



HAL
open science

Séparation de phase, rhéologie et structures des mélanges caseine micellaire-gallactomannanes

S. Bourriot, Catherine Garnier, Jean Louis Doublier

► **To cite this version:**

S. Bourriot, Catherine Garnier, Jean Louis Doublier. Séparation de phase, rhéologie et structures des mélanges caseine micellaire-gallactomannanes. *Les Cahiers de Rhéologie*, 1997, 15 (4), pp.284-293. hal-02686346

HAL Id: hal-02686346

<https://hal.inrae.fr/hal-02686346>

Submitted on 1 Jun 2020

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

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

Copyright

SEPARATION DE PHASE, RHEOLOGIE ET STRUCTURE DES MELANGES CASEINE MICELLAIRE-GALACTOMANNANES

Sophie BOURRIOT, Catherine GARNIER et Jean-Louis DOUBLIER.
Laboratoire de Physico-Chimie des Macromolécules, INRA, BP 71 627,
44316 Nantes Cedex 3, France.

Résumé : Les propriétés des mélanges caséine micellaire-galactomannanes ont été étudiées à 20°C, pH 7 et dans NaCl 0,25M. Dans ces conditions, ces mélanges donnent lieu à une de séparation de phase, probablement liée à un mécanisme de déplétion-floculation. Les propriétés d'écoulement et les caractéristiques viscoélastiques des polyosides sont très fortement modifiées en présence de caséine micellaire. La structure de ces mêmes systèmes est observée en microscopie confocale à balayage laser (MCBL) ; il apparaît alors très clairement que le processus de séparation de phase se traduit par la formation d'un réseau continu principalement constitué de micelles de caséine agrégées.

Abstract : The properties of micellar casein-galactomannan mixed systems have been investigated at 20°C, pH 7 and in 0.25M NaCl. In these conditions, the mixtures tended to phase separate probably due to depletion-flocculation mechanisms. The rheological properties of these mixed systems have been investigated and modifications of the flow and the viscoelastic properties were clearly evidenced in the two-phase domain. The ultrastructure of the galactomannan-micellar casein mixtures has been described using confocal laser scanning microscopy. In the biphasic domain, microscopic observations showed that the phase separation process has yielded a continuous network mostly composed of the aggregated micellar casein.

Introduction

Les mélanges de biopolymères sont très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire en vue de donner aux produits la texture désirée. Ils sont notamment très présents dans la formulation des produits laitiers où la caséine micellaire représente la fraction protéique majoritaire (environ 80%, (1)). La connaissance des mécanismes intervenant dans les mélanges caséine-polyoside est alors indispensable à la maîtrise des propriétés spécifiques ainsi qu'à la mise au point de produits laitiers stables.

Les caséines micellaires ont un diamètre compris entre 20 et 600 nm (2) ; elles sont constituées de différentes fractions de caséine (α_1 , α_2 , β , κ) qui s'organisent au sein de la micelle en fonction de leur degré

d'hydrophobicité. La cohésion de la micelle est assurée par des ponts de phosphate de calcium ainsi que par des liaisons hydrophobes entre les différentes fractions de caséines (3). La micelle de caséine est ainsi en équilibre dynamique avec son environnement (4, 5).

Les galactomannanes sont principalement utilisés dans l'industrie en tant qu'agents épaississants. Leur chaîne principale est constituée d'unités D-mannopyranose liées en $\beta(1-4)$, portant des branchements latéraux constitués d'une seule unité D-galactopyranose liée en $\alpha(1-6)$ à la chaîne principale (6). Les différents galactomannanes, guar et caroube, se distinguent par le rapport mannose sur galactose qui est de l'ordre de 1,8 pour le guar et de 3,5 pour la caroube.

L'objectif de l'étude est (i) de comprendre les mécanismes physico-chimiques entre la caséine micellaire et un polyside neutre et (ii) de caractériser le comportement des mélanges. Dans cette optique, une étude rhéologique a permis de caractériser l'organisation des systèmes d'un point de vue macroscopique. L'ultrastructure des mélanges a ensuite été observée par microscopie confocale à balayage laser (MCBL). Enfin, les diagrammes de phase correspondant aux différents systèmes ont été établis afin de connaître l'état des mélanges en fonction de leur composition.

Matériels et méthodes

Les caséines micellaires (CM) sont des phosphocaséinates de calcium natifs purifiés par ultrafiltration puis lyophilisés. Elles sont préparées au Laboratoire de Recherches et de Technologies Laitières de l'INRA de Rennes par P. Schuck. Leurs caractéristiques sont les suivantes : teneur en protéines : 90,7% ; protéines autres que caséine : 5% ; lactose 0,5% ; sels : 8,3%. Les échantillons de galactomannanes sont fournis par la société Systems Bio Industry (SBI, France). La viscosité intrinsèque de l'échantillon de gomme guar (G) est de 12,9 dl/g à 20°C dans une solution de chlorure de sodium à 0,25M et de 7,4 dl/g pour l'échantillon de caroube (LBG).

Les caséines micellaires sont dispersées à 10% (en poids) dans une solution de chlorure de sodium à 0,25M, à 20°C et à pH 7 par traitement aux ultrasons pendant 8 minutes à 50 Watts. La distribution en taille est contrôlée par un granulomètre laser (Malvern Mastersizer IP) et le diamètre moyen est de l'ordre de 300 nm, ce qui est en accord avec les données de la littérature (2). Les solutions de galactomannanes sont préparées à 1% (en poids) dans une solution de chlorure de sodium à 0,25M, à 20°C, sous agitation magnétique pendant une heure puis chauffées à 80°C pendant 30 minutes. Afin de comparer les diagrammes de phase, l'échantillon de guar a été dépolymérisé à la suite d'un traitement aux ultrasons (40 s à 10 Watts). La viscosité intrinsèque est alors abaissée à 8,5 dl/g. Les mélanges sont préparés à 20°C dans des tubes à essai.

L'étude rhéologique a été réalisée à l'aide d'un rhéomètre à déformation imposée, le Rheometrics Fluid Spectrometer (RFS II ; Piscataway, USA), équipé d'un système de mesure "cône-plan" (diamètre : 5 cm ; angle avec le plan : 0,04 rad ; distance de troncature : 50 μm). Les mesures ont été effectuées en régime permanent et en régime harmonique à 20°C et après un temps d'attente de 5 heures.

Les observations en MCBL ont été réalisées avec un microscope inversé Zeiss LSM 410 Axiovert, en mode fluorescence. La caséine micellaire est marquée avec de l'ANS (1-8-anilino-naphtalène sulfonate) qui a la propriété de s'adsorber au niveau des zones hydrophobes des protéines. Dans cet état particulier, l'ANS est fluorescent dans l'Ultraviolet. La longueur d'onde d'excitation du laser UV utilisé est 364 nm et l'émission de fluorescence est enregistrée entre 450 et 497 nm. Les échantillons de galactomannanes sont marqués de façon covalente avec de la rhodamine iso-thiocyanate (RITC). Le RITC peut être excité par un second laser à une longueur d'onde de 543 nm ; l'émission de fluorescence est alors enregistrée à une longueur d'onde supérieure à 570 nm. Les mélanges sont placés entre lame et lamelle. Ils sont observés avec un objectif de grossissement 40 à immersion dans l'eau.

Les diagrammes de phase ont été établis en fonction de la concentration en biopolymères des mélanges. Après un délai de 24 heures, les mélanges sont centrifugés à 1 500 g pendant 30 minutes. La séparation de phase est alors détectée à l'oeil nu, les deux phases étant distinctement séparées lorsque la démixtion a lieu. La phase supérieure est enrichie en galactomannanes alors que la phase inférieure contient principalement des caséines. La teneur en caséines de la phase supérieure est obtenue par dosage des protéines à 277 nm au spectrophotomètre et les galactomannanes sont dosés au réfractomètre. La composition de la phase inférieure est alors déduite à partir des volumes.

Résultats

Courbes d'écoulement

La Figure 1 montre les courbes d'écoulement d'une solution de guar à 0,2%, d'une suspension de caséines à 3%, d'un mélange contenant 0,2% de guar et 1% de caséines et enfin, d'un mélange contenant 0,2% de guar et 3% de caséines. Il faut par ailleurs rappeler que la teneur en caséines du lait est de l'ordre de 3%. La suspension de caséines présente un comportement newtonien et est très peu visqueuse ($\eta = \tau/\dot{\gamma} = 9.10^{-3}$ Pa.s).

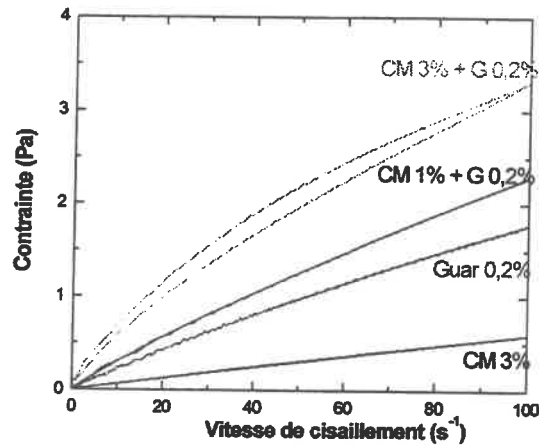


Figure 1 : Propriétés des mélanges sous cisaillement.

La solution de galactomannanes est légèrement rhéofluidifiante avec une viscosité apparente à 100 s^{-1} de $1,8 \cdot 10^{-2} \text{ Pa.s}$. Par contre, dans le cas des mélanges, les propriétés d'écoulement sont très nettement modifiées. La viscosité apparente des mélanges augmente et elle est supérieure à la somme des viscosités des systèmes contenant un seul type de macromolécules à la même concentration que dans le mélange. De plus, le mélange contenant 0,2% de guar et 3% de caséines présente un comportement légèrement thixotrope.

Propriétés viscoélastiques

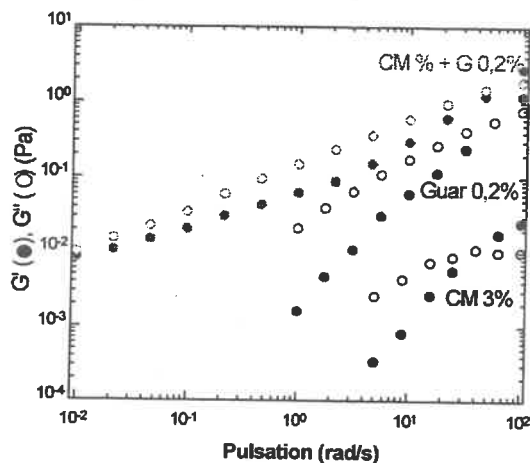


Figure 2 : Propriétés viscoélastiques des mélanges

La Figure 2 illustre le comportement viscoélastique des trois systèmes précédents. Les modules conservatif G' et dissipatif G'' sont portés en fonction de la pulsation ω . Dans le cas de la suspension de caséines et de la solution de guar, G' et G'' dépendent très fortement de la pulsation et les valeurs du module G' sont nettement inférieures à celles de G'' sur la majorité de la gamme de fréquences. Les systèmes à un seul type de

composant ont un comportement viscoélastique typique d'une solution macromoléculaire sans aucune organisation des biopolymères dans le milieu. En revanche, le système mixte Caséine-Guar présente des propriétés viscoélastiques très différentes. G' et G'' sont en effet nettement moins dépendants de la pulsation; en outre, les valeurs des modules G' et G'' sont plus élevées. Le système Caséines - Guar se comporte donc comme un système légèrement structuré.

D'après les mesures rhéologiques, aussi bien en régime permanent qu'en régime harmonique, il apparaît très nettement que l'ajout des galactomannanes aux caséines micellaires conduit à la formation de systèmes structurés. La structuration est par ailleurs d'autant plus prononcée que la concentration en biopolymères est élevée.

Observations microscopiques

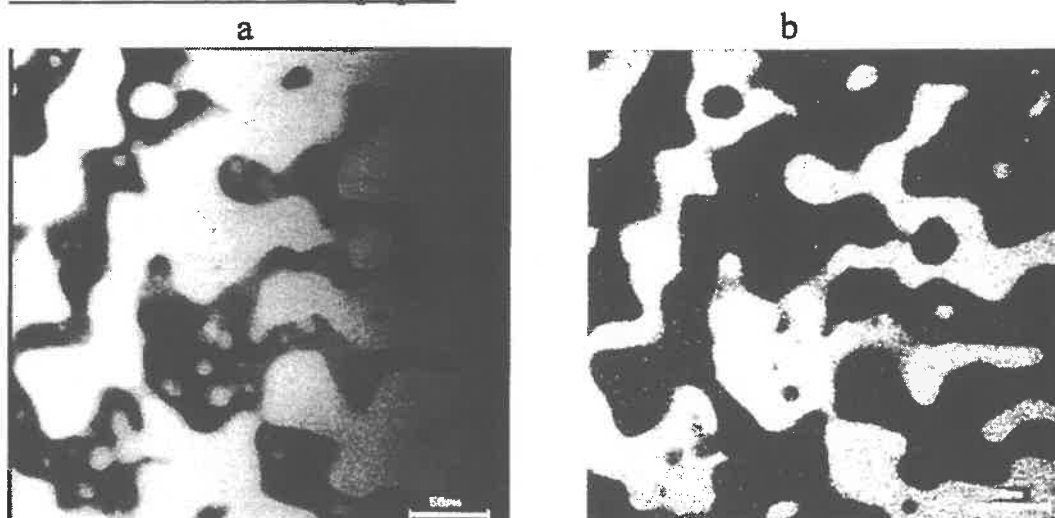
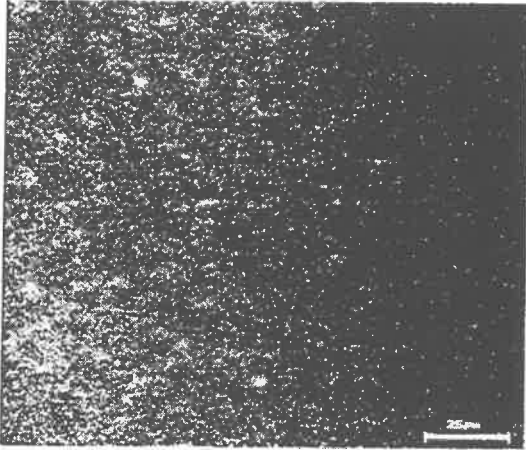


Figure 3 : Mélange Caséine (ANS)/Guar-RITC; observation à 364 nm (a), à 543 nm (b).

La Figure 3a correspond à un mélange contenant du guar marqué au RITC et des caséines micellaires marquées à l'ANS. Ce mélange est observé à 364 nm, c'est à dire à une longueur d'onde proche de la longueur d'onde correspondant au maximum d'excitation de l'ANS (372 nm). Les zones claires correspondent alors à la fluorescence de l'ANS et révèlent ainsi la présence des caséines micellaires. Par contraste, les zones sombres correspondent au guar, le RITC n'étant pas fluorescent à cette longueur d'onde. La Figure 3b illustre le même mélange, pris dans le même plan focal mais observé cette fois à 543 nm (longueur d'onde d'excitation du RITC). Les zones claires correspondent sur cette photographie à la fluorescence du RITC, ce qui permet de localiser la gomme guar dans le mélange ; par contraste, les zones sombres correspondent aux caséines micellaires. La comparaison des deux photographies précédentes permet d'observer que les zones claires de la photographie 1 correspondent aux

zones sombres de la deuxième photographie et inversement. Il est alors possible de localiser très précisément les biopolymères dans le mélange en fonction de la longueur d'onde choisie. Les observations suivantes seront réalisées à 364 nm, permettant ainsi de localiser directement les caséines micellaires.



**Figure 4 : Mélange Caséine (0,3%) + Guar (0,2%)
Observation à 364 nm.**

La Figure 4 montre un mélange contenant 0,2% de guar et 0,3% de caséines micellaires. La fluorescence est répartie régulièrement dans le mélange, indiquant que les caséines sont dispersées de façon homogène dans le système.

La Figure 3 correspond à un mélange contenant 0,2% de guar et 3% de caséines (les concentrations sont identiques à celles utilisées pour les mesures rhéologiques). Dans ces conditions, les caséines micellaires apparaissent concentrées dans des gouttelettes d'une taille très variable (10-100 μ m) qui tendent à coalescer. Rappelons que la taille d'une micelle est de l'ordre de 0,3 μ m. Nous pouvons alors supposer que les caséines micellaires se sont agrégées et constituent la phase continue du milieu, structurant ainsi le système. Dans ce mélange, deux phases coexistent ; l'une est enrichie en caséines, l'autre est plus concentrée en guar. En revanche, pour de plus faibles concentrations, la séparation de phase n'a pas lieu (Figure 4).

Diagrammes de phase

D'après les observations microscopiques, il apparaît que les mélanges caséine-galactomannane démixtent au delà d'une certaine concentration en biopolymères. Les diagrammes de phase ternaires ont alors été établis afin de connaître l'état, monophasique ou biphasique, des mélanges en fonction de leur composition.

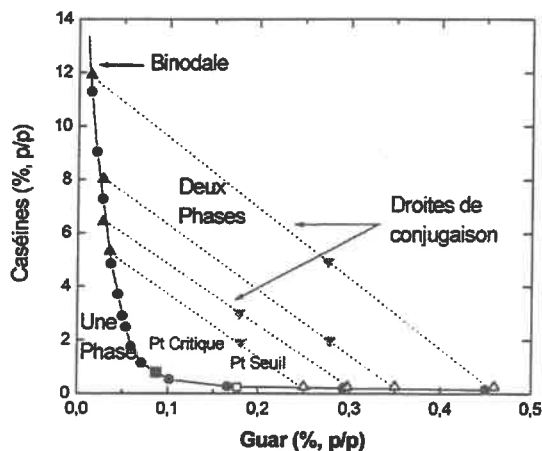


Figure 5 : Diagramme de phase du système caséines micellaires-guar dans NaCl 0,25M, à 20°C et à pH 7.

La Figure 5 présente les principales caractéristiques du diagramme de phase caséine-guar à 20°C et en présence de 0,25M NaCl. La courbe séparant la région monophasique de la région biphasique est la binodale (trait continu). Elle est construite par observation directe de la séparation de phase dans les tubes (points ●). Les mélanges initiaux, pris dans la zone biphasique (points ▼) se séparent alors en deux phases, la phase inférieure dont la composition est représentée par les points (▲) et la phase supérieure dont la composition est représentée par les points (△). L'analyse de chacune des phases permet de tracer les droites de conjugaison du diagramme. On sait que les mélanges dont la composition se situe sur une même droite de conjugaison se séparent en deux phases ayant les mêmes concentrations, seuls les volumes diffèrent. Le point critique (■) correspond à la composition d'un système démixtant en deux phases de même composition et de même volume (7) ; les coordonnées du point critique sont 0,8% de caséines et 0,09% de guar. Le point seuil (□) est défini comme la plus faible concentration totale en biopolymères conduisant à la séparation de phase (7) ; les coordonnées sont 0,18% de guar et 0,22% de caséines ; la concentration minimale donnant lieu à la démixtion est donc 0,40% pour le système caséine-guar.

La Figure 6 compare les binodales obtenues pour les systèmes caséine-guar, caséine-caroube et caséine-guar dépolymérisé. En présence de caroube et de guar dépolymérisé, le domaine monophasique est plus étendu que dans le cas du mélange caséine-guar. Les trois galactomannanes diffèrent par leur structure et par leur viscosité intrinsèque. La concentration en galactomannanes est multipliée par la viscosité intrinsèque de chaque galactomannane (Figure 7) ce qui permet de s'affranchir de la masse moléculaire des échantillons. Dans ces conditions, les trois binodales sont superposées. Il apparaît alors que la différence de structure n'affecte pas le comportement de séparation de

phase des systèmes. Seule la variation de la viscosité intrinsèque, donc la différence de volume occupé par la macromolécule, a une influence sur l'étendue des zones monophasique et biphasique

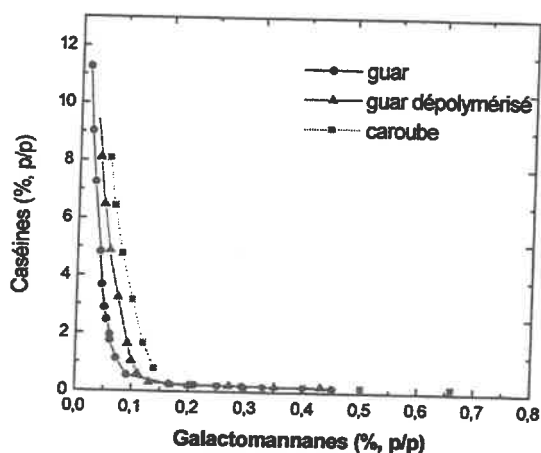


Figure 6 : Diagrammes de phase des systèmes caséine-guar, caséine-guar dépolymérisé, caséine-caroube.

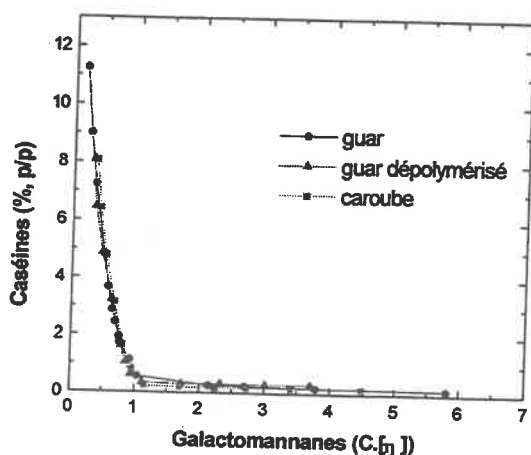


Figure 7 : Influence de la structure sur le comportement de séparation de phase des mélanges caséine-galactomannanes.

Discussion

Les résultats obtenus en rhéologie montrent une transition d'une solution macromoléculaire à un système structuré lorsque des galactomannanes sont ajoutés aux caséines micellaires, qu'il s'agisse de gomme guar ou de caroube (des résultats similaires ont été obtenus avec ce dernier galactomannane). D'après les observations microscopiques, ce comportement particulier est lié à un phénomène de séparation de phase. La démixtion peut alors être attribuée à l'agrégation des caséines micellaires, probablement par un mécanisme de déplétion-floculation. Le principe de la déplétion-floculation a été établi par Asakura et Oosawa (8, 9) dans le cas de sphères rigides en présence d'un polymère. Cette théorie

permet d'expliquer comment une suspension de particules sphériques peut être floculée lorsqu'un polymère est ajouté dans le milieu. Si le volume occupé par le polymère est supérieur à celui disponible entre deux particules, le polymère est exclu de la zone interparticulaire. La pression osmotique de la solution environnante est alors supérieure à la pression osmotique de la zone d'exclusion. Les particules ont tendance à se rapprocher afin de limiter la différence de pression, ce qui conduit à leur agrégation. En première approximation, les micelles de caséine peuvent être assimilées à des sphères et, de la même façon, les galactomannanes peuvent être exclus de l'espace existant entre les micelles, ce qui se traduit dans le milieu par une agrégation des caséines micellaires. Nous disposons de certains arguments qui tendent à confirmer cette hypothèse. Tout d'abord, nous avons observé que le mélange caséine (3%)-guar (0,2%) présente un comportement thixotrope ; l'organisation du système est ainsi perturbée sous l'action du cisaillement, indiquant que les liaisons entre les micelles de caséines sont de faible énergie. Ensuite, la dilution d'un système agrégé conduit à un système homogène stable, confirmant ainsi la nature des interactions entre les caséines (10) ; de plus, cette expérience montre que le processus d'agrégation est réversible et qu'il est fonction du volume disponible entre les caséines pour le galactomannane, ce qui est en accord avec le mécanisme de déplétion-floculation. Enfin, nous avons vu que la zone monophasique était moins importante pour le système caséine-guar que pour les systèmes caséine-caroube et caséine-guar dépolymérisé. Cette différence peut être expliquée par le biais de la déplétion-floculation. L'échantillon de guar a en effet une viscosité intrinsèque supérieure à celles des échantillons de caroube et de guar dépolymérisé ; il occupe ainsi un volume plus grand en solution et est, par conséquent, plus facilement exclu de l'espace entre les micelles de caséine. L'agrégation des micelles se fait donc pour des concentrations plus faibles en présence de guar qu'en présence de caroube ou de guar dépolymérisé.

En conclusion, il apparaît très clairement que les modifications du comportement des galactomannanes en présence de caséines peuvent être attribuées à l'agrégation de la caséine micellaire par floculation, induite par la présence des galactomannanes.

Remerciements

Nous remercions l'Institut CANDIA pour l'aide financière apportée à un des auteurs (S. Bourriot).

Références

1. H.E. Swaisgood, 'Developments in Dairy Chemistry', Fox P.F. (ed.), Applied Science Publishers, 1982, **1**, 1.
2. D.G. Schmidt, 'Developments in Dairy Chemistry', Fox P.F. (ed.), Applied Science Publishers, 1982, **1**, 60.
3. H.J.M. Van Dijk, *The Netherland Milk and Dairy Journal*, 1990, **44**, 65.
4. C. Holt, 'Advances in Protein Chemistry', Anfisen C.B., Edsall J.T., Richards F.M., Eisenberg D.S. (eds), Academic Press, 1992, **43**, 63.
5. H. Visser, 'Protein Interactions', Visser H. (ed.), VCH, 1992, 135.
6. R.L. Whilster, W. Dvotch, *Journal of Rheology*, 1948, **22**, 493.
7. V.B. Tolstoguzov, 'Gums and Stabilizers for the Food Industry', Phillips G.O., Williams P.A., Wedlock D.J. (eds), IRL Press, 1992, **6**, 241.
8. S. Asakura, F. Oosawa, *Journal of Chemical Physics*, 1954, **22**, 1255.
9. S. Asakura, F. Oosawa, *Journal of Polymer Science*, 1958, **33**, 183.
10. A.H. Clark, S.B. Ross Murphy, *Advances in Polymer Science*, 1987, **83**, 55.