoin et le lait contenant 1% de Fa45 obtenus en condition non réductrice puis réductrice.

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques



**Figure 67 :** Gel d'électrophorèse en condition non réductrice (droite) et réductrice (gauche) pour des laits à 3,5% MG et homogénéisé à 100 bars (témoin et avec 1% d'agrégats fractals Fa45)

Les profils d'électrophorèses du lait témoin et du lait avec l'ajout de 1% d'agrégats fractals montrent toutes les protéines du lait : l'albumine sérum bovine (SAB), les caséines, la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine que ce soit en condition non réductrice et réductrice.

**En condition non réductrice**, dans la phase culot contenant les constituants non absorbés, toutes les protéines du lait sont également présentes. Les protéines principales sont des caséines, et des traces de  $\beta$ -lactoglobuline et d' $\alpha$ -lactalbumine sont également observées. De plus, on observe des agrégats de protéines qui n'ont pas migré situés au sommet du gel (indiqué par la flèche rouge); ces agrégats sont essentiellement retrouvés dans la phase culot qui contient les constituants non adsorbés à l'interface des gouttelettes de matière grasse.

Dans la phase crème des laits témoin et avec l'ajout de 1% d'agrégats fractals sont retrouvées essentiellement des caséines. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie, comme expliqué précédemment, dans un système contenant une majorité de caséines, celles-ci s'adsorbent préférentiellement à l'interface par rapport aux agrégats de protéines sériques (Srinivasan et al., 1996; Ye, 2008). Et comme on peut le voir sur l'électrophorèse, l'interface des gouttelettes de matière grasse est saturée de caséines, ce qui avait déjà pu être montré dans les études de Chevallier et al. (2016, 2018). Ces résultats permettent de conforter les hypothèses précédentes qui supposaient que l'interface des gouttelettes de matière grasse des systèmes à 3,5% de matière grasse et homogénéisés à 100 bars

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

est composée essentiellement des caséines du lait. De plus, dans le lait contenant 1% d'agrégats fractals et 3,5% de matière grasse, les agrégats n'ont pas accès à l'interface des gouttelettes de matière grasse, en effet, ils sont retrouvés uniquement dans le culot. Cela confirme l'hypothèse que l'augmentation de la fermeté des gels lorsque l'on ajoute des agrégats fractals dans le lait est dû uniquement à un rôle des agrégats dans la phase continue du lait et non pas à l'interface des gouttelettes de matière grasse.

Le gel d'électrophorèse **en condition réductrice** montre également que l'interface des gouttelettes de matière grasse représenté par la phase crème pour les deux compositions testées : témoin et avec ajout de 1% d'agrégats fractals est majoritairement composée de caséines et d'une très faible quantité de protéines sériques ( $\beta$ -lg et  $\alpha$ -lac). Ces protéines sériques sont très probablement présentes naturellement dans le lait car on n'observe pas de différence entre les bandes obtenus pour le lait témoin et le lait avec l'ajout d'agrégats fractals. De plus comme expliqué précédemment, en condition non réductrice, on retrouve uniquement des agrégats dans le culot et pas dans la crème.

Enfin, la concentration protéique de chacune des 3 phases du lait témoin et du lait contenant 1% d'agrégats fractals séparés par la méthode de Patton & Huston (1986) a été déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm (Tableau XXVI) :

**Tableau XXVI** : Concentration protéique des différentes phase (crème, tampon, culot) d'un lait témoin et avec 1% fractals

Concentration (g/l)	Lait témoin			Lait avec 1% fractals		
	Crème	Tampon	Culot	Crème	Tampon	Culot
	5,7	0,9	13,8	5,5	0,8	17,9

Les mêmes concentrations protéiques sont ainsi retrouvées dans la crème du lait témoin et dans la crème du lait enrichi en agrégats fractals, ainsi que dans les phases tampons. En revanche, la concentration protéique augmente dans le culot du lait avec ajout d'agrégats fractals. Cette phase contient les constituants protéiques non adsorbés à l'interface des gouttelettes de matière grasse. Cela confirme bien que les agrégats fractals ajoutés dans le lait n'ont pas accès à l'interface. L'augmentation des modules conservatifs obtenus en rhéologie et la diminution de la synérèse lorsque l'on ajoute des agrégats fractals sont bien dus uniquement à un rôle de ces agrégats dans la phase continue.

### VI.7- Conclusions sur les gels acides gras laitiers

Les différentes analyses réalisées sur les gels acides gras contenant 3,5% MG et homogénéisés à 100 bars, ont montré des résultats dépendants du type d'agrégats ajoutés aux systèmes.

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

Utiliser différents types d'agrégats protéiques permet d'obtenir des gels acides laitiers contenant de la matière grasse avec des propriétés physiques variées. En effet, la texture, représentée notamment par la force du gel peut être modulée selon le type d'agrégats protéiques utilisés. Elle est renforcée en augmentant la concentration en protéines sériques ou en agrégats fractals et reste stable en présence d'agrégats mixtes et de microgels. De plus, le phénomène de synérèse peut être quasiment éliminé dans ces systèmes par addition de protéines sériques ou d'agrégats fractals.

Les principales conclusions et les intérêts majeurs que l'on peut retenir pour l'utilisation des différents agrégats sont regroupés dans le Tableau XXVII suivant :

**Tableau XXVII** : Conclusions sur les gels acides gras à 3,5% MG avec protéines sériques ou agrégats protéiques

<b>Agrégats protéiques</b>	<b>Protéines sériques</b>	<b>Agrégats fractals</b>	<b>Agrégats microgels</b>	<b>Agrégats mixtes</b>
<b>Rhéologie</b>	↗ force des gels avec la concentration ↗ pH gélification	↗ force des gels avec la concentration (< ajout PS) ↗ pH gélification	Force stable jusqu'à 1,5% microgels pH gélification stable	Force stable jusqu'à 1,5% mixtes ↘ pH gélification
<b>Synérèse</b>	Très forte diminution (proche de 0 à partir de 0,4% de PS)	Très faible à partir de 0,6% de fractals	Pas de diminution avec ↗ concentration	Baisse de la synérèse avec ↗ concentration
<b>Structure</b>	Réseau dense et homogène (très structuré)	Réseau dense et homogène (très structuré)	Réseau hétérogène (zone lactosérum marqué)	Réseau hétérogène (zone lactosérum moins marqué)
<b>Intérêts majeurs</b>	<b>Renforcement des gels, élimination de la synérèse</b> → PS les plus efficaces	<b>Renforcement des gels, élimination de la synérèse, texture légèrement différente de celle avec PS</b>	<b>Enrichissement en protéines sans augmentation de fermeté</b>	<b>Enrichissement en protéines sans augmentation de fermeté, limitation de la synérèse</b>

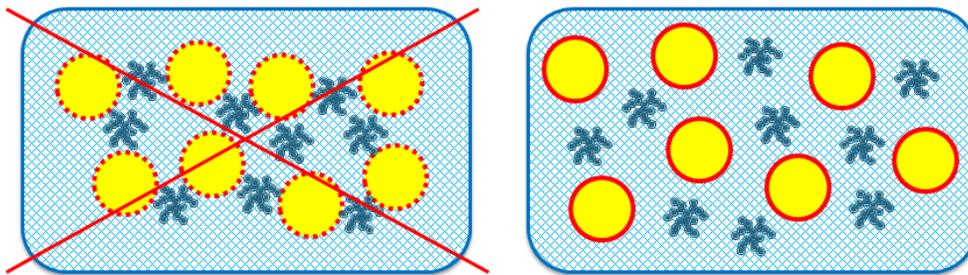
Toutefois, les résultats ont montré que la modulation des propriétés physiques des gels acides gras par les agrégats s'effectue au niveau de la phase continue, et non pas *via* l'interface, en raison de l'adsorption prioritaire des caséines très majoritaires dans le lait.

## Chapitre 6 : Modulation des propriétés des gels acides gras laitiers à 3,5% de matière grasse par addition d'agrégats protéiques

Les différents agrégats ne jouent pas le même rôle dans la formation du réseau de protéines : les protéines sériques et les agrégats fractals créent un nombre plus élevé de connexions ou des connexions plus fortes dans le réseau, ce qui renforce le réseau protéique et réduit la synérèse. Les agrégats microgels et les mixtes se comportent davantage comme des matériaux inertes. Les agrégats mixtes induisent cependant une diminution de la synérèse. Ces deux types d'agrégats permettent la formulation de gels laitiers acides enrichis en protéines, dotés de propriétés rhéologiques stables.

La Figure 68 présente l'hypothèse initiale de la composition d'un réseau protéique contenant des agrégats fractals lorsque les caséines ne sont pas en excès.

Dans ce système, les agrégats peuvent accéder à l'interface des gouttelettes de matières grasses et ainsi connecter les gouttelettes de matière grasse entre-elles. Cette hypothèse a été écartée pour les systèmes étudiés dans les conditions expérimentales choisies. Le second schéma illustre la structuration probable des systèmes obtenus. Les gouttelettes de matière grasse présentent une interface recouverte de caséines. Les agrégats fractals sont inclus dans le réseau de protéines continu et connectés à celui-ci.



**Figure 68** : Schéma représentant les hypothèses de structure des gels acides laitiers contenant des agrégats fractals : les caséines sont en rouge, les agrégats fractals en bleu foncé et le réseau de protéines continu en bleu clair

L'ensemble des analyses réalisées dans ce chapitre a montré que les agrégats testés ont uniquement un rôle dans la phase continue des systèmes à cause de la saturation de l'interface par les caséines. Par contre, les différents agrégats ont des fonctionnalités différentes avec un rôle actif pour les agrégats fractals et les protéines sériques ou passif pour les agrégats mixtes et les microgels.

Dans la suite du travail, différents paramètres pouvant moduler la surface interfaciale ont été testés pour favoriser l'adsorption à l'interface des agrégats protéiques. Les microgels ont été écartés des études au vu des résultats obtenus sur les gels acides contenant 3,5% de matière grasse. En effet, le seul effet obtenu est un enrichissement en protéines des produits sans changement de leur texture. De plus, les résultats étaient toujours proches de ceux des agrégats mixtes, nous avons décidé de nous consacrer à l'étude de ce type d'agrégat, plus original.

## **Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?**



## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Nous avons pu mettre en évidence dans le chapitre précédant qu'il est possible de moduler la texture de gels acides laitiers à 3,5% de matière grasse en utilisant différents types d'agrégats protéiques. En revanche, les résultats ont montré que cette modulation de texture découle plutôt d'une action des agrégats dans la phase continue du lait et non d'interactions des agrégats avec l'interface des gouttelettes de matière grasse. Cela est dû au fait que les caséines sont très majoritaires dans les protéines du lait, puisque présentes à environ 80%, et qu'elles s'adsorbent préférentiellement à l'interface, au détriment des autres agents tensio-actifs, comme les agrégats (Srinivasan et al., 1996; Ye, 2008). Or, l'un des objectifs de ce projet de thèse était de contrôler la texture des gels acides en modulant la composition interfaciale par adsorption des agrégats à l'interface.

Des études précédentes ont déjà pu mettre en évidence que l'on peut moduler la surface interfaciale et la texture des émulsions en jouant sur la concentration en matière grasse ou encore en modifiant la pression d'homogénéisation appliquée (Jost et al., 1986). En effet, l'homogénéisation permet de diminuer la taille des gouttelettes de matière grasse (Lucey & Singh, 1998). Au cours de la formation des gels laitiers, les gouttelettes de matière grasse peuvent faire partie intégrante du réseau protéique notamment par la présence des caséines à leur interface ce qui augmente la texturation (Chen & Dickinson, 1998). Dans ce cas, l'augmentation de la surface interfaciale permet d'augmenter la fermeté des gels laitiers par l'effet de multiplication des interactions au sein du réseau protéique (Aguilera & Kinsella, 1988; Cano-Ruiz & Richter, 1997; Dickinson & Chen, 1999).

**Travailler sur la pression d'homogénéisation et la teneur de matière grasse permet de faire varier la surface interfaciale disponible dans le but d'augmenter les possibilités de connexions entre les protéines présentes dans le lait et les gouttelettes de matière grasse. Augmenter la surface interfaciale pourrait de surcroit limiter la saturation de l'interface en caséines et permettrait aux agrégats d'accéder à celle-ci.**

Pour tester cette hypothèse, nous avons :

- dans un premier temps, fait varier la pression d'homogénéisation (de 50 à 500 bars) dans des laits témoins contenant 3,5% de matière grasse et dans des laits auxquels 1% de PS, d'agrégats fractals ou d'agrégats mixtes a été ajouté, dans le but de moduler la taille et le nombre des gouttelettes de matière grasse. Pour l'ensemble de ce chapitre, une concentration de 1% de PS ou d'agrégats a toujours été utilisée ;

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

- dans un deuxième temps, fait varier le taux de matière grasse laitière en comparant des systèmes contenant 3,5 ou 10% de matière grasse afin de déterminer l'affinité des agrégats vis-à-vis de l'interface des gouttelettes de matière grasse et évaluer leur impact sur les systèmes finaux. Les systèmes à 10% de matière grasse ont été homogénéisés à 100 ou 500 bars.

Des agrégats fractals de différentes tailles ont également été testés. En effet, nous avons pu voir dans l'étude sur les systèmes maigres que les propriétés rhéologiques des systèmes finaux étaient variables selon la distribution de tailles des agrégats fractals. De plus, dans d'autres thèses du projet PROFIL, il a pu être mis en évidence que des petits agrégats fractals étaient plus efficaces pour renforcer des systèmes laitiers neutres (Chevallier, 2017; Kharlamova, 2017; Loiseleux, 2017). Pour cette partie, 3 suspensions d'agrégats fractals avec des diamètres moyens différents (68, 93 et 228 nm) ont été ajoutées dans du lait contenant 3,5 ou 10% de matière grasse et homogénéisés à 100 ou 500 bars.

Comme dans le chapitre précédent, la composition interfaciale de certains laits contenant 10% de matière grasse et homogénéisés à 100 bars a également été analysée afin de comprendre comment l'augmentation de la surface interfaciale affecte l'accessibilité de l'interface aux agrégats. Les analyses n'ont cependant pas pu être réalisées à 500 bars car, dans ces conditions, le diamètre des gouttelettes de matière grasse est trop faible et elles ne peuvent pas être séparées par centrifugation. Pour compléter cette analyse de composition de l'interface, des observations en microscopie électronique en transmission ont été réalisées sur des gels acides à 10% de matière grasse et homogénéisés à 100 bars.

Ensuite, la création de ponts disulfures au cours de la formation des gels acides a été évaluée en ajoutant à différentes étapes du protocole de préparation de ces gels, du N-éthylmaléimide (NEM), un agent bloquant la formation de nouvelles liaisons SS. Le NEM a été ajouté soit en début de préparation des différents laits (avec ajout de PS ou d'agrégats fractals) contenant 3,5 ou 10% de matière grasse avant homogénéisation, ou après le traitement thermique, juste avant le début de l'acidification du lait.

Pour évaluer si la composition de l'interface des gouttelettes de matière grasse a vraiment un impact, des laits à 3,5% de MG pour lesquels la matière grasse provient de différents types d'émulsions à 30% MG avec une interface contrôlée ont été étudiés.

Enfin, toujours dans le but d'évaluer l'impact des agrégats à l'interface des gouttelettes de matière grasse, des observations et des analyses rhéologiques ont été réalisées sur des laits très enrichis en matière grasse : 15% de MG et homogénéisés à haute pression : 400 et 500 bars pour maximiser la surface développée.

### VII.1- Variation de la pression d'homogénéisation pour des gels acides laitiers à 3,5% de matière grasse

L'influence de la pression d'homogénéisation sur les systèmes à 3,5% MG a été évaluée. Cette étape permet de moduler la taille des gouttelettes de matière grasse dans le lait et donc faire varier la surface interfaciale disponible. Les pressions d'homogénéisation testées sont : 50 bars, 100 bars (résultats présentés dans le chapitre précédent) et 500 bars. Des analyses rhéologiques ont été réalisées sur des gels acides témoins sans ajout de protéines, et sur des gels contenant 1% de protéines sériques, d'agrégats fractals Fa45 : diamètre moyen de 228 nm, ou d'agrégats mixtes.

La Figure 69 présente le diamètre moyen des gouttelettes de matière grasse obtenues après homogénéisation de laits témoins aux différentes pressions. Les gouttelettes ont un diamètre moyen de 2  $\mu\text{m}$  pour les systèmes homogénéisés à 50 bars, de 0,8  $\mu\text{m}$  pour ceux à 100 bars et de 0,25  $\mu\text{m}$  pour les systèmes produits à 500 bars.

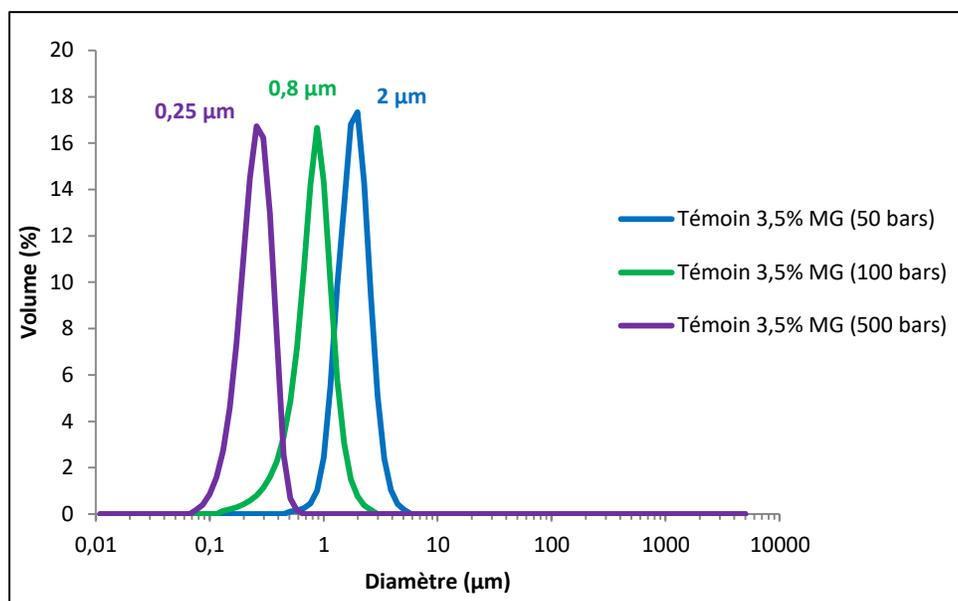


Figure 69 : Dispersion de taille des gouttelettes de matière grasse d'un lait témoin à 3,5% MG et homogénéisé à 50, 100 ou 500 bars

La distribution de taille des gouttelettes de matière grasse est dépendante de la pression d'homogénéisation appliquée au lait (Lucey & Singh, 1998). En revanche, les tailles obtenues ne varient pas avec la structure des protéines ajoutées : agrégats ou protéines sériques. Les résultats pour les 3 pressions testées sont toujours similaires aux résultats des laits témoins, ce qui montre que la quantité de protéines initialement présente dans le lait n'est pas limitante pour réduire la taille des gouttelettes.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Les résultats obtenus en granulométrie permettent d'obtenir la surface spécifique (SSp) exprimée en  $\text{m}^2/\text{g}$  de matière grasse, correspondant à la surface interfaciale. Elle est déterminée à partir du diamètre moyen des particules ( $\mu\text{m}$ ) pondéré en surface ( $d_{3,2}$ ) (cf. : III.5.2). Les valeurs obtenues présentées dans le Tableau XXVIII sont d'environ  $3,3 \text{ m}^2/\text{g}$  pour une homogénéisation à 50 bars,  $8,4 \text{ m}^2/\text{g}$  pour 100 bars et  $26,9 \text{ m}^2/\text{g}$  pour 500 bars donnant des surfaces totales pour des laits contenant 3,5% de matière grasse respectivement de  $0,12 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $0,29 \text{ m}^2/\text{g}$  et  $0,94 \text{ m}^2/\text{g}$ .

**Tableau XXVIII** : Variation de la surface spécifique (SSp) et de la surface totale à 3,5% de matière grasse en fonction de la pression d'homogénéisation

Pression (Bar)	SSp ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Surface totale à 3,5% MG ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
50	3,3	0,12
100	8,4	0,29
500	26,9	0,94

Ces résultats montrent bien que la surface interfaciale augmente en augmentant la pression d'homogénéisation appliquée sur le lait, ce qui est en lien avec la diminution de taille des gouttelettes de matière grasse à plus haute pression.

Les résultats obtenus en rhéologie pour les différents systèmes acidifiés (témoins, laits additionnés de PS, d'agrégats fractals ou mixtes) sont regroupés dans le Tableau XXIX. Le temps et le pH de gélification, ainsi que la valeur du  $G'$  final après 6 h d'acidification, l'augmentation de la valeur de  $G'$  lorsque la pression d'homogénéisation passe de 50 à 100 bars et de 100 à 500 bars, et la pente de  $G'$  obtenus au cours du balayage en fréquence sont indiqués dans le tableau.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

**Tableau XXIX :** Mesures rhéologiques et de pH sur des gels acides gras laitiers (3,5% MG) avec ajout de protéines sériques, d'agrégats fractals Fa45 ou d'agrégats mixtes, homogénéisation à 50, 100 ou 500 bars (acidification par GDL à 40 °C)

Echantillon		Temps gélification	pH gélification	G' max (Pa)	Augmentation du G' (Pa)	Pente G' (BF)
Témoin	50 bars	27,7 min	5,47	286	/	0,152
	100 bars	29,4 min	5,45	340	54	0,150
	500 bars	32,6 min	5,40	497	157	0,138
1% PS	50 bars	18,2 min	5,61	666	/	0,138
	100 bars	18,6 min	5,61	721	55	0,140
	500 bars	21,8 min	5,54	758	37	0,142
1% mixtes	50 bars	30,4 min	5,41	303	/	0,164
	100 bars	30,6 min	5,39	368	65	0,163
	500 bars	36,1 min	5,36	458	90	0,154
1% fractals Fa45	50 bars	19,4 min	5,58	541	/	0,131
	100 bars	20,7 min	5,60	647	106	0,133
	500 bars	22,8 min	5,54	807	160	0,135

Augmenter la pression d'homogénéisation, c'est-à-dire la surface interfaciale, entraîne une diminution du pH de gélification et une augmentation du temps de gélification pour l'ensemble des systèmes testés. Ce résultat est plus marqué pour les gels acides témoin et ceux contenant des agrégats mixtes. La diminution de la taille des gouttelettes de matière grasse à haute pression d'homogénéisation entraîne à une concentration identique une forte augmentation de leur nombre et de la surface interfaciale, ce qui peut probablement modifier la formation du réseau protéique pour tous les systèmes étudiés. L'adsorption des protéines à l'interface entraîne des réarrangements de leur structure. Il a déjà été établi qu'avec une concentration en matière grasse identique dans des gels acides laitiers, les émulsions contenant de plus petites gouttelettes de matière grasse renforçaient les gels de manière plus marquée que les émulsions à grosses gouttelettes de matière grasse, ce qui reflète l'importance du nombre et de la taille des gouttelettes dans les gels (Xiong et al., 1991).

On observe que le temps de gélification le plus long est obtenu en présence d'agrégats mixtes (500 bars), en accord avec les résultats précédents. En effet, nous avons déjà mis en évidence sur les systèmes références contenant 3,5% de MG et homogénéisés à 100 bars présentés dans le point VI.5.1, que ces agrégats n'interagissaient pas avec les caséines micellaires. De plus, la gélification se fait au pH le plus

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

bas, ce qui peut signifier que la présence des agrégats modifie de façon légèrement plus marquée le pouvoir tampon.

Quel que soit le système, les modules conservatifs obtenus en fin de cinétique d'acidification augmentent avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation. Cependant, l'augmentation dépend du type d'agrégats utilisés. Alors que pour tous les systèmes étudiés précédemment (maigres et gras homogénéisés à 100 bars), un renforcement maximal des gels acides était obtenu en présence de PS, la plus forte augmentation du module élastique est atteinte en présence d'agrégats fractals après une homogénéisation à 500 bars. De plus, on observe également une nette augmentation du module final lorsque l'on augmente la pression d'homogénéisation de 50 à 100 bars (+106 Pa) et de 100 à 500 bars (+160 Pa) en présence d'agrégats fractals. Cet effet est beaucoup moins marqué en présence de PS. Jusqu'alors l'addition de PS était le moyen le plus efficace d'augmenter la fermeté des gels acides laitiers. Les agrégats fractals semblent avoir un impact plus marqué sur la formation du réseau protéique que l'ajout de PS, cet effet étant d'autant plus marqué que la surface interfaciale est développée.

On remarque une fois de plus que les résultats des gels témoins et des gels avec l'ajout d'agrégats mixtes sont très similaires, ce qui confirme que ce type d'agrégat ne prend pas part à la structuration du réseau protéique et n'interagit pas avec les gouttelettes de matière grasse, dans la limite des conditions testées expérimentalement.

Enfin, on observe une diminution de la pente des balayages fréquence pour les systèmes témoins et avec ajout d'agrégats mixtes lorsque l'on augmente la pression d'homogénéisation, alors que pour l'ajout de PS et d'agrégats fractals les valeurs augmentent. Une pente plus faible pour les 2 premiers systèmes signifie l'obtention d'un réseau sensiblement plus fort et davantage structuré. En revanche, on suppose que pour les systèmes avec l'ajout de PS et d'agrégats fractals, des interactions différentes (peut-être de plus faible énergie) sont mises en place. Dans les deux cas, on obtient une augmentation du module  $G'$  final mais avec également une augmentation de la pente du balayage en fréquence lorsque l'on augmente la pression d'homogénéisation.

## VII.2- Propriétés rhéologiques des gels acides laitiers à 10% matière grasse homogénéisés à 100 ou 500 bars

Afin d'augmenter encore plus la surface interfaciale et le nombre de gouttelettes de matière grasse des systèmes étudiés, la teneur en matière grasse a été augmentée à 10% et l'étape d'homogénéisation a été réalisée à 100 et 500 bars. Les diamètres moyens des gouttelettes de matière grasse obtenues pour des laits témoins sont présentés sur la Figure 70.

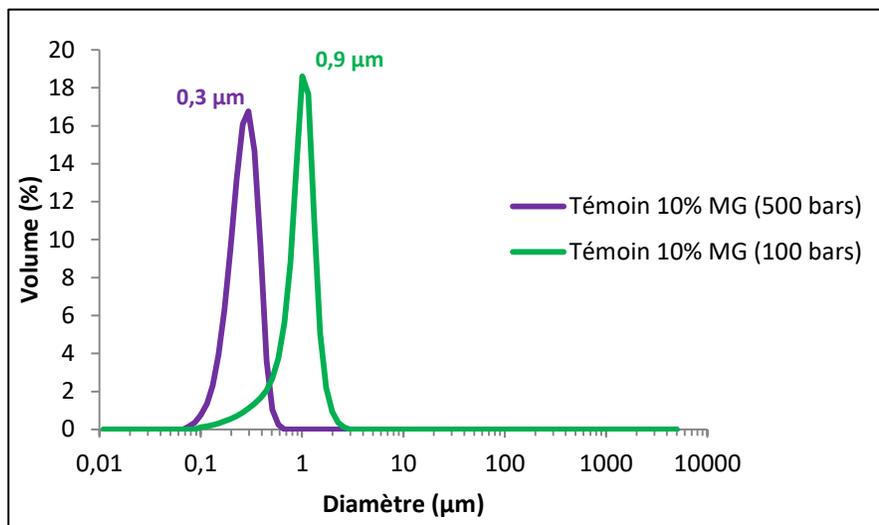


Figure 70 : Dispersion de taille des gouttelettes de matière grasse d'un lait témoin à 10% MG et homogénéisé à 100 ou 500 bars

Dans ces conditions la taille des gouttelettes de matière grasse dépend également de la pression d'homogénéisation appliquée au lait. Les gouttelettes ont un diamètre moyen de 0,9 μm pour tous les systèmes homogénéisés à 100 bars et de 0,3 μm pour ceux obtenus à 500 bars. L'augmentation de la teneur en matière grasse dans les systèmes produit donc à une pression d'homogénéisation équivalente un léger accroissement de la taille moyenne des gouttelettes. Comme précédemment, il a été vérifié que la taille des gouttelettes ne varie pas avec la nature des agrégats ajoutés (fractals Fa45 ou mixtes) ou lorsque l'on ajoute des PS.

Les SSp correspondant à la surface interfaciale ont également été déterminées pour les laits contenant 10% de matière grasse comme on peut le voir dans le Tableau XXX. Elles sont d'environ 8,2 m<sup>2</sup>/g pour une homogénéisation à 100 bars et 23,9 m<sup>2</sup>/g pour 500 bars donnant des surfaces totales pour des laits contenant 10% de matière grasse respectivement de 0,82 m<sup>2</sup>/g et 2,4 m<sup>2</sup>/g.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

**Tableau XXX** : Variation de la surface spécifique (SSp) et de la surface totale à 10% de matière grasse en fonction de la pression d'homogénéisation

Pression (Bar)	SSp (m <sup>2</sup> /g)	Surface totale à 10% MG (m <sup>2</sup> /g)
100	8,2	0,82
500	23,9	2,4

Ceci montre qu'on a une augmentation considérable de la surface interfaciale lorsque l'on augmente la quantité de matière grasse avec des gouttelettes de taille presque identique aux systèmes réalisés avec 3,5% de MG ce qui montre également qu'on a une forte augmentation du nombre de gouttelettes de matière grasse.

Les résultats des analyses rhéologiques sont présentés dans le Tableau XXXI pour des gels acides témoin et avec ajout de PS, d'agrégats fractals Fa45 ou d'agrégats mixtes contenant 10% de matière grasse et homogénéisés à 100 ou 500 bars.

**Tableau XXXI** : Mesures rhéologiques et de pH sur des gels acides gras laitiers (10% MG) avec ajout de protéines sériques, d'agrégats fractals Fa45 ou d'agrégats mixtes, homogénéisation à 100 ou 500 bars (acidification par GDL à 40 °C)

Echantillons		Temps gélification	pH gélification	G' max (Pa)	Augmentation du G' (Pa)	Pente G' (BF)
Témoin	100 bars	29,7 min	5,46	561	/	0,137
	500 bars	27,6 min	5,48	811	250	0,121
1% PS	100 bars	17,9 min	5,60	1040	/	0,140
	500 bars	25,2 min	5,50	<b>1322</b>	282	0,127
1% mixtes	100 bars	29,6 min	5,4	586	/	0,148
	500 bars	29,2 min	5,41	908	322	0,129
1% fractals Fa45	100 bars	19,3 min	5,62	951	/	0,133
	500 bars	14,5 min	5,68	1279	<b>328</b>	0,121

L'évolution des pH et temps de gélification est différente selon le type de protéine ajoutée. En présence de PS, le temps de gélification augmente comme précédemment lorsque l'on augmente la pression d'homogénéisation. Etant donné que la surface interfaciale est dans ces conditions très importante, on peut penser qu'une partie des protéines sériques ajoutées est adsorbée sur les gouttelettes de matière grasse, ce qui entraîne leur dénaturation. Beaucoup moins d'agrégats de PS pouvant interagir avec les caséines micellaires seraient ainsi formés au cours du traitement thermique, retardant ainsi la gélification. En revanche, en présence d'agrégats fractals, le temps de gélification diminue avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation, les agrégats fractals déjà préformés pourraient agir

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

dans le système comme précédemment en favorisant la mise en place du réseau protéique rapidement. De plus, le pH de gélification varie de façon opposée entre les systèmes avec ajout de PS (diminution à 500 bars) et d'agrégats fractals (augmentation à 500 bars). Les agrégats sont plus hydrophobes, ce qui entraîne une augmentation du pH de gélification (Morand et al., 2012). Le pH reste plutôt stable pour les autres systèmes (témoin et avec agrégats mixtes).

Dans ces conditions, le module conservatif est légèrement plus élevé avec l'ajout de PS par rapport à l'utilisation des agrégats fractals (environ 100 Pa de plus pour 100 bars et 40 Pa pour 500 bars). En revanche, l'augmentation de la pression d'homogénéisation de 100 à 500 bars a un effet plus important en présence d'agrégats fractals. Pour ces systèmes à 10% de matière grasse, il est difficile d'affirmer que les agrégats fractals Fa45 ou les PS jouent un rôle à l'interface mais il est évident qu'ils assurent une fonction importante dans la formation du réseau protéique et sa consolidation.

On obtient pour l'ensemble des systèmes une diminution de la pente du balayage fréquence lorsque la pression d'homogénéisation est augmentée ce qui témoigne que l'on obtient des gels plus structurés.

Des résultats proches sont obtenus une fois de plus pour les gels acides gras témoin et avec ajout d'agrégats mixtes ; même en présence de 10% de matière grasse, les agrégats mixtes ne permettent pas de renforcer le réseau protéique. L'augmentation du module final à 500 bars est due principalement à l'augmentation de la surface interfaciale et du nombre de gouttelettes de matière grasse connectées au réseau de caséines. Lorsque l'on augmente la pression d'homogénéisation, on remarque cependant que l'évolution est plus forte avec l'ajout d'agrégats mixtes que pour le témoin.

### **VII.3- Variation de la taille des agrégats fractals ajoutés dans des laits à 3,5 ou 10% de MG et homogénéisés à 100 ou 500 bars**

Il a déjà été montré au cours des thèses du projet PROFIL réalisées par Marie Chevallier, Thibault Loiseleux et Anna Kharlamova (Chevallier, 2017; Kharlamova, 2017; Loiseleux, 2017) ou encore dans l'étude de Liu et al. (2016) que des agrégats de plus petite taille pouvaient être plus efficaces pour texturer des systèmes laitiers. Trois tailles d'agrégats fractals ont donc été testées dans des systèmes laitiers contenant 3,5 ou 10% de matière grasse et homogénéisés à 100 ou 500 bars. Ces conditions visent à faire varier la surface interfaciale totale, afin de déterminer si la taille des agrégats module leur adsorption à l'interface.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Des agrégats fractals de différentes tailles ont été obtenus en faisant varier la concentration de NaCl ajouté avant le traitement thermique (cf : IV.1.1). Dans le Tableau XXXII les tailles moyennes obtenues en fonction de la force ionique sont rappelées.

**Tableau XXXII** : Taille moyenne des suspensions d'agrégats fractals en fonction de la quantité de NaCl déterminée par mesure en diffusion dynamique de la lumière

Quantité de NaCl	Taille moyenne (nm)	Nom des agrégats
0 mM	68	Fa0
20 mM	93	Fa20
45 mM	228	Fa45

Dans un souci de simplification, les agrégats fractals seront par la suite nommés selon la quantité de NaCl utilisée au cours de leur préparation, c'est-à-dire : Fa0, Fa20 et Fa45.

La distribution de taille des gouttelettes de matière grasse a également été évaluée dans les laits homogénéisés en présence d'agrégats fractals de différentes tailles. Dans ces conditions, la taille des gouttelettes de matière grasse dépend uniquement de la pression d'homogénéisation et de la fraction volumique de matière grasse. La taille des agrégats fractals utilisés n'impacte donc pas les diamètres moyens des gouttelettes qui sont les mêmes que dans les deux points précédemment, ni la surface interfaciale développée qui est également similaire aux résultats précédents.

Les résultats des analyses rhéologiques et le pH de gélification en présence de 1% d'agrégats fractals de taille différente pour des systèmes à 3,5 ou 10% de MG et homogénéisés à 100 ou 500 bars sont présentés dans le Tableau XXXIII. Les résultats obtenus pour les témoins et avec l'ajout de PS sont également rappelés pour comparaison.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

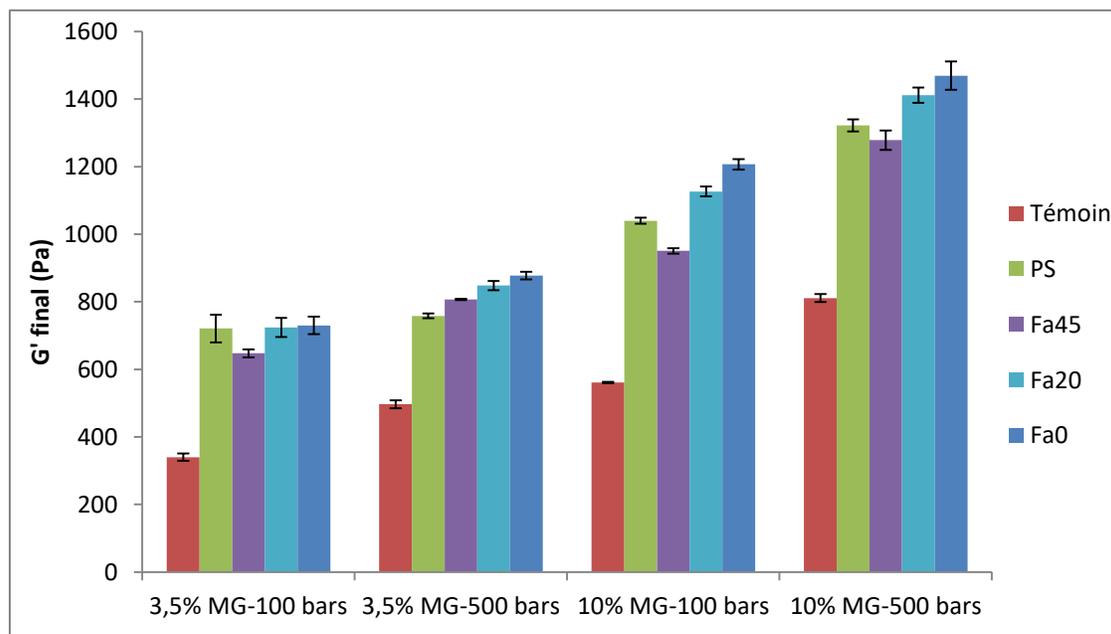
**Tableau XXXIII** : Valeurs moyennes des mesures rhéologiques et de pH sur des gels acides gras laitiers (3,5% et 10 % MG) avec ajout d'agrégats fractals de différentes taille, homogénéisation à 100 ou 500 bars (acidification par GDL à 40 °C)

Echantillons		Temps gélification	pH gélification	G' max (Pa)	Augmentation du G' (Pa)	Pente G' (BF)
<b>3,5% matière grasse</b>						
Témoin	100 bars	29,4 min	5,45	340	/	0,150
	500 bars	32,6 min	5,40	497	157	0,138
1% PS	100 bars	18,6 min	5,61	721	/	0,140
	500 bars	21,8 min	5,54	758	37	0,142
1% Fa45	100 bars	20,7 min	5,60	647	/	0,133
	500 bars	22,8 min	5,54	807	160	0,135
1% Fa20	100 bars	19,3 min	5,61	724	/	0,137
	500 bars	20 min	5,59	848	124	0,135
1% Fa0	100 bars	18,4 min	5,62	730	/	0,142
	500 bars	18,4 min	5,62	878	148	0,136
<b>10% de matière grasse</b>						
Témoin	100 bars	29,7 min	5,46	561	/	0,137
	500 bars	27,6 min	5,48	811	251	0,121
1% PS	100 bars	17,9 min	5,60	1040	/	0,140
	500 bars	25,2 min	5,50	1322	282	0,127
1% Fa45	100 bars	19,3 min	5,62	951	/	0,133
	500 bars	14,5 min	5,68	1279	328	0,121
1% Fa20	100 bars	16,5 min	5,65	1127	/	0,132
	500 bars	12,6 min	5,73	1412	285	0,121
1% Fa0	100 bars	16,4 min	5,66	1207	/	0,132
	500 bars	12,6 min	5,73	1470	263	0,120

Le Tableau XXXIII montre que quelles que soient les teneurs en matière grasse et pressions d'homogénéisation, la gélification se fait d'autant plus rapidement et à un pH plus élevé que les agrégats fractals ajoutés dans le lait sont petits. Pour les systèmes contenant 3,5% de MG, les variations entre une pression d'homogénéisation de 100 et 500 bars sont assez faibles. Le temps de gélification pour le témoin et avec l'ajout des Fa45 augmente uniquement à 500 bars, alors que pour les autres agrégats fractals ce paramètre reste constant. En revanche, pour les systèmes contenant 10% de MG, on observe toujours une diminution du temps de gélification et une augmentation du pH de gélification lorsque l'on passe d'une homogénéisation de 100 bars à 500 bars. Des agrégats plus petits peuvent probablement s'associer plus facilement et rapidement aux micelles de caséines qui se déstabilisent plus tôt. Cela

pourrait être également dû à un  $pH_i$  plus élevé pour les petits agrégats. Ces résultats sont en accord avec le point précédent, pour lequel nous avons pu voir une diminution du temps de gélification avec un  $pH$  de gélification plus élevé en présence d'agrégats fractals par rapport à l'ajout de PS.

Les valeurs moyennes du module élastique final obtenues après 6 h d'acidification en présence de 1% d'agrégats fractals de tailles différentes pour des systèmes contenant 3,5 ou 10% de MG et homogénéisés à 100 ou 500 bars sont présentées sur la Figure 71 et comparées aux résultats des systèmes témoins et avec ajout de 1% de PS.



**Figure 71** : Module élastique final après 6h d'acidification pour des gels d'acides contenant 3,5 ou 10% de MG témoins et avec l'ajout de 1% de PS et 1% d'agrégats fractals de tailles différentes (Fa45, Fa20 ou Fa0) homogénéisés à 100 ou 500 bars

A taux de matière grasse fixe, le module élastique en fin de cinétique augmente avec la diminution de taille des agrégats fractals ajoutés et également avec l'augmentation de la pression. Kharlamova (2017) a déjà mis en évidence que des agrégats fractals plus petits sont plus efficace pour augmenter la fermeté de gels de caséines sans matière grasse comme c'est également le cas ici dans des gels acides laitiers contenant de la matière grasse. De plus, l'augmentation est plus marquée en présence de 10% de matière grasse : en effet, il croît de plus de 260 Pa entre 100 et 500 bars pour tous les systèmes contenant 10% de MG contre au maximum 160 Pa pour ceux à 3,5% de MG. En revanche, cette augmentation des modules entre 100 bars et 500 bars est plutôt constante pour toutes les tailles d'agrégats fractals testées et également assez similaires aux résultats obtenus pour les témoins.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Pour les deux plus petites tailles d'agrégats fractals, dans les émulsions contenant 3,5% de matière grasse et préparées à 100 bars, des valeurs très proches de celles obtenues pour l'ajout de PS sont observées : Fa20 : 724 Pa, Fa0 : 730 Pa contre 721 Pa pour l'ajout de PS. En revanche, pour les émulsions préparées après une homogénéisation à 500 bars, la valeur finale du module élastique est plus importante pour les trois tailles d'agrégats fractals que pour l'ajout de PS (758 Pa). L'utilisation d'agrégats fractals dans des émulsions à haute pression en présence d'une surface interfaciale plus développée semble être le meilleur moyen pour augmenter la fermeté des gels acides laitiers.

En présence de 10% de MG à 100 et 500 bars, la même tendance a été observée : l'utilisation des deux plus petites tailles d'agrégats fractals permet d'obtenir une fermeté plus importante que pour l'ajout de PS dont les modules finaux sont de 1040 Pa pour 100 bars et 1322 Pa pour 500 bars. Ces résultats montrent une fois de plus que les agrégats fractals peuvent être plus efficaces pour augmenter la fermeté que l'ajout de protéines sériques. Cette évolution pourrait être due au développement d'interactions plus nombreuses entre le réseau de caséines et les agrégats en raison de leur nombre.

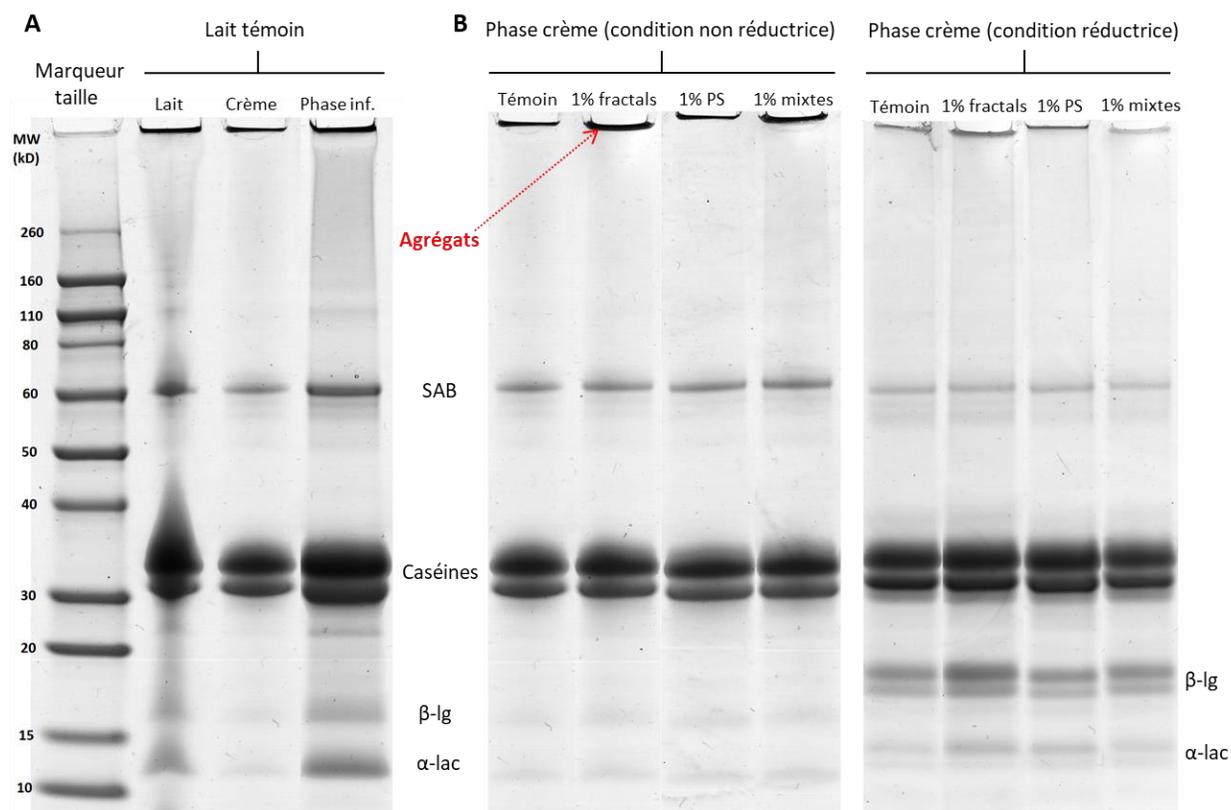
De plus, on remarque qu'à 3,5% de MG on obtient une très légère augmentation des pentes des balayages fréquence lorsque la taille des agrégats fractals diminue, que ce soit à 100 ou 500 bars, ce qui indique des gels légèrement moins structurés même si les modules conservatifs sont plus élevés. Et il y a peu d'évolution entre 100 et 500 bars. Cette observation est probablement due à des interactions différentes du point de vue de leur nombre ou de leur nature. En revanche à 10% de MG dans les deux conditions d'homogénéisation, les valeurs de pentes de  $G'$  sont globalement stables pour toutes les tailles d'agrégats fractals révélant une structuration comparable des systèmes, mais toujours avec des valeurs nettement plus basse à 500 bars. A 10% de MG, augmenter la pression augmente davantage la surface interfaciale ce qui pourrait induire l'adsorption d'agrégats, alors qu'à 3,5% de MG, il y a beaucoup moins d'effet car l'interface est moins développée, cela se voit aussi avec l'ajout de PS.

On observe une augmentation des  $G'$  finaux avec la réduction de la taille des agrégats fractals à 10% de MG. Pour autant, aucun changement radical dans l'évolution de ces modules avec les différents agrégats n'est apparu. Cela semble montrer qu'ils n'ont pas un rôle majeur sur l'interface des gouttelettes dans ces conditions. Toutefois, les modules obtenus sont nettement plus élevés lorsque la surface interfaciale augmente. Le réseau de caséines, renforcé par la présence de nombreuses gouttelettes de matière grasse de petite taille, jouerait un rôle essentiel sur la structuration des systèmes. L'impact de l'addition d'agrégats sur la modulation de la texture par leur adsorption à l'interface semble minoritaire.

## VII.4- Composition interfaciale des laits à 10% de MG et homogénéisé à 100 bars

Une forte élévation des modules conservatifs en présence d'agrégats est observée lorsque la teneur en MG et la pression d'homogénéisation sont augmentées. Pour savoir si les agrégats ont pu accéder à l'interface et participer à la texturation du système en connectant les gouttelettes de MG, la composition interfaciale des gouttelettes dans des laits contenant 10% de matière grasse et homogénéisés à 100 bars, auxquels 1% d'agrégats mixtes, de PS ou d'agrégats Fa0 ont été ajoutés a été analysée par électrophorèse en conditions réductrice et non réductrice en utilisant la méthode de Patton & Huston (1986). La composition interfaciale d'un lait témoin sans addition de protéines a également été analysée.

Le lait témoin et 2 des phases séparées du lait par la méthode de Patton & Huston (1986) ont été analysés en conditions non réductrice. Il s'agit de la phase inférieure, contenant les constituants non adsorbés, et de la phase crème, contenant les gouttelettes de matière grasse. De plus, les crèmes des laits contenant 1% de PS, d'agrégats fractals ou mixtes ont également été analysées en conditions non réductrice et réductrice. La Figure 72 présente les résultats obtenus.



**Figure 72 :** (A) Electrophorèse de la composition interfaciale du lait témoin contenant 10% de MG en conditions non réductrice. (B) SDS-PAGE de la composition interfaciale de la phase crème du lait témoin à 10% de MG et des laits contenant 1% de PS ou d'agrégats fractals ou mixtes en conditions non réductrice et réductrice.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Le profil d'électrophorèse du lait témoin total (puits «lait», Figure 72A) montre les bandes caractéristiques après migration de toutes les protéines du lait : l'albumine sérum bovine (SAB), les caséines (majoritaires), la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine. Pour la phase inférieure, contenant les constituants non absorbés sur l'interface des gouttelettes de matière grasse, toutes les protéines sont également présentes, comme pour le lait total.

De plus, des agrégats de protéines qui n'ont pas pénétrés dans le gel, correspondant à ceux qui se sont formés au cours du traitement thermique du lait, sont trouvés au sommet du gel (conditions non réductrices). Ces agrégats sont présents dans le lait témoin total et la phase inférieure, mais ils sont beaucoup moins présents dans la phase crème contenant les protéines adsorbées à la surface des gouttelettes de matière grasse. De plus, dans la phase crème du lait témoin, on ne trouve presque que des caséines, avec une faible proportion de SAB.

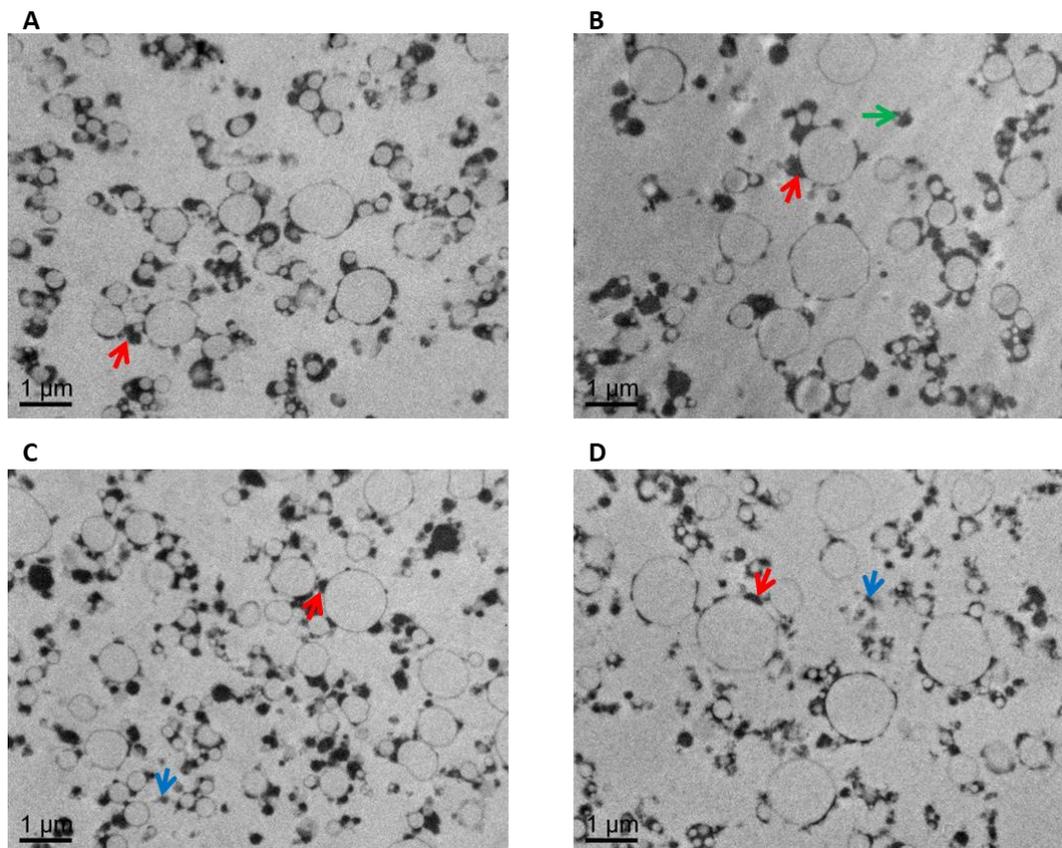
Les électrophorèses des phases crème en condition non réductrice, des laits avec ajout d'agrégats (Figure 72B) semblent mettre en évidence la présence d'agrégats au sommet du gel, ce qui signifierait qu'une partie des agrégats préformés ajoutés dans le lait pourrait avoir accès à l'interface des gouttelettes de matière grasse. Outre la présence de ces agrégats, pour l'ensemble des laits testés, les profils d'électrophorèse montrent principalement la présence de caséines et très peu de  $\beta$ -lactoglobuline et d' $\alpha$ -lactalbumine, ce qui confirme l'adsorption préférentielle des caséines à la surface des gouttelettes de matière grasse par rapport aux PS (Srinivasan et al., 1996; Ye, 2008). A une concentration suffisante, et si elles sont en excès, il a été montré que les caséines peuvent recouvrir complètement la surface des gouttelettes (Chevallier et al., 2016, 2018). Les analyses de la phase crème en conditions réductrices révèlent des bandes correspondant à la  $\beta$ -lactoglobuline et à l' $\alpha$ -lactalbumine, alors que les bandes correspondant aux agrégats diminuent en intensité. Ces protéines étaient donc présentes dans les agrégats observés en conditions non réductrice, dans les gels d'électrophorèse, probablement adsorbées sur les caséines ou directement à l'interface. En particulier, l'électrophorèse de la phase crème du lait contenant 1% d'agrégats Fa0 en condition réductrice montre des bandes plus importantes pour la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine que pour les autres laits, ce qui signifie que ces agrégats pourraient accéder en plus grand nombre à l'interface des gouttelettes de matière grasse.

En résumé, ces électrophorèses montrent que l'interface des gouttelettes de matière grasse dans du lait contenant 10% de MG et homogénéisé à 100 bars est principalement recouverte par les caséines du lait. En condition réductrice, on observe une légère augmentation des bandes correspondant à la  $\beta$ -

lactoglobuline et à l' $\alpha$ -lactalbumine provenant de la dissociation des agrégats observés en petites quantités en conditions non réductrices. Cela signifie donc que pour une teneur de matière grasse de 10% et une pression d'homogénéisation de 100 bars, des agrégats pourraient être retrouvés à l'interface en petites quantités, et ce, de façon légèrement plus prononcée dans le cas des agrégats fractals, ce qui expliquerait l'augmentation des propriétés rhéologiques observées dans le paragraphe précédent. De plus, les mêmes phénomènes doivent se produire à 500 bars de façon amplifiée.

### VII.5- Microstructure des gels acides à 10% de MG et homogénéisés à 100 bars

Pour compléter les informations obtenues sur la composition de l'interface, des observations en microscopie électronique en transmission (MET) ont été réalisées sur les différents gels **après acidification**, en se focalisant sur les gouttelettes de matière grasse. Les laits à 10% de MG (lait témoin, et additionnés d'1% d'agrégats mixtes, 1% de PS et 1% d'agrégats fractals Fa0) ont été homogénéisés à 100 bars. Après acidification, les gels ont été inclus dans une résine EPON (cf. : III.6). Les coupes ultrafines ont été placées sur une grille en cuivre, puis colorées à l'acétate d'uranyle avant observation. Sur la Figure 73 sont présentées les observations réalisées sur les gels acides.



**Figure 73** : Observation en MET des gels acides à 10% de MG et homogénéisé à 100 bars (A) gel acide témoin, (B) avec 1% d'agrégats mixtes (C) avec 1% de PS (D) avec 1% d'agrégats fractals Fa0

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Sur les différentes images obtenues en MET, on peut voir les gouttelettes de matière grasse dont la taille apparaît en accord avec celle déterminée en DLS (0,9  $\mu\text{m}$  en moyenne). Pour l'ensemble des systèmes, on observe à la surface des gouttelettes la présence de micelles de caséines, apparaissant en noir (flèches rouges), en accord avec les électrophorèses présentées précédemment. En revanche, les micelles ne couvrent pas l'ensemble de l'interface, une large part étant recouverte d'un film mince et lisse probablement composé de micelles dissociées et étalées. Les interfaces ainsi que la phase continue ne semblent pas identiques pour tous les systèmes. En effet, pour le gel acide témoin (A) et celui contenant 1% d'agrégats mixtes (B), la phase continue semble contenir moins d'éléments non adsorbés que pour les gels acides contenant 1% de PS (C) et 1% d'agrégats Fa0 (D) (flèches bleues). La majorité des micelles semblant adsorbées sur les gouttelettes de matière grasse dans les 2 premiers cas. Pour les gels C et D, on observe également beaucoup de protéines non adsorbées dans la phase continue qui semble plus claires et diffuse, il s'agirait d'agrégats de protéines sériques car les micelles apparaissent plus dense et elles sont plus foncées.

La présence de ces protéines dans la phase continue dans les deux gels contenant des PS et des Fa0 (C et D) leur donne une apparence plus dense. Les observations à cette échelle sont donc en accord avec les observations faites en microscopie confocale pour les systèmes à 3,5% de MG, avec les résultats des analyses rhéologiques qui montraient des gels plus forts, ainsi qu'avec les analyses de la synérèse qui montraient une meilleure rétention du lactosérum pour les systèmes contenant des PS ou des agrégats fractals. De plus, on remarque que le gel acide témoin et celui contenant 1% d'agrégats mixtes sont assez similaires, ce qui est cohérent avec les analyses rhéologiques. En présence d'agrégats mixtes, il semble cependant y avoir un peu plus d'éléments dans la phase continue (flèche verte), ce qui pourrait expliquer la légère augmentation de la rétention du lactosérum pour ces systèmes.

Ces résultats montrent bien que les agrégats peuvent être en partie adsorbés à l'interface des gouttelettes de matière grasse si la surface interfaciale disponible est suffisante afin que les caséines soient en quantité limitante. Ce phénomène contribue certainement au renforcement des propriétés rhéologiques des systèmes étudiés après homogénéisation à 500 bars. Dans ces conditions il peut se mettre en place plus de connexions entre les gouttelettes de matière grasse *via* les agrégats présents à l'interface de celles-ci.

## VII.6- Etudes des interactions se mettant en place au cours de la formation des gels acides laitiers contenant de la matière grasse

Pour mieux comprendre les interactions entre les protéines des systèmes laitiers pendant la formation du réseau protéique, des analyses ont été réalisées sur des systèmes à 3,5 et 10% de MG (témoin et avec ajout d'agrégats fractals Fa0 et Fa45 ou de PS) en présence de N-éthylmaléimide (NEM), un agent bloquant la formation des ponts disulfures. Une concentration de 20 mM a été ajoutée pour bloquer tous les groupes -SH présents dans les laits. Ces expériences ont été menées dans le but d'évaluer si, et à quel moment, se forment des ponts disulfures et évaluer si d'autres types d'interactions sont mises en place. Cet agent a été ajouté à différents moments du processus de fabrication des gels acides laitiers :

- avant l'homogénéisation à 100 bars et le traitement thermique.
- ou après le traitement thermique et avant l'ajout de la GDL.

Les résultats rhéologiques obtenus dans ces conditions en présence de 3,5% de MG sont présentés dans le Tableau XXXIV. Pour faciliter la comparaison, les résultats obtenus sans ajout de NEM ont été rappelés.

**Tableau XXXIV** : Mesures rhéologiques et de pH des gels acides gras laitiers témoin à 3,5% MG et avec l'ajout de 1% de PS ou d'agrégats fractals Fa45 ou Fa0, sans ajout de NEM et avec un ajout de NEM avant l'homogénéisation à 100 bars et après le traitement thermique (acidification par GDL à 40 °C)

Echantillon	Temps gélification	pH gélification	Amplitude tan $\delta$	G' max (Pa)	Pente G' (BF)
<b>Sans ajout de NEM</b>					
<i>Témoin</i>	<i>29,4 min</i>	<i>5,45</i>	<i>0,53</i>	<i>340</i>	<i>0,150</i>
<i>1% Fa45</i>	<i>20,7 min</i>	<i>5,60</i>	<i>0,35</i>	<i>647</i>	<i>0,133</i>
<i>1% Fa0</i>	<i>18,4 min</i>	<i>5,62</i>	<i>0,35</i>	<i>730</i>	<i>0,142</i>
<i>1% PS</i>	<i>18,7 min</i>	<i>5,62</i>	<i>0,37</i>	<i>721</i>	<i>0,140</i>
<b>NEM avant homogénéisation</b>					
Témoin	35,4 min	5,25	0,46	243	0,152
1% Fa45	16,8 min	5,52	0,32	681	0,145
1% Fa0	15,7 min	5,53	0,35	801	0,152
<b>NEM après traitement thermique</b>					
Témoin	29 min	5,43	0,57	320	0,151
1% Fa45	20,4 min	5,57	0,36	530	0,142
1% Fa0	21,2 min	5,57	0,38	620	0,157
1% PS	18,1 min	5,58	0,40	653	0,149

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Le Tableau XXXIV montre que l'ajout de NEM provoque une augmentation du temps de gélification et une diminution du pH de gélification pour le témoin lorsqu'il est ajouté avant homogénéisation par rapport aux résultats sans ajout de NEM (29,4 min à pH 5,45 contre 35,4 min à pH 5,25), en accord avec les résultats de Lucey, Tamehana, Singh, & Munro (1998b). En revanche, l'ajout de NEM après traitement thermique n'engendre pas de grande modification de ces deux paramètres. Des interactions essentielles, permettant l'agrégation des PS au cours du traitement thermique, sont en effet empêchées dans le premier cas, car la formation de ponts disulfures est bloquée par le NEM (Lucey, et al., 1998b).

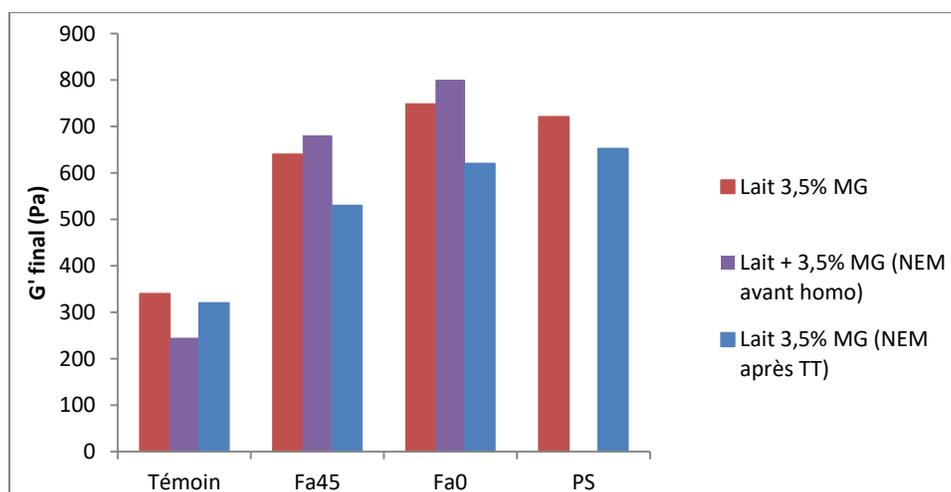
Quelles que soient les conditions, ajouter des agrégats fractals provoque une forte diminution du temps de gélification et donc une augmentation du pH de gélification par rapport au témoin. En présence d'agrégats fractals, lorsque le NEM est ajouté avant traitement thermique, le temps de gélification est nettement réduit, mais il se fait également à un pH plus bas que sans l'ajout de NEM ou lorsque le NEM est ajouté plus tard. Cela signifie qu'il y a certainement une légère modification du pouvoir tampon. Les agrégats fractals peuvent être impliqués dans des connexions autres que des ponts disulfures, qui entraînent une gélification plus rapide des gels laitiers. Liu, Jæger, et al. (2016) ont évoqué la possibilité de l'augmentation du nombre des interactions non covalentes par exposition de sites hydrophobes, entre les protéines sériques et le réseau de caséines.

En revanche, lorsque l'on ajoute le NEM avant l'homogénéisation, il n'a pas été possible de réaliser des mesures rhéologiques pour les systèmes contenant des PS, car les gels obtenus sont peu élastiques et cassants. On suppose que dans ce cas-là, un grand nombre de liaisons non covalentes, donc de faible énergie se formerait rapidement, rendant le gel très fragile. Les PS dans ces conditions ne sont pas restreintes par des ponts disulfures, et peuvent être agencées pour continuer à interagir de façon non covalente entre elles pendant la gélification (Havea, Watkinson, & Kuhn-Sherlock, 2009). Ainsi, le nombre total de connexions entre les protéines pourrait augmenter dans les gels acides de lait contenant du NEM dès le début de la préparation, ce qui conduirait théoriquement à des valeurs  $G'$  plus élevées malgré l'absence de ponts disulfures.

Lorsque le NEM est ajouté après le traitement thermique, on remarque que le temps de gélification est moins élevé lorsque l'on ajoute des PS par rapport au témoin comme cela a déjà été montré dans une étude précédente avec un ajout de NEM au même moment (Nguyen, Wong, Guyomarc, Havea, & Anema, 2014) et également avec l'ajout d'agrégats fractals. On suppose que des ponts disulfures se sont

produites dans les premières étapes de la préparation ce qui limite la mise en place d'un nombre aussi important de liaisons covalentes entre le réseau et les PS.

L'évolution des modules  $G'$  des systèmes contenant 3,5% de matière grasse obtenus en fin d'acidification lorsque le NEM est ajouté avant l'homogénéisation ou après le traitement thermique est également comparée à celle obtenue pour les gels acides laitiers sans ajout de NEM (Figure 74).



**Figure 74** : Module élastique final pour des gels d'acides contenant 3,5% de matière grasse témoins et avec l'ajout de 1% d'agrégats fractals Fa45 ou Fa0 homogénéisés à 100 bars et avec ou sans ajout de NEM avant l'homogénéisation

On observe une diminution du module  $G'$  final de près de 100 Pa pour le système témoin lorsque l'on ajoute du NEM avant l'homogénéisation, ce qui montre une inhibition de la formation de ponts disulfures entre les protéines sériques et la caséine- $\kappa$  (Lucey, Tamehana, et al., 1998b). En revanche, des associations de nature différente comme des liaisons hydrophobes et hydrogènes entre protéines s'établissent, conduisant à la formation d'un gel.

Cependant, la présence des deux types d'agrégats fractals lorsque l'on ajoute le NEM avant l'homogénéisation, conduit à une légère augmentation des modules, ce qui signifie la formation d'un plus grand nombre de liaisons au cours de l'ensemble du processus (homogénéisation, traitement thermique et acidification). Il s'agit probablement de liaisons non covalentes entre les agrégats fractals et le réseau de caséines. Ceci implique que, même sans ponts disulfures intermoléculaires, l'établissement d'un plus grand nombre d'interactions non covalentes comme des interactions hydrophobes, peut être suffisant pour obtenir des gels acides avec une fermeté supérieure à celle des gels obtenus sans NEM, comme déjà mis en évidence dans l'étude de Nguyen, Wong, Guyomarc, Havea, & Anema (2014).

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Les liaisons de plus faible énergie expliquent également les pentes des balayages en fréquences plus élevées par rapport aux systèmes sans ajout de NEM. De plus, on remarque que le module  $G'$  est plus élevé avec les agrégats Fa0, ce qui signifie que ces agrégats permettent la mise en place d'un plus grand nombre de liaisons non covalentes, étant plus petits ils sont plus nombreux et ont donc davantage de surface d'interaction permettant d'augmenter le nombre de liaison.

Ensuite, lorsque l'on ajoute du NEM après le traitement thermique on observe dans tous les cas (ajout d'agrégats fractals ou de PS) une diminution du  $G'$  final en comparaison avec les gels acides préparés sans NEM. On suppose donc que des ponts disulfures peuvent aussi se former après le traitement thermique pendant l'étape d'acidification à 40 °C, et la formation du réseau protéique. Les études de Lucey, Tamehana, et al. (1998b) et Vasbinder et al. (2003) avaient déjà mis en évidence la possible formation de ponts disulfures dans les dernières étapes de formation de gels acides laitiers. En conclusion, la formation de ponts disulfures intervient tout au long de la préparation des gels acides laitiers, et lorsque l'on bloque leur formation, d'autres types d'interactions de faible énergie peuvent survenir en plus grand nombre.

Dans les gels contenant des agrégats fractals ou PS, l'amplitude de  $\tan \delta$  (Tableau XXXIV) est toujours inférieure à celle obtenue pour le gel témoin lorsque l'on ajoute du NEM, ce qui montre un renforcement des systèmes, probablement dû à une augmentation du nombre d'interactions de faible énergie entre les agrégats et les protéines du réseau. En revanche, les valeurs bien qu'inférieures au témoin sont légèrement plus élevées lorsque l'on ajoute le NEM après traitement thermique. Cela peut être expliqué par le fait que dans les premières étapes de préparation, des ponts disulfures se sont formés limitant ainsi le nombre d'interactions de faible énergie.

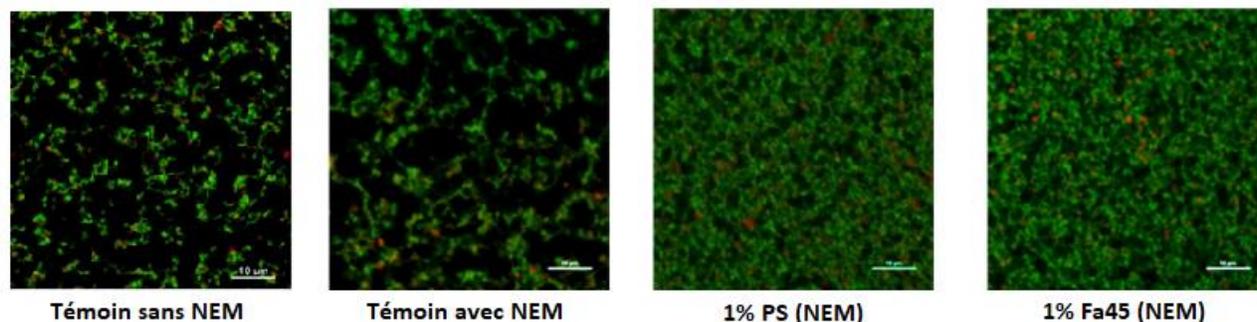
En revanche, on obtient des valeurs pour les pentes de balayage en fréquence plus proches du témoin pour l'ajout de NEM avant homogénéisation et après traitement thermique que lorsque l'on n'ajoute pas de NEM. Cela montre que la structuration des systèmes est légèrement modifiée et qu'elle est due aux interactions différentes se mettant en place au cours de la formation du réseau en présence de NEM en début de préparation mais également au cours de l'acidification.

Les analyses de la rupture des gels (balayage en déformation, cf. : III.5.3.1) ont montré qu'en présence de NEM ajouté avant l'homogénéisation ou après le traitement thermique, la rupture des gels intervient dans tous les cas plus tôt à de faible déformation que pour les systèmes sans NEM. Il a déjà été mis en

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

évidence que les ponts disulfures sont plus importants et efficaces que les interactions non covalentes pour limiter la rupture lorsque l'on applique une déformation sur des gels laitiers (Nguyen et al., 2014).

Enfin, les observations en microscopie confocale des systèmes avec ajout de NEM avant l'homogénéisation (Figure 75) montrent l'organisation structurale du réseau protéique.



**Figure 75 :** Photographies en microscopie confocale de gels acides à 3,5% de MG témoin sans ajout de NEM et avec ajout de NEM dans des gels acides à 3,5% de MG témoin et avec 1% de PS ou d'agrégats Fa45

L'observation du gel gras témoin contenant du NEM met en évidence un réseau de protéines assez hétérogène, avec des poches de sérum légèrement plus large qu'un gel témoin réalisé sans NEM. Cela est en relation avec le faible module conservatif qui témoigne d'un réseau moins structuré lorsque l'on ajoute du NEM.

En présence de 1% de PS et de 1% de Fa45, les gels acides montrent une forte densification du réseau protéique par rapport au témoin. La taille des cavités est fortement diminuée et les réseaux protéiques paraissent similaires, légèrement plus denses qu'en présence de PS, en accord avec la fragilité observée pour ces derniers.

Pour conforter ces résultats, nous avons également réalisé quelques expériences à 10% de matière grasse. Les résultats rhéologiques sont présentés dans le Tableau XXXV, (sans ajout de NEM, puis ajout du NEM avant l'homogénéisation et enfin ajout du NEM après le traitement thermique).

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

**Tableau XXXV** : Mesures rhéologiques et de pH des gels acides gras laitiers témoin à 10% MG et avec l'ajout de 1% de PS ou d'agrégats fractals Fa45 ou Fa0, sans ajout de NEM et avec un ajout de NEM avant l'homogénéisation à 100 bars et après le traitement thermique (acidification par GDL à 40 °C)

Echantillon	Temps gélification	pH gélification	Amplitude tan $\delta$	G' max (Pa)	Pente G' (BF)
<b>Sans ajout de NEM</b>					
<i>Témoin</i>	<i>29,7 min</i>	<i>5,46</i>	<i>0,47</i>	<i>561</i>	<i>0,137</i>
<i>1% Fa45</i>	<i>19,3 min</i>	<i>5,62</i>	<i>0,40</i>	<i>951</i>	<i>0,133</i>
<i>1% Fa0</i>	<i>16,4 min</i>	<i>5,66</i>	<i>0,33</i>	<i>1207</i>	<i>0,132</i>
<i>1% PS</i>	<i>17,9 min</i>	<i>5,60</i>	<i>0,33</i>	<i>1040</i>	<i>0,140</i>
<b>NEM avant homogénéisation</b>					
Témoin	36,9 min	5,27	0,45	416,6	0,139
1% Fa0	14,7 min	5,55	0,33	1235	0,146
<b>NEM après traitement thermique</b>					
Témoin	29,7 min	5,44	0,50	543	0,133
1% Fa45	17,9 min	5,61	0,35	831	0,136
1% Fa0	15,8 min	5,64	0,37	1003	0,148
1% PS	17,1 min	5,61	0,43	856	0,144

Pour l'ensemble des paramètres étudiés, nous observons les mêmes évolutions que pour les gels avec 3,5% de MG. Cela signifie qu'augmenter la quantité de matière grasse à 10% ne change pas la nature et l'évolution des interactions se mettant en place au cours des différentes étapes de fabrication des gels acides laitiers. Cela est également en lien avec les résultats précédents montrant que à 10% de MG peu d'agrégats peuvent accéder à l'interface ce qui signifie que les systèmes sont formés de la même façon avec les mêmes interactions.

### VII.7- Gels laitiers à 3,5% de MG (à interface contrôlée)

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que l'adsorption des agrégats sur la surface des gouttelettes de matière grasse n'était possible qu'à fortes concentrations en MG. Nous avons voulu tester une procédure alternative en incorporant une émulsion concentrée déjà texturée par des agrégats fractals (Loiseleux, 2017) dans le lait. Ainsi, des quantités variables de PS ont été ajoutées dans des émulsions contenant 30% de matière grasse, 1,2% d'agrégats fractals Fa45 ou Fa0 et du NaCl afin d'obtenir des textures différentes. Après homogénéisation, la texture des émulsions est immédiatement évaluée de manière visuelle et classée en 2 catégories donnant leurs noms aux émulsions.

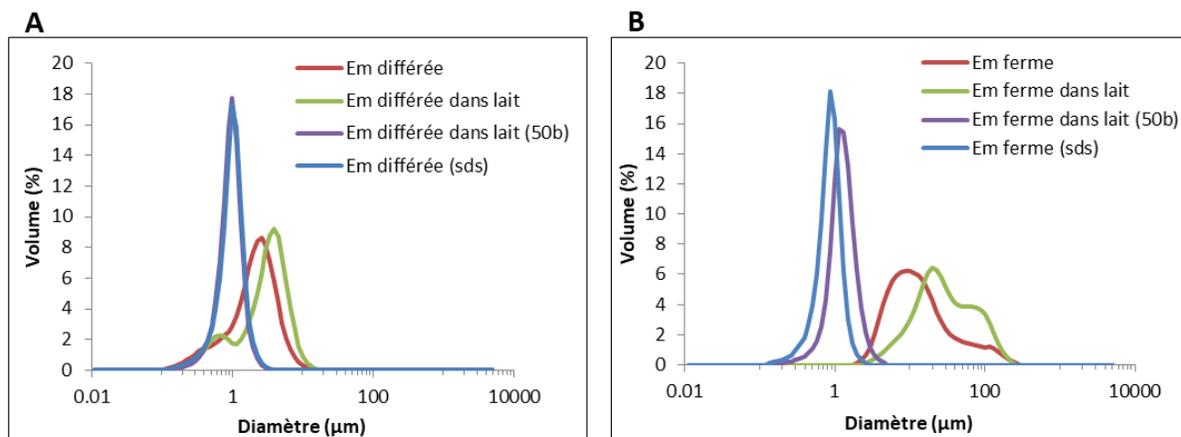
## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Lorsque l'émulsion a une texture très ferme, c'est-à-dire qu'elle est gélifiée directement en sortie d'homogénéisateur, elle est nommée « Em ferme » et si l'émulsion s'écoule en sortie d'homogénéisateur et se texture dans le temps, l'émulsion est dite « Em différée ». Les concentrations en protéines des deux types d'émulsions sont les suivantes :

- 1,8% PS - 1,2% fractals Fa45 : **Em différée**
- 0,6% PS - 1,2% fractals Fa45 ou Fa0 : **Em ferme**

Les émulsions ont été incorporées au lait écrémé sous agitation magnétique douce pour obtenir une concentration finale en matière grasse de 3,5%. Puis le lait a dans certains cas, subi une homogénéisation supplémentaire à 50 bars pour permettre une meilleure dispersion des gouttelettes de matière grasse de l'émulsion. Tous les échantillons ont ensuite été traités thermiquement et acidifiés par utilisation de GDL pour atteindre un pH final d'environ 4,6 après 6 h (cf. : III.4.3).

Dans un premier temps, une analyse de la taille des gouttelettes de matière grasse a été réalisée dans différentes conditions. La distribution de taille des gouttelettes des deux émulsions a été déterminée en absence ou en présence de SDS. De même, la distribution de taille des gouttelettes a été déterminée après addition des émulsions dans le lait, avec ou sans homogénéisation supplémentaire à 50 bars. La Figure 76 présente les résultats obtenus pour les 4 situations avec les deux types d'émulsion.



**Figure 76** : Dispersion de taille des gouttelettes de matière grasse pour deux émulsions (A) : Emulsion différée seule, diluée dans le lait, diluée dans le lait et homogénéisation à 50 bars et diluée dans du SDS ; (B) : Emulsion ferme seule, diluée dans le lait, diluée dans le lait et homogénéisation à 50 bars et diluée dans du SDS

La distribution de taille des gouttelettes de matière grasse pour les deux émulsions seules (courbe rouge) est nettement plus étendue que pour l'ensemble des systèmes précédemment étudiés, avec une taille moyenne plus importante. En effet, pour Em différée (A), la majorité des gouttelettes floccule durant

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

l'étape d'homogénéisation à 100 bars formant de petits amas autour de 10  $\mu\text{m}$ , ce qui avait déjà été mis en évidence (Loiseleux, 2017). En revanche, on remarque qu'il persiste une fraction de gouttelettes individuelles dans l'émulsion car la distribution commence en-dessous de 1  $\mu\text{m}$ . Pour Em ferme (B), on observe de gros amas de gouttelettes allant de 2 à plus de 200  $\mu\text{m}$  et une taille moyenne en volume autour de 10  $\mu\text{m}$ , ce qui signifie que les gouttelettes de matière grasse sont toutes reliées entre-elle par les protéines présentes dans la solution, l'ensemble des gouttelettes de matière grasse a floculé. Sous l'action du SDS, pour les deux émulsions analysées, on obtient des gouttelettes de matière grasse autour de 0,9  $\mu\text{m}$ , diamètre comparables aux gouttelettes des systèmes à 10% de matière grasse et homogénéisé à 100 bars étudiés précédemment.

Lorsque les deux types d'émulsion sont ajoutés dans le lait sans étape d'homogénéisation on retrouve des amas de gouttelettes qui persistent, montrant que les connexions entre gouttelettes de matière grasse peuvent résister à une agitation magnétique de faible intensité. En revanche, lorsque le lait subit une étape d'homogénéisation à 50 bars pour bien disperser l'émulsion, on remarque dans le cas d'Em différée qu'il reste uniquement des gouttelettes individuelles avec une distribution de taille identique à celle de l'émulsion diluée dans le SDS. Pour Em ferme, la taille des gouttelettes est légèrement plus importante : il n'y a plus de gros amas, mais une nouvelle distribution de taille de gouttelettes non floculées et légèrement plus grosse est obtenue par rapport à l'émulsion diluée dans le SDS, signifiant un début de coalescence des gouttelettes de matière grasse.

Des analyses rhéologiques ont été réalisées sur les gels acides contenant 3,5% de matière grasse apportée sous formes d'émulsions à 30% : Em différée et Em ferme (Fa45 ou Fa0). Les résultats obtenus pour le temps et le pH de gélification, ainsi que le  $G'$  final et les valeurs de la pente de  $G'$  au cours du balayage fréquence sont présentés dans le Tableau XXXVI.

**Tableau XXXVI** : Résultats des analyses réalisées sur des laits à 3,5% MG par incorporation d'une émulsion à 30% MG

Echantillon	Agrégats	Homogénéisation	Temps gélification	pH gélification	$G'$ final (Pa)	Pente $G'$ (BF)
<i>Témoin</i>	/	/	29,4 min	5,45	340	0,150
Lait + Em différée	Fa45	/	25,5 min	5,49	394	0,146
Lait + Em différée	Fa45	50 bars	24,3 min	5,54	420	0,143
Lait + Em ferme	Fa45	/	28,5 min	5,45	295	0,162
Lait + Em ferme	Fa45	50 bars	30,8 min	5,45	327	0,151
Lait + Em ferme	Fa0	50 bars	26,6 min	5,47	344	0,147

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Tout d'abord, on observe une diminution du temps de gélification et une augmentation du pH de gélification par rapport au témoin (29,4 min), plus marquées avec l'émulsion différée, c'est-à-dire lorsque l'émulsion ajoutée contient plus de PS. En effet, l'ajout des émulsions apporte quelques protéines supplémentaires (PS natives et agrégats fractals) par rapport au témoin : Em différée : +0,105% et Em ferme : +0,063% de protéines, ce qui expliquerait une partie de l'évolution de ces paramètres, comme cela avait été observé avec l'ajout de quantité plus importante et croissante de PS dans du lait à 3,5% de matière grasse. De plus, dans le cas de l'émulsion préparée avec les agrégats Fa0, le temps de gélification est plus court que celui obtenu pour l'émulsion contenant des agrégats Fa45, ce qui est en accord avec les résultats observés sur la variation de la taille des agrégats fractals présentés précédemment.

Les gels obtenus ont des modules conservatifs finaux similaires, et proches du lait témoin à 3,5% de MG (340 Pa en fin de cinétique). En revanche, on remarque que les  $G'$  diminuent avec l'augmentation de la fermeté de l'émulsion ajoutée dans le lait. Le fait que des amas de gouttelettes floculées persistent dans le lait ne semble pas bénéfique pour améliorer la fermeté des gels acides laitiers. Il est en effet préférable d'obtenir une bonne dispersion de la matière grasse dans le lait (Aguilera & Kinsella, 1988; Lucey & Singh, 1998). L'incorporation de matière grasse avec une interface déjà formée et composée de protéines sériques et d'agrégats fractals n'entraîne donc pas d'amélioration de la texture des gels.

Enfin, la réalisation d'une étape d'homogénéisation supplémentaire n'entraîne pas non plus de réelle amélioration de la texture finale des gels acides laitiers. Nous avons envisagé la possibilité que les caséines du lait pourraient potentiellement remplacer les protéines (PS natives et agrégats fractals) présentes à l'interface des gouttelettes de matière grasse lorsque l'émulsion est incorporée dans le lait ce qui pourrait potentiellement expliquer les résultats similaires au témoin contenant la même quantité de matière grasse.

Enfin, on remarque que les valeurs des pentes de  $G'$  obtenues au cours du balayage en fréquence sont dépendantes des conditions. Sans étape d'homogénéisation, plus l'émulsion ajoutée dans le lait est ferme, plus la pente est importante, ce qui signifie une moins bonne structuration. La réalisation d'une étape d'homogénéisation permettant une meilleure répartition de la matière grasse permet de diminuer légèrement la valeur de la pente et d'avoir une meilleure structuration du système. Enfin, on remarque que la pente est légèrement inférieure lorsque l'on ajoute des agrégats Fa0 plutôt que les Fa45. Globalement, moins l'émulsion à 30% de matière grasse est texturée, plus les gels acides laitiers sont

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

forts, car la matière grasse est mieux répartie dans le gel et lorsque de gros amas sont présents ils peuvent gêner la formation du réseau.

Pour mieux comprendre ces systèmes et l'intérêt des agrégats fractals, trois expériences ont été réalisées sur certains des laits précédents auxquels 1% d'agrégats Fa45 ou Fa0 ont été ajoutés (cf. : III.4.3). Dans ce cas, la matière grasse était apportée par l'incorporation d'une émulsion à 30% MG (Em ferme préparée avec des agrégats Fa45). Les résultats sont présentés dans le Tableau XXXVII. Ceux obtenus sur des laits à 3,5% de MG et 1% d'agrégats fractals sont également rappelés dans le tableau.

**Tableau XXXVII** : Résultats des analyses réalisées sur des laits à 3,5% MG contenant 1% d'agrégats fractals Fa45 ou Fa0 par incorporation d'une émulsion à 30% MG

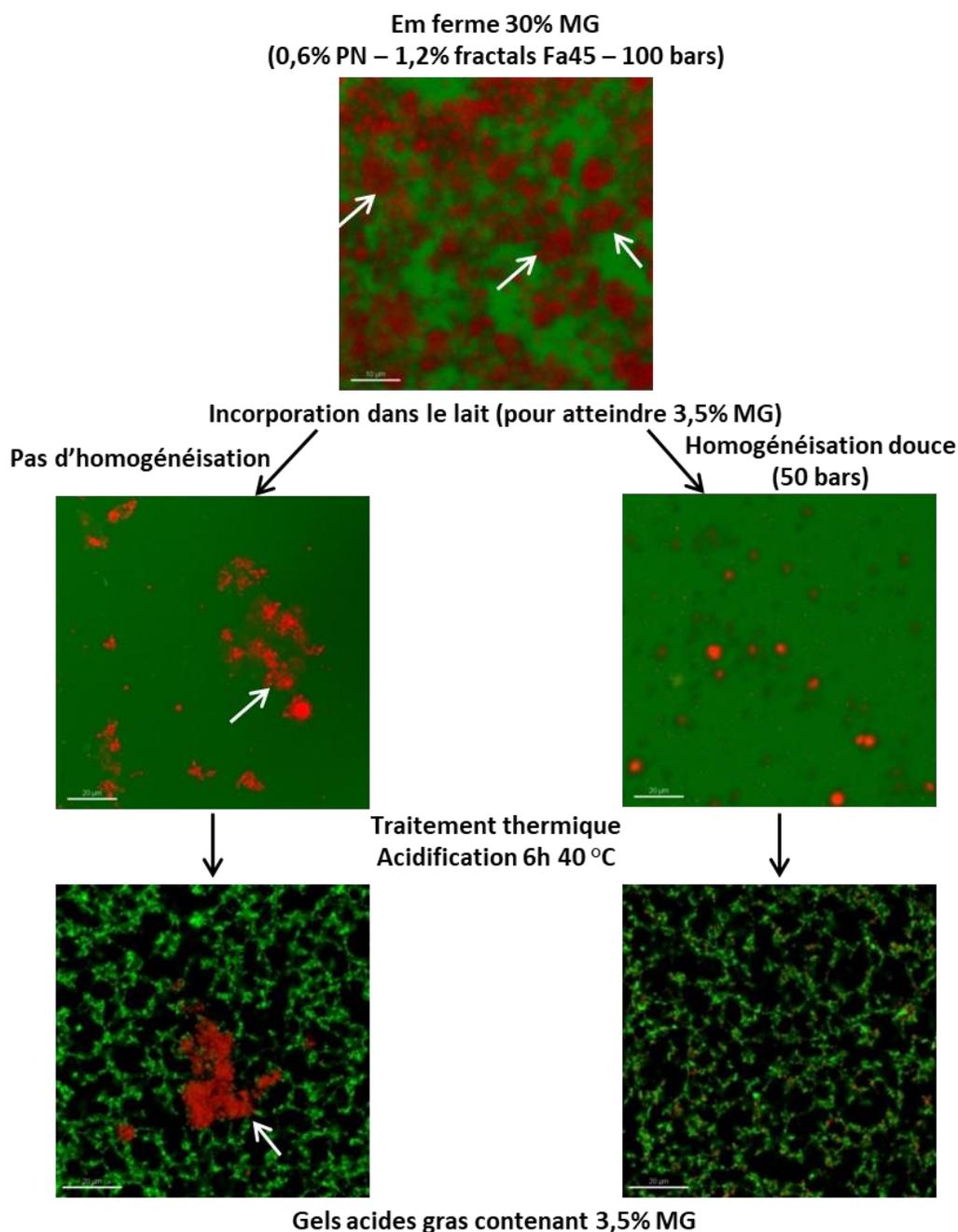
Echantillon	Homogénéisation	Temps gélification	pH gélification	G' final (Pa)	Pente G' (BF)
<i>Lait 3,5% MG + 1% Fa45</i>	/	20,7 min	5,60	647	0,133
<i>Lait 3,5% MG + 1% Fa0</i>	/	18,4 min	5,62	730	0,142
Lait + Em ferme + 1% Fa45	50 bars	21 min	5,6	640	0,128
Lait + Em ferme + 1% Fa0	/	20,8 min	5,6	742	0,138
Lait + Em ferme + 1% Fa0	50 bars	19 min	5,63	812	0,135

Le gel réalisé à partir du lait avec 1% de Fa45, l'émulsion Em ferme et la réalisation d'une étape d'homogénéisation permettant une bonne répartition de la matière grasse atteint un niveau d'élasticité du même ordre de grandeur que pour un gel préparé avec un lait contenant 1% d'agrégats fractals dont la matière grasse est apportée de façon classique. En revanche, une amélioration de la texture est obtenue quand des agrégats fractals Fa0 sont ajoutés au lait avec l'ajout de Em ferme et qu'une étape d'homogénéisation à 50 bars est réalisée pour bien disperser la matière grasse. La valeur du module G' obtenue (812 Pa) est supérieure à celle obtenue pour des gels à 3,5% de matière grasse et 1% de Fa0 (730 Pa), ainsi que celle obtenue avec 1% de PS (721 Pa). La petite taille des agrégats semble donc être un facteur déterminant de l'amélioration de la texture. De plus, on remarque que les pentes du balayage en fréquence sont plus faibles que lorsque la matière grasse est ajoutée de façon classique (0,133 avec Fa45 et 0,142 avec Fa0), ce qui signifie une meilleure structuration des gels, mais cela peut être dû au fait que l'ajout d'émulsion à 30% de matière grasse apporte aussi des protéines supplémentaires.

Dans ces systèmes, il est malheureusement impossible de connaître le rôle exact des agrégats. Ceux-ci peuvent jouer un rôle dans la phase continue, ou au niveau de l'interface et nous ne savons pas si les agrégats présents dans l'émulsion de départ à 30% de matière grasse restent en place sur l'interface des gouttelettes de matière grasse ou s'ils sont déplacés par les caséines du lait.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Des observations en microscopie confocale ont été réalisées sur les systèmes contenant l'émulsion la plus ferme (Em ferme). Tout d'abord, l'émulsion a été observée seule puis, diluée dans le lait avec ou sans étape d'homogénéisation à 50 bars, et enfin la microstructure des gels acides obtenus après traitement thermique et acidification avec ou sans étape d'homogénéisation a également été déterminée. Les différentes observations sont regroupées dans la Figure 77.



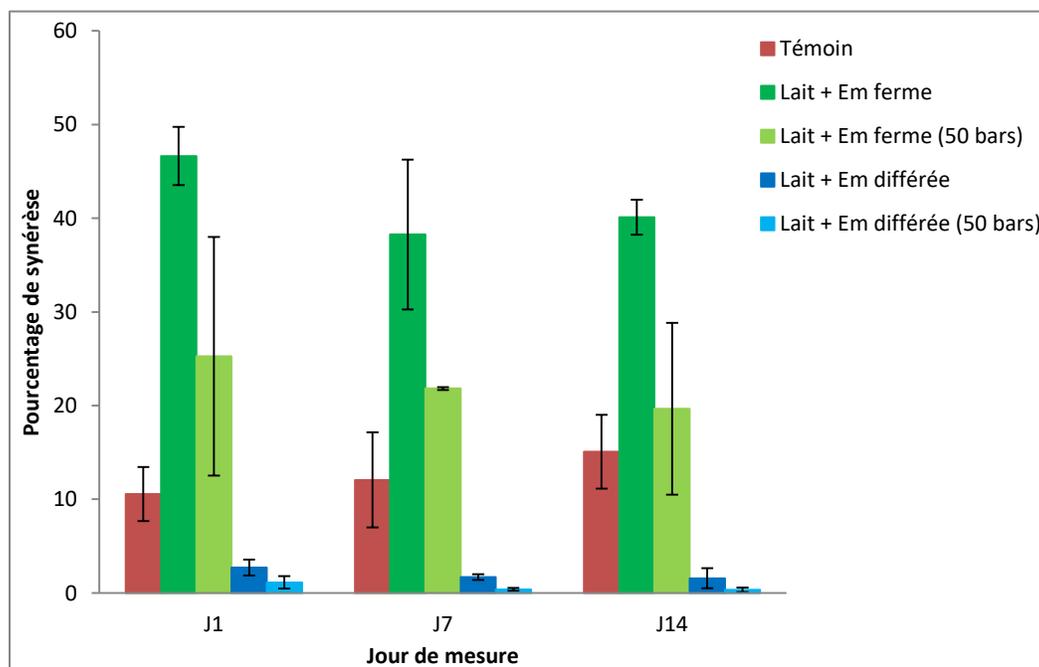
**Figure 77** : Observation en microscopie confocale d'une émulsion à 30% MG : Em ferme (échelle : 10 µm) et des systèmes laitiers contenant l'émulsion et homogénéisés ou non à 50 bars (échelle : 20 µm) puis acidifié à 40 °C (échelle : 20 µm)

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

De nombreux amas de gouttelettes de matière grasse de taille variable sont observables dans l'émulsion Em ferme, en accord avec l'analyse de la distribution de taille des gouttelettes (flèches blanches). Lorsque l'émulsion est incorporée au lait sans étape d'homogénéisation à 50 bars, on retrouve toujours de gros amas de gouttelettes de matière grasse qui sont également présents après la gélification et l'acidification du lait. En revanche, la réalisation d'une étape d'homogénéisation permet d'obtenir principalement des gouttelettes individuelles mieux réparties dans le lait et le gel acide, ce qui est en accord avec les résultats précédents.

La microstructure des gels acides obtenus après une étape d'homogénéisation à 50 bars montre un réseau protéique très semblable à celle du gel acide témoin, avec des gouttelettes de matière grasse bien dispersées dans l'ensemble du réseau protéique, en accord avec les analyses rhéologiques qui donnent des résultats comparables.

L'évolution du pourcentage de synérèse a également été mesurée dans le temps pour des laits à 3,5% de matière grasse contenant deux types d'émulsion : Em ferme et Em différée et ayant subi ou non une étape d'homogénéisation à 50 bars. Les résultats pour les deux types d'émulsion, ainsi que les résultats pour le gel témoin à 3,5% de matière grasse sont présentés sur la Figure 78.



**Figure 78** : Analyse du pourcentage de synérèse en fonction du temps de stockage à 4 °C et du type d'émulsion ajouté au lait (Em différée et Em ferme) et avec ou sans homogénéisation (50 bars)

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Des résultats très variables sont obtenus selon le type d'émulsion ajoutée dans le lait. Pour le gel acide contenant l'émulsion Em ferme sans étape d'homogénéisation, la synérèse est très importante (entre 40 et 50%) et bien supérieure à ce que l'on obtenait pour un gel témoin à 3,5% de matière grasse (entre 10 et 15%). Cela peut être expliqué par la présence de gros amas de gouttelettes qui gênent la formation du maillage du réseau, ce qui le rend moins homogène et moins apte à retenir le lactosérum. L'étape d'homogénéisation diminue le taux de synérèse, qui reste cependant élevé et supérieur au témoin, ce qui pourrait signifier que la matière grasse n'est pas bien dispersée dans le réseau ou que peu de connections sont établies avec l'interface.

Les gels acides contenant l'émulsion Em différée sont beaucoup moins sujets à la synérèse. On retrouve des valeurs de synérèse comparables à celles obtenues pour des gels pour lesquels une faible quantité de PS (entre 0,2 et 0,4%) avait été ajoutée dans le lait (cf. : VI.2.2). Les résultats sont également meilleurs lorsqu'une étape d'homogénéisation supplémentaire est réalisée. La meilleure répartition de la matière grasse dans le réseau permet de le renforcer comme pour les systèmes étudiés précédemment. On peut également noter que les résultats pour l'ajout de Em différée sont inférieurs à ceux obtenus avec l'ajout de 0,2% de PS dans un lait dont la matière grasse est apportée de façon classique ; or, l'ajout de Em différé dans le lait apporte seulement 0,1% de protéines supplémentaires (PS et agrégats fractals). Dans ce cas, on peut supposer que la composition de l'interface des gouttelettes de matière grasse a peut-être un impact sur la diminution de la synérèse.

En conclusion, l'ajout de matière grasse avec une interface déjà formée ne semble pas présenter d'intérêt majeur pour améliorer la fermeté des gels acides laitiers. Au contraire, la matière grasse est moins bien dispersée, les systèmes sont moins homogènes et la synérèse peut être très élevée selon le type d'émulsion ajoutée. De plus, la stabilité de l'interface n'est pas assurée au cours de la fabrication des gels acides laitiers. Les protocoles de fabrication sont également beaucoup plus lourds à mettre en place avec plus d'étapes à réaliser.

## VII.8- Systèmes laitiers à 15% de matière grasse avec variation de la pression d'homogénéisation

Les analyses précédentes ont montré qu'il était possible que les agrégats fractals accèdent à l'interface des gouttelettes de matière grasse lorsque la surface interfaciale est suffisamment développée et que les caséines sont en quantité limitante. Pour comparer l'impact des agrégats fractals et des protéines sériques *via* l'interface sur la texture des systèmes laitiers, une dernière série d'expériences a été réalisée sur des préparations lactières contenant 15% de matière grasse, en l'absence et en présence de 1% de protéines sériques ou d'agrégats Fa0 et Fa45, homogénéisées à des pressions allant jusqu'à 500 bars. Ces conditions permettent d'être limitant en caséines et d'avoir un impact des agrégats sur l'interface. Ces systèmes ne seront **pas acidifiés**. Il s'agit donc de texturer des émulsions contenant une large part de caséines micellaires, au contraire des travaux réalisés par Thibault Loiseleux ou celles-ci étaient minoritaires dans les systèmes considérés (Loiseleux, 2017) .

Des analyses rhéologiques et des mesures de la taille des gouttelettes de matière grasse ont été réalisées sur ces systèmes homogénéisés. Les systèmes obtenus ont également été photographiés à J1 après conservation une nuit à 4 °C. Certaines de ces émulsions se structurent immédiatement après l'homogénéisation. L'ensemble des émulsions a été caractérisé par un spectre mécanique en sortie d'homogénéisateur à 40 °C, suivi d'un balayage en température *in situ* (de 40 °C à 90 °C, puis 10 min à 90 °C et de 90 °C à 40 °C), (cf. : III.5.3.2). Un second balayage en fréquence a enfin été réalisé sur les systèmes après le balayage en température (40 °C). Dans un premier temps, les préparations lactières contenant 15% de matière grasse (témoin et avec 1% de PS, d'agrégats Fa0 ou Fa45) ont été caractérisées après l'homogénéisation. Le Tableau XXXVIII présente les résultats de distribution de taille des gouttelettes de matière grasse après homogénéisation à 400 ou 500 bars, ainsi que l'aspect des préparations lactières obtenues après conservation à 4 °C une nuit.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

**Tableau XXXVIII** : Présentation de la distribution de taille des gouttelettes de matière grasse après homogénéisation à 400 ou 500 bars des émulsions à 15% MG (bleu : sans SDS, rouge : avec SDS) et photographie de l'aspect des émulsions à J1 après une conservation à 4 °C

Emulsion	Granulométrie (400 bars)	Aspect J1 (4 °C)	Granulométrie (500 bars)	Aspect J1 (4 °C)
Emulsion témoin 15% MG				
Emulsion 15% MG + 1% PS				
Emulsion 15% MG + 1% Fa0 (68 nm)				
Emulsion 15% MG + 1% Fa45 (228 nm)				

Les deux témoins étudiés sont liquides et ne se texturent pas dans le temps, même après homogénéisation à 500 bars. Les gouttelettes de matière grasse ont une taille inférieure à 1 µm qui évolue très peu avec l'augmentation de la pression : 0,38 µm et 0,33 µm à 400 et 500 bars, respectivement (courbes bleues). En présence de SDS (courbes rouges), leur taille n'est quasiment pas modifiée, elle est de 0,30 µm à 400 bars contre 0,26 µm à 500 bars. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de floculation des gouttelettes de matière grasse et que dans ces conditions la pression d'homogénéisation joue assez peu sur leur taille.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

Avec l'ajout de 1% de PS, la taille moyenne des gouttelettes de matière grasse varie également peu en fonction de la pression. Elle est de 0,34  $\mu\text{m}$  pour 400 bars sans SDS. En revanche pour une pression d'homogénéisation de 500 bars, la taille moyenne correspondant au pic principal est à 0,29  $\mu\text{m}$  et on observe également une très légère floculation des gouttelettes de matière grasse en absence de SDS. Les gouttelettes floculées ont des tailles situées entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ . Cependant, les systèmes observés à J1 restent liquides dans les deux cas, ce qui montre que les quelques gouttelettes de matière grasse floculées ne suffisent pas à texturer l'émulsion.

Contrairement aux résultats précédents (témoin et avec ajout de PS), des états différents selon la pression appliquée sont obtenus pour l'ajout d'agrégats fractals Fa0 ayant un diamètre moyen de 68 nm. Après une homogénéisation à 400 bars, les tailles des gouttelettes de matière grasse sont comparables à celles des systèmes précédents et l'émulsion est liquide à J1. En revanche, pour une homogénéisation à 500 bars, deux populations de gouttelettes sont obtenues, la première de taille similaire aux autres systèmes sans SDS entre 0,2 et 0,3  $\mu\text{m}$ , et la deuxième de taille plus importante composée d'amas de gouttelettes avec une taille centrée autour de 10  $\mu\text{m}$  signe d'un début de floculation des gouttelettes de matière grasse. La réalisation d'une homogénéisation à 500 bars en présence d'agrégats Fa0 conduit à une texture de gel faible à J1 après une conservation de l'échantillon à 4 °C, ce qui signifie que la proportion d'amas de gouttelettes floculées est suffisante pour texturer l'émulsion.

Les systèmes contenant les agrégats Fa45 montrent des états différents des systèmes précédant. Après une homogénéisation à 400 bars et 500 bars, on observe une floculation de l'ensemble des gouttelettes de matière grasse sous forme d'amas de grande taille et des gels instantanés sont formés directement en sortie d'homogénéisation, avec un gel plus ferme à 500 bars qu'à 400 bars. Les amas de gouttelettes ont des tailles allant de 5 à 300  $\mu\text{m}$  pour une homogénéisation à 400 bars et de 5  $\mu\text{m}$  à 520  $\mu\text{m}$  à 500 bars. Les amas de gouttelettes de matière grasse floculées sont connectés entre eux permettant d'obtenir cette texture de gel ferme instantané.

Les valeurs des modules  $G'$  obtenus avant et après le traitement thermique, sont présentées dans le Tableau XXXIX. La déformation appliquée dépend du système étudié pour les témoins : elle est de 30 et 10% à 400 et 500 bars respectivement, de 10% pour les systèmes avec PS et de 1% pour les systèmes avec agrégats Fa0 et Fa45. Ces valeurs de déformations permettent de rester dans le domaine viscoélastique linéaire.

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

**Tableau XXXIX** : Valeurs du module  $G'$  des émulsions à 15% de MG avant traitement thermique (initial) et après traitement thermique (final) sur le rhéomètre à 1 rad/s et une déformation dépendante du système

Emulsion	$G'$ initial (400 bars)	$G'$ final (400 bars)	$G'$ initial (500 bars)	$G'$ final (500 bars)
Emulsion témoin 15% MG	0,01 Pa	0,14 Pa	0,03 Pa	0,12 Pa
Emulsion 15% MG + 1% PS	0,08 Pa	0,21 Pa	0,03 Pa	2,72 Pa
Emulsion 15% MG + 1% Fa0	0,10 Pa	14 Pa	4,78 Pa	193 Pa
Emulsion 15% MG + 1% Fa45	<b>287 Pa</b>	<b>760 Pa</b>	<b>297 Pa</b>	<b>878 Pa</b>

Pour les deux émulsions témoins réalisées à 400 et 500 bars, les valeurs de modules  $G'$  très faible obtenus après le traitement thermique montrent bien qu'il n'y a pas structuration des émulsions pendant cette étape.

Pour les émulsions contenant 1% de PS, les modules  $G'$  obtenus après traitement thermique sont très faibles, mais une très légère augmentation du module pour le système homogénéisé à 500 bars est observée (2,72 Pa). Les quelques gouttelettes floculées ne permettent pas d'obtenir une texturation importante du système. Les PS ne permettent pas de créer assez de liaisons entre les gouttelettes de matière grasse pour former un réseau dans ces conditions. Pour pouvoir créer des liaisons avec les gouttelettes de matière grasse, les protéines sériques doivent être dénaturées avant l'étape d'homogénéisation.

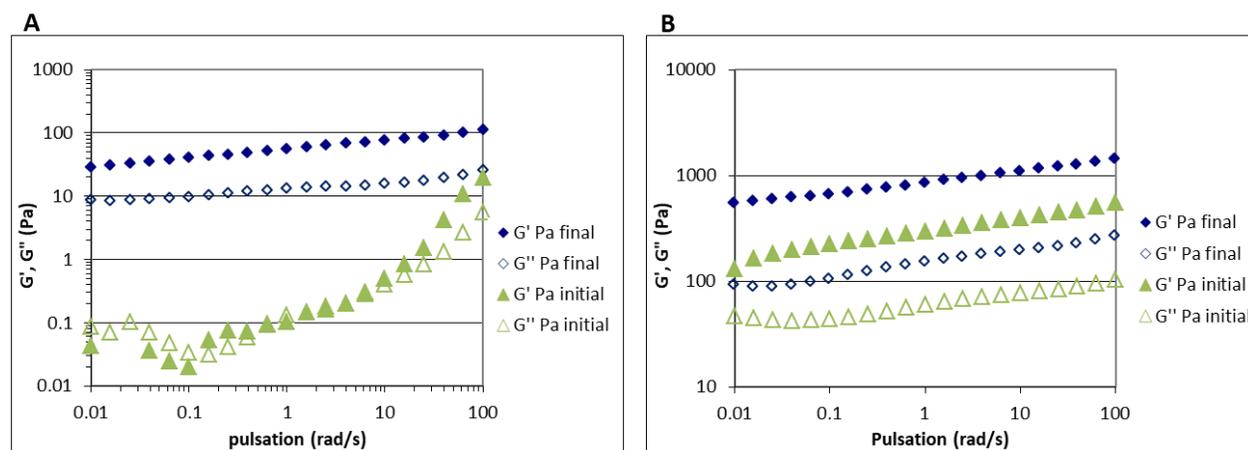
Avec l'ajout d'agrégats Fa0, le module  $G'$  obtenu après traitement thermique pour le système homogénéisé à 400 bars est bien supérieur aux valeurs obtenues pour les émulsions témoins et en présence de PS. De plus, une nette augmentation du module (193 Pa) est obtenue pour l'émulsion homogénéisée à 500 bars après le traitement thermique. La présence d'agrégats fractals dans l'émulsion, conduit à la floculation des gouttelettes de matière grasse, ce qui permet la formation d'un réseau faible pendant l'étape d'homogénéisation à 500 bars. Le traitement thermique réalisé par la suite permet de renforcer le réseau et d'obtenir un gel plus ferme.

Enfin, l'ajout d'agrégats Fa45 conduit à une forte augmentation des modules  $G'$  après homogénéisation : 287 Pa et 297 Pa respectivement pour 400 et 500 bars. Ensuite, la forte augmentation des modules suite au traitement thermique montre que le réseau est encore renforcé par celui-ci. Les modules  $G'$  après traitement thermique sont beaucoup plus élevés qu'avec les petits agrégats fractals. Les agrégats fractals de plus grande taille (228 nm) ont donc une meilleure capacité à connecter les gouttelettes de matière

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

grasse car ils peuvent agir à une plus grande distance permettant l'établissement d'un réseau tridimensionnel plus structuré dès l'étape d'homogénéisation.

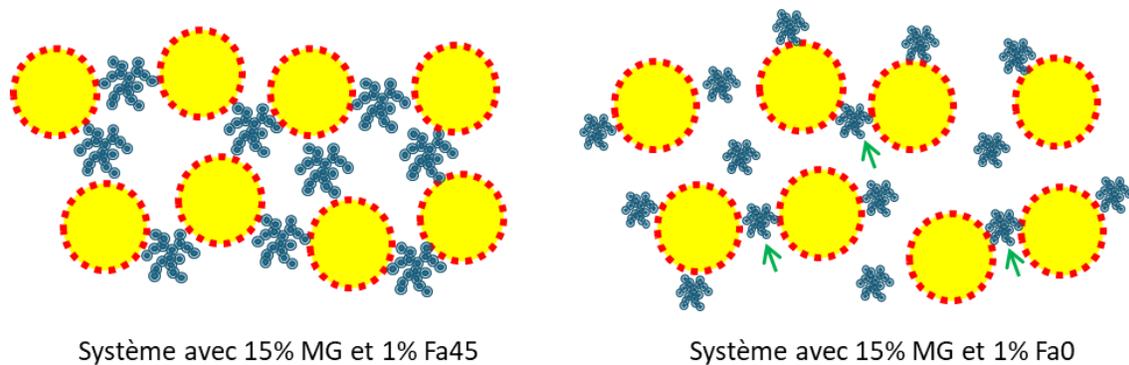
Les balayages en fréquence réalisés à 40 °C avant et après traitement thermique, sur les deux systèmes homogénéisés à 500 bars contenant 1% d'agrégats fractals Fa0 et Fa45 sont présentés sur la Figure 79.



**Figure 79 :** Balayage en fréquence réalisé avant (initial) et après (final) traitement thermique sur le rhéomètre à une déformation de 1% pour des gels homogénéisés à 500 bars contenant 15% de matière grasse et 1% d'agrégats Fa0 (A) et d'agrégats Fa45 (B)

En présence des agrégats fractals Fa0 (A), on remarque que le système n'est pas texturé avant le traitement thermique. Un gel est obtenu seulement après celui-ci. En effet,  $G'$  reste toujours supérieur au module  $G''$  sur toute la gamme de fréquence et la pente du module  $G'$  est de 0,141. En présence d'agrégats Fa45, les mesures ont une allure assez similaire avant ou après le traitement thermique mais avec des valeurs plus basses avant, ce qui témoigne que le gel formé est renforcé au cours du chauffage mais avec des ratios  $G'/G''$  similaires. Il faut noter que la valeur de la pente de  $G'$  après le traitement thermique est de 0,105 contre 0,136 avant traitement thermique, ce qui signifie que la dénaturation des protéines induites par le traitement thermique permet de renforcer le gel et d'obtenir une meilleure structuration.

La structuration des deux systèmes précédents après traitement thermique contenant 15% de matière grasse et des agrégats fractals Fa45 et Fa0 peut être expliquée par le schéma suivant (Figure 80).



**Figure 80** : Schéma représentant les connexions entre les gouttelettes de matière grasse avec des interfaces non saturées en caséines et les agrégats fractals des systèmes contenant 15% matière grasse et 1% de Fa45 (gauche) ou Fa0 (droite)

Dans les deux cas, le nombre et la taille des gouttelettes individuelles sont similaires et l'interface est composée majoritairement de caséines (en rouge), mais également de protéines sériques agrégées et d'agrégats fractals.

Dans le premier cas, les agrégats fractals (Fa45) ont une taille assez importante qui leur permet de connecter les gouttelettes de matière grasse et de générer un réseau tridimensionnel.

Dans le second cas, les agrégats (Fa0), bien que plus nombreux, sont trop petits pour connecter les gouttelettes de matière grasse sur de longues distances. Seules des connexions entre les gouttelettes les plus proches peuvent être établies, en relation avec la texture de gel faible obtenue.

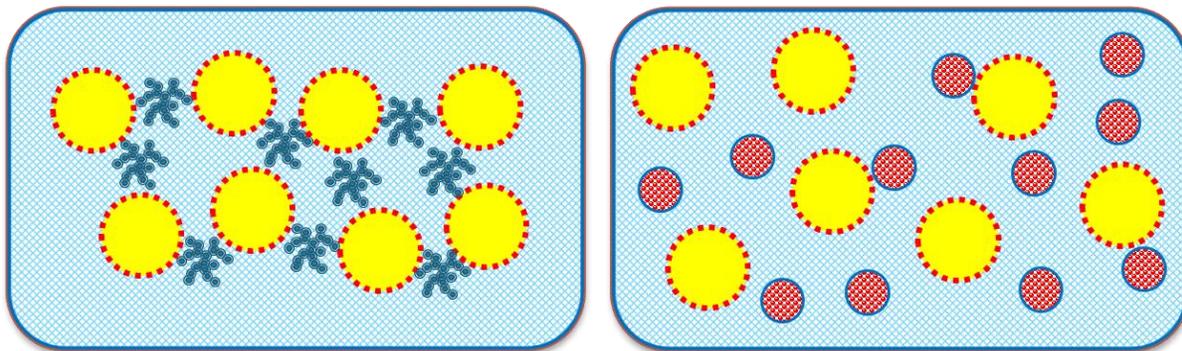
En conclusion, ces analyses ont montré que la texture des émulsions est dépendante du type de protéines ajoutées (PS ou agrégats fractals) comme déjà montrée dans les travaux de Thibault Loiseleux (Loiseleux, 2017) et également de la taille des agrégats fractals. Nous avons pu mettre en évidence que, même en présence d'une forte concentration de caséines, ce qui n'était pas le cas dans les travaux cités précédemment, il est possible de devenir limitant en caséines et de permettre aux agrégats de diriger la texturation des émulsions. Néanmoins, ces systèmes n'ont pas été acidifiés en raison de leur texture en sortie d'homogénéisation. En se plaçant dans des conditions où l'incorporation homogène de GDL serait possible, l'étude de cette pré-structuration pourrait fournir des informations supplémentaires sur l'impact des agrégats sur les propriétés des gels acides.

## VII.9- Conclusions sur la variation de la surface interfaciale

Ce dernier chapitre de résultats a mis en évidence le fait que certains types d'agrégats peuvent accéder à l'interface des gouttelettes de matière grasse lorsque celle-ci est suffisamment importante, c'est-à-dire pour une augmentation de la pression d'homogénéisation et/ou de la quantité de matière grasse. Les caséines du lait, en quantité limitante vis-à-vis de la surface interfaciale développée ne peuvent ainsi plus recouvrir entièrement l'interface et laissent la possibilité aux agrégats d'y parvenir.

Les résultats ont montré que toutes les structures protéiques n'ont pas les mêmes fonctionnalités. En effet, lorsqu'il n'y a pas de saturation de l'interface par les caséines, les agrégats fractals peuvent créer des connexions entre les gouttelettes de matière grasse et ainsi augmenter la texture finale des gels acides. En revanche, pour les agrégats mixtes il est possible qu'une partie de ces derniers puisse accéder à l'interface mais qu'ils ne soient pas capables de créer des connexions entre les gouttelettes, ce qui donne dans toutes les conditions testées des gels acides de même fermeté que les gels acides témoins.

La représentation schématique des deux types de structure est présentée sur la Figure 81.



**Figure 81** : Schéma représentant les hypothèses de structure des gels acides laitiers avec une interface non saturée en caséines contenant des agrégats fractals (gauche) ou des agrégats mixtes (droite)

L'étude des interactions a montré que la formation de ponts disulfures intervient tout au long de la préparation des gels laitiers acides. Lorsque l'on bloque leur formation, d'autres types d'interactions de faible énergie peuvent se former en plus grand nombre induisant la formation de gel ferme mais très cassant, que ce soit en présence de PS ou d'agrégats fractals.

La dernière partie de ce chapitre a également mis en évidence que deux éléments sont fondamentaux pour permettre la connexion des gouttelettes de matière grasse entre elles pour des systèmes enrichis en matière grasse avec une interface non saturée en caséines. Il s'agit de :

## Chapitre 7 : Comment impliquer l'interface dans la texturation des gels acides gras laitiers ?

- la taille des agrégats qui, si elle augmente, peut permettre des connexions entre gouttelettes de matière grasse à longue distance,
- le nombre d'agrégats qui, si il augmente peut permettre d'augmenter les probabilités de connexions entre les gouttelettes de matière grasse.

Les résultats sur les préparations laitières à 15% de matière grasse ont également montré que, sans acidification, il est possible d'obtenir des gels laitiers lorsque la surface interfaciale est suffisamment développée pour que les caséines ne la saturent pas. Dans ce cas, la taille des agrégats fractals est un facteur essentiel pour moduler la texture du gel.

## **Chapitre 8 : Discussion générale**



Différents agrégats composés de protéines sériques ou de protéines sériques et de micelles de caséines possédant des tailles et morphologies différentes ont été produits et caractérisés en faisant varier les conditions physico-chimiques de fabrication telles que le pH, la force ionique, la durée et la température du traitement thermique (chapitre 4). Ces agrégats ont déjà été étudiés dans les thèses du projet PROFIL par Marie Chevallier, Thibault Loiseleux et Anna Kharlamova. Ainsi, à pH neutre, des agrégats branchés et peu denses (agrégats fractals), sont obtenus. Ils présentent différentes tailles selon la concentration en NaCl utilisée pour leur fabrication, car l'électrolyte écrante les charges électrostatiques et favorise leur croissance (Mahmoudi et al., 2007; Phan-Xuan et al., 2011). Des objets sphériques et denses : les agrégats microgels, sont fabriqués à un pH proche du point isoélectrique et à faible force ionique (Donato et al., 2009; Schmitt et al., 2011). A pH 2, faible force ionique et sous cisaillement (Aymard et al., 1999), de longs bâtonnets fins, les fibrilles, sont produits. Un dernier type d'agrégats a été fabriqué : les agrégats mixtes, obtenus en chauffant un mélange de micelles de caséines et de protéines sériques à un pH de 6,3 (Anema, 2007; Anema & Klostermeyer, 1997). Sous l'action du traitement thermique, les protéines sériques dénaturées se lient préférentiellement aux micelles de caséines. Cette liaison est réalisée par l'intermédiaire des caséines- $\kappa$ , les PS dénaturées s'y associant *via* des interactions hydrophobes et des ponts disulfures (Haque & Kinsella, 1988; Jang & Swaisgood, 1990).

Dans la fabrication des yaourts, le lait est dans un premier temps chauffé et homogénéisé pour améliorer la texture des gels. Ce traitement thermique entraîne la formation d'agrégats mais sans aucun contrôle sur leur forme. Les différents agrégats présentés précédemment aux morphologies variées et contrôlées, sont de bons candidats pour modifier la texture des produits laitiers tels que les yaourts. Les agrégats fibrillaires de par leur longueur semblaient être très prometteurs pour obtenir une forte texturation des gels laitiers gras et acides et également pour parer au phénomène de synérèse en s'incluant dans le réseau protéique. Cependant, leur condition de production à pH 2 a rendu leur utilisation trop compliquée dans nos produits. De plus, il a été montré que ce type d'agrégat n'est pas stable au cours des étapes d'homogénéisation nécessaires à la fabrication des gels acides laitiers contenant de la matière grasse (Loiseleux, 2017). Ils ont donc rapidement été écartés pour la réalisation de nos essais.

Les trois autres types d'agrégats ont en revanche été ajoutés dans les gels acides laitiers maigres ou contenant de la matière grasse et comparés à l'ajout de protéines sériques natives (chapitre 5 et 6).

Selon le type d'agrégat incorporé aux systèmes, il est possible de jouer sur la cinétique de formation du réseau protéique, sa fermeté et la capacité de rétention du lactosérum. Les différents agrégats montrent des capacités différentes à moduler la structure de la phase continue.

Les agrégats fractals, de par leur morphologie branchée, leur faible masse volumique et en conséquence leur nombre important, sont de très bons candidats pour s'intégrer dans un réseau protéique et créer des connexions pouvant rendre le gel plus homogène et avec une meilleure capacité de rétention du lactosérum.

En revanche, les agrégats microgels sont moins adaptés pour augmenter la fermeté des systèmes. Leur taille et densité très élevée impliquent une moindre population à concentration fixe que dans le cas des PS natives ou des agrégats fractals. Ce sont donc de bons candidats pour augmenter la concentration en protéines des yaourts sans influencer les propriétés mécaniques. Les agrégats mixtes quant à eux, jouent un rôle mineur sur le réseau protéique, bien qu'ils aient une légère capacité de rétention d'eau à haute concentration, sans augmenter de façon marquée la fermeté des gels. Ces deux structures d'agrégats sont donc intéressantes dans une volonté de production de produits laitiers hyper protéinés sans modification significative de la texture.

### 8.1- Structuration du réseau protéique des gels acides laitiers sans matière grasse

La formation des gels laitiers acides sans matière grasse dépend de l'enchaînement de plusieurs étapes de changement physique indispensable à la formation d'un réseau protéique. Dans un premier temps, le traitement thermique permet la dénaturation des protéines sériques du lait qui perdent leur structure native et s'agrègent entre elles ou pour la  $\beta$ -lg avec les caséine-k des micelles *via* des ponts disulfures et des interactions hydrophobes modifiant ainsi leurs propriétés initiales (Donato & Guyomarc'h, 2009; Mahmoudi et al., 2011, 2010; Vasbinder et al., 2001; Vélez-Ruiz et al., 1997). Les interactions des protéines sériques avec les caséines augmentent le caractère hydrophobe et le  $pH_i$  de la surface micellaire, ce qui favorise et accélère la gélification au cours de l'abaissement du pH (Guyomarc'h, Jemin, et al., 2009; Lucey, Munro, et al., 1998; Lucey & Singh, 1998; Ozcan et al., 2015; Vasbinder et al., 2001). De plus, il est également connu que l'augmentation de la concentration en protéines sériques par ajout de poudre de protéines avant le traitement thermique du lait conduit à l'obtention de systèmes acides plus structurés et gélifiant plus rapidement. Cela s'explique par le fait que lors de l'acidification les protéines sériques supplémentaires, dénaturées par le traitement thermique peuvent également se fixer à la surface des micelles de caséines, ou former des agrégats solubles. Ces protéines ont un  $pH_i$  plus élevé que les micelles ce qui accélère leur déstabilisation à un pH plus élevé. De plus, les protéines sériques dénaturées associées aux micelles de caséines et les agrégats solubles peuvent agir en tant que

nœuds de liaison et créer des connexions supplémentaires entre les protéines du réseau protéique, ce qui facilite la gélification et améliore la texture du gel (Lucey & Singh, 1998).

Plusieurs études ont été réalisées sur l'ajout d'agrégats protéiques dans le lait écrémé pour améliorer les propriétés des gels acides laitiers. Par exemple, Liu et al. (2016) ou encore Andoyo et al. (2014) ont montré que l'ajout d'agrégats de protéines améliore la microstructure des gels acides maigres avec une répartition plus homogène de la matière protéique dans le réseau, et donc une meilleure rétention du lactosérum. Les gels se forment plus rapidement et ont une fermeté accrue. Cela serait dû à un recouvrement partiel de la surface des micelles de caséines par les agrégats de protéines sériques qui favoriserait des interactions fortes dans le gel. Lors de l'acidification, les agrégats de protéines sériques peuvent agir comme des ponts entre les micelles de caséines ce qui renforce le réseau protéique et donne des gels acides laitiers plus fermes (Andoyo et al., 2015). Différents facteurs peuvent moduler la structure et les propriétés mécaniques du gel, y compris la forme et la taille des agrégats. Par exemple, Donato et al. (2011) ont montré que les microgels de taille supérieure, de charge et d'hydrophobie de surface inférieure et possédant une plus faible teneur en groupes thiols accessibles que les agrégats solubles formés à un pH proche de 7,0 sont moins intéressants que ces derniers pour obtenir une gélification rapide et une fermeté accrue.

Le chapitre 5 nous a permis de mieux comprendre la formation du réseau protéique dans des gels acides maigres et le rôle de différents types d'agrégats de protéines dans la mise en place de celui-ci en utilisant toujours les mêmes conditions physiques (traitement thermique et acidification) et les mêmes matériaux protéiques. Cela permet une bonne comparaison des différents agrégats utilisés dans les mêmes systèmes à différentes concentrations.

Les agrégats fractals préformés incorporés dans le lait entraînent une diminution du temps de gélification et la formation d'un réseau protéique plus structuré car ils sont capables d'agir de façon similaire aux protéines sériques dénaturées du lait traité thermiquement. En effet, ils interagissent avec les caséines micellaires et entraînent les mêmes réactions physiques que des PS dénaturées par traitement thermique. Plus la concentration protéique sous forme d'agrégats fractals est importante, plus les améliorations sont marquées ce qui montre qu'ils prennent entièrement part à la formation d'un réseau protéique ferme.

En revanche, l'utilisation d'agrégats plus denses et de taille supérieure comme les microgels ne présente pas d'intérêt pour le renforcement de la texture des gels laitiers acides maigres. Ces agrégats ne

prennent pas part à la formation du réseau protéique formé au cours de l'acidification. Les résultats obtenus sont proches de ceux observés pour des gels acides laitiers maigres témoins dans lesquels aucune protéine supplémentaire n'est ajoutée.

Pour les agrégats mixtes, les résultats sont plus surprenants : ces agrégats sont préformés en solution avec des protéines sériques natives et des caséines micellaires, ils sont composés des mêmes protéines que le lait et dans les mêmes proportions. En revanche, ils n'entraînent pas d'augmentation de la fermeté. Ces structures semblent inertes par rapport au réseau. On suppose que leur pH de formation de 6,3 impacte leur fonctionnalité par rapport aux agrégats mixtes qui se forme *in situ* dans le lait à pH 6,7. Il a été montré que lorsque le traitement thermique du lait est réalisé à un pH plus élevé (> 6,7), il conduit à la formation de davantage d'agrégats solubles de protéines sériques que lorsqu'il est réalisé à un pH inférieur de 6,3 à 6,5 (Anema, Lee, Lowe, & Klostermeyer, 2004; Lucey, Tamehana, et al., 1998b; Vasbinder & De Kruif, 2003). Ce pH de 6,3 à 6,5 entraîne la formation de plus d'associations des protéines sériques avec les micelles de caséines formant des agrégats mixtes. Néanmoins, les agrégats mixtes préformés sont incapables de créer des connexions et d'augmenter la fermeté des gels, mais possèdent une légère capacité de rétention d'eau expliquant la diminution de la synérèse à forte concentration d'agrégats ajoutés.

### **8.2- Structuration du réseau protéique et formation de l'interface des gouttelettes de matière grasse des gels acides laitiers à 3,5% de MG**

Nous avons vu au cours des recherches bibliographiques qu'il existe plusieurs études réalisées sur les gels acides laitiers avec ajout d'agrégats de protéines laitières de différentes structures. En revanche, les études sont généralement réalisées sur des systèmes modèles qui ne contiennent pas de matière grasse. Pour comprendre les fonctionnalités de ces agrégats vis-à-vis de la matière grasse, les systèmes étudiés précédemment ont été enrichis en MGLA. Nous savons déjà, suite aux résultats du chapitre 5 que le type d'agrégats conditionne la participation à la formation du réseau protéique. Nous savons également que, comparativement aux agrégats, les protéines sériques sont de meilleurs tensioactifs (McClements, 1999). Surel et al. (2014) ont cependant montré que si la concentration en agrégats mixtes ou en agrégats fractals est suffisante, ils sont capables de connecter les gouttelettes et de texturer des émulsions modèles à 30% de matière grasse. Les agrégats peuvent s'adsorber simultanément à la surface de deux gouttelettes et ainsi provoquer leur pontage. La texture de l'émulsion ainsi formée dépend de la concentration en agrégats à l'interface : elle peut être liquide lorsque la quantité d'agrégats adsorbés est faible ou gélifiée si la concentration interfaciale en agrégats est plus élevée.

De plus, Thibault Loiseleux au cours de sa thèse sur des émulsions à pH neutre (Loiseleux, 2017) a montré que deux paramètres sont essentiels pour texturer les émulsions à savoir :

- La taille et la concentration en agrégats. 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.
- La distance entre les gouttelettes dépendant de la quantité de matière grasse et de la taille des gouttelettes. En augmentant la concentration et/ou la pression d'homogénéisation, la taille est réduite et le nombre de gouttelettes augmente, réduisant la distance entre elles.

Ces études ont été menées sur des émulsions modèles à pH neutre contenant essentiellement des protéines sériques et peu de caséines et non dans des systèmes laits complets. Or notre étude porte ici sur la formation de gels acides laitiers de type yaourt de lait entier. Le lait est composé d'environ 80% de caséines et de 20% de protéines sériques, et il est connu que les caséines s'adsorbent préférentiellement à l'interface des gouttelettes de matière grasse par rapport aux agrégats protéiques et aux protéines sériques (Srinivasan et al., 1996; Ye, 2008). De plus, il a été montré qu'elles peuvent recouvrir entièrement les gouttelettes de matière grasse (Chevallier et al., 2016, 2018). Il faut également noter que la concentration et le type de protéines adsorbées à la surface des gouttelettes de matière grasse influencent les propriétés du yaourt (Cho et al., 1999). La nature des protéines, à savoir native, dénaturée ou agrégée, détermine les types d'interactions qui peuvent se produire entre les gouttelettes de matière grasse et la matrice de protéines.

Nos résultats ont montré que la modulation des propriétés physiques des gels acides contenant 3,5% de matière grasse, par les agrégats s'effectue majoritairement au niveau de la phase continue, et non pas *via* l'interface, en raison de l'adsorption prioritaire des caséines, très majoritaires dans le lait. Les différents agrégats ne jouent cependant pas le même rôle dans la formation du réseau de protéines : les protéines sériques et les agrégats fractals créent un nombre plus élevé de connexions ou des connexions plus fortes dans le réseau, ce qui permet de le renforcer et de réduire la synérèse comme c'est également le cas dans les systèmes maigres. Ce résultat montre que chauffer des PS natives à pH 6,7 en présence des caséines conduit à la production de structure similaire aux agrégats fractals. Les agrégats microgels et mixtes se comportent davantage comme des matériaux inertes vis-à-vis du réseau de

caséines. Les agrégats mixtes induisent cependant une diminution de la synérèse. Ces deux types d'agrégats permettent d'enrichir les systèmes en protéines sans augmenter fortement leur fermeté.

L'ensemble des analyses réalisées dans le chapitre 5 a montré que les agrégats testés ont majoritairement un rôle dans la phase continue des systèmes en raison de la saturation de l'interface par les caséines. Par contre, les différents agrégats ont des fonctionnalités différentes dans la phase continue avec un rôle actif pour les agrégats fractals et les protéines sériques ou passif pour les agrégats mixtes et les microgels.

### 8.3- Forcer les agrégats à aller à l'interface dans des systèmes laitiers

Les études citées précédemment ont montré qu'il est possible de moduler la texture d'émulsions à pH neutre par adsorption d'agrégats sur l'interface des gouttelettes de matière grasse (Loiseleux, 2017; Surel, 2012). Nous avons voulu déterminer les conditions nécessaires pour parvenir au même résultat dans des systèmes laitiers plus complexes, c'est-à-dire contenant une concentration importante de caséines. Pour cela, il a fallu augmenter la surface interfaciale en jouant sur la concentration en matière grasse et/ou la pression d'homogénéisation. Les caséines, en quantité limitante vis-à-vis de l'importante surface interfaciale ainsi développée, ne peuvent plus couvrir entièrement l'interface et laissent la possibilité aux agrégats d'y parvenir.

Dans cette partie, les microgels ont été écartés des études au vu des résultats obtenus sur les gels acides contenant 3,5% de matière grasse. En effet, le seul effet obtenu dans la gamme de concentration testée est un enrichissement en protéines des produits sans changement de leur texture. De plus, étant donné que les résultats étaient toujours proches de ceux des agrégats mixtes, nous avons décidé de nous consacrer à l'étude de seulement ce dernier type d'agrégat, plus original.

Les résultats ont aussi montré que dans ce cas, toutes les structures protéiques n'ont pas les mêmes fonctionnalités. En effet, lorsqu'il n'y a pas de saturation de l'interface par les caséines, les agrégats fractals peuvent créer des connexions entre les gouttelettes de matière grasse et ainsi augmenter la texture finale des gels acides. En revanche, il est possible qu'une partie des agrégats mixtes puissent accéder à l'interface, mais si c'est le cas, ils ne sont pas capables de créer des connexions entre les gouttelettes, ce qui donne des gels peu fermes, comme c'était le cas dans les systèmes maigres ou ils avaient un rôle inerte.

Les agrégats fractals ont des fonctionnalités très intéressantes dans les gels acides et dépendantes de la surface interfaciale développée dans le milieu, lorsque la concentration en matière grasse est inférieure à 10%. Plus les agrégats ajoutés sont petits, plus les propriétés mécaniques des gels augmentent. Le nombre d'agrégats ajoutés dans le système est donc un paramètre majeur. En effet des caractéristiques texturales plus faibles sont obtenues en présence d'agrégats de plus grande taille. On explique cela par le fait que les agrégats agissent principalement dans le renforcement du réseau protéique. Or plus leur nombre est important, plus cela permet la formation d'un nombre élevé de connexions et notamment de ponts disulfures tout au long du processus de formation des gels acides. Cela permet l'obtention d'une texture ferme. De plus, si la formation des ponts disulfure est bloquée par l'ajout de NEM, nous avons vu que ces agrégats peuvent créer un nombre élevé de connexion de faible énergie. Cela permet aussi d'obtenir des gels acides qui sont fermes mais très cassants.

En revanche, si la concentration en matière grasse est plus importante (15% de matière grasse), nous avons montré qu'il est plus intéressant de privilégier l'utilisation d'agrégats fractals de plus grande taille. Dans ces conditions, ils agissent sur l'interface des gouttelettes de matière grasse non saturée par les caséines et peuvent permettre la formation d'un gel neutre sans acidification. Plus la taille des agrégats est élevée, plus ils permettent des connexions entre les gouttelettes de matière grasse à longue distance par rapport aux petits agrégats.

Le Tableau XL présente un bilan des intérêts majeurs des PS et des différents agrégats protéiques selon les applications envisagées.

## Chapitre 8 : Discussion générale

Tableau XL : Bilan des intérêts majeurs des PS et des différents agrégats selon le système étudié

Agrégats protéiques	Protéines sériques	Agrégats fractals	Agrégats mixtes	Microgels
<b>Gels acides maigres et contenant 3,5% MG</b>	Amélioration de toutes les propriétés du gel acide ↓ Participation à la formation du réseau protéique	Globalement amélioration de toutes les propriétés du gel acide (moins efficace que les PS) ↓ Participation à la formation du réseau protéique	Pas d'amélioration des propriétés sauf légère diminution de la synérèse ↓ Capacité de rétention d'eau	Pas d'amélioration des propriétés ↓ Rôle inerte (présence dans la phase continue)
<b>Gels acides à 10% MG</b>	Amélioration de toutes les propriétés du gel acide ↓ Participation à la formation du réseau protéique	Amélioration de toutes les propriétés du gel acide ( <b>résultats dépendent de la taille</b> ) ↓ <b>Création d'un nombre plus important de connexions</b> (↗ avec les petits agrégats) <b>Accès limité à l'interface des gouttelettes de MG</b>	Pas d'amélioration des propriétés ↓ Impossibilité des agrégats à créer des connexions (réseau protéique)	Non testé
<b>Lait hyper enrichi en MG (15%) non acidifié</b>	Incapacité à texturer l'émulsion ↓ Accès à l'interface mais pas de connexions inter-gouttelettes	Capacité à connecter les gouttelettes de MG ( <b>dépend de la taille des agrégats</b> ) ↓ Grand agrégats → <b>connexions à longue distance</b>	Non testé	Non testé

# Conclusions

## Conclusions

---

### **Stratégie de la thèse**

Le projet PROFIL proposait d'étudier les fonctionnalités d'agrégats de protéines laitières dans différentes matrices, soit à pH neutre, ou soit dans le cas de cette thèse, dans des gels laitiers à pH acide. L'objectif était d'obtenir des produits gélifiés avec des comportements technologiques spécifiques apportés par l'utilisation des agrégats de protéines laitières et sans additifs alimentaires. Dans ce cadre, l'objectif principal de cette thèse était d'étudier l'influence de la structure et de la taille des différents agrégats protéiques sur la texture et les propriétés des gels acides contenant ou non de la matière grasse. Un autre objectif était de comprendre les interactions se mettant en place entre les différents éléments entrant dans la composition des gels acides laitiers : protéines sériques, agrégats protéiques, caséines et matière grasse.

L'efficacité de différents agrégats protéiques à moduler la texture d'émulsion modèle à pH neutre a déjà été montrée au cours d'une précédente étude (Loiseleux, 2017). C'est en se basant sur ces résultats que nous avons défini plusieurs hypothèses permettant de comprendre et de contrôler le mécanisme de texturation des gels laitiers acides contenant ou non de la matière grasse et bâtir ainsi la stratégie d'étude de cette thèse.

Les différents agrégats ont des fonctionnalités différentes dans les émulsions à pH neutre. En effet, les agrégats fractals permettent d'obtenir une texture de gel lorsqu'ils sont ajoutés dans l'émulsion contenant peu de matière grasse (5%) avant homogénéisation alors que les agrégats microgels qui sont plus denses ne permettent pas d'obtenir les mêmes fonctionnalités surtout s'ils sont utilisés aux mêmes concentrations que les agrégats fractals. Les agrégats mixtes permettent également de texturer les systèmes comme les agrégats fractals mais uniquement à une concentration en matière grasse plus importante.

Tous ces résultats ont été obtenus dans des émulsions modèles contenant peu de caséines et à pH neutre. Or nous savons que les caséines s'adsorbent préférentiellement à la surface des gouttelettes de matière grasse (Chevallier et al., 2016, 2018; Srinivasan et al., 1996; Ye, 2008). Le but de notre travail était d'évaluer les fonctionnalités des agrégats dans des systèmes plus complexes, contenant tous les éléments du lait, tout d'abord en évaluant leur impact sur la formation du réseau protéique au cours de l'acidification dans des systèmes sans matière grasse. Puis, dans un second temps, en évaluant si les agrégats peuvent agir sur l'interface des gouttelettes de matière grasse dans des systèmes contenant 80% de caséines ou si leur action se limite au réseau protéique de la phase continue.

### **Production et caractérisation des agrégats de protéines laitières**

Nous avons étudié le potentiel de texturation de quatre types d'agrégats de protéines laitières que nous avons choisis suite aux résultats obtenus au cours des thèses précédentes du projet PROFIL :

- Les agrégats fractals (branchés et peu denses) produits à pH 7 avec des concentrations variables en NaCl pour moduler leur taille.
- Les agrégats microgels (sphériques et denses) produits à un pH de 5,8.
- Les fibrilles avec une morphologie de longs et fins bâtonnets obtenus sous cisaillement à pH 2.
- Les agrégats mixtes correspondant à une micelle de caséine avec des agrégats de protéines sériques dénaturées adsorbés sur leur surface obtenus à un pH de 6,3.

Les fibrilles, de par leur pH de fabrication et leur sensibilité aux hautes pressions, ont rapidement été écartées de cette étude. A l'inverse, les capacités des agrégats fractals, des microgels et des agrégats mixtes, à moduler la texture des gels laitiers acides maigres et gras, ont été testées en les comparant avec celles des protéines sériques natives.

### **Quantification des protéines natives résiduelles après traitement thermique**

En préambule, nous avons étudié l'effet du traitement thermique sur les protéines du lait. Comme attendu, le traitement thermique entraîne une réduction du taux de protéines sériques natives résiduelles. Un temps de chauffage de 11 min à 90 °C est suffisant pour dénaturer une part importante des PS natives. De plus, les analyses sur la quantification des protéines laitières ont montré que l'ajout de protéines sériques natives ou d'agrégats fractals n'a pas d'impact significatif sur la dénaturation des protéines présentes initialement dans le lait reconstitué. En effet, la grande majorité des PS natives ajoutées avant le traitement thermique est dénaturée par celui-ci. De plus, l'ajout d'agrégats fractals n'a pas apporté de protéines sériques individuelles supplémentaires et n'a pas d'impact sur la dénaturation des PS présentes initialement dans le lait. Cela signifie que les suspensions d'agrégats fractals sont composées essentiellement d'agrégats et qu'il ne reste pas ou peu de PS natives. Par analogie, il a été considéré que les résultats seraient similaires dans le cas de l'ajout des agrégats microgels et mixtes.

Au cours de cette étude nous avons voulu répondre à plusieurs questions de recherches qui sont :

### **La structure des agrégats protéiques a-t-elle un impact sur la formation et la structure des gels laitiers acides maigres et gras ?**

La première partie de ce travail portait sur l'étude de l'impact des différents types d'agrégats sur la formation du réseau protéique dans des gels laitiers acides maigres et gras à 3,5% de matière grasse.

Elle a confirmé que l'ajout de PS natives avant traitement thermique dans du lait écrémé ou gras conduit à l'obtention de systèmes acides plus structurés avec une gélification plus rapide correspondant à un pH plus élevé. Lors de l'acidification, les protéines sériques dénaturées ont pu se fixer à la surface des micelles de caséines et/ou former des agrégats solubles, ce qui a permis d'entraîner une gélification à un pH plus élevé. Les agrégats solubles de PS peuvent agir en tant que nœuds de liaison et créer des connexions supplémentaires avec les caséines formant le réseau. L'augmentation de la fermeté des gels est d'autant plus marquée que la concentration en PS ajoutée est importante.

Les agrégats fractals ont globalement montré des aptitudes similaires aux PS sur la modulation des propriétés des gels laitiers acides maigres et contenant 3,5% de matière grasse. Cela signifie que des agrégats fractals préformés ont les mêmes capacités pour provoquer une déstabilisation plus rapide des micelles de caséines et également créer des connexions avec le réseau protéique. Une amélioration de la structure et de l'homogénéité du réseau protéique a également été obtenue. En revanche, l'ajout d'agrégats fractals conduit à des résultats variables pour la structure finale des gels acides maigres selon leur taille et les conditions d'addition. Cela peut être dû au nombre d'agrégats ou encore à leur morphologie différente qui a pu entraîner la formation d'un nombre variable de connexions avec le réseau protéique. De manière générale, l'utilisation des agrégats fractals n'a pas été plus efficace que l'ajout de protéines sériques pour améliorer la texture des gels laitiers acides maigres et gras.

La modulation des propriétés physiques des gels gras par les protéines sériques dénaturées au cours du traitement thermique ou par les agrégats provenait majoritairement du renforcement du réseau protéique de caséines au niveau de la phase continue, et non *via* l'interface des gouttelettes de matière grasse, en raison de l'adsorption prioritaire des caséines très majoritaires dans le lait. La matière grasse, incluse dans le réseau de caséines, renforce les gels acides mais n'interagit pas avec les agrégats car l'interface est saturée par les caséines. Cette matière grasse permet également de réduire de façon très importante la synérèse en comparaison avec les systèmes maigres, elle a pu être quasiment éliminée dans les systèmes pour lesquels des protéines sériques ou des agrégats fractals ont été ajoutés à des concentrations supérieures à 0,4%.

L'utilisation d'agrégats microgels ou mixtes n'a pas permis le renforcement de la texture des gels laitiers acides maigres et contenant 3,5% de matière grasse même à la plus haute concentration testée (1,5%). Les agrégats mixtes induisent cependant une diminution de la synérèse, ce qui démontre leur capacité d'absorption d'eau. En revanche, les agrégats microgels et mixtes ne semblent pas prendre part à la formation du réseau protéique et ne créent pas de connexions avec le réseau de caséines. Ils ont cependant permis de réaliser un enrichissement en protéines des gels laitiers acides et donc la création d'un type de produit différent des deux premiers cas, avec une texture moins ferme malgré une formule enrichie en protéines.

### **La taille des agrégats influence-t-elle les propriétés des gels laitiers acides ?**

Deux éléments structuraux des agrégats sont fondamentaux pour moduler les propriétés des gels laitiers acide, il s'agit de :

- la taille des agrégats → permettant lorsqu'ils sont plus grands la formation de connexions à longue distance
- le nombre d'agrégats → permettant lorsqu'ils sont nombreux d'augmenter les probabilités de connexions.

Les résultats ont montré une meilleure capacité des agrégats fractals à augmenter la fermeté des gels laitiers acides à 3,5 et 10% de matière grasse. En effet, plus les agrégats sont petits plus leur **nombre est important** et plus les modules augmentent au cours de l'acidification, car le nombre de connexions avec le réseau protéique est supérieur.

En revanche, sur les préparations lactières non acidifiées à 15% de matière grasse, lorsque la surface interfaciale est suffisamment développée pour être limitant en caséines, **la taille** des agrégats fractals est le point essentiel. Une taille importante permet des connexions à longue distance entre les interfaces des gouttelettes de matière grasse.

### **Les agrégats protéiques jouent-ils un rôle sur l'interface des gouttelettes de matière grasse ?**

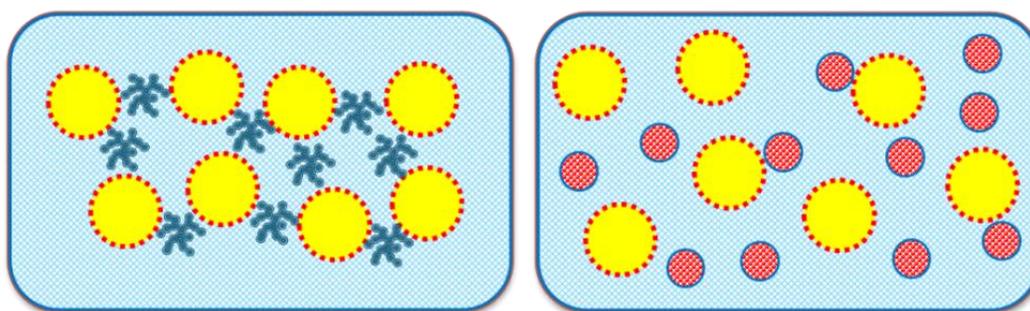
Nous avons donc réussi à maîtriser la texture des gels acides laitiers en jouant principalement, dans un premier temps, sur la formation du réseau protéique et la composition de la phase continue pour les systèmes contenant peu de matière grasse, mais également à plus forte concentration en matière grasse, en jouant sur la composition interfaciale et la création de différentes interactions. Nous avons réussi à comprendre les différences de mécanismes impliqués selon les conditions expérimentales, ce qui a permis de vérifier ou réfuter les hypothèses de départ.

## Conclusions

Nous avons mis en évidence par électrophorèse le fait que certains types d'agrégats peuvent accéder à l'interface des gouttelettes de matière grasse lorsque celle-ci est suffisamment importante, c'est-à-dire en augmentant la pression d'homogénéisation et/ou en augmentant la quantité de matière grasse. Les caséines, en quantité limitante, ne recouvrent alors pas entièrement l'interface et laissent la possibilité aux agrégats de s'y adsorber. En revanche, les résultats ont montré que toutes les structures protéiques n'ont pas les mêmes fonctionnalités. En effet, lorsqu'ils sont présents à la surface des gouttelettes de matière grasse, les agrégats fractals créent des connexions entre elles et avec le réseau et ainsi augmentent la texture finale des gels acides.

D'autre part, au vu des résultats obtenus à 10% de matière grasse, on suppose qu'une partie des agrégats mixtes peut accéder à l'interface, sans avoir la capacité de créer des connexions entre les gouttelettes. Dans toutes les conditions testées, les gels obtenus ont une fermeté proche de celle des gels dans lesquels aucun élément n'est ajouté.

Pour rappel, une représentation schématique des deux types de structure : avec agrégats fractals et avec agrégats mixtes est montrée sur la Figure 82. On observe des agrégats fractals à l'interface des gouttelettes de matière grasse, créant des connexions avec les gouttelettes voisines, alors que seuls certains agrégats mixtes accèdent à l'interface, sans pour autant créer de nouvelles connexions, et que la majorité d'entre eux restent dans la phase continue.



**Figure 82** : Schéma représentant les hypothèses de structure des gels acides laitiers avec une interface non saturée en caséines (rouge) contenant des agrégats fractals (gauche) ou des agrégats mixtes (droite)

### **La formation de liaison SS joue-t-elle un rôle dans la structuration des gels laitiers acides ?**

L'étude des interactions a montré que la formation de ponts disulfures intervient tout au long de l'élaboration des gels laitiers acides. Lorsque leur formation est bloquée, d'autres types d'interactions de faible énergie peuvent se mettre en place, en plus grand nombre en présence de protéines sériques ou d'agrégats fractals, qui induisent alors la création de gels forts mais très cassants.

## Conclusions

---

# Perspectives



Les résultats obtenus au cours de cette étude ouvrent plusieurs perspectives, pour des recherches à la fois scientifiques ou plus appliquées, et qui peuvent intéresser différents domaines de l'industrie agroalimentaire.

### **Perspectives de recherches scientifiques**

Dans ce travail, les caséines avaient un rôle primordial dans la texturation des gels laitiers acides de par leur capacité à s'absorber de façon préférentielle à l'interface des gouttelettes de matière grasse. Le rôle des agrégats est alors très minime dans les systèmes à faible concentration en matière grasse. A ces teneurs en MG, il serait très intéressant de travailler sur de nouveaux systèmes modèles de yaourt contenant moins de caséines. Ainsi, les agrégats pourraient agir de façon marquée sur l'interface et moduler plus nettement la texture des gels.

Un autre point sur lequel des recherches pourraient être menées est la compréhension du rôle respectif des agrégats mixtes préformés à pH 6,3 et des agrégats mixtes produits *in situ* à pH 6,7. En effet, nos résultats ont montré que les agrégats mixtes préformés puis ajoutés dans le lait, n'ont pas les mêmes fonctionnalités que des agrégats mixtes se formant *in situ* lors d'un traitement thermique classique du lait. Nous savons que les conditions expérimentales mises en œuvre ne sont pas les mêmes et qu'ils n'induisent pas la formation des mêmes proportions d'agrégats mixtes et d'agrégats de protéines sériques solubles. Une caractérisation plus poussée de ces agrégats, en isolant les structures formées *in situ*, permettrait de répondre à cette question. Il faudrait étudier également plus finement l'impact du pH sur leur structure.

Pour pousser encore plus l'analyse des systèmes étudiés au cours de cette thèse, des observations en microscopie électronique à balayage environnementale pourraient être réalisées, afin d'avoir une meilleure caractérisation de l'interface des gouttelettes de matière grasse. En effet, la technique utilisée au cours de ce travail de thèse, à savoir la microscopie électronique en transmission après inclusion dans une résine, demande de nombreuses étapes de préparation pouvant altérer les échantillons, alors que l'échantillon pourrait être observé directement en MEB utilisé en mode environnemental.

Au cours de cette étude, nous avons uniquement travaillé sur des produits modèles acidifiés par de la glucono- $\delta$ -lactone. Or il serait intéressant de travailler en fermentation lactique sur ces mêmes produits avec l'ajout des différents agrégats. Cela permettrait de valider les conclusions obtenues en systèmes modèle et d'acquérir une meilleure compréhension, ce qui est en cours d'étude dans le projet PROFIL.

Enfin il serait intéressant d'approfondir l'étude des systèmes laitiers hyper enrichis en matière grasse et de réaliser une acidification efficace et homogène des systèmes déjà texturés après homogénéisation. De plus nous avons mis en évidence que les agrégats présentent des fonctionnalités différentes selon leur nature, mais aucune expérience n'a été réalisée sur des mélanges de ces différents agrégats ce qui pourrait constituer une recherche potentielle pour évaluer s'il existe de possibles synergies entre les différents agrégats protéiques.

### **Perspectives de recherches industrielles**

Les résultats présentés au cours de cette thèse ont été réalisés sur des systèmes acidifiés de type yaourt et les agrégats utilisés ont également été étudiés précédemment dans des émulsions modèles à pH neutre. Cependant d'autres produits alimentaires laitiers ou non dans lesquels des protéines laitières sont déjà ajoutées pourraient faire l'objet d'un travail similaire. En effet, nous avons montré qu'il est possible d'avoir une gamme de texture assez large en ajoutant dans le lait différents types d'agrégats protéiques. Or ceux-ci pourraient être inclus dans d'autres produits alimentaires pour lesquels on souhaite modifier la texture, en jouant sur la composition en matière grasse ou en protéines ou encore limiter la synérèse. Les agrégats de protéines laitières peuvent avantageusement remplacer certains additifs alimentaires autorisés dans la formulation de nombreux produits alimentaires, mais ces additifs ont une mauvaise réputation auprès des consommateurs et sont régulièrement remis en cause dans des études nutritionnelles. De nombreux acteurs industriels pourraient souhaiter utiliser ces agrégats naturels en remplacement de certains additifs.

Les agrégats utilisés au cours de ce travail sont très intéressants pour moduler la texture des gels acides laitiers. Cependant ces agrégats ont été ajoutés dans le lait sous forme d'une suspension liquide et ont été produits en petite quantité. Il serait plus intéressant qu'ils soient sous forme d'une poudre ce qui faciliterait leur utilisation et leur conservation. Des études du projet PROFIL sont actuellement entreprises pour développer un procédé de fabrication en continu permettant de produire de grandes quantités d'agrégats, ainsi qu'un procédé de séchage pour permettre leur utilisation sous forme d'un ingrédient sec, plus facile d'utilisation.

# Bibliographies



## Bibliographies

---

- Adamcik, J., & Mezzenga, R. (2012). Proteins fibrils from a polymer physics perspective. *Macromolecules*, 45(3), 1137–1150. <http://doi.org/10.1021/ma202157h>
- Aguilera, J. M., & Kinsella, J. E. (1988). Physico-chemical and rheological properties of milk fat globules with modified membranes. *Milchwissenschaft*, 43(411–415).
- Aguilera, J. M., & Kinsella, J. E. (1991). Compression Strength of Dairy Gels and Microstructural Interpretation. *Journal of Food Science*, 56(5), 1224–1228. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb04739.x>
- Aguilera, J. M., Xiong, Y. L., & Kinsella, J. E. (1993). Viscoelastic Properties of Mixed Flour Gels. *Food Research International*, 26, 11–17.
- Akkermans, C., van der Goot, A. J., Venema, P., van der Linden, E., & Boom, R. M. (2008). Formation of fibrillar whey protein aggregates: Influence of heat and shear treatment, and resulting rheology. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1315–1325. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.07.001>
- 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 b-lactoglobulin formed at pH 2. *Biomacromolecules*, 9(5), 1474–1479. <http://doi.org/10.1021/bm7014224>
- 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. <http://doi.org/10.1021/jf011657m>
- 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. <http://doi.org/10.1021/jf000474h>
- Andoyo, R., Guyomarc'h, F., Burel, A., & Famelart, M. H. (2015). Spatial arrangement of casein micelles and whey protein aggregate in acid gels: Insight on mechanisms. *Food Hydrocolloids*, 51, 118–128. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.031>
- Andoyo, R., Guyomarc'h, F., Cauty, C., & Famelart, M. H. (2014). Model mixtures evidence the respective roles of whey protein particles and casein micelles during acid gelation. *Food Hydrocolloids*, 37, 203–212. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.019>
- Anema, S. G. (2007). Role of  $\kappa$ -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. <http://doi.org/10.1021/jf062734m>
- 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. <http://doi.org/10.1021/jf960507m>
- Anema, S. G., Lee, K. S., Lowe, E. K., & Klostermeyer, H. (2004). Rheological Properties of Acid Gels Prepared from Heated pH-Adjusted Skim Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 337–343. <http://doi.org/10.1021/jf034972c>
- Anema, S. G., & Li, Y. (2000). Further Studies on the Heat-induced, pH-dependent Dissociation of Casein from the Micelles in Reconstituted Skim Milk. *LWT - Food Science and Technology*, 33(5), 335–343.

## Bibliographies

---

- <http://doi.org/10.1006/fstl.2000.0665>
- 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, 73–83. <http://doi.org/10.1017/S0022029902005903>
- Anema, S. G., & Li, Y. (2015). Reassociation of dissociated caseins upon acidification of heated pH-adjusted skim milk. *Food Chemistry*, 174, 339–347. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.054>
- Anema, S. G., & McKenna, A. B. (1996). Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 422–428. <http://doi.org/10.1021/jf950217q>
- Aymard, P., Gimel, J. C., Nicolai, T., & Durand, D. (1996). Experimental evidence for a two-step process in the aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 7. *Journal de Chimie Physique*, 93, 987–997.
- Aymard, P., Nicolai, T., Durand, D., & Clark, A. (1999). Static and Dynamic Scattering of  $\beta$ -Lactoglobulin Aggregates Formed after Heat-Induced Denaturation at pH 2. *Macromolecules*, 32(8), 2542–2552. <http://doi.org/10.1021/ma981689j>
- Bingham, E. W. (1971). Influence of Temperature and pH on the Solubility of  $\alpha$ 1-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -Casein. *Journal of Dairy Science*, 54(7), 1077–1080. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(71\)85974-X](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(71)85974-X)
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.002>
- Bouchoux, A., Debbou, B., Gésan-Guiziou, G., Famelart, M.-H., Doublier, J.-L., & Cabane, B. (2009). Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions. *The Journal of Chemical Physics*, 131(16), 165106. <http://doi.org/10.1063/1.3245956>
- Bouchoux, A., Gésan-Guiziou, G., Pérez, J., & Cabane, B. (2010). How to squeeze a sponge: Casein micelles under osmotic stress, a SAXS study. *Biophysical Journal*, 99(11), 3754–3762. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.019>
- Britten, M., & Giroux, H. J. (1991). Emulsifying Properties of Whey Protein and Casein Composite Blends. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3318–3325. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78519-6](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78519-6)
- Bryant, C. M., & McClements, J. 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. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00031-4](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00031-4)
- Cano-Ruiz, M. E., & Richter, R. L. (1997). Effect of Homogenization Pressure on the Milk Fat Globule Membrane Proteins. *Journal of Dairy Science*, 80(11), 2732–2739. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76235-0](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76235-0)
- Cayot, P., & Lorient, D. (1998). *Structures et technofonctions des protéines du lait*. Paris: Tec et doc Lavoisier.
- Cheftel, J. C., & Lorient, D. (1982). Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Le Lait*, 62, 435–483.

## Bibliographies

---

- Chen, J., & Dickinson, E. (1998). Viscoelastic properties of heat-set whey protein emulsion gels. *Journal of Texture Studies*, 29(3), 285–304. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1998.tb00171.x>
- Chevallier, M. (2017). *Combined effect of the whey protein aggregates and caseins on dairy emulsions stability during technological treatments*. Université Bretagne Loire.
- Chevallier, M., Riaublanc, A., Lopez, C., Hamon, P., Rousseau, F., & Croguennec, T. (2016). Aggregated whey proteins and trace of caseins synergistically improve the heat stability of whey protein-rich emulsions. *Food Hydrocolloids*, 61, 487–495. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.009>
- Chevallier, M., Riaublanc, A., Lopez, C., Hamon, P., Rousseau, F., Thevenot, J., & Croguennec, T. (2018). Increasing the heat stability of whey protein-rich emulsions by combining the functional role of WPM and caseins. *Food Hydrocolloids*, 76, 164–172. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.014>
- Cho, Y. H., Lucey, J. A., & Singh, H. (1999). Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat globule surface material and heat treatment of milk. *International Dairy Journal*, 9(8), 537–545. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00123-5](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00123-5)
- Cobos, A., Horne, D. S., & Muir, D. D. (1995). Rheological properties of acid milk gels. I. Effect of composition, process and acidification conditions on products from recombined milks. *Milchwissenschaft*, 50, 444–448.
- Creamer, L. K., Parry, D. A. D., & Malcolm, G. N. (1983). *Secondary Structure of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin B*. *Archives of biochemistry and biophysics* (Vol. 227).
- Dalgleish, D. G. (1996). Conformations and structures of milk proteins adsorbed to oil-water interfaces. *Food Research International*, 29(5–6), 541–547. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(96\)00065-8](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00065-8)
- Dalgleish, D. G., & Law, A. J. R. (1988). pH-induced dissociation of bovine casein micelles I. Analysis of liberated caseins. *Journal of Dairy Research*, 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(5), 727–735. <http://doi.org/10.1017/S0022029900029290>
- Dalgleish, D. G., Senaratne, V., & Francois, S. (1997). Interactions between  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin in the Early Stages of Heat Denaturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3459–3464. <http://doi.org/10.1021/jf970113a>
- 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. <http://doi.org/10.1021/jf970524r>
- Darling, D. F., & Dickson, J. (1979). Electrophoretic mobility of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 46, 441–451. <http://doi.org/10.1017/S0022029900017477>
- de Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S., & Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171–172, 36–52. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002>
- de Kruif, C. G., & Zhulina, E. B. (1996). k-casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. *Colloids and Surfaces*, 117, 151–159.

## Bibliographies

---

- de Wit, J. N. (1981). Structure and functional behaviour of whey proteins. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35, 47–64.
- de Wit, J. N. (1998). Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*, 81(3), 597–608. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75613-9](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75613-9)
- de Wit, J. N. (2009). Thermal behaviour of bovine  $\beta$ -lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(1), 27–34. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.012>
- 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. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81628-8](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81628-8)
- Deeth, H. C. (1997). The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. *Australian Journal of Dairy Technology*, 52(1), 44–46.
- Delikanli, B., & Ozcan, T. (2017). Improving the Textural Properties of Yogurt Fortified with Milk Proteins. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5). <http://doi.org/10.1111/jfpp.13101>
- 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. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb03997.x>
- 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. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04407.x>
- Deroanne, C. (1976). La cristallisation et le fractionnement naturel de la matière grasse butyrique. *Le Lait*, 56, 39–55.
- Dickinson, E. (1996). *Les colloïdes alimentaires*. Paris: Masson.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 25–39. [http://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00120-5](http://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00120-5)
- 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. <http://doi.org/10.1080/01932699908943787>
- Dickinson, E., Rolfe, S. E., & Dalgleish, D. G. (1988). Competitive adsorption of  $\alpha$ s1-casein and  $\beta$ -casein in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 2(5), 397–405. [http://doi.org/10.1016/S0268-005X\(88\)80004-3](http://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80004-3)
- Donato, L., & Guyomarç'h, F. (2009). Formation and properties of the whey protein/ $\kappa$ -casein complexes in heated skim milk – A review. *Dairy Science and Technology*, 89(1), 3–29. <http://doi.org/10.1051/dst:2008033>
- Donato, L., Kolodziejczyk, E., & Rouvet, M. (2011). Mixtures of whey protein microgels and soluble aggregates as building blocks to control rheology and structure of acid induced cold-set gels. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 734–742. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.020>
- Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L., & Rouvet, M. (2009). Mechanism of formation of stable heat-induced

## Bibliographies

---

- $\beta$ -lactoglobulin microgels. *International Dairy Journal*, 19(5), 295–306.  
<http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.11.005>
- Drelon, N. (2006). *Élaboration et consolidation thermique de gels à base de substances émulsionnées cristallisables*. Bordeaux 1.
- Drelon, N., Gravier, E., Daheron, L., Boisserie, L., Omari, A., & Leal-Calderon, F. (2006). Influence of tempering on the mechanical properties of whipped dairy creams. *International Dairy Journal*, 16(12), 1454–1463. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.003>
- Elfagm, A. A., & Wheelock, J. V. (1978). Heat Interaction Between  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin and Casein in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 61(2), 159–163. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83572-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83572-3)
- Elfagm, A. A., & Wheelock, J. V. (1977). Effect of heat on  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 44(2), 367. <http://doi.org/10.1017/S002202990002032X>
- Euber, J. R., & Brunner, J. R. (1982). Interaction of  $\kappa$ -Casein with Immobilized  $\beta$ -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 65(12), 2384–2387. [http://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(82\)82512-5](http://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(82)82512-5)
- Famelart, M. H., Guyomarc'h, F., Morand, M., & Novales, B. (2011). Agrégation protéique et propriétés gélifiantes et moussantes des protéines laitières – quoi de neuf sur le plan des connaissances ? *Innovations Agronomiques*, 13(13), 117–132.
- Famelart, M. H., Lepesant, F., Gaucheron, F., Le Graet, Y., & Schuck, P. (1996). pH-Induced physicochemical modifications of native phosphocaseinate suspensions: Influence of aqueous phase. *Le Lait*, 76(5), 445–460. <http://doi.org/10.1051/lait:1996534>
- FAO. (2003a). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Chapitre 5 : Lait fermentés. Retrieved June 12, 2018, from <http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F0d.htm>
- FAO. (2003b). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine - Matière grasse. Retrieved August 22, 2018, from <http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F0i.htm>
- 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. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
- Fly, J. A., Clarke, P. T., Du Parquet, H., Toyne, S., & Augustin, M. A. (1997). Use of glucono-delta- lactone in the manufacture of yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 52, 20–23.
- Gaucheron, F. (2004). *Minéraux et produits laitiers*. Paris: Tec et doc Lavoisier.
- Gosal, W. S., Clark, A. H., Pudney, P. D. A., & Ross-Murphy, S. B. (2002). Novel amyloid fibrillar networks derived from a globular protein:  $\beta$ -lactoglobulin. *Langmuir*, 18(19), 7174–7181. <http://doi.org/10.1021/la025531a>
- Graham, D. ., & Phillips, M. . (1979). Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3), 403–414. [http://doi.org/10.1016/0021-9797\(79\)90048-1](http://doi.org/10.1016/0021-9797(79)90048-1)
- Guyomarc'h, F., Jemin, M., Tilly, V. Le, Madec, M. N., & Famelart, M. H. (2009). Role of the heat-induced

## Bibliographies

---

- whey protein/ $\kappa$ -casein complexes in the formation of acid milk gels: A kinetic study using rheology and confocal microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5910–5917. <http://doi.org/10.1021/jf804042k>
- Guyomarc'h, F., Nono, M., Nicolai, T., & Durand, D. (2009). Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of  $\kappa$ -casein or sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1103–1110. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.001>
- Haque, Z., & Kinsella, J. E. (1988). Interaction between heated  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin: Predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation. *Journal of Dairy Research*, 55(1), 67–80. <http://doi.org/10.1017/S0022029900025863>
- Haque, Z., Kristjansson, M. M., & Kinsella, J. E. (1987). Interaction Between  $\kappa$ -Casein and  $\beta$ -Lactoglobulin: Possible Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(5), 644–649. <http://doi.org/10.1021/jf00077a003>
- 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. <http://doi.org/10.1021/jf990736j>
- Havea, P., Watkinson, P., & Kuhn-Sherlock, B. (2009). Heat-Induced Whey Protein Gels : Protein - Protein Interactions and Functional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1506–1512.
- Holt, C. (1992). Structure and Stability of Bovine Casein Micelles. *Advances in Protein Chemistry*, 43, 63–151. [http://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60554-9](http://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60554-9)
- 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, 85–111.
- Isleten, M., & Karagul-Yuceer, Y. (2006). Effects of Dried Dairy Ingredients on Physical and Sensory Properties of Nonfat Yogurt. *Journal of Dairy Science*, 89(8), 2865–2872. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72559-0](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72559-0)
- Jang, H. D., & Swaisgood, H. E. (1990). Disulfide Bond Formation Between Thermally Denatured  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\kappa$ -Casein in Casein Micelles. *Journal of Dairy Science*, 73(4), 900–904. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78746-2](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78746-2)
- Jost, R., Baechler, R., & Masson, G. (1986). Gelation of oil-in-water emulsions stabilized by whey protein. *Journal of Food Quality*, 51, 440–444. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.12.011>
- Jost, R., Dannenberg, F., & Rosset, J. (1989). Heat-set gels based on oil/water emulsions: an application of whey protein functionality. *Food Microstructure*, 8(1), 23–28.
- Jung, J. M., Savin, G., Pouzot, M., Schmitt, C., & Mezzenga, R. (2008). Structure of heat-induced  $\beta$ -lactoglobulin aggregates and their complexes with sodium-dodecyl sulfate. *Biomacromolecules*, 9(9), 2477–2486. <http://doi.org/10.1021/bm800502j>
- Keogh, M. K., & O'Kennedy, B. T. (1998). Rheology of Stirred Yogurt as Affected by Added Milk Fat, Protein and Hydrocolloids. *Journal of Food Science*, 63(1), 108–112. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15687.x>
- Kharlamova, A. (2017). *Texturization of dairy protein systems with whey protein isolate aggregates*.

Maine.

- Kharlamova, A., Inthavong, W., Nicolai, T., & Chassenieux, C. (2016). The effect of aggregation into fractals or microgels on the charge density and the isoionic point of globular proteins. *Food Hydrocolloids*, *60*, 470–475. <http://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.04.013>
- Kim, B. Y., & Kinsella, J. E. (1989). Rheological Changes During Slow Acid Induced Milk by D-glucono-Wactone. *Journal of Food Science*, *54*(4), 894–898.
- Kinsella, J. E., & Whitehead, D. M. (1989). Proteins in Whey: Chemical, Physical, and Functional Properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, *33*, 343–438. [http://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60130-8](http://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60130-8)
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.02.016>
- Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Tzanetakis, N. (2003). Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. *Food Chemistry*, *83*(3), 437–446. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00126-2](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00126-2)
- Le Graet, Y., & Brulé, G. (1993). Les équilibres minéraux du lait : influence du pH et de la force ionique. *Le Lait*, *73*(1), 51–60. <http://doi.org/10.1051/lait:199312>
- Liu, G., Buldo, P., Greve, M. T., Nielsen, S. B., Nielsen, J. H., & Ipsen, R. (2016). Effects of added whey protein aggregates on textural and microstructural properties of acidified milk model systems. *International Dairy Journal*, *62*, 43–52. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.07.006>
- Liu, G., Jæger, T. C., Lund, M. N., Nielsen, S. B., Ray, C. A., & Ipsen, R. (2016). Effects of disulphide bonds between added whey protein aggregates and other milk components on the rheological properties of acidified milk model systems. *International Dairy Journal*, *59*, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.03.002>
- Loiseleux, T. (2017). *Compétition interfaciale entre les protéines solubles et agrégées : connectivité des gouttelettes et texture des émulsions laitières*. Université Bretagne Loire.
- Loiseleux, T., Rolland-Sabaté, A., Garnier, C., Croguennec, T., Guilois, S., Anton, M., & Riaublanc, A. (2018). 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 Hydrocolloids*, *74*, 197–206. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.012>
- Lopez, C. (2005). Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products. *Reproduction Nutrition Development*, *45*(4), 497–511. <http://doi.org/10.1051/rnd:2005034>
- Lucey, J. A., Munro, P. A., & Singh, H. (1998). Rheological properties and microstructure of acid milk gels as affected by fat content and heat treatment. *Journal of Food Science*, *63*(4), 660–664. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15807.x>
- Lucey, J. A., Munro, P. A., & Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, *9*(3–6), 275–

279. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00074-6](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00074-6)
- Lucey, J. A., & Singh, H. (1998). Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International*, 30(7), 529–542. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00015-5](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5)
- Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (1998a). A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- $\delta$ -lactone. *Food Research International*, 31(2), 147–155. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00075-1](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00075-1)
- Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (1998b). Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *Journal of Dairy Research*, 65(4), 555–567. <http://doi.org/10.1017/S0022029998003057>
- Lucey, J. A., Teo, C. T., Munro, P. A., & Singh, H. (1997). Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. *Journal of Dairy Research*, 64(4), 591–600. <http://doi.org/10.1017/S0022029997002380>
- Lucey, J. A., Teo, C. T., Munro, P. A., & Singh, H. (1998). Microstructure, permeability and appearance of acid gels made from heated skim milk. *Food Hydrocolloids*, 12(2), 159–165. [http://doi.org/10.1016/S0268-005X\(98\)00012-5](http://doi.org/10.1016/S0268-005X(98)00012-5)
- Lucey, J. A., van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T., & Walstra, P. (1997). Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- $\delta$ -lactone. 1. Rheological properties. *International Dairy Journal*, 7(6–7), 381–388. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00027-7](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00027-7)
- Mahmoudi, N., Axelos, M. a. V., & Riaublanc, A. (2011). Interfacial properties of fractal and spherical whey protein aggregates. *Soft Matter*, 7(17), 7643. <http://doi.org/10.1039/c1sm05262d>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.01.036>
- Mahmoudi, N., Mehalebi, S., Nicolai, T., Durand, D., & Riaublanc, A. (2007). Light-Scattering Study of the Structure of Aggregates and Gels Formed by Heat-Denatured Whey Protein Isolate and  $\beta$ -Lactoglobulin at Neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3104–3111. <http://doi.org/10.1021/jf063029g>
- Martin, A. H., Grolle, K., Bos, M. A., Stuart, M. A. C., & van Vliet, T. (2002). Network Forming Properties of Various Proteins Adsorbed at the Air/Water Interface in Relation to Foam Stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 254(1), 175–183. <http://doi.org/10.1006/JCIS.2002.8592>
- Mathieu, J. (1998). *Initiation à la physicochimie du lait*. Paris: Tec et doc Lavoisier.
- McClements, D. J. (1999). *Food emulsions : principles, practices, and techniques*. Washington DC: CRC Press.
- Mehalebi, S., Nicolai, T., & Durand, D. (2008). Light scattering study of heat-denatured globular protein aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(2), 129–135. <http://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2008.04.002>
- Ménard, O., Camier, B., & Guyomarc'h, F. (2005). Effect of heat treatment at alkaline pH on the rennet

- coagulation properties of skim milk. *Lait*, 85, 515–526. <http://doi.org/10.1051/lait:2005037>
- Mie, G. (1908). Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Annalen Der Physik*, 25(3), 377–445. <http://doi.org/10.1002/andp.19083300302>
- Morand, M., Dekkari, A., Guyomarc'h, F., & Famelart, M. H. (2012). Increasing the hydrophobicity of the heat-induced whey protein complexes improves the acid gelation of skim milk. *International Dairy Journal*, 25(2), 103–111. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.03.002>
- Morr, C. V. (1967). Effect of Oxalate and Urea upon Ultracentrifugation Properties of Raw and Heated Skimmilk Casein Micelles. *Journal of Dairy Science*, 50(11), 1744–1751. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(67\)87710-5](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(67)87710-5)
- Mottar, J., Bassier, A., Joniau, M., & Baert, J. (1989). Effect of Heat-Induced Association of Whey Proteins and Casein Micelles on Yogurt Texture. *Journal of Dairy Science*, 72(9), 2247–2256. [http://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(89\)79355-3](http://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(89)79355-3)
- Nguyen, N. H. A., Wong, M., Guyomarc, F., Havea, P., & Anema, S. G. (2014). Effects of non-covalent interactions between the milk proteins on the rheological properties of acid gels. *International Dairy Journal*, 37(2), 57–63. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.001>
- Nicolai, T., Britten, M., & Schmitt, C. (2011).  $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1945–1962. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.006>
- Nicolai, T., & Durand, D. (2013). Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 249–256. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.03.001>
- Ozcan, T., Horne, D. S., & Lucey, J. A. (2015). Yogurt made from milk heated at different pH values. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 6749–6758. <http://doi.org/10.3168/jds.2015-9643>
- Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., ... Kraulis, P. J. (1986). The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324(6095), 383–385. <http://doi.org/10.1038/324383a0>
- Patton, S., & Huston, G. E. (1986). a Method for Isolation of Milk-Fat Globules. *Lipids*, 21(2), 170–174. <http://doi.org/10.1007/bf02534441>
- 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. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78707-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78707-3)
- Phan-Xuan, T. (2013). *Elaboration of microgel protein particles by controlled selfassembling of heat-denatured beta-lactoglobulin*. Maine.
- Phan-Xuan, T., Durand, D., Nicolai, T., Donato, L., Schmitt, C., & Bovetto, L. (2011). On the crucial importance of the ph for the formation and self-stabilization of protein microgels and strands. *Langmuir*, 27(24), 15092–15101. <http://doi.org/10.1021/la203357p>
- Phan-Xuan, T., Durand, D., Nicolai, T., Donato, L., Schmitt, C., & Bovetto, L. (2014). Heat induced formation of beta-lactoglobulin microgels driven by addition of calcium ions. *Food Hydrocolloids*, 34, 227–235. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.09.008>

## Bibliographies

---

- Relkin, P. (1998). Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of  $\beta$ -lactoglobulin: Their role in heat-induced sol-gel state transition. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22(1), 59–66. [http://doi.org/10.1016/S0141-8130\(97\)00089-5](http://doi.org/10.1016/S0141-8130(97)00089-5)
- Ribadeau-Dumas, B., & Grappin, R. (1989). Milk protein analysis. *Le Lait*, 69(5), 357–416.
- Roefs, S. P. F. M., & De Kruif, K. G. (1994). A model for the denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry*, 226(3), 883–889. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00883.x>
- Schmidt, D. G. (1982). *Association of caseins and casein micelle structure*. Londres: Developments in Dairy Chemistry.
- Schmitt, C., Bovay, C., Vuilliamenet, A. M., Rouvet, M., & Bovetto, L. (2011). Influence of protein and mineral composition on the formation of whey protein heat-induced microgels. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 558–567. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.010>
- 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. <http://doi.org/10.1039/c0sm00220h>
- Sfakianakis, P., & Tzia, C. (2014). Conventional and Innovative Processing of Milk for Yogurt Manufacture; Development of Texture and Flavor: A Review. *Foods*, 3(1), 176–193. <http://doi.org/10.3390/foods3010176>
- Shaker, R. ., Jumah, R. ., & Abu-Jdayil, B. (2000). Rheological properties of plain yogurt during coagulation process: impact of fat content and preheat treatment of milk. *Journal of Food Engineering*, 44(3), 175–180. [http://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00022-4](http://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00022-4)
- Shukla, A., Narayanan, T., & Zanchi, D. (2009). Structure of casein micelles and their complexation with tannins. *Soft Matter*, 5(15), 2884–2888. <http://doi.org/10.1039/b903103k>
- 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. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb08019.x>
- Singh, H., & Fox, P. F. (1986). Heat stability of milk: further studies on the pH-dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -casein. *Journal of Dairy Research*, 53(2), 237. <http://doi.org/10.1017/S0022029900024845>
- Singh, H., & Fox, P. F. (1987). Heat stability of milk: role of  $\beta$ -lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -casein. *Journal of Dairy Research*, 54(4), 509. <http://doi.org/10.1017/S0022029900025711>
- Soukoulis, C., Panagiotidis, P., Koureli, R., & Tzia, C. (2007). Industrial Yogurt Manufacture: Monitoring of Fermentation Process and Improvement of Final Product Quality. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2641–2654. <http://doi.org/10.3168/jds.2006-802>
- Srinivasan, M., Singh, H., & Munro, P. A. (1996). Sodium Caseinate-Stabilized Emulsions: Factors Affecting Coverage and Composition of Surface Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3807–3811. <http://doi.org/10.1021/jf960135h>

## Bibliographies

---

- Steventon, A. J., Parkinson, C. J., Fryer, P. J., & Bottomley, R. C. (1990). *The rheology of yoghurt*. (R. E. Carter, Ed.). London: Elsevier Applied Science.
- Surel, C. (2012). *Structure et connectivité des interfaces huile-eau en relation avec les propriétés rhéologiques des crèmes dessert et l'oxydation des lipides*. Nantes.
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.016>
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's yoghurt : science and technology*. Cambridge: Woodhead Publishing LTD.
- Thompson, A., Boland, M., & Singh, H. (2009). *Milk Proteins: from expression to food*. Amsterdam: Elsevier.
- 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.
- Torres, I. C., Amigo, J. M., Knudsen, J. C., Tolkach, A., Mikkelsen, B. Ø., & Ipsen, R. (2018). Rheology and microstructure of low-fat yoghurt produced with whey protein microparticles as fat replacer. *International Dairy Journal*, *81*, 62–71. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.01.004>
- van Vliet, T., van Dijk, H. J. M., Zoon, P., & Walstra, P. (1991). Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid & Polymer Science*, *269*(6), 620–627. <http://doi.org/10.1007/BF00659917>
- Vasbinder, A. J., Alting, A. C., Visschers, R. W., & De Kruif, C. G. (2003). Texture of acid milk gels: Formation of disulfide cross-links during acidification. *International Dairy Journal*, *13*(1), 29–38. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00141-3](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00141-3)
- Vasbinder, A. J., & De Kruif, C. G. (2003). Casein-whey protein interactions in heated milk: The influence of pH. *International Dairy Journal*, *13*(8), 669–677. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00120-1](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00120-1)
- Vasbinder, A. J., de Velde, F. V., & de Kruif, C. G. (2004). Gelation of casein-whey protein mixtures. *Journal of Dairy Science*, *87*(5), 1167–1176. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73265-8](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73265-8)
- Vasbinder, A. J., Van Mil, P. J. J. M., Bot, A., & De Kruif, K. G. (2001). Acid-induced gelation of heat-treated milk studied by diffusing wave spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *21*(1–3), 245–250. [http://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00177-1](http://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00177-1)
- Veerman, C., Ruis, H., Sagis, L. M. C., & van der Linden, E. (2002). Effect of electrostatic interactions on the percolation concentration of fibrillar beta-lactoglobulin gels. *Biomacromolecules*, *3*(4), 869–73. [http://doi.org/bm025533+ \[pii\]](http://doi.org/bm025533+ [pii])
- Vélez-Ruiz, J. F., Barbosa Cánovas, G. V., & Peleg, M. (1997). Rheological properties of selected dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *37*(4), 311–359. <http://doi.org/10.1080/10408399709527778>
- Walstra, P. (1990). On the Stability of Casein Micelles. *Journal of Dairy Science*, *73*(8), 1965–1979. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78875-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78875-3)

## Bibliographies

---

- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9(3–6), 189–192. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00059-X](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00059-X)
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., & Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 63–71. <http://doi.org/10.1016/J.CIS.2003.10.011>
- Xiong, Y. L., Aguilera, J. M., & Kinsella, J. E. (1991). Emulsified Milkfat Effects on Rheology of Acid-Induced Milk Gels. *Journal of Food Science*, 56(4), 920–925. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb14606.x>
- Ye, A. (2008). Interfacial composition and stability of emulsions made with mixtures of commercial sodium caseinate and whey protein concentrate. *Food Chemistry*, 110(4), 946–952. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.091>
- Zhang, Z., Arrighi, V., Campbell, L., Lonchamp, J., & Euston, S. R. (2016). Properties of partially denatured whey protein products: Formation and characterisation of structure. *Food Hydrocolloids*, 52, 95–105. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.009>

**Titre :** Modulation de la texture de gels acides laitiers par addition d'agrégats de protéines lactières

**Mots clés :** agrégats protéiques, texture, gels acides laitiers, viscoélasticité, synérèse, composition interfaciale

**Résumé :** La texture des produits laitiers est un paramètre clé influençant les choix des consommateurs. Dans les systèmes acides de type yaourt, l'ajout d'agrégats protéiques permettrait le développement de produits aux textures innovantes ne contenant que des ingrédients laitiers. Le but de ce travail est de mettre en évidence et de comprendre les mécanismes de texturation d'émulsions lactières acidifiées modèles, par des agrégats protéiques de différentes composition, morphologie et taille, en les comparant avec les systèmes classiques supplémentés en protéines sériques. Pour cela, des gels laitiers gras acidifiés par la GDL ont été fabriqués en faisant varier la concentration des différents d'agrégats. L'ajout de protéines sériques et d'agrégats fractals permet d'augmenter la fermeté des gels et de diminuer leur synérèse.

Alors que l'ajout d'agrégats sphériques et denses et d'agrégats mixtes (caséines-protéines sériques) ne modifie pas la texture. Les agrégats ont un rôle dans la phase continue. Le développement de la surface interfaciale en augmentant la pression d'homogénéisation et la fraction de matière grasse peut permettre l'adsorption d'agrégats à l'interface des gouttelettes de matière grasse et augmenter la fermeté. La nature des agrégats influence les interactions s'établissant avec le réseau de caséines au cours de l'acidification. Parmi les interactions formées, des ponts disulfures entre les protéines sériques ou les agrégats fractals et le réseau ont été mis en évidence. La grande variété de texture obtenue dans ces systèmes permet d'envisager la création de produits innovants et plus particulièrement enrichis en protéines pour cibler certains types de population.

**Title:** Modulation of the texture of dairy acid gels by addition of milk protein aggregates

**Keywords:** protein aggregates, texture, acid milk gels, viscoelasticity, syneresis, interfacial composition

**Abstract:** The texture of dairy products is a key parameter influencing consumer choices. In yogurt-type acid systems, the addition of milk protein aggregates would allow the development of products with innovative textures containing only dairy ingredients. The aim of this work is thus to highlight and understand the texturizing mechanisms of acidified models dairy emulsions through protein aggregates of different compositions, morphologies and sizes, by comparing them with conventional systems supplemented with whey proteins. For this purpose, fatty dairy gels acidified with GDL were manufactured by varying the concentration of different types of aggregates. The addition of whey proteins and fractal aggregates increases the strength of the gels and reduces their syneresis.

Whereas the addition of compact spherical and mixed (casein-whey protein) aggregates does not modify the texture. Aggregates have a role in the continuous phase. The development of the interfacial surface by increasing the homogenization pressure and the fat fraction can allow the adsorption of aggregates at the interface of the fat droplets and increase the firmness. The nature of the aggregates influences interactions formed with the casein network during acidification. Among the interactions formed, disulphide bridges between whey proteins or fractal aggregates and the network were highlighted. The large variety of texture obtained in these systems demonstrates that it is possible to create innovative and specific products, especially protein-rich ones, to target certain types of population.