



**HAL**  
open science

## Structure et stabilité face au traitement UHT de micelles de caséines acidifiées et modifiées

Camille Broyard

► **To cite this version:**

Camille Broyard. Structure et stabilité face au traitement UHT de micelles de caséines acidifiées et modifiées. Alimentation et Nutrition. Agrocampus Ouest, 2015. Français. NNT : 2015NSARB272 . tel-02801200

**HAL Id: tel-02801200**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02801200>**

Submitted on 25 Jun 2021

**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.



**CONFIDENTIEL**

**THÈSE / AGROCAMPUS OUEST**

Sous le label de l'Université Européenne de Bretagne

pour obtenir le diplôme de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPÉRIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES,  
AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE**

Spécialité : « Sciences des aliments »

**École Doctorale : « Vie Agro Santé »**

présentée par :

**« Camille BROYARD »**

**AMÉLIORATION DE LA STABILITÉ DES PROTÉINES  
LAITIÈRES ACIDIFIÉES FACE AU TRAITEMENT  
THERMIQUE ULTRA-HAUTE TEMPÉRATURE**

soutenue le 30/11/2015 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

Sylvie MARCHESSEAU, professeur, Université de Montpellier, Montpellier	Rapporteur
Camille MICHON, professeur, AgroParisTech, Massy	Rapporteur
Thomas CROGUENNEC, professeur, AGROCAMPUS OUEST/INRA, Rennes	Président
Alain RIAUBLANC, chargé de recherche, INRA, Nantes	Examineur
Isabelle GAUCHER, chef de projet scientifique, SOREDAB, La Boissière-École	Co-encadrante
Frédéric GAUCHERON, chargé de recherche, AGROCAMPUS OUEST/INRA, Rennes	Directeur de thèse
Clarisse BAUMY, chef de projet scientifique, ELVIR, Condé-sur-Vire	Membre invité



# REMERCIEMENTS

Ça y'est, la fin d'un chapitre approche et le temps du bilan et des remerciements arrive. En trois ans, j'ai beaucoup appris professionnellement (et personnellement) et très nombreuses sont les personnes qui ont contribué aux succès de ce projet. Je ne pourrai toutes les remercier ici mais je crois et j'espère que chacune est intimement convaincue de la reconnaissance que j'éprouve à son égard.

Je tiens à remercier plus particulièrement les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci à Camille Michon et Sylvie Marchesseau, rapportrices de ce manuscrit, pour leurs relectures attentives, leur intérêt pour mon travail et la discussion enrichissante qui en a découlé. Merci également à Thomas Croguennec pour avoir présidé mon jury et à Alain Riaublanc pour avoir participé à tous les jalons importants de cette thèse.

Ces travaux ont été menés au sein de deux laboratoires de recherche, un privé et un public. Je suis très reconnaissante à M. Bertrand Salczer, directeur de SOREDAB (Société de REcherche Alimentaire et Biotechnologique), et à Joëlle Léonil, directrice du STLO (Sciences et Technologies du Lait et de l'Œuf), de m'avoir accueillie au sein de leurs structures et de m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions.

Je remercie également la société Elvir d'avoir initié ce projet et participé à son financement. Emmanuel Miège, directeur R&D, Clarisse Baomy et Nathalie Aubert, chefs de projet, merci de vous être battus pour que cette thèse voit enfin le jour et pour votre investissement tout au long de ces trois (voire quatre) ans. Je vous dois beaucoup.

Bien-sûr, ma reconnaissance va aussi à mon Directeur de thèse, Frédéric Gaucheron. Merci pour ton soutien, ta gentillesse et tout le temps que tu m'as accordé. Merci d'avoir passé la blouse et d'être retourné à la paillasse à mes côtés quand je ne pouvais assurer sur tous les fronts. Rares sont les étudiants en thèse qui ont un encadrement aussi dévoué.

Merci à toute l'équipe du STLO pour son accueil toujours très chaleureux. J'ai passé peu de temps à Rennes mais ce fut toujours un plaisir et mes travaux y ont fait des bonds de géants. Je suis particulièrement reconnaissante à Éric pour les analyses physico-chimiques qu'il a réalisées sur mes innombrables échantillons, à Anne qui a toujours su m'envoyer les

.....

articles (même datant du plus profond des âges) que je lui demandais, à Julien et Valérie, les dieux de la spectrométrie de masse qui sous, réserve d’offrandes appropriées (cookies maisons et M&M’s), m’ont permis d’utiliser leur joujou préféré, à Fanny pour son aide et sa gentillesse... et à toutes les autres personnes (nombreuses) qui ont su répondre à mes questions (nombreuses) sans jamais se départir de leur sourire et de leur bonne humeur.

Ayant passé l’essentiel de ces trois dernières années à SOREDAB et ma mission m’ayant permis de toucher à plusieurs domaines disciplinaires, longue est la liste des personnes auxquelles j’aimerais faire part de ma gratitude.

En tout premier lieu, j’aimerais remercier celle qui a eu le plus de poids dans cette expérience professionnelle, Isabelle Gaucher. Merci pour votre confiance, votre soutien et votre exigence. Vous êtes une des meilleures scientifiques que je connaisse et vos conseils m’ont toujours été très précieux. Merci de m’avoir laissé autant d’autonomie tout en m’ayant toujours aidé à prendre du recul quand la situation me semblait désespérée (méchantes bactéries ! affreuses machines ! désespérants résultats !), merci pour votre patience et votre écoute (en particulier quand je n’étais pas d’accord avec vous), pour vos relectures méticuleuses (je n’oublierai plus jamais les espaces entre les chiffres et les unités, promis), merci d’avoir partagé votre expérience avec moi et d’avoir toujours pris soin d’assurer ma réussite académique en parallèle des exigences industrielles.

Bien-sûr, je suis également consciente de tout ce que je vous dois, Monsieur Soulié. Merci pour votre investissement dans mon groupe de travail et les heures passées le soir à m’enseigner progressivement votre savoir. Même si ce ne fut pas toujours facile, j’ai aussi beaucoup ri et votre pédagogie a imprimé de nombreux concepts de manière indélébile. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et mon respect.

Merci à l’ensemble de l’équipe analytique chimie pour son expertise technique, son aide et... le chapeau de Catherinette (Cathy l’impératrice du Leco, Elise la reine des minéraux, Thomas un chevalier qui a su voler à mon secours plus d’une fois, Clémence pour sa bonne humeur, Florence pour ses piques, Quentin pour sa gentillesse et Véronique pour son attention autant pro que perso), à l’équipe microbiologie et en particulier à Ingrid qui m’a fait découvrir le monde des ferments et à Nadège qui m’a appris à dompter la centrifugeuse avec un tournevis, à l’équipe ETI (Élise pour sa contribution essentielle, Bruno pour m’avoir initiée aux mystères du hall technologique et à l’art de diriger l’Armfield, Cyrielle pour son aide), aux services support (Yolande pour sa gentillesse, Alexandra pour son investissement, Nadine

.....

A. pour mes autoclaves impromptus et sa compagnie dans la salle de sport, Catherine et Nadine P. pour toute la vaisselle que je leur ai donnée, Fabien pour avoir boosté la chaudière rien que pour moi, Abdellah pour son sourire, Jean-Christophe pour avoir maintes fois essayé de lutter contre le froid glaciaire ou la chaleur étouffante du bureau (car oui, un thésard, c'est fragile)...), votre aide a été incommensurable. Sans vous je ne serais pas allée si loin.

J'ai également une pensée pour tous ceux qui ont travaillé à mes côtés que ce soit les stagiaires et apprentis qui ont défilé dans le bureau (accompagnés de leur bonne humeur et de leurs gourmandises) ou les A.I. et les ingénieurs qui n'ont jamais hésité à me donner un coup de main (merci à Bleuette - ma référence enzymo et *nail art*, Laure - plus minutieuse, tu meurs, Michèle – pour avoir répondu à mes appels au secours et même une fois rentrée chez elle, Nicolas B. pour son sarcasme et Nicolas M. pour son expertise et Nicolas E. pour ses conseils d'ex-thésard, Blandine, Virginie P...). Merci aussi à toi Mathilde, pour tes pitreries, ton infinie bonté et d'avoir toujours essayé de répondre à mes questions.

Aujourd'hui j'ai aussi une pensée particulièrement émue pour la « cat team ». Sans elle, rien n'aurait été pareil. Nos miaulements au téléphone ou dans les couloirs me manqueront. Merci à toi Chaton, de m'avoir forcée à prendre des pauses et de m'avoir fait découvrir tant de choses (comme le plaisir d'une bonne raclette en plein été ou d'un barbecue sans aubergine). Merci à toi Maître chat pour tes critiques sur mes figures (on va dire que si vous les trouvez belles c'est grâce à elle), ton soutien indéfectible et ...tout ce qui ne peut apparaître ici (ni nulle part ailleurs).

Et parce que ma thèse ne s'est pas résumée à ma vie au labo, merci à toi François, mon « astrophysicien » préféré. Tu es vraiment un ami extraordinaire, tellement dévoué et attentionné, ma gratitude à ton égard est immense. Tu resteras une des plus précieuses rencontres que j'ai pu faire ici.

Mais finalement, si je ne devais adresser qu'un seul remerciement, ce serait à ma famille. Du plus profond de mon cœur, merci. Vous avez été mes premiers supporters, vous avez toujours été là et c'est essentiellement grâce à vous si je peux aujourd'hui être fière de porter le titre Docteur. Mission accomplie, vous m'avez portée jusqu'au plus haut possible de mes études, la tête haute.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>20</b>
<b>1. Composition globale du lait</b>	<b>20</b>
1.1. Les composés azotés	21
1.1.1. Les caséines	22
1.1.2. Les protéines sériques	23
1.1.3. Substances azotées non protéiques	24
1.2. Les composés minéraux	24
1.3. Les composés lipidiques	27
1.4. Les composés glucidiques	29
<b>2. Caractéristiques et modèles de structure de la micelle de caséines</b>	<b>29</b>
<b>3. Impacts de quelques modifications physico-chimiques sur les micelles de caséines</b>	<b>34</b>
3.1. Conséquences des traitements thermiques	36
3.1.1. Refroidissement	36
3.1.2. Chauffage	37
3.2. Impact du traitement thermique sur les glucides	39
3.2.1. La réaction de glycation	39
3.2.2. La dégradation du lactose par la voie de Lobrey de Bruyn-Aberda van Ekenstein (voie L.A.)	43
3.3. Impact de l'acidification sur les structures et fonctions micellaires	45
3.4. Impact de l'ajout d'acide citrique	48
3.5. Impact de la teneur en protéines	50
3.6. Impact de l'enrichissement en minéraux	51
<b>4. Conclusion de la synthèse bibliographique</b>	<b>53</b>
<b>QUESTIONS DE RECHERCHE ET STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE</b>	<b>55</b>
1. Quelles questions de recherche pour répondre aux objectifs industriels ?	55
2. Quelle démarche de recherche pour s'intégrer dans une stratégie industrielle ?	56
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIELS &amp; MÉTHODES</b>	<b>60</b>
1. Matières premières utilisées	60

1.1.	Sources de protéines laitières	60
1.1.1.	Lait cru	60
1.1.2.	Poudre de lait écrémé (PLE)	60
1.1.3.	Poudre de phosphocasinat natif (PPCN)	61
1.1.4.	Caséinate de sodium	61
1.2.	Matière grasse de lait anhydre	62
1.3.	Autres fractions laitières : perméat de lait et lactose	63
1.4.	Autres matières premières	64
1.4.1.	Acides	64
1.4.2.	Ferments	64
1.4.3.	Base	65
1.4.4.	Tampon phosphate 10 mmol.L <sup>-1</sup> pH 7,5 à 50°C	65
1.4.5.	Meritose 200°	65
1.4.6.	Urée	65
<b>2.</b>	<b>Préparation des formules</b>	<b>66</b>
2.1.	Composition des formules étudiées	68
2.1.1.	Formules étudiées dans la phase 1	68
2.1.2.	Formules étudiées dans la phase 2	69
2.2.	Réhydratation des poudres ou écrémage du lait frais	71
2.2.1.	Réhydratation des poudres	71
2.2.2.	Méthodes d'écrémage	71
2.3.	Émulsification de la matière grasse	72
2.4.	Homogénéisation	72
2.5.	Prétraitement de stabilisation	73
2.6.	Stockage	73
2.7.	Acidification	74
2.8.	Traitement thermique	75
<b>3.</b>	<b>Méthodes d'analyses physico-chimiques</b>	<b>77</b>
3.1.	Mesure du pH	79
3.2.	Mesure de couleur	79
3.3.	Photographies et observations microscopiques et binoculaires	80
3.4.	Mesures des teneurs en azote total, en azote soluble à pH 4,6 et en azote non protéique.	
	Calcul de l'indice de stabilité	81
3.4.1.	Dosage de l'azote total et calcul de l'indice de stabilité	81
3.4.2.	Dosage de l'azote soluble à pH 4,6	82
3.4.3.	Dosage de l'azote non protéique	83

3.5.	Mesures des teneurs en minéraux totaux ou solubles	84
3.5.1.	Méthode utilisée à Soredab pour la première phase de la thèse	85
3.5.2.	Méthode utilisée au STLO pour la seconde phase de la thèse	87
3.6.	Mesure de la taille de micelle	88
3.7.	Mesure du potentiel zêta	90
3.8.	Mesure de l'hydratation des culots d'ultracentrifugation	91
3.9.	Mesure des masses moléculaires par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide haute performance	91
3.9.1.	Analyse des protéines entières par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse	92
3.9.2.	Analyse des peptides tryptiques par spectrométrie de masse	94
3.9.3.	Interprétation des chromatogrammes et des spectres de masse	97
3.10.	Traitements statistiques utilisés dans la phase 1	100
	<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS &amp; DISCUSSION</b>	<b>101</b>
<b>1.</b>	<b>Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT</b>	<b>101</b>
1.1.	Résultats (phase 1)	104
1.1.1.	Évolution de l'indice de stabilité et observations aux échelles macro- et méso-scopiques	104
1.1.2.	Évolution des teneurs en calcium et phosphore solubles	112
1.1.3.	Évolution du potentiel zêta	118
1.1.4.	Approche multifactorielle	122
1.1.5.	Étude de la stabilité des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique UHT : point de départ pour la phase 2	125
1.2.	Discussion (phase 1)	126
1.2.1.	Influence du pH	126
1.2.2.	Influence de la température d'acidification	127
1.2.3.	Influence de l'ajout de matière grasse	128
1.2.4.	Influence de la teneur en protéines	129
1.2.5.	Influence du type d'acide	131
1.2.6.	Approche holistique de l'indice de stabilité	133
1.3.	Conclusion de la phase 1	134
<b>2.</b>	<b>Phase 2 : Étude de différentes voies de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique ultra-haute température</b>	<b>136</b>



2.1. Stratégie de recherche des voies de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique UHT	136
2.2. Traitement de lactosylation des caséines	139
2.2.1. Étude de la lactosylation en système modèle	140
2.2.2. Étude de l'impact de l'alcalinisation dans le prétraitement	161
2.2.3. Étude de la glycosylation face à la lactosylation en système modèle	169
2.2.4. Étude de l'impact de la teneur en lactose	175
2.2.5. Étude de l'impact de la durée de prétraitement à 90°C	184
2.3. Application du traitement de lactosylation sur du lait	190
2.3.2. Conclusion de l'étude sur la lactosylation des caséines & perspectives	200
2.4. Étude du rôle de l'azote et des minéraux dans le prétraitement thermique des caséines micellaires	201
2.4.1. Choix des conditions expérimentales et protocole	201
2.4.2. Étude du prétraitement thermique dans une formule dépourvue de protéines sériques : PPCN + perméat	202
2.4.3. Étude de l'impact de la teneur en perméat sur le prétraitement	210
2.4.4. Étude de l'impact de la teneur en protéines sur le prétraitement	219
2.4.5. Étude de l'impact de la teneur en azote dans le prétraitement	226
2.4.6. Étude de l'impact du pouvoir tampon dans le prétraitement	231
2.5. Conclusion de la phase 2	238
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE &amp; PERSPECTIVES</b>	<b>244</b>
<b>Phase 1 : Étude à l'échelle pilote de la stabilité des protéines laitières selon le pH, la température d'acidification, la teneur en protéines, la teneur en matière grasse et le mode d'acidification</b>	<b>244</b>
<b>Phase 2 : Recherche de solutions de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique UHT</b>	<b>247</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>256</b>
<b>VALORISATION DES RÉSULTATS</b>	<b>279</b>
1. Publication	279
2. Congrès	279
<b>FORMATIONS SUIVIES</b>	<b>280</b>
1. Première année	280
2. Deuxième année	280
3. Troisième année	281

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Lien unissant les trois partenaires de la thèse : l'unité mixte de recherche Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, les sociétés Soredab (Société de REcherche et Développement Alimentaire et Biologique) et Elvir .....	15
Figure 2 : Facteurs de stabilité des suspensions de protéines laitières (les cadres en gras correspondent aux facteurs étudiés au cours de la thèse) .....	18
Figure 3 : Principaux équilibres minéraux du lait dans la fraction non protéique ultrafiltrable (Brulé 1981). Les concentrations des différentes associations d'ions sont indiquées sous leurs formules. ....	25
Figure 4 : Les différents états d'ionisation des phosphates et leurs concentrations exprimées en pourcentages en fonction du pH .....	26
Figure 5 : Schéma de la membrane du globule gras natif (PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, PS : phosphatidylsérine, PI : phosphatidylinositol, SM : sphingomyéline) (Lopez 2005) .....	28
Figure 6 : Projection de Haworth du $\beta$ -D-galactopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)D-glucoopyranose ou lactose .....	29
Figure 7 : Modèle submicellaire de Walstra (1999) .....	32
Figure 8 : Représentation schématique d'un nanocluster de phosphate de calcium (Holt & Timmins 1997) .....	32
Figure 9 : Modèle à structure ouverte de Holt & Horne (1992) .....	33
Figure 10 : Modèle de micelle éponge (Bouchoux <i>et al.</i> 2010) .....	34
Figure 11 : Schématisation des principaux échanges en minéraux, eau et composés azotés en fonction des traitements physico-chimiques appliqués. Les flèches indiquent le sens de transfert entre les phases aqueuse et micellaire. ....	35
Figure 12 : Dynamiques dans un lait écrémé chauffé ou refroidi entre 10 et 20°C (A) et entre 10 et 40°C (B) (Liu <i>et al.</i> 2013). Les variations relatives de température (X), de pH (o) et de turbidité (♦ rose ou bleu) sont rapportées en fonction de la durée (en minutes) du chauffage (rose, de gauche à droite) ou du refroidissement (bleu, de droite à gauche). ....	37
Figure 13 : Douze exemples de réactions possibles au niveau des acides aminés des protéines chauffées à haute température (Walstra <i>et al.</i> 2006) .....	38
Figure 14 : Schéma réactionnel simplifié de la glycation.....	40
Figure 15 : Schéma simplifié de la cascade des réactions de Maillard (Hodge 1953).....	41
Figure 16 : Schéma réactionnel simplifié de la voie de L.A. (Berg & van Boekel 1994) .....	44
Figure 17 : Schématisation synthétique des modifications induites par l'acidification.....	45
Figure 18 : Modèle hypothétique de formation d'un gel acide .....	46
Figure 19 : Schéma illustrant l'impact d'une acidification sans agent chélatant (gauche, par exemple acidification lactique) <i>versus</i> une acidification avec agent chélatant (droite, par exemple acidification citrique) – (hypothèse, Walstra & Jenness 1984) .....	49

Figure 20 : Méthodologie appliquée pour répondre aux objectifs de la thèse (UHT : ultra-haute température ; UF : ultrafiltration de lait) .....	58
Figure 21 : Protocole d'acidification suivi pour la phase 1 .....	66
Figure 22 : Exemple de protocole employé dans la phase 2.....	67
Figure 23 : Photographie de l'homogénéisateur Niro Soavi Panda .....	72
Figure 24 : Photographie du cutter Stephan utilisé pour mélanger la formule lors de l'étape d'acidification à 8 ou 42°C .....	74
Figure 25 : Schéma représentant l'échangeur pilote de traitement thermique (fournisseur) .....	76
Figure 26 : Programme général des analyses physico-chimiques réalisées lors de la phase 1 ( <i>Chapitre 3 – paragraphe 1. Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT</i> ) (SDS = dodécylsulfate de sodium).....	77
Figure 27 : Programme général des analyses physico-chimiques réalisées lors de la phase 2 ( <i>Chapitre 3 – paragraphe 2. Phase 2 : Étude de différentes voies de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique ultra-haute température</i> ).....	78
Figure 28 : Caractérisation de la couleur avec le système L*a*b* .....	80
Figure 29 : Protocole de détermination de l'indice de stabilité.....	82
Figure 30 : Ultrafiltration des échantillons (MAT = matière protéique, MG = matière grasse) .....	85
Figure 31 : Structure générale d'un spectromètre de masse .....	92
Figure 32 : Source d'ionisation par électrospray.....	93
Figure 33 : Trajectoire d'un ion dans un analyseur à temps de vol (TOF) en mode linéaire .....	93
Figure 34 : Trajectoire des ions dans un orbitrap (en rouge) : Les ions sont injectés dans l'espace séparé par deux électrodes de forme géométrique parfaitement définie. Suivant son rapport $m/z$ , l'ion va osciller autour de l'électrode centrale avec une fréquence caractéristique. La mesure de cette fréquence permet d'atteindre une grande précision et de séparer des ions de masses très proches (illustration Thermoscientifique) .....	96
Figure 35 : Fragmentation des ions dans l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) .....	97
Figure 36 : Traitement des données obtenues par spectrométrie de masse : le chromatogramme de masse, extrait d'une enveloppe protéique, elle-même rattachée à un temps d'élution du chromatogramme UV à 214 nm, permettait d'obtenir l'intensité de signal entrant dans le calcul du quotient de lactosylation. Dans cet exemple, les masses extraites correspondent à la caséine $\beta$ variant A <sub>2</sub> à l'état de charge +18 lactosylée ou non. ....	98
Figure 37 : Observations macroscopiques (diamètre d'une coupelle = 9 cm) et mésoscopiques (échelle sur la photographie) de formules contenant 0 % de matière grasse et 7 % de protéines acidifiées à 42°C avec de l'acide citrique (haut) ou de l'acide lactique (bas) .....	107
Figure 38 : Comparaison à l'échelle macroscopique (hauteur d'un pot = 10 cm) d'échantillons contenant 3,2 % de protéines acidifiés avec de l'acide citrique à 42°C en fonction de leur teneur en matière grasse (ligne supérieure = 0 % de matière grasse et ligne inférieure = 12 % de matière grasse). Le	

<p style="text-align: center;">. . . . .</p>	
<p>pH est indiqué dans les cases bleues et la ligne de déphasage est mise en évidence par les flèches violettes. ....</p>	110
<p>Figure 39 : Comparaison à l'échelle macroscopique (hauteur d'un pot = 10 cm) d'échantillons contenant 0 % de matière grasse et 7 % de protéines, acidifiés à 42°C en fonction du mode d'acidification (ligne supérieure = avec des ferments et ligne inférieure = avec une solution d'acide lactique). Le pH est indiqué dans les cases bleues et la ligne de déphasage est mise en évidence par les flèches violettes. ....</p>	111
<p>Figure 40 : Impact du pH (entre pH 3,7 et pH natif), de la température d'acidification (8 versus 42 °C) et de la teneur en protéines (3,2 versus 7 %) sur les teneurs en calcium (A) et phosphore (B) solubilisés dans une formule contenant 0 % de matière grasse et acidifiée avec de l'acide citrique (l'incertitude de mesure est de 10 %).....</p>	113
<p>Figure 41 : Impact de la teneur en matière grasse (MG) (0 versus 12 %) et de la température (8 versus 42°C) sur les teneurs en calcium (A) et phosphore (B) solubilisés dans des formules contenant 3,2 ou 7 % de protéines et acidifiées avec de l'acide lactique (l'incertitude de mesure est de 10 %).....</p>	115
<p>Figure 42 : Impact de la teneur en protéines (3,2 versus 7 %) sur les teneurs en calcium (A) et phosphore (B) solubilisés dans une formule contenant 0 % de matière grasse et acidifiée avec de l'acide lactique à 8 ou 42°C (l'incertitude de mesure est de 10 %) .....</p>	116
<p>Figure 43 : Impact du mode d'acidification sur les teneurs en calcium (A) et phosphore (B) solubilisés dans une formule contenant 3,2 ou 7 % de protéines, 0 % de matière grasse et acidifiée à 42°C (l'incertitude de mesure est de 10 %).....</p>	118
<p>Figure 44 : Schéma de l'impact probable de la matière grasse (ronds jaunes, à droite) sur une formule protéique acidifiée.....</p>	128
<p>Figure 45 : Schématisation hypothétique de l'impact de la nature de l'acide sur la micelle lors d'une baisse de pH. Le complexe anionique citrate de calcium (bloc bleu et orange) serait en interaction avec les résidus de caséines chargés positivement en raison de l'acidification. Avec l'acide lactique, les ions calcium ayant quitté la structure micellaire et le lactate seraient dans la phase soluble ce qui ne limiterait pas l'augmentation du potentiel zêta.....</p>	132
<p>Figure 46 : Étude du traitement de lactosylation des micelles de caséines : hypothèses et facteurs testés</p>	137
<p>Figure 47 : Étude du traitement de lactosylation pour un lait : hypothèses et facteurs testés .....</p>	138
<p>Figure 48 : Étude de l'environnement physico-chimique et notamment des rôles de l'azote et des minéraux dans le prétraitement thermique : hypothèses et facteurs testés .....</p>	139
<p>Figure 49 : Impact du prétraitement 90°C/60 min et pH 7,5 sur l'indice de stabilité thermique (traitements « UHT » réalisés en bain d'huile après acidification), en fonction du pH, dans des formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN sans (colonnes bleues) et avec (colonnes rouges) lactose .....</p>	140
<p>Figure 50 : Impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur la dimension b* de la couleur (U.A. : unités arbitraires) dans des formules à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN contenant ou non du lactose, avant acidification (moyennes de 3 essais différents) .....</p>	142
<p style="text-align: center;">. . . . .</p>	

.....

Figure 51 : Impact du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes à pH 7,5 sur le potentiel zêta micellaire dans des formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN avec et sans lactose (moyennes sur 4 essais différents) ..... 144

Figure 52 : Impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur le diamètre des particules de formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN, sans et avec du lactose, avant acidification et traitement UHT (moyennes sur 4 essais différents)..... 146

Figure 53 : Schéma explicatif hypothétique de l'augmentation de taille de micelle avec l'ajout de lactose ..... 147

Figure 54 : Impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation dans des formules à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN contenant ou non du lactose (moyennes sur 4 essais différents) ..... 148

Figure 55 : Schématisation de l'impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur l'hydratation de la micelle de caséines (valeurs correspondant à la formule PPCN + lactose)..... 149

Figure 56 : Impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur les teneurs en calcium et phosphate solubles dans des formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN sans ou avec lactose (moyennes sur 3 essais différents) ..... 150

Figure 57 : Impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse des caséines dans la formule témoin contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN, sans (A) et avec lactose (B). ..... 152

Figure 59 : Hypothèse sur le rôle protecteur du phosphate dans la micelle de caséines face à la lactosylation..... 156

Figure 58 : Impact du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes à pH 7,5 sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse des caséines dans la formule contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de caséinate sans (A) et avec lactose (B) ..... 157

Figure 60 : Impact du prétraitement thermique 90°C/60 min/pH 7,5 sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par analyse par spectrométrie de masse des caséines dans une poudre contenant PPCN et lactose avec un rapport massique de 1 pour 2..... 159

Figure 61 : Impacts du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes et de l'alcalinisation sur l'indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile), dans des formules contenant PPCN et lactose et acidifiées à pH 6,9 et 6,8..... 162

Figure 62 : Impacts du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes et de l'alcalinisation sur le brunissement (U.A. : unités arbitraires) de formules contenant PPCN et lactose avant acidification (moyennes sur 3 mesures)..... 163

Figure 63 : Impacts du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes et de l'alcalinisation sur le potentiel zêta dans des formules contenant PPCN et lactose (moyennes sur 3 mesures) ..... 164

Figure 64 : Impacts du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes et de l'alcalinisation sur l'hydratation micellaire dans des formules contenant PPCN et lactose avant acidification (moyennes sur 2 mesures)..... 165

.....

Figure 65 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de l'alcalinisation sur les teneurs en calcium et phosphate solubles dans des formules contenant PPCN et lactose avant acidification (écart-type de 5 %).....	166
Figure 66 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de l'alcalinisation sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse des caséines dans les formules contenant PPCN et lactose.....	168
Figure 67 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0) et du type de sucre (lactose ou glucose) sur la dimension b* (U.A. : unités arbitraires) de formules contenant du PPCN et sans ajout de soude avant acidification (moyennes sur 3 mesures).....	171
Figure 68 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0) et du type de sucre (lactose ou glucose) sur l'hydratation micellaire dans des formules contenant du PPCN et sans ajout de soude, avant acidification (moyennes sur 2 mesures) .....	172
Figure 69 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0) et du type de sucre (lactose ou glucose) sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse des caséines dans les formules contenant du PPCN et sans ajout de soude .....	173
Figure 70 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (*1 = 50 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 100 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 150 g.L <sup>-1</sup> ) sur l'indice de stabilité (tests en bain d'huile) après acidification à pH 6,9 et 6,8.....	176
Figure 71 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (*1 = 50 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 100 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 150 g.L <sup>-1</sup> ) sur le brunissement (U.A. : unités arbitraires, moyennes de b* sur 3 mesures) avant acidification .....	177
Figure 72 : Impact de la teneur en lactose sur la variation de pH causée par le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) (moyennes sur 2 essais) .....	178
Figure 73 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (*1 = 50 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 100 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 150 g.L <sup>-1</sup> ) sur le potentiel zêta (moyenne sur 3 mesures).....	179
Figure 74 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (*1 = 50 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 100 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 150 g.L <sup>-1</sup> ) sur le diamètre des particules, avant acidification (moyenne sur 3 mesures).....	180
Figure 75 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (*1 = 50 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 100 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 150 g.L <sup>-1</sup> ) sur l'hydratation micellaire (moyenne sur 2 mesures).....	181
Figure 76 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (*1 = 50 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 100 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 150 g.L <sup>-1</sup> ) sur les quotients de lactosylation (analyse des caséines par spectrométrie de masse) .....	182
Figure 77 : Impact de la durée de prétraitement à 90°C/pH 7,5 sur la valeur de b* (U.A. : unités arbitraires) dans des formules contenant 25 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et sans ou avec lactose à 50 g.L <sup>-1</sup> (moyenne de 3 mesures pour t = 120 min et sur 6 mesures pour t = 0 et 60 min) .....	185
Figure 78 : Impact de la durée de prétraitement à 90°C/pH 7,5 sur le diamètre des particules (en nm) de formules contenant 25 g.L <sup>-1</sup> de PPCN sans ou avec lactose à 50 g.L <sup>-1</sup> , avant acidification (moyenne de 3 mesures pour t = 120 min et sur 6 mesures pour t = 0 et 60 min).....	187

Figure 79 : Impact de la durée de prétraitement à 90°C/pH 7,5 sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation (g d'eau.g <sup>-1</sup> de culot sec) dans des formules contenant 25 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et sans ou avec lactose à 50 g.L <sup>-1</sup> , avant acidification (moyenne de 2 mesures pour t = 120 min et sur 4 mesures pour t = 0 et 60 min) .....	188
Figure 80 : Impact de la durée de prétraitement à 90°C (entre 0 et 360 minutes) sur le brunissement (b*, U.A. : unités arbitraires) d'un lait reconstitué au pH ajusté par ajout de solution de NaOH 1 mol.L <sup>-1</sup> , avant acidification (moyennes sur 1 à 3 essais) .....	192
Figure 81 : Impact de la durée de prétraitement à 90°C sur le brunissement (b*) d'un lait frais ou reconstitué (PLE = poudre de lait écrémé) avec un pH ajusté par ajout de solution de NaOH 1 mol.L <sup>-1</sup> ou non, avant acidification (moyennes sur 1 à 3 essais) .....	193
Figure 82 : Impact de la durée de prétraitement sur le pH d'un lait frais au pH ajusté et d'un lait reconstitué (PLE = poudre de lait écrémé) avec ou sans ajustement à la soude, avant acidification	194
Figure 83 : Impact de la durée de chauffage sur le potentiel zêta dans un lait frais au pH ajusté et dans un lait reconstitué (PLE = poudre de lait écrémé) avec ou sans ajout de la solution de NaOH 1 mol.L <sup>-1</sup> , avant acidification (moyennes sur 3 à 15 mesures).....	195
Figure 84 : Impact de la durée de chauffage sur la taille de particule dans un lait frais au pH ajusté et dans un lait reconstitué (PLE = poudre de lait écrémé) avec ou sans ajout de la solution de NaOH à 1 mol.L <sup>-1</sup> , avant acidification (moyennes sur 3 à 15 mesures).....	196
Figure 85 : Impact du prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 d'une formule contenant PPCN et perméat sur l'indice de stabilité thermique des protéines acidifiées, en fonction du pH d'acidification (tests en bain d'huile) .....	202
Figure 86 : Impact de la durée du prétraitement à 90°C sur le pH d'une formule simplifiée contenant PPCN et perméat, et comparaison avec une formule modèle contenant PPCN et lactose, avant acidification .....	203
Figure 87 : Impact de la durée du prétraitement à 90°C/pH 7,5 sur le diamètre des particules d'une formule contenant PPCN et perméat, et comparaison avec une formule modèle PPCN + lactose, avant acidification (moyennes sur 2 à 6 mesures).....	205
Figure 88 : Impact de la durée du prétraitement à 90°C sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation dans une formule contenant PPCN et perméat et comparaison avec une formule modèle PPCN + lactose, avant acidification (moyennes sur 2 à 7 mesures) .....	206
Figure 89 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse dans la formule simplifiée PPCN + perméat et comparaison avec les formules modèle (PPCN + lactose) et contrôle (PPCN seul) .....	208
Figure 90 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en perméat (*1 = 65 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 130 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 195 g.L <sup>-1</sup> ) sur l'indice de stabilité des protéines acidifiées (tests en bain d'huile), en fonction du pH d'acidification (N.D. = non déterminé).....	211
Figure 91 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en perméat (*1 = 65 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 130 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 195 g.L <sup>-1</sup> ) sur la dimension b*(U.A. : unités arbitraires) de la couleur, avant acidification (moyennes sur 3 à 9 mesures) .....	212

Figure 92 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en perméat (*1 = 65 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 130 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 195 g.L <sup>-1</sup> ) sur le potentiel zêta (moyennes de 3 à 9 mesures).....	213
Figure 93 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en perméat (*1 = 65 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 130 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 195 g.L <sup>-1</sup> ) sur le diamètre des particules (moyennes de 3 à 9 mesures).....	214
Figure 94 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en perméat (*1 = 65 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 130 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 195 g.L <sup>-1</sup> ) sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation (moyennes sur 2 à 6 mesures).....	216
Figure 95 : Impact du prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 et de la teneur en perméat (*1 = 65 g.L <sup>-1</sup> , *2 = 130 g.L <sup>-1</sup> et *3 = 195 g.L <sup>-1</sup> ) sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse.....	217
Figure 96 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur l'indice de stabilité d'une formule à 50 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et comparaison avec les formules PPCN à 25 g.L <sup>-1</sup> et PPCN + perméat (tests en bain d'huile).....	219
Figure 97 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur le brunissement (b*, U.A. : unités arbitraires) d'une formule à 50 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et comparaison avec les formules PPCN à 25 g.L <sup>-1</sup> et PPCN + perméat (moyennes sur 3 mesures) .....	221
Figure 98 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur le potentiel zêta d'une formule à 50 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et comparaison avec les formules PPCN à 25 g.L <sup>-1</sup> et PPCN + perméat (moyennes sur 3 mesures minimum) .....	222
Figure 99 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur le diamètre des particules d'une formule à 50 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et comparaison avec les formules PPCN à 25 g.L <sup>-1</sup> et PPCN + perméat (moyennes sur 3 mesures minimum).....	223
Figure 100 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation d'une formule à 50 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et comparaison avec les formules PPCN à 25 g.L <sup>-1</sup> et PPCN + perméat (moyennes sur 2 mesures) .....	224
Figure 101 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur l'indice de stabilité d'une formule contenant 25 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et de l'urée, et comparaison avec les formules PPCN à 50 g.L <sup>-1</sup> et PPCN + perméat, à pH 6,7 (tests en bain d'huile).....	227
Figure 102 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur le brunissement (b*, U.A. : unités arbitraires) d'une formule contenant 25 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et de l'urée et comparaison avec les formules PPCN à 50 g.L <sup>-1</sup> et PPCN + perméat, avant acidification (moyennes sur 3 mesures) .....	228
Figure 103 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la taille des particules d'une formule contenant 25 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et de l'urée, et comparaison avec les formules PPCN à 50 g.L <sup>-1</sup> et PPCN + perméat, avant acidification (moyennes sur 3 mesures) .....	229
Figure 104 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la teneur en eau du culot d'ultracentrifugation d'une formule contenant 25 g.L <sup>-1</sup> de PPCN et de l'urée, et comparaison avec les formules PPCN à 50 g.L <sup>-1</sup> et PPCN + perméat, avant acidification (moyennes sur 2 mesures) ..	230



.....	
<b>Figure 105 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur l'indice de stabilité d'une suspension de PPCN dans un tampon phosphate 10 mmol.L<sup>-1</sup> et comparaison avec la formule PPCN + perméat, en fonction du pH d'acidification (tests en bain d'huile) .....</b>	<b>232</b>
<b>Figure 106 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la couleur (U.A. : unités arbitraires) d'une suspension de PPCN dans un tampon phosphate (PO<sub>4</sub>) 10 mmol.L<sup>-1</sup>, et comparaison avec les formules PPCN dans eau ultra-pure (UP) et PPCN + perméat, avant acidification (moyennes sur 3 mesures).....</b>	<b>233</b>
<b>Figure 107 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur le potentiel zêta d'une suspension de PPCN dans un tampon phosphate (PO<sub>4</sub>) 10 mmol.L<sup>-1</sup> et comparaison avec les formules PPCN dans eau ultra-pure (UP) et PPCN + perméat (moyennes sur 3 mesures).....</b>	<b>234</b>
<b>Figure 108 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la taille des particules d'une suspension de PPCN dans un tampon phosphate (PO<sub>4</sub>) 10 mmol.L<sup>-1</sup> et comparaison avec les formules PPCN dans eau ultra-pure (UP) et PPCN + perméat (moyennes sur 3 mesures).....</b>	<b>235</b>
<b>Figure 109 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation d'une suspension de PPCN dans un tampon phosphate (PO<sub>4</sub>) 10 mmol.L<sup>-1</sup> et comparaison avec les formules PPCN dans eau ultra-pure (UP) et PPCN + perméat (moyennes sur 2 mesures).....</b>	<b>236</b>
<b>Figure 110 : Influence de la force ionique I sur le pH<sub>i</sub> d'une protéine (I<sub>a</sub> &lt; I<sub>b</sub>).....</b>	<b>242</b>
<b>Figure 111 : Mémo des conclusions de la phase 1 issu du poster présenté à la 9<sup>th</sup> NIZO Dairy Conference (la matière grasse n'ayant pas d'impact significatif sur les variables observées).....</b>	<b>246</b>
<b>Figure 112 : Synthèse des travaux de la phase 2 et perspectives (les flèches bleues traduisent les variations de teneur en eau des culots d'ultracentrifugation, les flèches grises traduisent les variations de potentiel zêta, les flèches vertes et rouges traduisent la fixation de molécules sur les caséines, les flèches violette et orange traduisent des transferts, les flèches en pointillés traduisent l'acidification due à la dégradation thermique du lactose, * signale un effet induit par le prétraitement) .....</b>	<b>250</b>
<b>Figure 113 : Schéma réactionnel de la désamidation (rouge = charge positive et bleu = charge négative) (Jaspard 2001).....</b>	<b>253</b>
<b>Figure 114 : Représentation schématique de l'effet du chauffage sur les micelles de caséines en présence de protéines sériques sans et avec ajout préalable de phospholipides (d'après Kasinos <i>et al.</i> 2014b)...</b>	<b>254</b>
.....	

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition moyenne du lait entier de vache (Walstra <i>et al.</i> 2006).....	21
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des quatre molécules de caséines pour chacun des variants majoritaires (Farrell <i>et al.</i> 2004).....	22
Tableau 3 : Caractéristiques de la $\beta$ -lactoglobuline et de l' $\alpha$ -lactalbumine (Farrell <i>et al.</i> 2004).....	23
Tableau 4 : Concentrations (en mmol.L <sup>-1</sup> ) et répartition (en %) des principaux minéraux du lait à pH 6,7 (Holt & Jenness 1984).....	24
Tableau 5 : Concentrations (en mmol.L <sup>-1</sup> ) des ions libres et des complexes présents dans la phase soluble du lait à pH 6,7 (Holt <i>et al.</i> 1981).....	25
Tableau 6 : Constituants lipidiques du lait et localisation dans le globule gras (% p.p <sup>-1</sup> de matière grasse) .....	27
Tableau 7 : Principales caractéristiques physico-chimiques des micelles de caséines.....	30
Tableau 8 : Pourcentages de calcium et phosphate solubilisés dans la phase aqueuse à pH 4,6 et 5,2 respectivement, en fonction de la concentration en caséines micellaires (Le Graët & Gaucheron 1999).....	50
Tableau 9 : Influence de la concentration en chlorure de sodium (NaCl) sur les constantes de liaisons des caséines $\alpha_{s1}$ et $\beta$ pour le calcium (Parker & Dalgleish 1981). Expériences réalisées à pH 7,0 et 20°C	52
Tableau 10 : Composition de la poudre de PPCN (données analytiques) (NS = azote soluble).....	61
Tableau 11 : Composition de la poudre de caséinate de sodium (données fournisseur) (N = azote).....	62
Tableau 12 : Composition de la poudre de lactose et de la poudre de perméat de lait (données fournisseur et données analytiques) (N : azote, N.C. : non communiquée).....	63
Tableau 13 : Composition de la poudre Meritose 200 <sup>®</sup> (données fournisseur) (MS = matière sèche) .....	65
Tableau 14 : Teneurs des ingrédients utilisés dans la phase 1 pour chacune des formules acidifiées étudiées (MG = matière grasse, MGLA 32 → source de matière grasse, LEF 100 → source de protéines).....	68
Tableau 15 : Teneurs des ingrédients utilisés dans la phase 2 pour chacune des formules étudiées (PPCN = phosphocasinat natif, PLE = poudre de lait écrémé, $\emptyset$ = aucun).....	69
Tableau 16 : Facteurs correctifs utilisés pour calculer les teneurs en minéraux solubles en fonction de la composition de la formule .....	86
Tableau 17 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation des protéines par chromatographie .....	93
Tableau 18 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation des peptides par chromatographie .....	95
Tableau 19 : Indices de stabilité en pourcentages (calcul exposé dans le <i>Chapitre 2 – paragraphe 3.4.1. Dosage de l'azote total et calcul de l'indice de stabilité</i> ) en fonction de la teneur en matière grasse (MG), de la teneur en protéines (MP), de la température d'acidification, du mode d'acidification et du pH (case noire = stable, case grise = en cours de déstabilisation, case blanche = déstabilisé) .....	105
Tableau 20 : Potentiel zêta exprimé en mV (N.D. = non déterminé), en fonction de la teneur en matière grasse (MG), de la teneur en protéines (MP), de la température d'acidification, du mode	

.....

d'acidification et du pH. Plus la couleur des cases est claire, plus le potentiel zêta tend vers des valeurs positives. L'écart-type est indiqué entre parenthèses..... 119

**Tableau 21 : Impact des conditions d'acidification (B = pH, teneurs en protéines et en matière grasse, température ou mode d'acidification) sur les caractéristiques micellaires (A = indice de stabilité, potentiel zêta, calcium ou phosphore solubles « standardisés »). Chaque colonne correspond à une Anova avec une *p-value* < 2,2.10<sup>-16</sup>. \*\*\* correspond à une *p-value* < 1.10<sup>-3</sup>. Une grosse flèche avec le chiffre 1 indique que la condition B a l'effet le plus fort sur la caractéristique A, une flèche moyenne avec le chiffre 2 indique que la condition B a le deuxième effet le plus fort sur A, une petit flèche avec le chiffre 3 indique le troisième effet B le plus fort sur A, etc. Si la flèche est ascendante, cela signifie que A augmente avec B et si la flèche est descendante, cela signifie que A augmente quand B diminue. .... 123**

**Tableau 22 : Indices de stabilité thermique en fonction du type de lait, de l'ajout ou non de solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>, du barème de prétraitement thermique (Ø = aucun prétraitement), du pH d'acidification, du mode de traitement UHT (laboratoire = bain d'huile, pilote = échangeur tubulaire) ..... 191**

**Tableau 23 : Impact du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes sur les mesures les plus discriminantes et selon la formulation (hydratation = teneur en eau des culots d'ultracentrifugation, KXX/XX = positionnement de la lysine/caséine support) ..... 239**

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

La filière laitière française joue un rôle majeur dans l'économie du pays. D'après ÉSANE (Élaboration des Statistiques Annuelles d'Entreprises), elle représentait un chiffre d'affaires de 27,2 milliards d'euros en 2010. Parmi les 24,6 milliards de litres de lait de vache collectés en 2014 en France, 75 % ont été transformés en produits laitiers pour la grande consommation (L'Économie Laitière en Chiffres, 2015, Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière). Cela en fait la catégorie d'aliments préférée des Français (à égalité avec les fruits et légumes, étude CSA de 2012), qui y consacraient 14 % de leurs dépenses alimentaires en 2012. Ainsi, le secteur des produits laitiers est très concurrentiel et au cœur d'enjeux économiques importants. Il fait donc l'objet de multiples attentions (Figure 1).

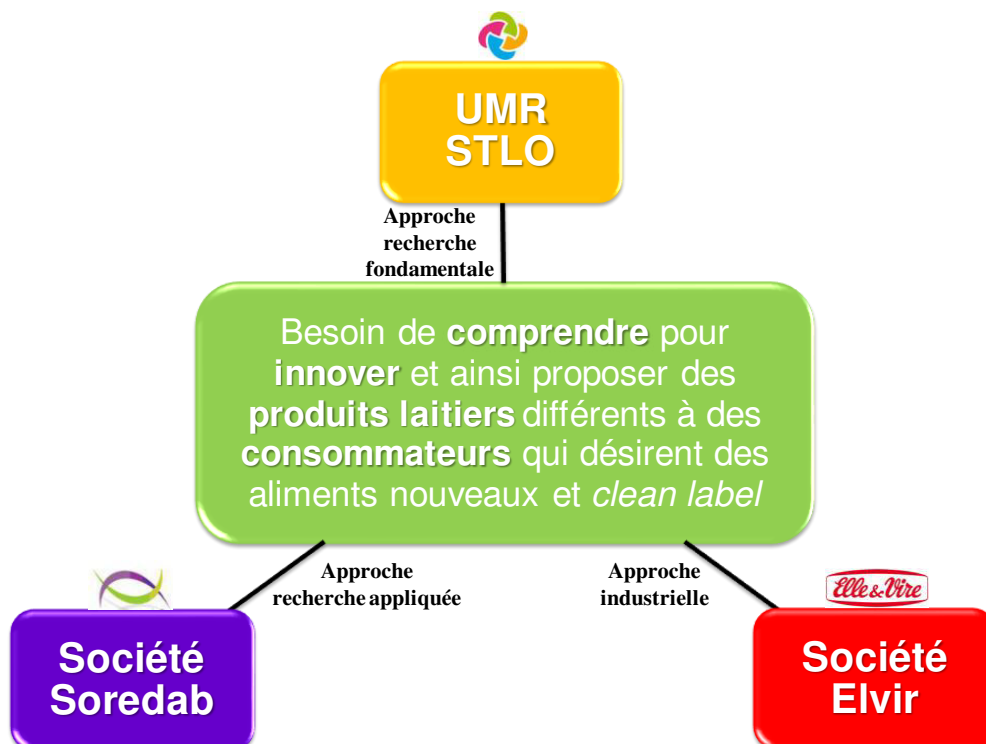


Figure 1 : Lien unissant les trois partenaires de la thèse : l'unité mixte de recherche Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, les sociétés Soredab (SOciété de REcherche et Développement Alimentaire et Biologique) et Elvir

Les travaux rapportés dans ce manuscrit s'intègrent dans ce contexte et ont été financés *via* un dispositif CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche). Ils ont bénéficié d'un encadrement tripartite (Figure 1).

1. L'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) représente le partenaire académique de ce projet de thèse. Il est au service d'enjeux de société majeurs et a pour finalité de « livrer des clés pour que la société puisse choisir et innover ». Le **laboratoire STLO** (Science et Technologie du Lait et de l'Œuf), situé à Rennes et qui a participé à l'encadrement de ce travail, est une unité mixte de recherche : UMR 1253 INRA / Agrocampus Ouest. Son activité de recherche couvre l'étude de la composition et de la structure du lait et de l'œuf, les processus physico-chimiques et microbiologiques qui sont impliqués au cours de leurs transformations, ainsi que les procédés nécessaires à la mise en œuvre de ces dernières, en lien avec les fonctionnalités des produits obtenus.

2. La société **Elvir**, partenaire industriel, est l'initiateur du projet. C'est une filiale du Groupe Savencia (anciennement Bongrain), leader mondial des spécialités fromagères et des pâtes molles à marque. La mission principale de cette entreprise basée en Normandie est de fournir des produits laitiers de haute qualité satisfaisant le consommateur d'un point de vue organoleptique, praticité et avec une bonne aptitude au stockage, tout en assurant sa sécurité alimentaire (qualité microbiologique). Ses gammes de produits, majoritairement commercialisés sous la marque *Elle & Vire*, sont régulièrement enrichies de produits innovants, et ce depuis plus de soixante ans, grâce à des avancées constantes en termes de technologie et de formulation. Une des spécificités de la société Elvir réside dans sa capacité à traiter à des couples temps - températures élevés (stérilisation ou pasteurisation haute par exemple) différents types de produits laitiers afin de leur assurer une durée de vie longue (plusieurs mois) à température ambiante. Pour élargir toujours plus son offre alimentaire, cette entreprise peut être amenée à traiter thermiquement des produits proches de la neutralité, mais avec des risques d'encrassement des échangeurs thermiques et des défauts sensoriels (sableux en bouche) par exemple. Sa production comprend également des aliments fermentés (destinés principalement à l'exportation) qui sont traditionnellement stockés à température ambiante. Ces produits fermentés doivent toutefois être très acides et stabilisés à l'aide d'additifs alimentaires tels que les gommages et pectines.

3. **Soredab**, autre filiale du Groupe Savencia Saveurs & Spécialités, est le troisième partenaire de ce projet. L'essentiel des travaux de thèse a été réalisé au sein de ses

locaux. L'activité de cette société localisée au sud de l'Île-de-France est davantage tournée vers la recherche appliquée. Elle soutient l'ensemble des filiales du Groupe dans leurs questionnements scientifiques et dispose d'un très bon niveau d'équipements analytiques ainsi que d'un hall technologique.

Ces deux filiales travaillent notamment sur l'élaboration de nouveaux produits laitiers ayant différentes compositions protéiques, minérales et lipidiques, plus ou moins acidifiés et traités thermiquement.

Tout comme le laboratoire STLO, les sociétés Elvir et Soredab cherchent constamment à améliorer leur savoir-faire par l'acquisition de connaissances sur les modifications des protéines et de leur environnement minéral, induites par les traitements technologiques (acidification et traitement thermique), en présence ou non de matière grasse. L'acquisition de savoirs dans ce domaine (objectif visé par la recherche fondamentale), complétée par la proposition de solutions de stabilisation des protéines (approche plus industrielle), permettrait une amélioration de la qualité des produits actuels et une diversification de l'offre pour rester concurrentiel et satisfaire les consommateurs. Ces trois entités ont donc trouvé un intérêt commun (Figure 1) à mettre en place et soutenir le projet de thèse dont les principaux résultats sont rapportés dans le présent manuscrit.

Chacun sait que la formulation et les traitements technologiques impactent la structure des protéines et leur environnement (pH et minéraux). Cela peut alors avoir des répercussions sur la stabilité du produit et plus largement sur sa qualité organoleptique. Si des questionnements scientifiques proches des problématiques industrielles se posent depuis plusieurs décennies, il est aujourd'hui largement admis que la stabilité de formules protéiques élaborées dépend étroitement (Figure 2) :

- des proportions en protéines ;
- de leur organisation et de leur état structural : micellaire, globulaire ou rhéomorphique, native, dénaturée ou agrégée ;
- de leurs propriétés de surface : charge, hydratation ;
- de leurs interactions entre elles ;

- de leur environnement physico-chimique : présence de matière grasse, de minéraux, pH... ;
- des traitements technologiques : traitements thermiques, cisaillements ;
- des conditions de stockage.

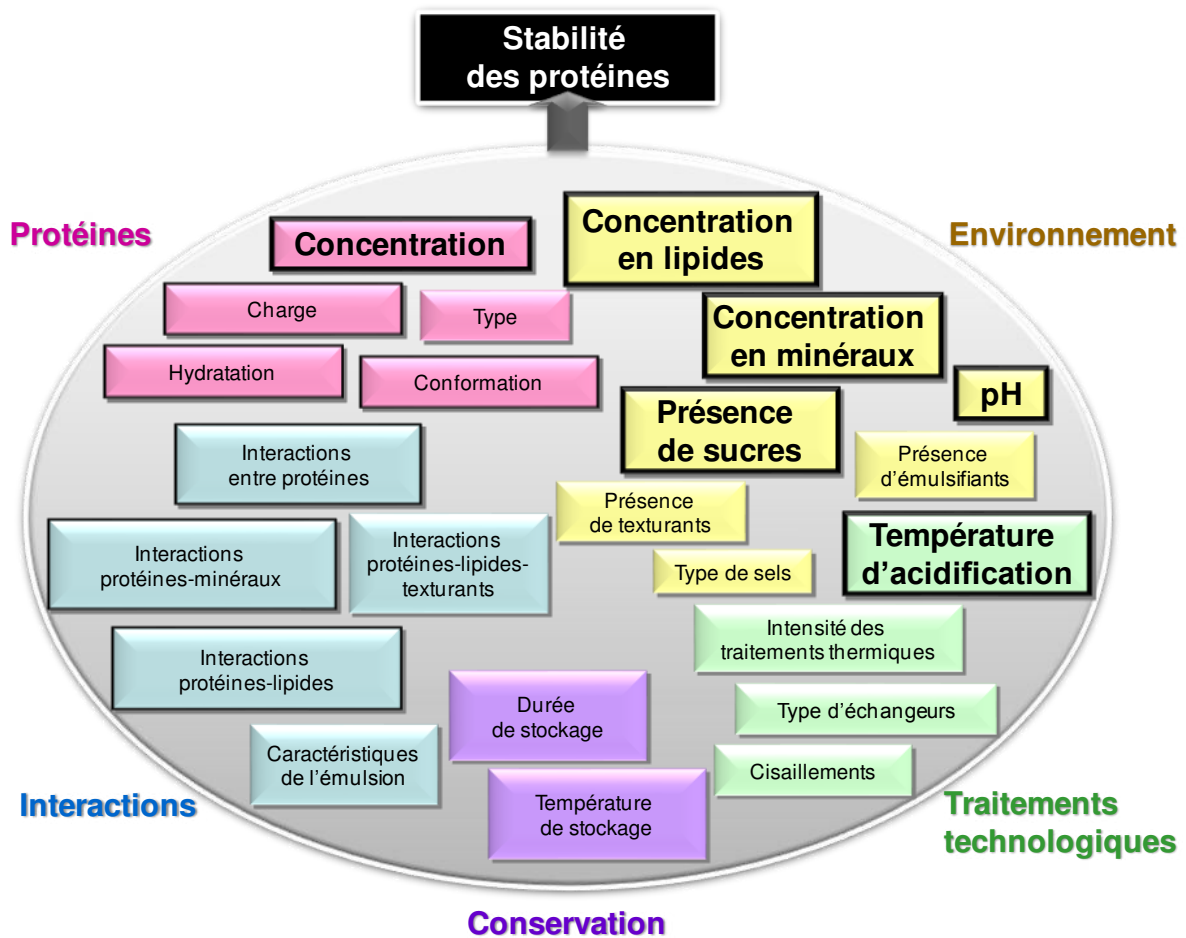


Figure 2 : Facteurs de stabilité des suspensions de protéines laitières (les cadres en gras correspondent aux facteurs étudiés au cours de la thèse)

Dans le cas d'un lait, les protéines correspondent à 80 % à des caséines et à 20 % à des protéines sériques. Les premières se distinguent par leur sensibilité à l'acidification et les secondes aux traitements thermiques. Ainsi, les micelles de caséines sont déstabilisées et

participent à la formation de gels lorsque le milieu est acidifié. Les protéines sériques peuvent quant à elles se dénaturer et s'agréger entre elles ou avec les caséines en cas de chauffage à une température supérieure à 70°C pendant plusieurs minutes. En présence de matière grasse, les protéines peuvent s'adsorber aux interfaces et modifier les propriétés des émulsions. En fonction du taux de matière grasse dans le milieu, du type et des taux de cisaillements, du type de protéines, les émulsions peuvent réagir différemment face à un abaissement de pH et à des traitements thermiques par exemple.

De nombreuses recherches ont porté sur les modifications protéiques induites par l'acidification ou les traitements thermiques, mais peu ont traité des modifications des protéines induites par l'acidification suivie de traitements thermiques de type stérilisation, en présence ou non de matière grasse. Il apparaît donc aujourd'hui nécessaire de

- **mieux comprendre pourquoi la stabilité des protéines, et en particulier celle des micelles de caséines, varie dans ces conditions de formulation et de traitement thermique fort,**
- **proposer des solutions de stabilisation thermique nécessaires pour innover en industrie laitière.**



# CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE

## BIBLIOGRAPHIQUE

Bien que parfois controversés, les produits laitiers jouissent généralement d'une bonne image auprès du grand public en raison de leurs qualités gustatives, de leurs vertus nutritionnelles et de leur diversité. Parce qu'en plus ils représentent une grande part de la production agro-alimentaire française, ils sont au cœur de nombreux enjeux. Ainsi, le lait est probablement le liquide alimentaire le plus étudié, ce depuis plusieurs décennies et encore aujourd'hui.

Cette synthèse a pour objectif de présenter les caractéristiques physico-chimiques essentielles du lait. Une attention particulière est portée aux micelles de caséines, objet principal de cette étude. Les conséquences de l'acidification sont ensuite rapportées. Un état de l'art s'appuyant sur la bibliographie portant sur les traitements thermiques est également présenté afin de préciser le contexte scientifique de ces travaux. Enfin, certaines modifications des caséines sont abordées, comme soutien théorique aux recherches sur les voies de stabilisation des caséines acidifiées face à la stérilisation ultra-haute température (UHT).

### ***1. Composition globale du lait***

Le lait est un système triphasé qui se définit à la fois comme

1. une suspension colloïdale de micelles de caséines : association de protéines et minéraux ;
2. une émulsion de globules gras (entourés d'une membrane lipoprotéique) ;
3. une phase aqueuse continue contenant des molécules et ions dissous ainsi que des micro-organismes et des cellules somatiques (Walstra *et al.* 2006).

Cette composition est quantitativement variable. Les facteurs génétiques (race, individu), physiologiques (âge, stade de lactation, état de santé), environnementaux (saison, région, climat, exposition à la lumière, altitude) et zootechniques (alimentation, conditions de traite, espace disponible par exemple) la modifient significativement. Ci-dessous, le Tableau 1 rassemble des données moyennes de composition pour un lait de vache.

**Tableau 1 : Composition moyenne du lait entier de vache (Walstra *et al.* 2006)**

Composants	Concentration moyenne (% p.p <sup>-1</sup> )	Gamme de concentrations (% p.p <sup>-1</sup> )
Eau	87,1	85,3 - 88,7
Matière grasse	4,0	2,5 - 5,5
Matières sèches non grasses	8,9	7,9 - 10,0
Lactose	4,6	3,8 - 5,3
Protéines	3,3	2,3 - 4,4
Caséines	2,6	1,7 - 3,5
Protéines sériques	0,6	–
Substances azotées non protéiques	0,06	–
Substances minérales	0,7	0,57 - 0,83
Acides organiques	0,17	0,12 - 0,21
Constituants divers	0,15	–

De plus, le pH d'un lait natif est de 6,7, sa force ionique est d'environ 75 mmol.L<sup>-1</sup> et sa masse volumique à pression et température ambiantes est de 1 029 kg.m<sup>-3</sup> (Walstra *et al.* 2006).

### 1.1. Les composés azotés

L'azote du lait est majoritairement de nature protéique (95 % de la matière azotée totale). Une partie est donc non protéique : environ 5 %, essentiellement de l'urée. Les protéines se subdivisent en deux classes aux propriétés physico-chimiques différentes : les caséines et les protéines sériques, présentes dans un rapport massique 80/20 en moyenne (Tableau 1).

1.1.1. *Les caséines*

Les caséines constituent les protéines majoritaires du lait. Leurs caractéristiques sont décrites dans le Tableau 2. Ces protéines rhéomorphiques et phosphorylées lient le calcium, peuvent s’auto-associer pour former des micelles et précipitent par acidification rapide à pH 4,6 à 20°C. Cette valeur de pH correspond à leur point iso-électrique moyen. Il y a quatre types de caséines appelés  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ . Ils se distinguent par leur composition et notamment par leur nombre d’acides aminés, par leur niveau de phosphorylation, par leur teneur en cystéine, par la présence ou non de groupements glycosidiques, par leur caractère plus ou moins hydrophobe et par leur capacité à lier le calcium. Les caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  sont quantitativement les plus nombreuses et constituent respectivement 37 et 34 % des caséines. Avec la caséine  $\alpha_{s2}$ , elles ont la particularité de précipiter en présence de calcium et possèdent un caractère amphiphile marqué en raison de leurs régions hydrophiles et hydrophobes nettement séparées (Horne 1986). Les caséines ne sont pas sensibles aux variations de température, à l’exception de la caséine  $\beta$  qui se solubilise à froid.

**Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des quatre molécules de caséines pour chacun des variants majoritaires (Farrell *et al.* 2004)**

	<b>Caséine <math>\alpha_{s1}</math></b> (variant B-8P)	<b>Caséine <math>\alpha_{s2}</math></b> (variant A-11P)	<b>Caséine <math>\beta</math></b> (variant A <sub>2</sub> -5P)	<b>Caséine <math>\kappa</math></b> (variant A-1P)
Poids moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	23 615	25 226	24 023	19 037
Concentration (g.L <sup>-1</sup> de lait)	12-15	3-4	9-11	2-4
Nombre d’acides aminés	199	207	209	169
Nombre de résidus				
Cystéine	0	2	0	2
Phosphosérine	8	12	5	1
Lysine	14	24	11	9
Glutamine	25	24	19	12
Asparagine	7	4	4	4
Résidus apolaires (%)	28	25	31	29
Hydrophobie (kJ.résidu <sup>-1</sup> )	4,89	4,64	5,58	5,12
Charge à pH 6,6 (mV)	-22	-14	-13	-3
pH <sub>i</sub> calculé	4,94	5,37	5,14	5,61

### 1.1.2. Les protéines sériques

Les protéines du lactosérum représentent environ 15 % de la matière azotée totale. Quelques-unes de leurs caractéristiques sont décrites dans le Tableau 3. Ce sont des molécules globulaires pouvant être précipitées par l'acide trichloro-acétique à 12 %. Contrairement aux caséines, ces protéines restent solubles à pH 4,6 à 20°C. Elles sont sensibles au traitement thermique et se dénaturent dès 65°C au bout de quelques minutes. Ainsi, en cas de chauffage du lait, plusieurs réactions ont lieu (*Chapitre 1 - paragraphe 3.1.2. Chauffage*), notamment leur dénaturation et la formation de complexes entre ces protéines dénaturées, les micelles de caséines et les globules gras (*via* leur interface où les protéines peuvent s'être adsorbées) éventuellement présents. Ce phénomène est appelé coagulation thermique. Les principales protéines sériques sont la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -Lg), l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -Lac), la sérum-albumine et les immunoglobulines (Farrell *et al.* 2004 ; Walstra *et al.* 2006). La  $\beta$ -Lg et l' $\alpha$ -Lac représentent respectivement environ 50 et 20 % des protéines sériques (Walstra *et al.* 2006).

L' $\alpha$ -Lac a la particularité de posséder un site de fixation du calcium. Celui-ci fait partie intégrante de la molécule et permet de stabiliser la conformation protéique (Walstra *et al.* 2006). Le thiol libre (SH) de la  $\beta$ -Lg et les ponts disulfures (S-S) des acides aminés soufrés (cystéines) des  $\beta$ -Lg et l' $\alpha$ -Lac leur confèrent leurs propriétés d'agrégation, notamment au cours d'une pasteurisation ou stérilisation.

**Tableau 3 : Caractéristiques de la  $\beta$ -lactoglobuline et de l' $\alpha$ -lactalbumine (Farrell *et al.* 2004)**

	$\beta$ -lactoglobuline	$\alpha$ -lactalbumine
Poids moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	18 277	14 178
Concentration (g.L <sup>-1</sup> de lait)	2 - 4	0,6 - 1,7
Nombres d'acides aminés	162	123
Nombre de résidus cystéine	5	8
dont thiol libre	1	0

### 1.1.3. Substances azotées non protéiques

Les substances azotées non protéiques sont peu abondantes dans le lait, environ 5 % de l'azote total. Ce sont de petites molécules, de poids moléculaire inférieur à 300 g.mol<sup>-1</sup> (Walstra *et al.* 2006). La molécule la plus importante en concentration est l'urée, avec une teneur allant de 84 à 280 mg.kg<sup>-1</sup> de lait. Cette teneur peut varier en fonction des apports alimentaires et de la saison (Holt *et al.* 1978). Cette fraction d'azote non protéique contient aussi de la créatine, de la créatinine, de l'acide orotique, de l'acide urique, de l'ammoniaque, des acides aminés libres et des peptides (Walstra *et al.* 2006).

## 1.2. Les composés minéraux

Les minéraux constituent une petite fraction du lait, environ 7 à 8 % (p.p<sup>-1</sup>) de la matière sèche non grasse. Ils se distribuent entre une phase soluble et une phase micellaire (Tableau 4).

Tableau 4 : Concentrations (en mmol.L<sup>-1</sup>) et répartition (en %) des principaux minéraux du lait à pH 6,7 (Holt & Jenness 1984)

Constituants	Concentrations			% de solubles
	Totale	Soluble	Micellaire	
<b>Calcium</b>	29,4	9,2	20,2	31
<b>Phosphate inorganique</b>	20,9	11,2	9,7	54
<b>Magnésium</b>	5,1	3,3	1,8	65
<b>Citrate</b>	9,2	8,2	1	89
<b>Sodium</b>	24,2	24,2	0	100
<b>Potassium</b>	34,7	34,7	0	100
<b>Chlorure</b>	30,2	30,2	0	100

Dans la phase soluble, les minéraux peuvent être sous forme libre (ionique) ou bien associée (sel) voire précipitée (Tableau 5).

Tableau 5 : Concentrations (en mmol.L<sup>-1</sup>) des ions libres et des complexes présents dans la phase soluble du lait à pH 6,7 (Holt *et al.* 1981)

Anion	Ion libre	Complexes			
		Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
H <sub>2</sub> Cit <sup>-</sup>	< 5.10 <sup>-3</sup>	< 5.10 <sup>-3</sup>	< 5.10 <sup>-3</sup>	< 5.10 <sup>-3</sup>	< 5.10 <sup>-3</sup>
HCit <sup>2-</sup>	0,04	0,01	< 5.10 <sup>-3</sup>	< 5.10 <sup>-3</sup>	< 5.10 <sup>-3</sup>
Cit <sup>3-</sup>	0,26	6,96	2,02	0,03	0,04
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	7,50	0,07	0,04	0,10	0,18
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2,65	0,59	0,34	0,39	0,52
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	< 5.10 <sup>-3</sup>	0,01	< 5.10 <sup>-3</sup>	< 5.10 <sup>-3</sup>	< 5.10 <sup>-3</sup>
Cl <sup>-</sup>	30,9	0,26	0,07	0,39	0,68
<b>Ion libre</b>	–	2,00	0,81	20,92	36,29

Dans cette phase soluble, le sodium, le potassium et le chlorure existent principalement sous forme d'ions libres alors que le calcium, le magnésium et le citrate sont préférentiellement associés sous forme de sels CaCit<sup>-</sup> (Figure 3) et MgCit<sup>-</sup>.

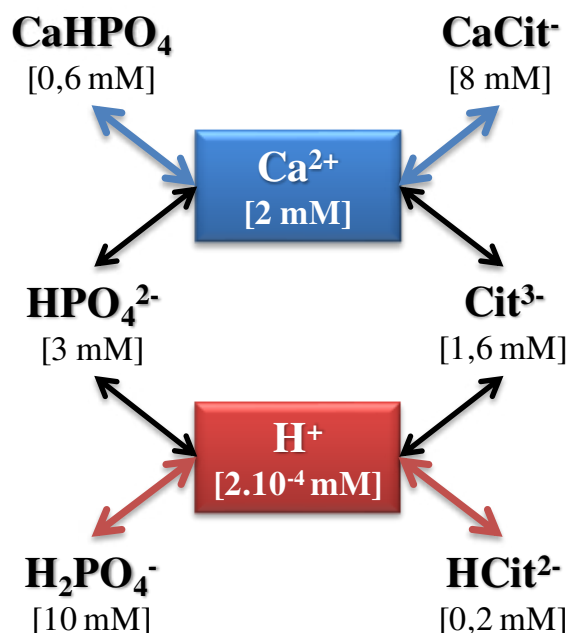


Figure 3 : Principaux équilibres minéraux du lait dans la fraction non protéique ultrafiltrable (Brulé 1981). Les concentrations des différentes associations d'ions sont indiquées sous leurs formules.

Le phosphate est majoritairement sous forme libre ( $\approx 10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) et, tout comme le citrate, son état d'ionisation dépend du pH (formes  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ou  $\text{HPO}_4^{2-}$ , Figure 4). Le phosphate est également associé au calcium pour former du  $\text{CaHPO}_4$  ( $0,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), sel très peu soluble et à saturation dans la phase aqueuse du lait (Figure 3).

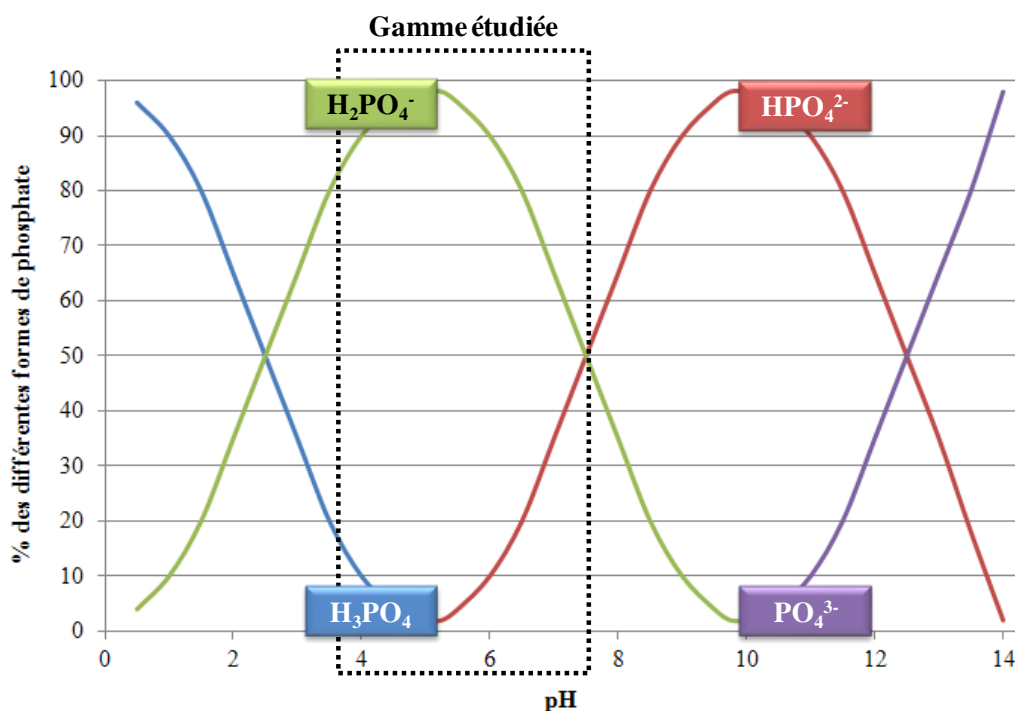


Figure 4 : Les différents états d'ionisation des phosphates et leurs concentrations exprimées en pourcentages en fonction du pH

Dans la phase micellaire, les principaux minéraux sont le phosphate et le calcium, et minoritairement, le citrate et le magnésium. Leur organisation et leur rôle dans la structure de la micelle sont controversés.

Ces différentes formes minérales, notamment le phosphate de calcium, sont en équilibre entre les phases soluble et colloïdale et peuvent évoluer selon les modifications physico-chimiques du milieu (acidification, addition de minéraux, température, etc., *Chapitre 1 – paragraphe 3 Impacts de quelques modifications physico-chimiques sur les micelles de caséines*) (Brulé & Fauquant 1981).

### 1.3. Les composés lipidiques

Le lait contient 3,5 à 4,5 % de matière grasse. Les lipides sont en émulsion dans la phase aqueuse, sous forme de gouttelettes appelées globules gras. Leur taille varie de 0,2 à 15  $\mu\text{m}$  avec une population centrée sur 4  $\mu\text{m}$  en moyenne dans un lait (Lopez 2005). Les traitements technologiques généralement appliqués dans l'industrie laitière (essentiellement homogénéisation mais aussi cisaillement *via* les pompes, agitation ou traitement thermique) peuvent réduire le diamètre moyen des globules gras autour de 0,2 à 1  $\mu\text{m}$ . Ils évitent le crémage, modifient la composition de la membrane de surface et les caractéristiques sensorielles du produit, entre autres.

La composition des lipides du lait ainsi que leurs localisations sont décrites dans le Tableau 6 et la Figure 5.

**Tableau 6 : Constituants lipidiques du lait et localisation dans le globule gras (% p.p<sup>-1</sup> de matière grasse)**

Constituants lipidiques	Proportions	Localisation
Triglycérides	96 - 98	Cœur du globule gras
Diglycérides	0,3 - 1,6	Cœur du globule gras
Monoglycérides	0 - 0,1	Cœur du globule gras
Phospholipides	0,2 - 1,0	Membrane du globule gras
Cérébrosides	0 - 0,08	Membrane du globule gras
Stéroïdes	0,2 - 0,4	Cœur du globule gras
Acides gras libres	0,1 - 0,4	Membrane du globule gras
Esters du cholestérol	Traces	Membrane du globule gras
Vitamines	0,1 - 0,2	Cœur du globule gras



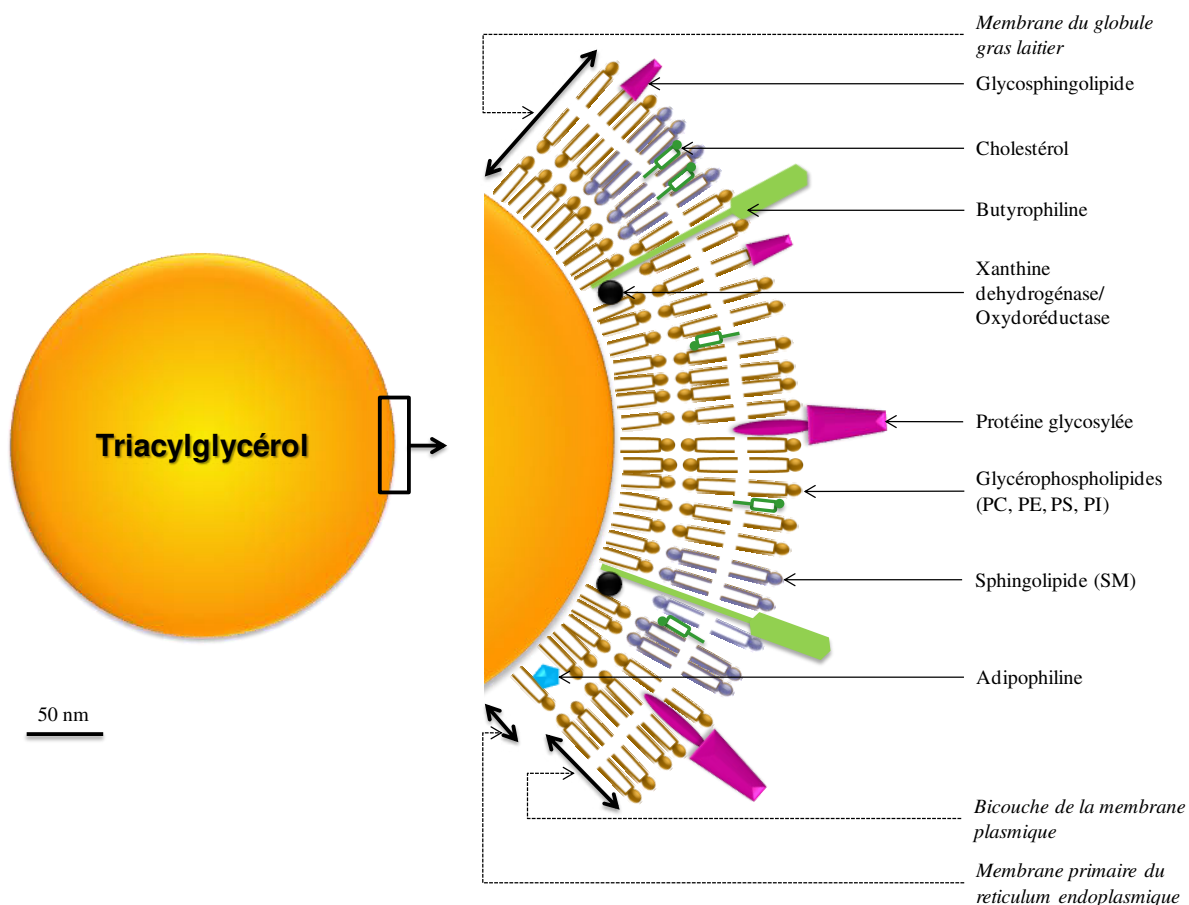


Figure 5 : Schéma de la membrane du globule gras natif (PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, PS : phosphatidylsérine, PI : phosphatidylinositol, SM : sphingomyéline) (Lopez 2005)

Le globule gras natif est essentiellement formé de triglycérides (98 %), entouré d'une membrane complexe formée de protéines (glycoprotéines, enzymes), de lipides polaires, de cholestérol et d'autres composants mineurs (Figure 5). Les lipides membranaires, qui représentent 25 % en masse de la membrane, comprennent des lipides neutres (mono, diglycérides, esters et cholestérols) et des lipides polaires (glycolipides et phospholipides). Les phospholipides sont majoritaires. Cette membrane, d'une épaisseur inférieure à 10 nm, est composée de trois couches. Elle agit comme un émulsifiant naturel en dispersant la matière grasse dans la phase aqueuse et prévient son agrégation et sa coalescence. Elle protège également les lipides des dégradations enzymatiques, notamment de la lipolyse (Lopez 2005).

Industriellement, la matière grasse est isolée du lait par écrémage. La crème obtenue contient dix fois plus de matière grasse qu'un lait entier.

## 1.4. Les composés glucidiques

Le lactose est le glucide majoritaire du lait. Sa teneur moyenne est de 4,6 % (p.p<sup>-1</sup>) dans un lait entier (Walstra *et al.* 2006). C'est un sucre réducteur du fait de la présence d'une fonction hémiacétale dans sa formule. Ce diholoside (ou disaccharide) est composé d'une molécule de  $\beta$ -D-galactose et d'une molécule de  $\alpha/\beta$ -D-glucose reliées entre elles par une liaison osidique  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figure 6).

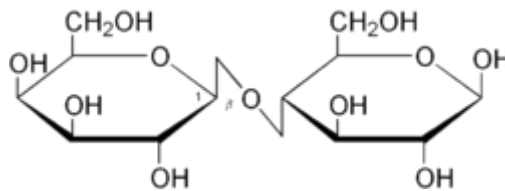


Figure 6 : Projection de Haworth du  $\beta$ -D-galactopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)D-glucopyranose ou lactose

Le lactose a une masse molaire de 342 g.mol<sup>-1</sup>. Sa solubilité dans l'eau est de 18,9 g à 25°C, 25,1 g à 40°C et 37,2 g à 60°C pour 100 g de solution. D'autre part, d'un point de vue sensoriel, il a un pouvoir sucrant assez faible de 0,16 (à comparer au saccharose qui a un pouvoir sucrant de 1).

## 2. *Caractéristiques et modèles de structure de la micelle de caséines*

Les caséines possèdent une structure spatiale peu ordonnée avec peu de structure tertiaire et pas de structure quaternaire. Comme évoqué précédemment, elles peuvent s'associer pour former une suprastructure appelée micelle de caséines. 95 % des caséines du lait sont associées dans cet édifice supramoléculaire qui donne sa couleur blanche au lait (Schmidt 1982 ; Holt 1992 ; Farrel 2004). Cette association se fait dans un rapport massique moyen de 3 : 0,8 : 3 : 1 pour respectivement les caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  (Schmidt 1982).

Principale particule protéique du lait, avec une concentration de  $25 \text{ g.L}^{-1}$ , sa composition (nature des caséines et du phosphate de calcium) et ses propriétés colloïdales (taille, charge et hydratation) sont bien décrites dans la littérature (Tableau 7). Dans un lait natif, les micelles de caséines ont un diamètre moyen proche de 200 nm, un potentiel zêta égal à -18 mV et une couche d'hydratation importante (évaluée à  $4 \text{ g d'eau.g}^{-1}$  de protéines).

**Tableau 7 : Principales caractéristiques physico-chimiques des micelles de caséines**

Caractéristiques	Valeurs
Diamètre	200 nm (entre 50 et 500 nm)
Aire de surface	$8.10^{-10} \text{ cm}^2$
Volume	$2,1.10^{-15} \text{ cm}^3$
Densité (hydratée)	$1,0632 \text{ g.cm}^3$
Masse	$2,2.10^{-15} \text{ g}$
Teneur en eau	63 %
Hydratation	$3,7 \text{ g H}_2\text{O.g}^{-1}$
Voluminosité	$4,4 \text{ cm}^3 .\text{g}^{-1}$
Poids moléculaire (hydratée)	$1,3.10^9 \text{ g.mol}^{-1}$
Poids moléculaire (déshydratée)	$5.10^8 \text{ g.mol}^{-1}$
Nombre de chaînes peptidiques	$5.10^3$
Nombre de particules (par mL de lait)	$10^{14}$ à $10^{16}$
Surface des micelles (par mL de lait)	$5.10^4 \text{ cm}^2$
Distance moyenne entre les particules	240 nm

Des questions demeurent au sujet de sa structure interne qui n'a pas été parfaitement résolue et aujourd'hui encore plusieurs modèles sont proposés. Les chercheurs s'accordent sur la présence d'interactions protéiques, en particulier hydrophobes et électrostatiques, et sur l'importance du calcium et du phosphate (6 à 8 % en poids) dans cette association. Différentes approches et méthodes (de l'échelle moléculaire à l'échelle colloïdale) sont rapportées dans les nombreuses revues cherchant à comprendre et expliquer cette structure micellaire (Walstra 1990, 1992 et 2002 ; Schmidt 1982 ; Horne 1986 ; Holt & Horne 1996 ; Fox & McSweeney 1998 ; Swaisgood 1992 et 2003 ; Tuinier & de Kruif 2002 ; Dalgleish *et al.* 2004 ; Walstra *et*

al. 2006 ; Fox & Brodtkorb 2008 ; De Kruif & Holt 2003 ; Dalgleish 2011 ; Dalgleish & Corredig 2012 ; De Kruif *et al.* 2012).

Trois modèles principaux de la structure micellaire peuvent être retenus. Tous s'accordent sur une forme quasi-sphérique de la micelle qui serait couverte d'une couche de caséines  $\kappa$  (Dupont *et al.* 2001). Les parties C-terminales de cette protéine portent des chaînes glucidiques et s'apparentent à des « cheveux » qui se déploient à la surface de la micelle native. Cette « couche » épaisse de 12 nm environ confère une charge nette négative à la particule. Elle participe à sa stabilité en évitant les phénomènes d'agrégation entre les micelles grâce à son encombrement stérique et aux répulsions électrostatiques (Holt & Horne 1996). Les molécules d'eau piégées par les « cheveux » forment aussi une barrière d'hydratation qui induit des forces de dispersion vis-à-vis des autres molécules du milieu dispersant. La structure interne et plus particulièrement la nature exacte des interactions entre les caséines et leur organisation au sein de la micelle sont en revanche discutées. Le rôle des nanoclusters de phosphate de calcium ou l'existence de submicelles dans les micelles sont par exemple controversés.

Dans le **modèle submicellaire** (Figure 7), la structure est décrite comme un assemblage de sous-unités de 15 nm de diamètre environ (Morr 1967 ; Schmidt 1982 ; Ono & Obata 1989 ; Walstra 1999). Ces submicelles sont de compositions variables mais peuvent être regroupées en deux types principaux. L'un est majoritairement composé de caséines  $\alpha$  et  $\beta$  alors que l'autre est riche en caséines  $\alpha$  et  $\kappa$ . Des clusters de phosphate de calcium forment des ponts entre les submicelles, les agrègent entre elles jusqu'à la formation de la suprastructure micellaire. Les submicelles contenant des caséines  $\kappa$  se répartissent à l'extérieur de la micelle, formant ainsi la couche « chevelue » (Figure 7). Ce modèle, longtemps admis, a été remis en cause suite aux résultats obtenus par des observations en cryo-microscopie à transmission et des analyses en diffusion des rayons X et neutrons aux petits et ultra-petits angles (Marchin 2007 ; Marchin *et al.* 2007 ; de Kruif *et al.* 2012).

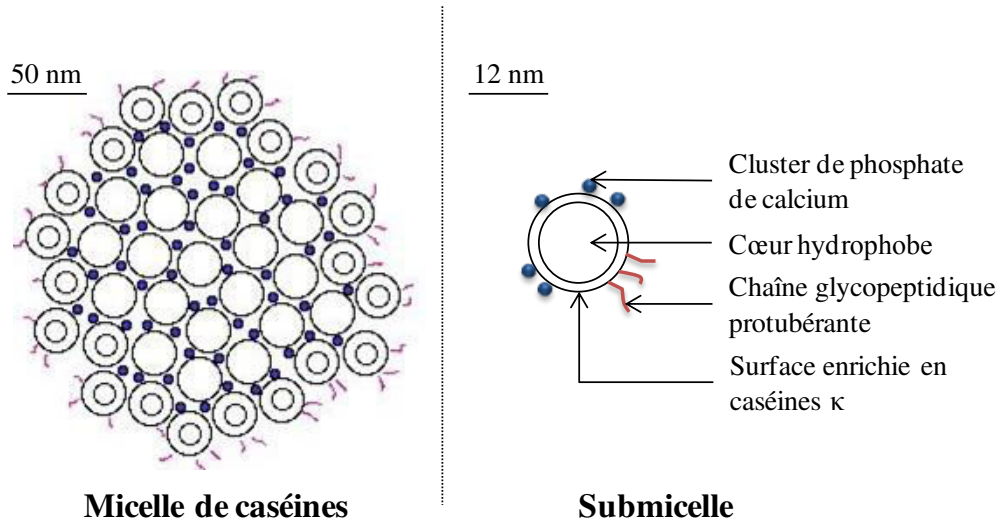


Figure 7 : Modèle submicellaire de Walstra (1999)

Le modèle à structure ouverte de Holt et Horne (1996) suggère quant à lui que le réseau caséinique est « cimenté » par des nanoclusters de phosphate de calcium (Figure 8 et Figure 9). Ces nanoclusters correspondent à la forme inorganique des minéraux présents dans la phase micellaire et leur nature est aujourd'hui encore discutée. D'après Holt (2004), ils seraient constitués d'une partie centrale de phosphate de calcium amorphe hydratée d'environ 4,8 nm de diamètre, « recouvert » d'une enveloppe peptidique d'environ 1,6 nm d'épaisseur, avec des centres phosphate à l'interface (Figure 8).

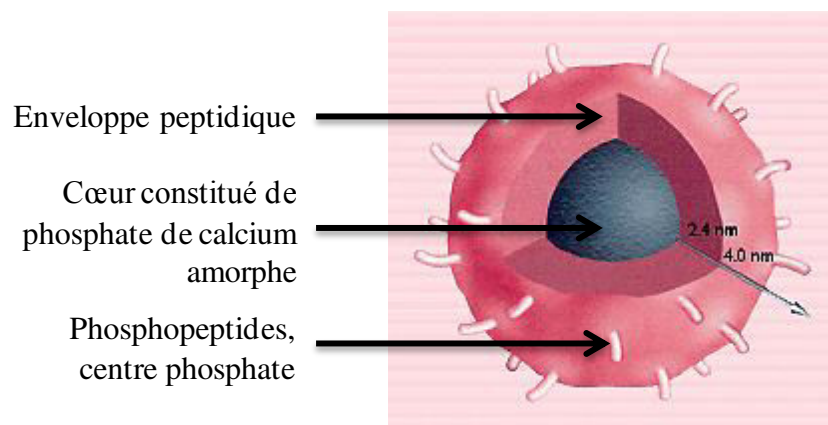


Figure 8 : Représentation schématique d'un nanocluster de phosphate de calcium (Holt & Timmins 1997)

À ce jour, la formule proposée pour un nanocluster entouré d'une couronne peptidique de 49 centres phosphate est la suivante :  $[Ca_{13,2}(Pi)_{6,5}Mg_{1,0}Cit_{1,3}SerP_4Cas]_{49}$  (de Kruif & Holt

2003). Le pontage entre caséines et nanoclusters se fait par l'intermédiaire des centres phosphate correspondant aux résidus sérine phosphorylés regroupés au sein des molécules de caséines. De récentes études tendent à prouver que ce modèle à structure ouverte est le plus probable pour décrire la micelle de caséines (*cf.* références citées dans l'article de de Kruif *et al.* 2012).

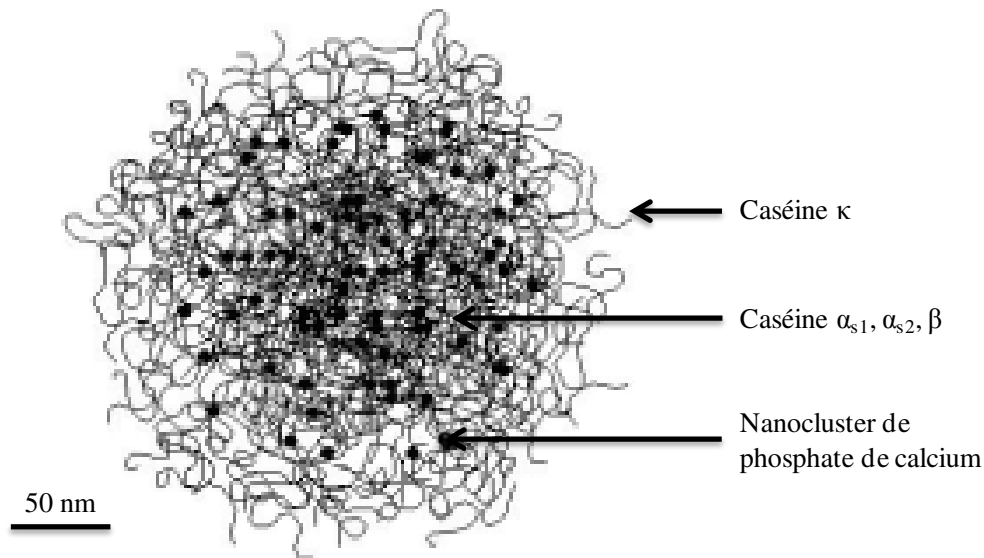


Figure 9 : Modèle à structure ouverte de Holt & Horne (1992)

Un troisième modèle a récemment été proposé : **le modèle éponge ou modèle en cellules** (Bouchoux *et al.* 2010) (Figure 10). Ce dernier modèle (Marchin *et al.* 2007 ; Bouchoux *et al.* 2010 ; Dalgleish 2011) propose l'existence de régions denses, composées de nanoclusters de phosphate de calcium interagissant avec des caséines, et de canaux aqueux ioniques et protéiques. La micelle  $\gamma$  est décrite comme une matrice protéique hétérogène, composée à 50 % de zones denses et donc difficiles à compresser et à 50 % de zones « vides », c'est-à-dire dépourvues de caséines et facilement compressibles. Dans ce modèle, la caséine  $\kappa$  n'est pas la seule caséine à la surface de la micelle. Marchin (2007) puis Dupont *et al.* (2011) ont en effet montré, à l'aide d'anticorps dirigés contre les différentes caséines, que les caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\alpha_{s2}$  étaient accessibles en surface de la micelle. Là encore, l'organisation des différentes caséines dans le cœur et à la surface de la micelle ainsi que leur implication dans la stabilité micellaire ne sont donc pas totalement résolues et requièrent des études complémentaires.

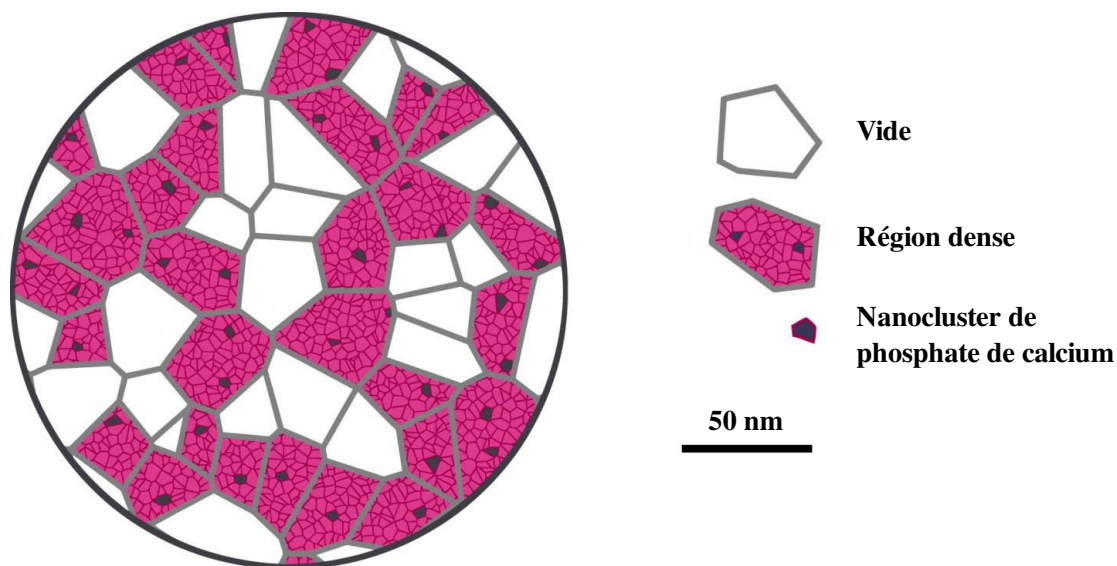


Figure 10 : Modèle de micelle éponge (Bouchoux *et al.* 2010)

### 3. *Impacts de quelques modifications physico-chimiques sur les micelles de caséines*

La micelle est une suprastructure relativement stable grâce, d'une part, aux différents types d'interactions participant à la cohésion des caséines entre elles, et d'autre part, à la couche chevelue. Cette stabilité peut être altérée en modifiant l'environnement et la composition de cette structure.

Dans des conditions « normales », plusieurs constituants sont échangés entre les phases micellaire et aqueuse. C'est le cas des minéraux (phosphate de calcium en particulier) et de la caséine  $\beta$  qui se solubilisent à froid et qui peuvent réintégrer la micelle lorsque la température remonte. Si des modifications biologiques (enzymes), physico-chimiques (acidification, alcalinisation, addition de minéraux, cations ou chélatants) ou technologiques (traitement thermique, haute pression, refroidissement, concentration, séchage, filtration) sont appliquées, les échanges et équilibres peuvent varier de manières qualitative et quantitative (Figure 11). Ces modifications peuvent toucher les propriétés des micelles de caséines (compositions minérale et caséinique, charge, hydrophobicité, forme) et leur structure interne. C'est donc un moyen d'apporter de nouvelles fonctionnalités.

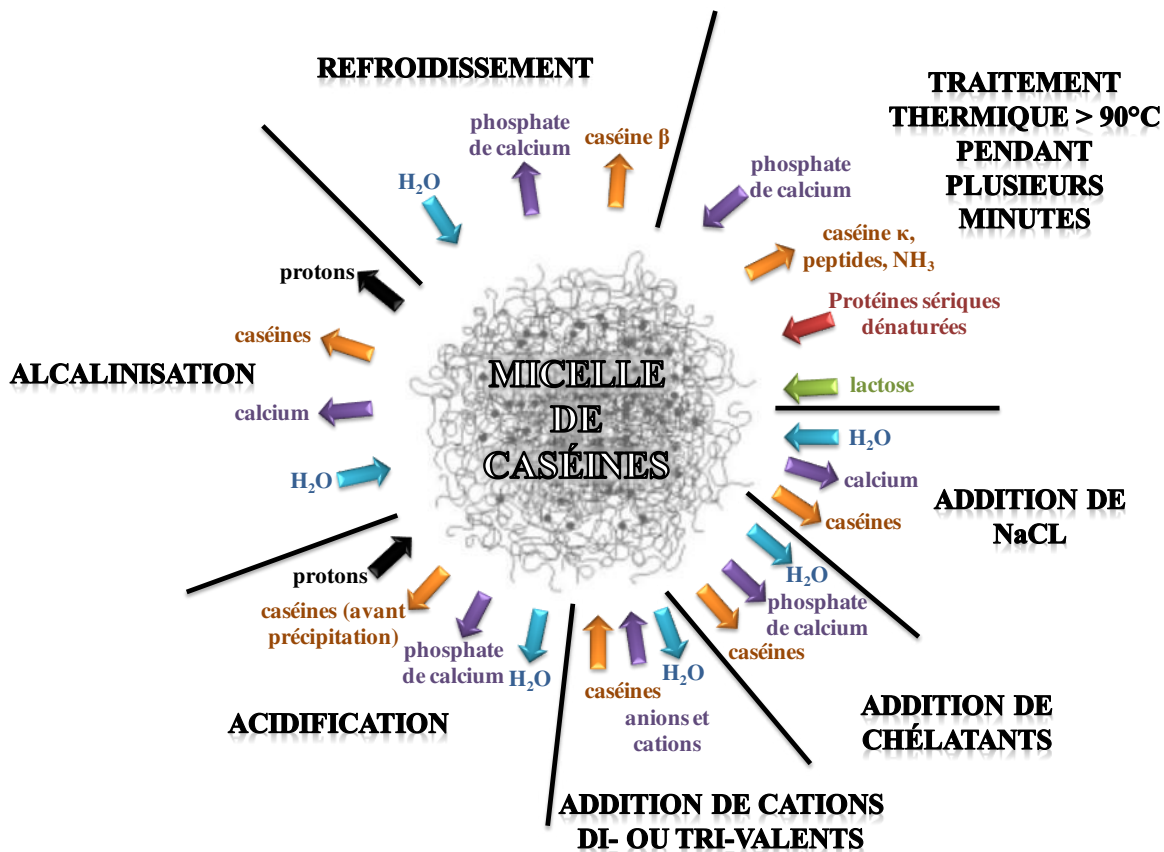


Figure 11 : Schématisation des principaux échanges en minéraux, eau et composés azotés en fonction des traitements physico-chimiques appliqués. Les flèches indiquent le sens de transfert entre les phases aqueuse et micellaire.

Selon les changements de conditions physico-chimiques et leur intensité, les conséquences sur la structure et la stabilité de la micelle sont plus ou moins importantes, réversibles ou non, et peuvent conduire à sa déstabilisation avec des répercussions sur les techno-fonctionnalités du lait (Gaucheron 2004 ; Dalglish & Corredig 2012). Modifier les constituants des produits laitiers pour leur apporter de nouvelles caractéristiques et en particulier moduler l'organisation et la fonctionnalité des micelles de caséines est donc un défi à la fois scientifique et technologique.

Au cours des travaux rapportés dans ce manuscrit, l'accent a davantage été mis sur les modifications liées aux traitements thermiques, à l'acidification, à l'ajout de chélatant et à l'enrichissement en protéines ou en minéraux.



### 3.1. Conséquences des traitements thermiques

#### 3.1.1. Refroidissement

L'impact du refroidissement est généralement observé à 4°C, température recommandée pour le stockage de produits frais afin de les préserver microbiologiquement.

La baisse de température induit des changements micellaires réversibles. Les études portant sur cette diminution et ses impacts sur le phosphate de calcium sont peu nombreuses et assez anciennes. Toutefois, il est admis que, dans la phase aqueuse, la solubilité du phosphate de calcium augmente avec la baisse de la température. Une augmentation parallèle de la solubilisation du phosphate de calcium micellaire apparaît à froid. Ichilczyck-Leone *et al.* (1981) mettent en évidence une augmentation de 10 % environ du calcium et du phosphate inorganique dans la phase aqueuse après le refroidissement à 3°C d'un lait écrémé. Koutina *et al.* (2014) ont confirmé cette tendance en rapportant des quantités de calcium et de phosphore dans la phase soluble plus importantes à 4°C qu'à 40°C. Ces changements sont réversibles et la répartition saline initiale peut être ré-établie après chauffage.

L'autre impact majeur du refroidissement est la solubilisation de la caséine  $\beta$  initialement micellaire (Downey & Murphy 1970 ; Creamer *et al.* 1977 ; Pierre & Brulé 1981). La diminution de la température entraîne une diminution des interactions hydrophobes entre les protéines ce qui permet la dissociation de cette caséine (la plus hydrophobe de toutes) de la micelle vers la phase aqueuse (environ 1,4 g.kg<sup>-1</sup> à 4°C, Pierre & Brulé 1981). Cette solubilisation n'est pas totalement réversible car la caséine  $\beta$  ne retrouve pas exactement sa place après un retour à la température initiale.

Liu *et al.* (2013) confirment que la structure de la micelle et le système minéral du lait sont tous deux dépendants de la température dans une gamme allant de 10 à 40°C. Ainsi, une fois le produit parfaitement équilibré à une température donnée, la quantité de caséines solubles, le pH, l'hydratation et la voluminosité apparente des micelles d'un lait écrémé diminuent avec l'augmentation de la température. De plus, ces auteurs montrent que, quand la température est modifiée, la turbidité du lait à l'équilibre est plus ou moins rapidement atteinte selon la manière dont cette variation thermique s'opère (Figure 12). Cette rééquilibration est plus rapide lors d'une remontée de température à une valeur cible plutôt

que lors d'un refroidissement à cette même température (Figure 12). D'après Liu *et al.* (2013), comme la variation de pH due au changement de température est instantanée, les variations de partitions minérales le seraient aussi et le retard observé au niveau de la turbidité serait plutôt dû aux caséines (solubilisation, taille ou hydratation micellaires). Ce phénomène d'hystérésis est d'autant plus important que la variation de température est grande (Figure 12).

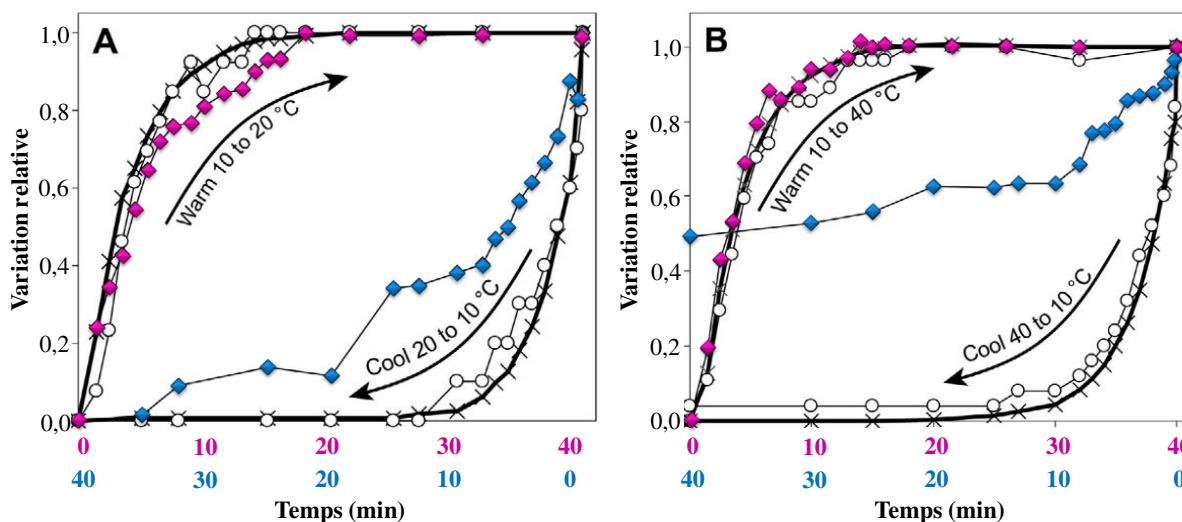


Figure 12 : Dynamiques dans un lait écrémé chauffé ou refroidi entre 10 et 20°C (A) et entre 10 et 40°C (B) (Liu *et al.* 2013). Les variations relatives de température (X), de pH (o) et de turbidité (♦ rose ou bleu) sont rapportées en fonction de la durée (en minutes) du chauffage (rose, de gauche à droite) ou du refroidissement (bleu, de droite à gauche).

### 3.1.2. Chauffage

La première application du traitement thermique relève de la sécurité alimentaire. Ces traitements entraînent de nombreuses modifications, en particulier au niveau de la micelle de caséines. Certaines altérations sont utiles, notamment dans la fabrication du fromage (pour en améliorer le rendement), et d'autres subies (comme le brunissement du lait ou sa déstabilisation) (Kethireddipalli & Hill 2015).

Les micelles de caséines sont remarquablement résistantes face aux traitements thermiques, contrairement aux protéines sériques. Cette résistance à la chaleur est due à l'absence de structure tertiaire (rhéomorphisme). Toutefois, la fixation des protéines sériques sur les caséines ( $\kappa$  en particulier) et la formation d'agrégats de ces protéines thermo-dénaturées entraînent une coagulation thermique (Corredig & Dalgleish 1999).

La stabilité structurale des micelles de caséines n'exclut pas d'autres modifications thermo-induites. Les caséines quitteraient la micelle lors d'un chauffage. Ce phénomène serait dépendant de la température et du pH et toucherait plus ou moins les caséines selon leur type ( $\kappa > \alpha_s > \beta$ ) (Kethireddipalli & Hill 2015). Plusieurs modifications biochimiques des protéines sont également décrites, comme la désamidation des résidus asparagine et glutamine, une réticulation entre les acides aminés, une rupture des ponts disulfure et des échanges de groupements thiol libres présents sur les résidus cystéine (Walstra *et al.* 2006) (Figure 13).

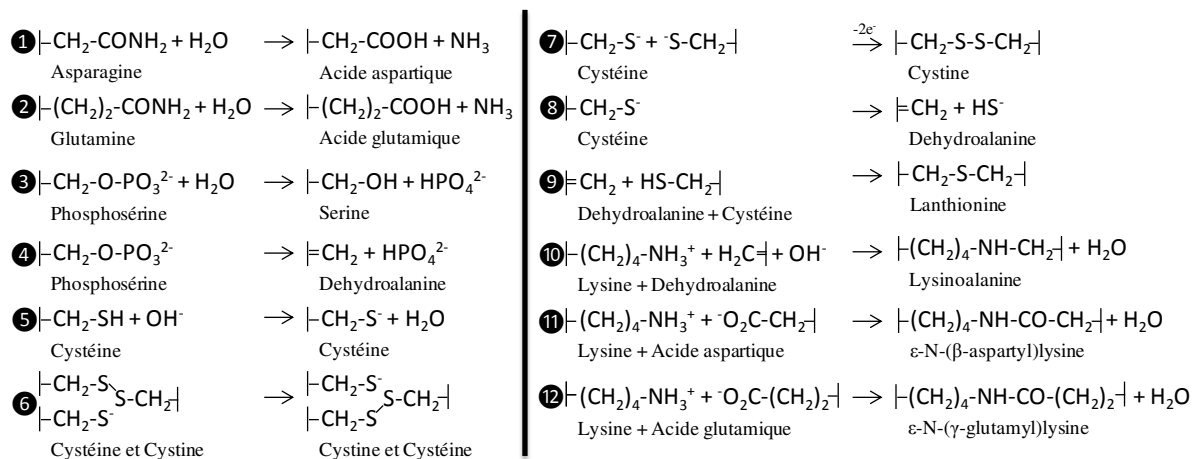


Figure 13 : Douze exemples de réactions possibles au niveau des acides aminés des protéines chauffées à haute température (Walstra *et al.* 2006)

En ce qui concerne la fraction phospho-calcique, une diminution de sa solubilité dans la phase aqueuse est observée pendant le traitement thermique. Cette baisse peut influencer la composition et la structure des micelles de caséines, notamment en modifiant leur surface (Rose & Tessier 1959 ; Davies & White 1960 ; Kethireddipalli & Hill 2015). La composition, la localisation et les interactions de ce « phosphate de calcium » nouvellement formé au niveau des micelles de caséines ne sont pas décrites précisément dans la littérature. Il pourrait se déposer au niveau des nanoclusters considérés comme des sites de nucléation (Kethireddipalli & Hill 2015). Si le traitement thermique est inférieur à 95°C pendant quelques minutes, les modifications des équilibres salins sont considérées réversibles. En revanche, un traitement thermique plus important (par exemple 120°C pendant 20 minutes) entraîne des modifications irréversibles au niveau des micelles de caséines et de la répartition des minéraux. Les résidus phosphoséryl des caséines peuvent être partiellement déphosphorylés (Bellec & Jenness 1962). La diminution des teneurs en calcium et phosphate

.....

dans la phase aqueuse ne correspond alors pas à une simple précipitation du phosphate de calcium soluble puisqu'y participe aussi le phosphate issu des caséines.

Le pouvoir tampon d'un lait chauffé fortement (120°C pendant 10 minutes) est plus élevé que celui d'un lait témoin sans chauffage (Salaün *et al.* 2005).

Lors d'un traitement thermique supérieur à 70°C pendant plusieurs minutes, des liaisons covalentes entre protéines sériques dénaturées et micelles de caséines apparaissent (plus ou moins selon le pH) et une agrégation thermo-induite est provoquée. Par conséquent, le diamètre hydrodynamique des micelles de caséines augmente (Anema & Li 2003 ; Tran Le *et al.* 2008). La balance saline est également influencée par le pH au moment du traitement thermique. La précipitation du phosphate de calcium est par exemple plus importante lorsque le lait est chauffé à pH alcalin (Kethireddipalli & Hill 2015).

De nombreuses modifications physico-chimiques sont causées par le traitement thermique, comme exposé précédemment ; mais outre les altérations au niveau des minéraux et les dégradations au niveau du lactose (*Chapitre 1 – paragraphe 3.2. Impact du traitement thermique sur les glucides*) et des caséines, la dégradation de l'urée en acide carbonique par exemple pourrait jouer un rôle (Fox *et al.* 1980).

La lactosylation est une autre réaction importante induite par le traitement thermique du lait et est présentée plus spécifiquement dans le paragraphe suivant (*Chapitre 1 – paragraphe 3.2. Impact du traitement thermique sur les glucides*).

## **3.2. Impact du traitement thermique sur les glucides**

### **3.2.1. La réaction de glycation**

La glycation correspond à la réaction entre une fonction carbonylée libre d'un sucre réducteur (cétone ou aldéhyde) et les groupements basiques  $\epsilon$ -amines libres situés sur les résidus lysyls essentiellement (Liu *et al.* 2012). Favorisée à chaud, elle génère une base de Schiff qui, par réarrangement, donne un composé d'Amadori (Akillioğlu & Gökmen 2014), premier produit stable de la réaction (Figure 14).

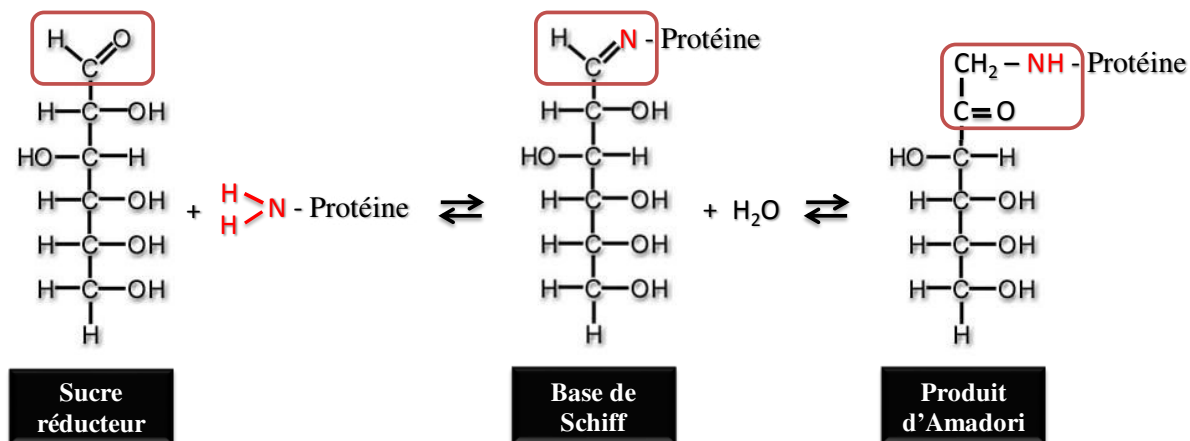


Figure 14 : Schéma réactionnel simplifié de la glycation

Le sucre peut être du lactose ( $\rightarrow$ lactosylation), du glucose, du galactose, du saccharose, de l'acide galacturonique ou du dextran par exemple ( $\rightarrow$  glycosylation) (Olivier *et al.* 2006 ; Chen *et al.* 2015). Toutes les protéines du lait sont concernées par ce type de réactions car toutes possèdent des résidus lysyls. La littérature portant sur les réactions de lactosylation et ses effets sur les micelles de caséines est cependant assez pauvre. En revanche, la réaction entre le lactose et les caséines purifiées est mieux décrite, en particulier pour les caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  qui sont riches en résidus lysyls (Swaisgood 1992 ; Darewicz & Dizuba 2001 ; Akilloğlu & Gökmen 2014 ; Bhatt *et al.* 2014) (Tableau 2).

D'un point de vue mécanistique, la glycation constitue la première étape dans les réactions de Maillard (Henle *et al.* 1991). Ce processus très complexe est en effet divisé en trois stades : primaire, avancé et final. Il fait toujours l'objet d'études aujourd'hui (Liu & Zhong 2015) et ses mécanismes restent controversés (Liu *et al.* 2012). Une fois initiée, la réaction de Maillard est difficilement stoppable, même en refroidissant. Après la glycation *sensu stricto*, suivent plusieurs voies de transformation avec des mécanismes de condensation, polymérisation, oxydation, élimination et dégradation qui aboutissent notamment à la formation de lactulose, de mélanoidines (pigments bruns), de molécules aromatiques comme le furfural ou d'acides organiques (Figure 15) (Hodge 1953 ; Chevalier *et al.* 2001a ; Akilloğlu & Gökmen 2014).

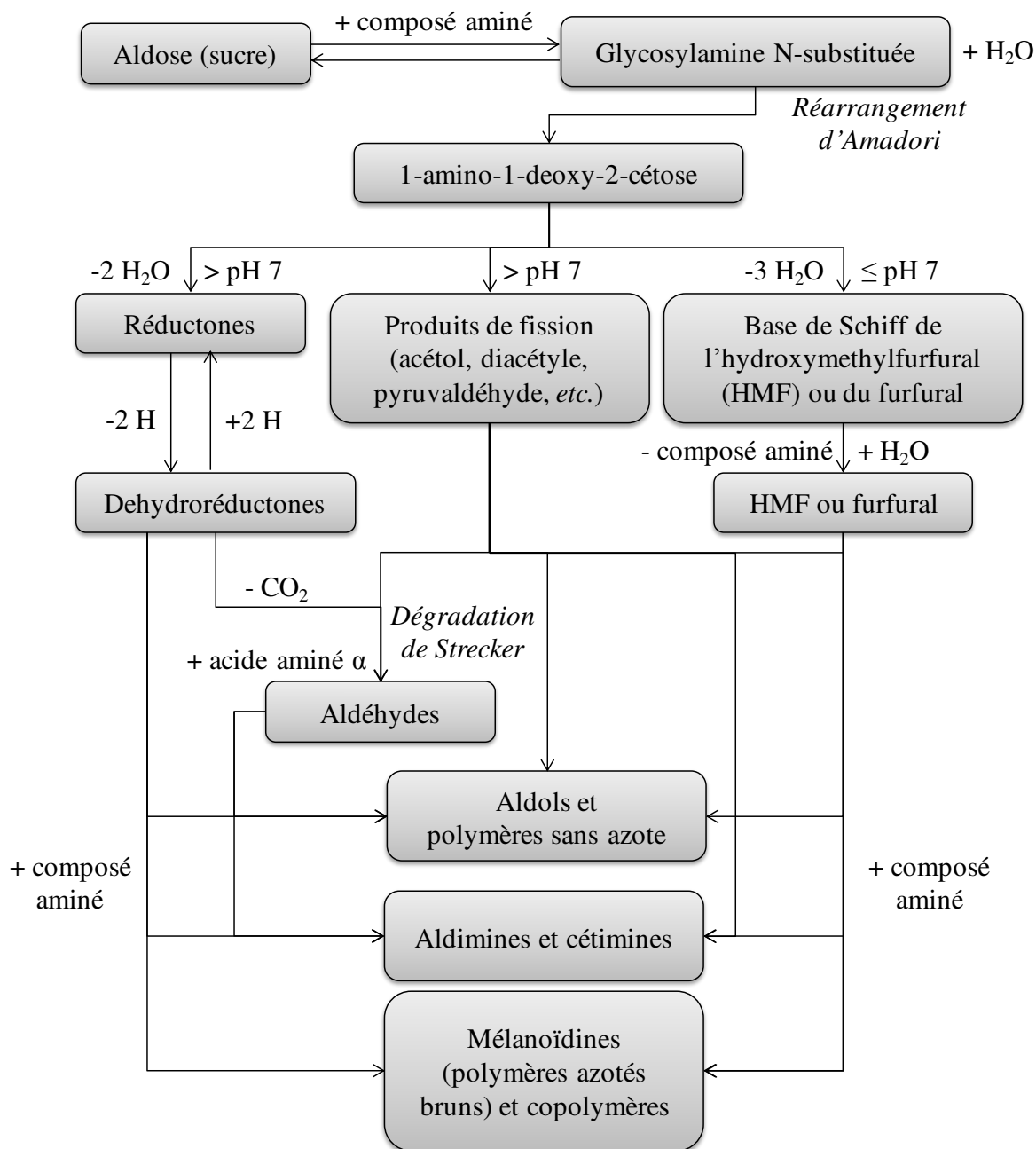


Figure 15 : Schéma simplifié de la cascade des réactions de Maillard (Hodge 1953)

Le degré de lactosylation dépend de nombreux paramètres comme :

- l'intensité du traitement thermique (durée et température),
- les conditions environnementales telles que le pH, le type et la structure de la protéine considérée (van Boekel 1998 ; Scaloni *et al.* 2002 ; Bhatt *et al.* 2014),
- le rapport sucre / protéines (Evangelisti *et al.* 1994 ; Liu *et al.* 2012),
- la teneur en eau.

Le degré de glycation dépend également de la taille et de l'état de charge du sucre réducteur (étude comparative menée sur la  $\beta$ -lactoglobuline (Chen *et al.* 2015)). Ainsi, plus la taille moléculaire est importante ou l'état de charge négatif, moins la glycation est favorisée, ce qui se traduit par une cinétique de réaction plus lente (Chen *et al.* 2013). Cette moindre vitesse s'expliquerait par des interactions électrostatiques et des répulsions stériques qui limiteraient l'approche des réactifs pour la première phase des réactions. En revanche, pour une taille moléculaire supérieure ou un état de charge négatif moindre et pour un même taux de glycation, la stabilisation thermique des protéines est plus significative (Liu & Zhong 2013). Chevalier *et al.* (2001 b) ont également montré que les fonctionnalités apportées à la  $\beta$ -lactoglobuline, *via* sa glycation, dépendent aussi de la nature du sucre (confirmé par Fenaille *et al.* 2003 ; Chobert *et al.* 2006).

Les conséquences de la glycation sur les caractéristiques et fonctionnalités des molécules et micelles de caséines sont multiples et complexes :

- Cette réaction améliore le pouvoir émulsifiant de la caséine  $\beta$  (Darewicz & Dziuba 2001).
- Elle augmente la voluminosité des caséines (Colas *et al.* 1988).
- Elle augmente la viscosité de suspensions de caséinates (Olivier, Melton et Stanley 2006), ce qui suggère une plus grande quantité d'eau liée aux protéines modifiées (Landy *et al.* 1997).
- Elle améliore la solubilité des caséines dans une gamme de pH proches de leur  $pH_i$  (Courthaudon *et al.* 1989 ; Cayot *et al.* 1991). En combinant l'addition chimique de dix groupements glucose et neuf groupements lactose à la déphosphorylation enzymatique de la caséine  $\beta$ , Darewicz *et al.* (1999) réussirent à déplacer le  $pH_i$  des caséines vers des pH plus acides, à diminuer leur solubilité à pH acide et à réduire leur sensibilité au calcium.
- D'après Bhatt *et al.* (2014), en plus de changer la charge des caséines (retrait de charges positives), la lactosylation apporte une gêne stérique (attachement d'une molécule de lactose).
- Plusieurs travaux menés sur des protéines sériques comme la  $\beta$ -lactoglobuline ont mis en avant une amélioration de la stabilité thermique (Chevalier *et al.* 2001 a et b ; Chobert *et al.* 2006 ; Chen *et al.* 2015). Toutefois, celle-ci est moins évidente

pour les caséines puisque, d'après Crujisen (1996), l'ajout de lactose diminue la stabilité thermique de caséinates en apportant de l'acidité lors du chauffage.

D'un point de vue industriel, la réaction de glycation peut :

- être contrôlée et recherchée ou être subie ;
- avoir lieu à sec ou en solution aqueuse (Fenaille *et al.* 2003) ;
- se produire lors du stockage, pendant le traitement thermique de stabilisation ou bien encore lors de la cuisson (Siciliano *et al.* 2000) ;
- être utilisée pour améliorer le pouvoir émulsifiant, la solubilité, l'arôme, la couleur (pigmentation brune) ou la texture d'un produit (Hodge 1953 ; Jindal & Naeem 2002 ; Liu *et al.* 2012).

Les réactions de Maillard apportent une fonctionnalité qu'il faut néanmoins associer aux impacts controversés sur la santé comme la dégradation nutritionnelle de l'aliment (diminution de sa teneur en lysine, acide aminé essentiel, par exemple) (Jindal & Naeem 2002 ; Chobert *et al.* 2006 ; Siciliano *et al.* 2013 ; Gu *et al.* 2010).

### ***3.2.2. La dégradation du lactose par la voie de Lobrey de Bruyn-Aberda van Ekenstein (voie L.A.)***

Le lactose ne réagit pas seulement avec les protéines du lait *via* les réactions de Maillard. Il s'isomérisé aussi *via* la voie de Lobrey de Bruyn-Aberda van Ekenstein (voie L.A.) en lactulose puis est dégradé sous forme d'acide formique et de composés à 5 ou 6 carbones comme le galactose (Figure 16).



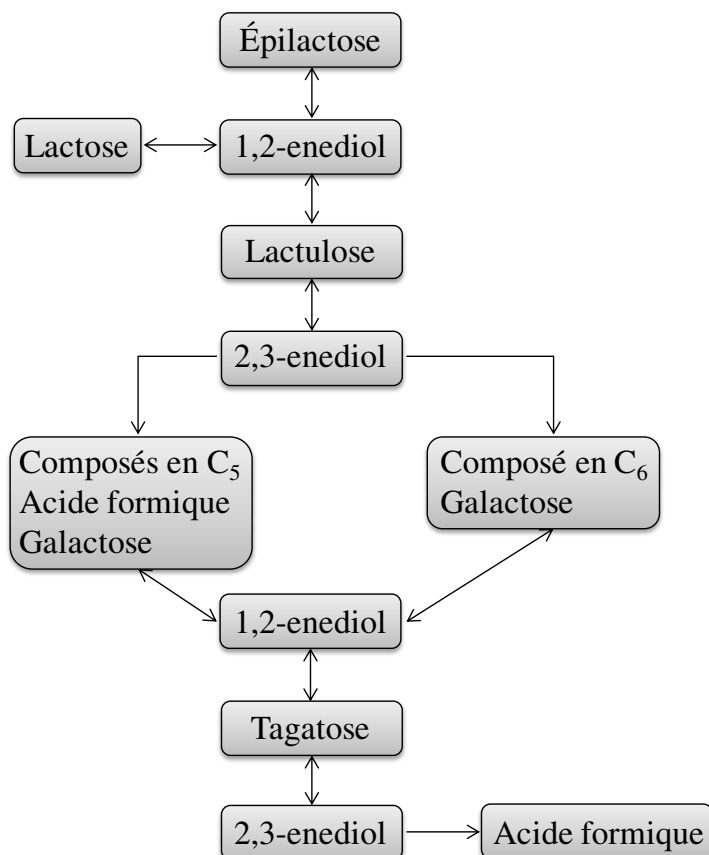


Figure 16 : Schéma réactionnel simplifié de la voie de L.A. (Berg & van Boekel 1994)

Le lactulose formé à partir du lactose *via* un intermédiaire 1,2-enediol est dégradé en galactose, tagatose et acide formique. Le lactose peut aussi s'épimériser en épilactose. De l'hydroxyméthylfurfural (HMF) est également produit lors de cette transformation (O'Brien 1995). Berg (1993) a montré que la dégradation directe du lactose selon la voie de L.A. est quantitativement plus importante que par les réactions de Maillard à haute température. En effet, sa contribution à la production d'acidité est de 80 % au cours de traitements thermiques conduits entre 110 et 150°C pendant 20 minutes. Les autres 20 % d'acidité sont attribués aux réactions de Maillard (Berg & van Boekel 1994). D'autre part, la concentration en protéines du lait peut influencer la formation du lactulose. En effet, l'augmentation de la teneur en protéines favoriserait les réactions de Maillard aux dépens de la production de lactulose.

### 3.3. Impact de l'acidification sur les structures et fonctions micellaires

L'acidification est une des modifications les plus étudiées au niveau des micelles de caséines car elle est impliquée dans l'élaboration de nombreux produits laitiers. Plusieurs centaines de publications rapportent les différents changements physico-chimiques (Figure 17) ayant lieu lors de la diminution du pH (de Kruif 1997).

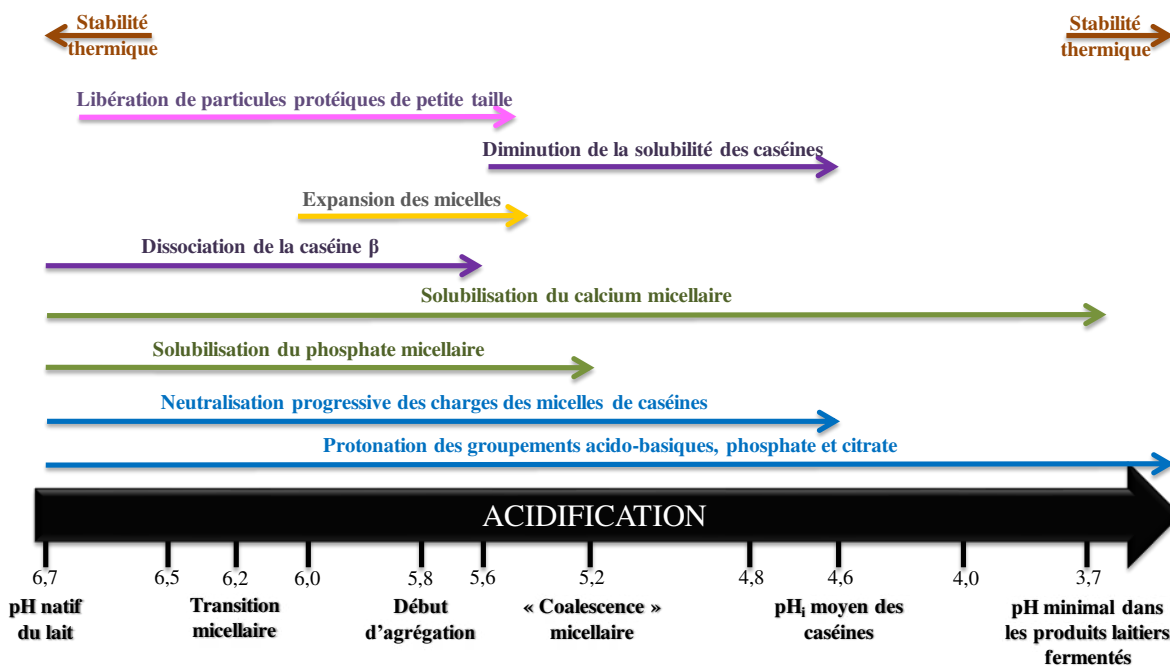


Figure 17 : Schématisation synthétique des modifications induites par l'acidification

Au niveau biochimique, lorsque le lait est acidifié, les groupements acido-basiques des molécules (phosphates organique et inorganique, citrate, groupements carboxyliques et résidus phosphoséryl) sont de plus en plus protonés. Selon le pH et les pK<sub>a</sub> respectifs de ces groupements ionisables, leur niveau de protonation varie (exemple Figure 4).

En lien avec la protonation due à l'acidification, la phase aqueuse devient moins saturée en phosphate de calcium car ce sel se dissocie. Le phosphate de calcium colloïdal se solubilise partiellement, ce qui s'accompagne d'une solubilisation partielle des caséines dans la phase aqueuse (Visser *et al.* 1986 ; Dalglish & Law 1988, 1989). Le niveau de dissociation des caséines et minéraux dépend de la valeur du pH et de la température. À pH 5,2, une partie du calcium et la totalité du phosphate inorganique sont solubilisés. Le calcium, lui, est

totallement solubilisé à pH 3,5 (Le Graët & Brulé 1993). La modification de la distribution des minéraux induite par l'acidification est irréversible. Ainsi, il est impossible de reconstituer le phosphate de calcium micellaire initial et la structure micellaire native en remontant le pH à sa valeur de départ, soit 6,7.

En plus de ces solubilisations phosphocalciques, les interactions caséines-minéraux, caséines-caséines et caséines-eau sont également modifiées par l'acidification. En effet, l'état d'ionisation des caséines diminue en raison de leur affinité pour les ions  $H^+$  et en particulier à cause de la protonation des groupements phosphoséryl et carboxyl. Elles deviennent de moins en moins négativement chargées avec l'acidification, jusqu'à précipiter à pH 4,6,  $pH_i$  moyen des caséines. À ce pH, leur solubilité est minimale (état agrégé ou gélifié selon la vitesse d'acidification).

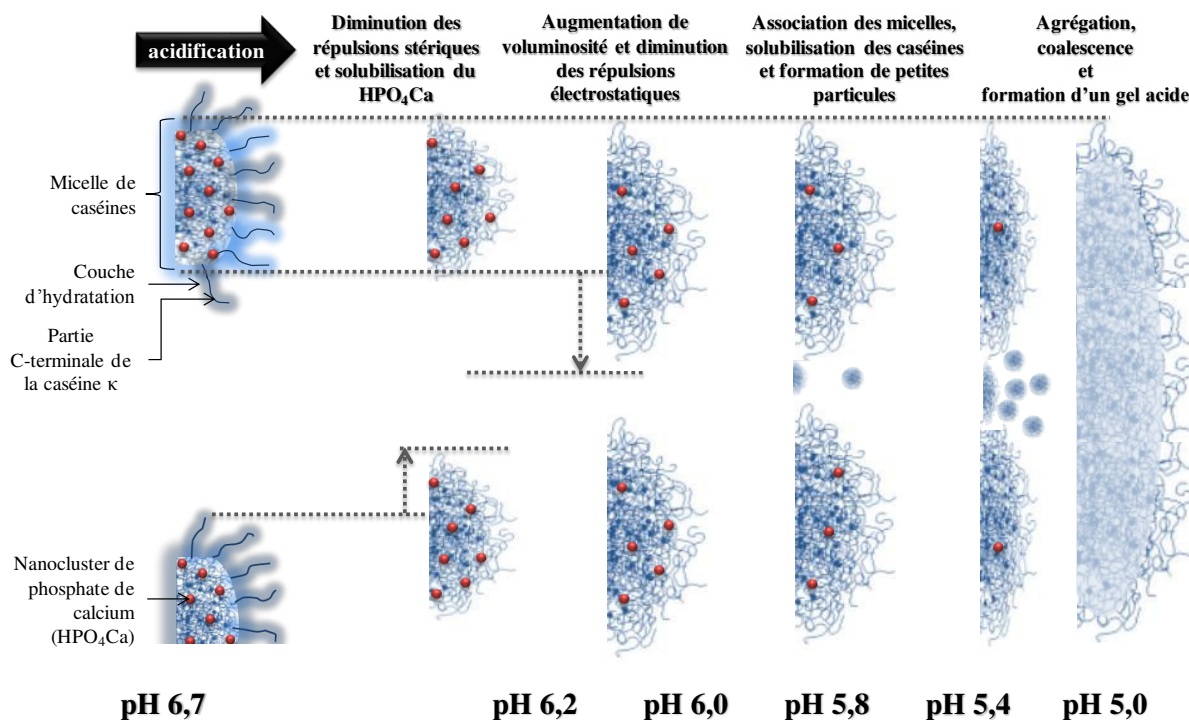


Figure 18 : Modèle hypothétique de formation d'un gel acide

Avec la diminution du pH, un « amincissement » et finalement un « effondrement » total de la couche « chevelue » des caséines  $\kappa$  sont observés (Figure 18). La stabilisation stérique des micelles de caséines diminue donc, avec comme conséquence l'apparition de



### 3.4. Impact de l'ajout d'acide citrique

Comme décrit dans le paragraphe ci-dessus (*Chapitre 1 – paragraphe 3.3. Impact de l'acidification sur les structures et fonctions micellaires*), l'acidification entraîne de nombreuses modifications physico-chimiques. La majorité des articles scientifiques la décrivant sont réalisés avec de l'acide chlorhydrique ou de la glucono- $\delta$ -lactone qui est hydrolysé en acide gluconique et diminue donc progressivement le pH (Alexander & Dalgleish 2005 ; Lucey & Singh 1998 ; Dalgleish & Law 1988, 1989 ; De Kruif 1997 ; Donato *et al.* 2007 ; Le Graët & Brulé 1993). Les connaissances en matière d'acidifications fermentaires ou avec de l'acide citrique sont moindres.

L'ajout d'acide citrique cause des altérations supplémentaires à l'acidification chlorhydrique en raison du pouvoir chélatant bien connu du citrate sur le calcium. Il induit des diminutions du calcium ionique et de la saturation en phosphate de calcium dans la phase aqueuse. Cela se traduit donc par un déplacement du calcium et du phosphate inorganique de la phase micellaire vers la phase soluble.

L'ajout de ce chélatant modifie également quantitativement et qualitativement le pouvoir tampon des micelles de caséines (Salaün *et al.* 2007). Quantitativement, ce pouvoir tampon augmente car les agents chélatants, de par leurs groupements acido-basiques, sont capables de lier les protons  $H^+$  et contribuent donc directement à la résistance de la suspension à l'acidification. Qualitativement, selon leur  $pK_a$ , les agents chélatants modifient le pH du pouvoir tampon maximal de la suspension. Par exemple, les sels de citrate déplacent le pouvoir tampon vers un pH plus élevé puisque qu'ils entraînent la solubilisation d'une partie du phosphate inorganique (Figure 19).

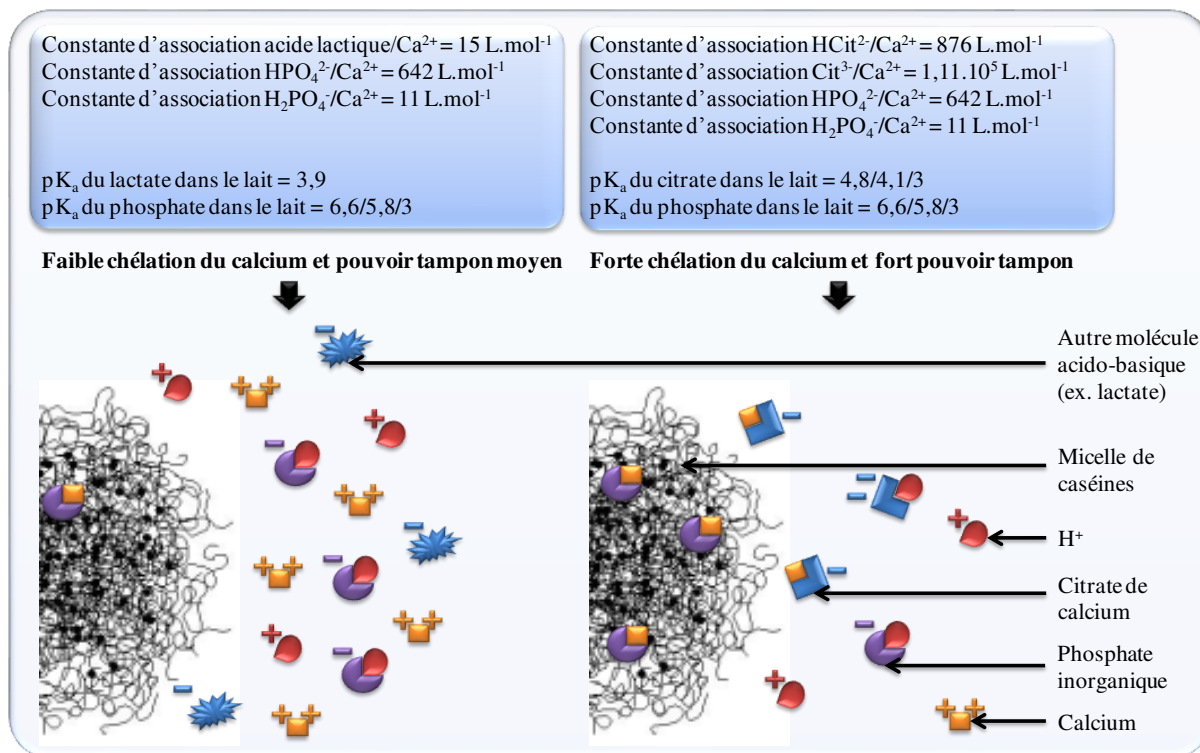


Figure 19 : Schéma illustrant l'impact d'une acidification sans agent chélatant (gauche, par exemple acidification lactique) versus une acidification avec agent chélatant (droite, par exemple acidification citrique) – (hypothèse, Walstra & Jenness 1984)

Mizuno & Lucey (2005) ont également montré que cette solubilisation induite par l'acide citrique entraînait une diminution de la turbidité du lait, suggérant que la structure micellaire était modifiée avec la libération de petits agrégats de caséines non solubles dans la phase aqueuse. Pitowksi *et al.* (2008) ont mis en évidence ces petits agrégats contenant 10 à 158 molécules de caséines et ayant un rayon hydrodynamique de 10 nm. De plus, d'après De Kort *et al.* (2011), ces petits agrégats augmenteraient la viscosité. Enfin, Pitowksi *et al.* (2008) expliquent que le potentiel zêta des caséines devient plus négatif parce que les interactions entre les résidus phosphoséryl et le calcium seraient réduites.

### 3.5. Impact de la teneur en protéines

L'augmentation de la concentration en micelles de caséines accroît l'activité du calcium ionique (Crowley *et al.* 2014) et influence la solubilisation des minéraux qu'elles contiennent. D'une façon générale, plus la suspension est concentrée en micelles de caséines, plus il est nécessaire de descendre à des pH acides pour avoir une solubilisation totale des minéraux (Tableau 8).

**Tableau 8 : Pourcentages de calcium et phosphate solubilisés dans la phase aqueuse à pH 4,6 et 5,2 respectivement, en fonction de la concentration en caséines micellaires (Le Graët & Gaucheron 1999).**

Concentration en caséines micellaires (g.kg <sup>-1</sup> )	% de calcium solubilisé à pH 4,6	% de phosphate solubilisé à pH 5,2
27	93	100
55	88	87
83	85	73
144	75	56

Ce retard à la solubilisation du phosphate de calcium lorsque la concentration micellaire augmente est lié à une concentration en sels phosphocalciques de la phase aqueuse d'autant plus importante que la suspension est riche en caséines micellaires (Le Graët & Gaucheron 1999). En d'autres termes, la phase aqueuse étant à saturation en phosphate de calcium (et le produit de solubilité constant) et la quantité de minéraux micellaires à solubiliser étant plus importante pour des solutions plus concentrées en protéines, il est nécessaire de descendre à des valeurs de pH plus basses pour les solubiliser. Par ailleurs, le pouvoir tampon de ces suspensions est augmenté de façon proportionnelle à la concentration en caséines micellaires. Cette augmentation est liée aux augmentations conjointes des concentrations en protéines et en phosphate micellaires. Srilaorkul *et al.* (1989) décrivent un déplacement de la zone de pouvoir tampon maximal vers des valeurs de pH plus basses d'environ 0,4 unité de pH lorsque l'on passe d'un lait à un rétentat concentré cinq fois. Le retard à la solubilisation des ions phosphate, lorsque la concentration initiale en caséines micellaires augmente, explique ce déplacement de zone tampon maximal vers des pH acides.

### 3.6. Impact de l'enrichissement en minéraux

La majorité des publications rapporte les conséquences physico-chimiques, fonctionnelles, technologiques ou nutritionnelles de l'ajout d'un seul type de minéraux, le plus fréquemment le calcium (souvent  $\text{CaCl}_2$ ), le magnésium (sous forme de  $\text{MgCl}_2$ ) ou le sodium (sous forme  $\text{NaCl}$ ) voire le fer et le zinc, mais pas d'une augmentation de concentration de l'ensemble des minéraux du lait. Or, de nombreux facteurs entrent en jeu lors d'un ajout de minéraux et notamment la composition de la phase aqueuse. Par conséquent, ce paragraphe présente quelques concepts essentiels sans pour autant pouvoir envisager précisément ce qui se produisait lors des expérimentations de la phase 2 de cette thèse.

L'ajout d'un (ou plusieurs) ion impacte l'équilibre de tous les minéraux et a de multiples conséquences. Les principales sont :

- L'augmentation de la force ionique qui réduit le coefficient d'activité et augmente la solubilité du phosphate et du citrate de calcium ;
- La modification des liaisons entre cations et caséines, lorsqu'elles sont de nature électrostatique (cas du calcium, magnésium, sodium et potassium) : plus la force ionique augmente moins les cations se lient aux micelles ;
- Des effets spécifiques selon la nature des minéraux, leur concentration, leurs proportions relatives et l'environnement physicochimique (pH, température, force ionique, présence d'ions interférants (phosphate, citrate, hydrocolloïdes, *etc.*)) (Gaucheron 2004).

Ainsi, les cations ajoutés s'associent plus ou moins aux micelles de caséines. Par exemple, pour une augmentation d'environ  $8 \text{ mmol.L}^{-1}$  des ions ferriques, zinc, calcium, cuivre et magnésium respectivement, les taux d'association à la micelle, mesurés dans des suspensions PPCN + perméat d'ultrafiltration de lait, étaient de 99, 95, 82, 52 et 25 % et les pourcentages de précipitation saline des cations étaient de 92, 79, 91, 51 et 48 % (Philippe *et al.* 2005). Une diminution des concentrations en phosphate inorganique et en citrate de la phase soluble était aussi observée (Philippe *et al.* 2005). L'addition de cations entraînant la formation de nouveaux sels comme des cations-citrate ou cations-phosphate inorganique, elle induit un rééquilibrage des différentes formes du calcium (exemple de l'influence de l'addition



de chlorure de sodium sur les constantes de liaisons des caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  pour le calcium (Tableau 9).

**Tableau 9 : Influence de la concentration en chlorure de sodium (NaCl) sur les constantes de liaisons des caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  pour le calcium (Parker & Dalgleish 1981). Expériences réalisées à pH 7,0 et 20°C**

NaCl (mmol.L <sup>-1</sup> )	Constante de liaison (L.mol <sup>-1</sup> )	
	Caséine $\alpha_{s1}$	Caséine $\beta$
50	894	886
100	574	519
150	405	347
200	281	247

Les équilibres entre  $H_2PO_4^-$  et  $HPO_4^{2-}$  et entre citrate<sup>2-</sup> et citrate<sup>3-</sup> sont alors modifiés. Ces rééquilibrations sont responsables d'une libération de  $H^+$  qui diminue le pH (Philippe *et al.* 2005).

Il est à noter que l'ajout de chlorure de sodium entraîne une solubilisation sélective du calcium. Le phosphate inorganique et le citrate micellaires ne sont pas mis en jeu dans les échanges entre sodium et calcium lié aux résidus phosphosérine et groupements carboxyliques des caséines. À l'opposé, si du chlorure de calcium est ajouté à du lait, des sels de phosphate et de citrate de calcium se forment sur la micelle de caséines essentiellement (en association avec du phosphate inorganique et du citrate de la phase aqueuse).

Lors d'un enrichissement en calcium, une partie de celui-ci se lie également à la suprastructure. Par conséquent, comme il y a « association » de phosphate, de citrate et de calcium à la fraction micellaire durant l'enrichissement, les taux de calcium et de phosphate fixés à cette fraction, pour une même valeur de pH, sont supérieurs lorsque le lait est enrichi. Le pouvoir tampon est alors décalé vers des valeurs de pH plus basses et augmenté (Ismail *et al.* 1973). Ces décalages et augmentation correspondraient à une solubilisation plus tardive du phosphate inorganique et du citrate nouvellement « associés » à la micelle de caséines suite à l'addition de calcium.

.....

L'addition de chlorure de sodium à des micelles de caséines entraîne également une augmentation de leur hydratation et une solubilisation de la caséine  $\beta$  (Gaucheron 2004 ; Pierre & Brulé 1981). L'addition de calcium entraîne en plus une diminution de l'hydratation des micelles de caséines ainsi qu'une augmentation de l'hydrophobicité micellaire, une diminution du potentiel zêta et une diminution de la stabilité thermique (Philippe *et al.* 2005). Les conséquences d'un ajout de chlorure de magnésium sont similaires (Philippe *et al.* 2005).

À ma connaissance peu d'études relatent l'impact d'ajouts d'anions. Pourtant, phosphate et citrate de par leurs propriétés acido-basiques et de par leurs propriétés d'interaction avec le calcium modifient significativement les solubilisations minérales. Ainsi, Ismail *et al.* (1973) relèvent une augmentation et un déplacement du pouvoir tampon maximal de pH 5,2-5,3 vers pH 6,5 après addition de citrate et vers pH 7 après addition de pyrophosphate.

D'un point de vue fonctionnel, l'ajout de minéraux comme le calcium, le magnésium, le fer, entraîne une plus grande instabilité thermique des micelles de caséines (Philippe *et al.* 2005). En effet, toutes les modifications de charges et de structure induites par l'enrichissement minéral fragilisent cette suprastructure.

#### ***4. Conclusion de la synthèse bibliographique***

Depuis des dizaines d'années, la communauté scientifique cherche à mieux décrire et comprendre la **complexité du lait** et plus précisément celle des micelles de caséines. **Différentes approches** ont été utilisées, qu'elles soient chimiques, biochimiques, biologiques ou biophysiques, mais, encore aujourd'hui, les controverses, **débats** et discussions à leur sujet sont nombreux. Cette synthèse bibliographique s'est donc attachée à présenter les résultats les plus couramment admis ainsi que les **modèles les plus souvent utilisés**. L'essentiel à retenir est que le lait est un milieu aux **multiples équilibres** et que la micelle de caséines est une **suprastructure plastique, poreuse qui peut être modifiée de multiples manières et de façon plus ou moins réversible**. Ces changements, causés par des variations physico-

.....

chimiques de leur environnement ou des actions chimiques ou enzymatiques au niveau protéique, permettent de **moduler son organisation et de lui apporter de nouvelles fonctionnalités**.

Cette synthèse bibliographique a permis de construire un socle de connaissances nécessaire à la compréhension des résultats obtenus au cours de cette thèse tout en suggérant le besoin d'acquérir des données complémentaires dans certains domaines. Ce travail se propose donc de participer, à son échelle, au comblement de ces manques.

# QUESTIONS DE RECHERCHE ET STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

## *1. Quelles questions de recherche pour répondre aux objectifs industriels ?*

Ma thèse avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes gouvernant la stabilité des protéines laitières, dans une gamme de pH allant de 6,7 à 3,7, face à des traitements thermiques, en portant une attention particulière aux micelles de caséines. Plusieurs travaux scientifiques traitent des modifications provoquées par l'acidification ou par les traitements thermiques des protéines (*Chapitre 1*). Toutefois, peu de travaux relatent les modifications des protéines combinant à la fois une acidification suivie d'un traitement thermique à l'échelle pilote, en présence ou non de matière grasse. Les études sur des acidifications réalisées dans une large gamme de pH avec des traitements thermiques supérieurs à 100°C pendant quelques secondes sont encore plus rares.

De ce niveau de connaissances insuffisant sur des matrices complexes est né un besoin de comprendre les modifications ayant lieu au cours de ces opérations technologiques. Une fois décrites, des hypothèses de stabilisation des systèmes caséiniques dans ces milieux complexes ont été testées en vue d'éviter la déstabilisation des formules acidifiées face au traitement ultra-haute température (UHT).

Pour atteindre les objectifs de cette thèse (INTRODUCTION GÉNÉRALE), il s'agissait donc de répondre aux questions de recherches suivantes :

1. **Quels sont les facteurs intrinsèque (charge de surface) et extrinsèques (environnement minéral, présence de matière grasse) qui gouvernent la stabilité des systèmes protéiques face à une acidification comprise dans une gamme de pH allant de 6,7 à 3,7 ?**
2. **Quels leviers physico-chimiques permettent de stabiliser les systèmes protéiques acidifiés face aux traitements thermiques de type stérilisation ?**

## ***2. Quelle démarche de recherche pour s'intégrer dans une stratégie industrielle ?***

Afin de répondre aux questions de recherche soulevées, une stratégie s'appuyant sur deux phases a été mise en place (Figure 20).

Dans un premier temps, l'objectif était de déterminer les conditions d'acidification déstabilisant différents systèmes laitiers. La stratégie a donc consisté à faire varier les facteurs qui pouvaient jouer sur le phénomène d'agrégation protéique, à savoir le pH, la teneur en protéines ou en matière grasse, le type d'acide et la température d'acidification, puis de traiter statistiquement les résultats obtenus. Afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu, une approche stratégique multi-échelle a été privilégiée. Ainsi, les systèmes ont été étudiés de l'échelle moléculaire à l'échelle macroscopique *via* :

- des observations à l'œil nu, à la loupe binoculaire et au microscope optique,
- des mesures de taille et de potentiel zêta des particules (échelle colloïdale),

- des dosages d'azote et de minéraux solubles par exemple (échelles moléculaire et ionique).

Enfin, les solutions stables suite à l'acidification étaient traitées à ultra-haute température (UHT) pour évaluer leur stabilité. Cette étude a été menée sur un échangeur thermique pilote, représentatif des conditions industrielles (formulation sur 25 kg, essais UHT sur 3 kg minimum). Afin de limiter les problèmes d'approvisionnement, de contamination, de variabilité saisonnière et donc de pouvoir comparer rigoureusement les différents essais, la stratégie menée s'est appuyée sur l'emploi de matières premières sèches issues de lots uniques : poudre de lait écrémé et matière grasse laitière anhydre par exemple.

Dans un second temps, l'objectif était d'identifier des voies de stabilisation et de les tester *via* des preuves de concept avant d'approfondir les recherches. Cette seconde phase s'est appuyée sur la première pour choisir les paramètres de formulation et d'acidification. En effet, les conditions les plus déstabilisatrices pour les protéines laitières ont été choisies en partant du principe qu'il serait sans doute plus aisé de transposer les solutions efficaces à des systèmes un peu moins fragiles. Cette stratégie avait pour but de maximiser le nombre d'hypothèses de stabilisation à explorer (aux dépens de leur généralisation face aux conditions d'acidification). La cible prioritaire de ce travail était les micelles de caséines. Cette seconde phase de recherche s'est donc appuyée sur une autre matière première : la poudre de phosphocaseinate natif (PPCN), constituée essentiellement de micelles de caséines. Afin de pouvoir intégrer ce travail dans une stratégie industrielle, les expérimentations ont aussi été menées sur des systèmes plus complexes comme le lait cru de la ferme voisine. La démarche de recherche s'est aussi construite à plusieurs échelles en faisant appel à des techniques expérimentales de plus en plus fines, en commençant par l'observation visuelle pour aller jusqu'à des analyses par spectrométrie de masse. Plusieurs approches pour stabiliser les micelles de caséines étaient possibles. Ici, les travaux se sont concentrés sur une hypothèse initiale majeure : l'abaissement du point isoélectrique ( $pH_i$ ) des caséines pourrait améliorer la stabilité des micelles acidifiées face au traitement thermique UHT.

## QUESTIONS DE RECHERCHE ET STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

Quelle démarche de recherche pour s'intégrer dans une stratégie industrielle ?

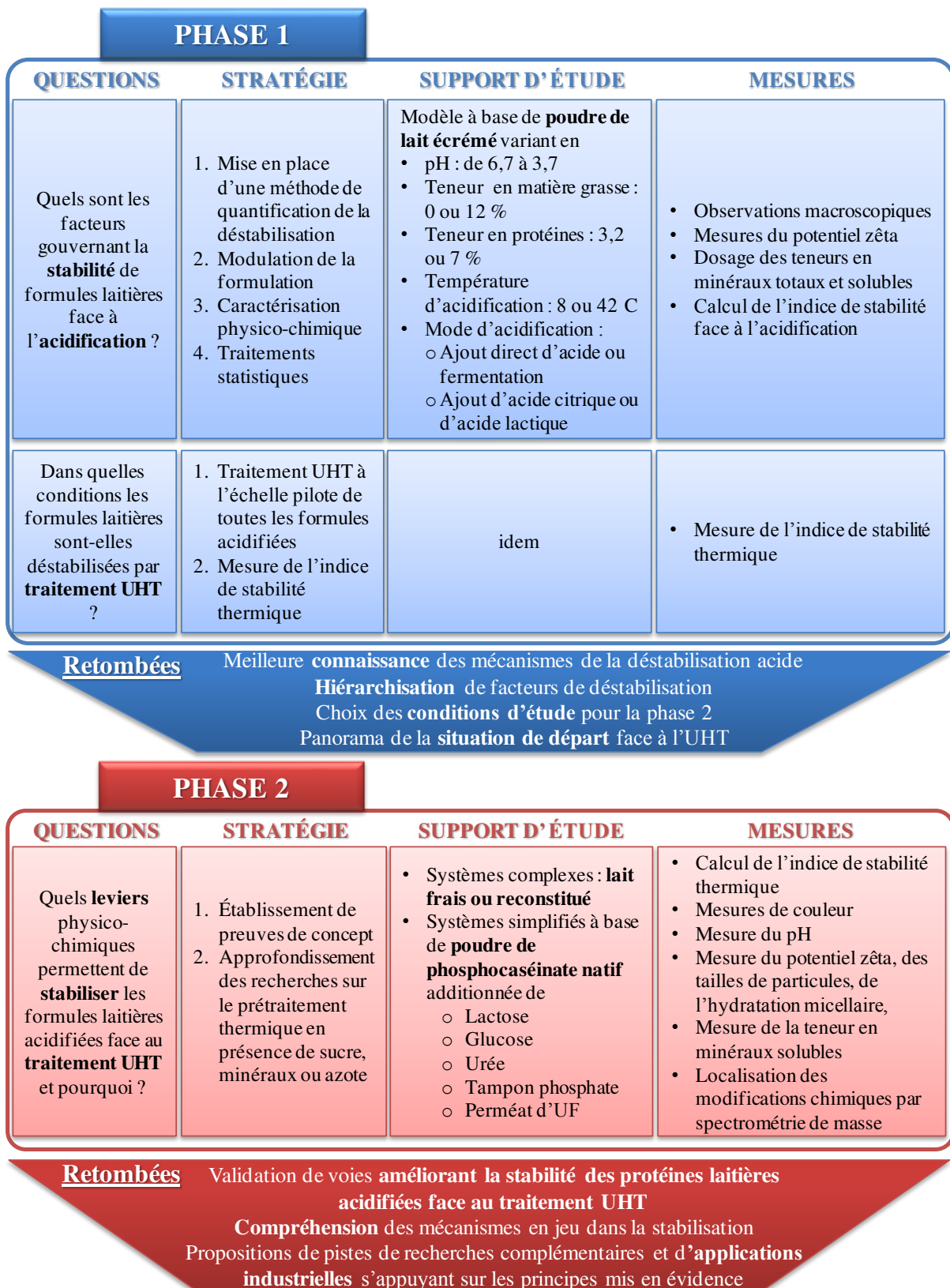


Figure 20 : Méthodologie appliquée pour répondre aux objectifs de la thèse (UHT : ultra-haute température ; UF : ultrafiltration de lait)

Afin d'exposer les résultats obtenus en appliquant la stratégie présentée ci-dessus (Figure 20), le manuscrit de thèse a été divisé en 3 chapitres :

Le chapitre 1 propose une synthèse bibliographique afin de faire l'état de l'art sur les connaissances relatives au lait et aux caséines, protéines majoritaires dans les formules étudiées. Cette synthèse s'est axée principalement sur les modifications induites par l'acidification et les traitements thermiques ainsi que sur les modifications de formulation testées dans ce projet.

Dans le deuxième chapitre, les matériels et méthodes utilisés au cours des travaux sont décrits.

Le chapitre 3 présente les résultats de la phase 1 correspondant à l'étude des effets de la diminution du pH, dans les différentes formules laitières et dans différentes conditions d'acidification. L'analyse des données est soutenue par une approche statistique. L'impact du traitement UHT sur ces mêmes formules est également présenté. Dans la seconde partie de ce chapitre, les résultats obtenus au cours de la recherche de solutions de stabilisation face aux traitements thermiques UHT (phase 2) sont exposés et discutés.

Pour parachever ce document, une conclusion générale est tirée sur l'ensemble des travaux et des perspectives de recherche et industrielles sont proposées. Les références bibliographiques, la valorisation des résultats et les formations suivies au cours du doctorat sont également indiquées en fin de manuscrit.



# CHAPITRE 2 : MATÉRIELS & MÉTHODES

## ***1. Matières premières utilisées***

### **1.1. Sources de protéines laitières**

#### ***1.1.1. Lait cru***

Pour se rapprocher de la réalité industrielle, des expérimentations ont été effectuées avec du lait cru. Issu de la traite des vaches de la ferme voisine (cheptel de 150 vaches laitières), il était écrémé à 50°C puis stocké à 4°C. Les expérimentations étaient menées le jour de la traite voire le lendemain. Les échantillons étaient stabilisés microbiologiquement par un ajout à 0,02 % d'azote de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne).

#### ***1.1.2. Poudre de lait écrémé (PLE)***

La poudre de lait écrémée utilisée était de la LEF 100 (Armor Protéines, Saint-Brice en Coglès, France). Elle était produite à partir d'un lait écrémé faiblement traité thermiquement (72°C pendant 15 secondes) puis séché par atomisation. Son index d'azote pour protéines sériques (aussi appelé Whey Protein Nitrogen Index = WPNI) de 6,3 mg de protéines sériques non dénaturées par gramme de poudre correspondait à une poudre de lait *low heat*. D'après le fournisseur, elle était composée à 36,5 % (p.p<sup>-1</sup>) de protéines avec un rapport caséines/protéines sériques de 80 / 20, 52 % de lactose, un maximum de 7,9 % de cendres et 0,8 % de matière grasse résiduelle.

L'utilisation d'une poudre permettait d'ajuster la concentration dans la formule afin d'atteindre les teneurs en protéines choisies (phase 1) et évitait toute variabilité saisonnière ou difficultés d'approvisionnement.

### 1.1.3. Poudre de phosphocaséinate natif (PPCN)

La poudre de phosphocaséinate natif a été fournie par l'UMR STLO de l'INRA de Rennes (France). Cette poudre contenant majoritairement des micelles de caséines (Tableau 10) a été choisie pour la seconde phase du travail de thèse comme modèle d'étude, afin de faciliter la compréhension des mécanismes en jeu au niveau des caséines. Elle était obtenue par microfiltration tangentielle (seuil de coupure : 0,1  $\mu\text{m}$ ) d'un lait écrémé cru (Pierre *et al.* 1992 ; Schuck *et al.* 1994). Une diafiltration avec quatre à cinq volumes d'eau permettait d'éliminer les composés de la phase soluble du lait (minéraux, protéines sériques, peptides, lactose...). La suspension micellaire était ensuite séchée par atomisation. *In fine*, cette poudre blanche contenait 85,2 % de matière protéique dont 83,8% de micelles de caséines et peu de constituants de la phase soluble (Tableau 10).

**Tableau 10 : Composition de la poudre de PPCN (données analytiques) (NS = azote soluble)**

Caractéristique	Valeur
Azote total (%)	13,4
Azote non protéique (%)	0,04
Protéine soluble (x 6,38 %)	3,68
Lactose ( $\text{g.kg}^{-1}$ )	2,35
Calcium ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	25 758
Phosphore ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	14 758
Potassium ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	860
Magnésium ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	881
Sodium ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	452
Chlorure ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	6 500
pH (à 10 %)	7,1

### 1.1.4. Caséinate de sodium

Du caséinate de sodium a également été utilisé dans cette thèse (source confidentielle). Cette poudre était riche en protéines (92 % de la poudre) et plus particulièrement en caséines

(90 % des protéines). Cet ingrédient contenait également d'autres éléments en faibles quantités (Tableau 11). Comparé au PPCN, sa teneur en lactose était inférieure (1,31 contre 2,35 g.kg<sup>-1</sup>) et la fraction minérale était considérée comme négligeable (excepté le sodium).

**Tableau 11 : Composition de la poudre de caséinate de sodium (données fournisseur) (N = azote)**

Caractéristiques	Valeur
Humidité (%)	4,97
Protéines brutes (N x 6,38) (%)	91,64
Caséines (% de protéines)	90,47
Cendres (%)	4,03
Lactose (g.kg <sup>-1</sup> )	1,31
Calcium (mg.kg <sup>-1</sup> )	665
Phosphore (mg.kg <sup>-1</sup> )	7 177
Potassium (mg.kg <sup>-1</sup> )	240
Magnésium (mg.kg <sup>-1</sup> )	38
Sodium (mg.kg <sup>-1</sup> )	15 208
Chlorures (mg.kg <sup>-1</sup> )	1 700
Acide citrique (g.kg <sup>-1</sup> )	1,94
pH (à 10 %)	7

## 1.2. Matière grasse de lait anhydre

Afin de limiter la variabilité saisonnière et les difficultés d'approvisionnement associées à l'utilisation de la crème produite par Elvir, de la matière grasse laitière anhydre standard BC TREX 32 (Corman, Goé Limbourg, Belgique) a été utilisée. Elle contenait au minimum 99,8 % de matière grasse, majoritairement des triglycérides. Sa composition était en moyenne de 65 % d'acides gras saturés, de 30 % d'acides gras mono-insaturés et de 4 % d'acides gras polyinsaturés. Son point de fusion était de 32°C. Stockée à -20°C sur le long terme, elle était découpée en cubes, conditionnée sous vide et placée en chambre froide (4°C) avant utilisation (à court ou moyen terme) afin de préserver ses qualités et de limiter les phénomènes d'oxydation.

### 1.3. Autres fractions laitières : perméat de lait et lactose

Les poudres de lactose et de perméat de lait (Tableau 12) ont été fournies par Armor Protéines (Saint Brice en Coglès, France). Elles étaient stockées en seaux de 10 L à température ambiante.

**Tableau 12 : Composition de la poudre de lactose et de la poudre de perméat de lait (données fournisseur et données analytiques) (N : azote, N.C. : non communiquée)**

Caractéristique	Lactose	Perméat
Humidité libre (%)	0,2	3 max
Propreté	A	A
Azote total (%)	0,03	0,57
Azote non protéique (%)	N.C	0,42
Azote soluble (%)	N.C.	0,52
Matière grasse (%)	N.C.	1 max
Lactose (g.kg <sup>-1</sup> )	999	761
Calcium (mg.kg <sup>-1</sup> )	600	3 175
Phosphore (mg.kg <sup>-1</sup> )	500	5 718
Potassium (mg.kg <sup>-1</sup> )	250	24 117
Magnésium (mg.kg <sup>-1</sup> )	60	1 091
Sodium (mg.kg <sup>-1</sup> )	200	6 142
Chlorure (mg.kg <sup>-1</sup> )	150	18 900
Acide citrique (g.kg <sup>-1</sup> )	N.C.	53
pH (à 10 %)	6,5	6,4

Le perméat était obtenu par ultrafiltration à partir d'un lait écrémé. L'ultrafiltrat était pasteurisé (72°C pendant 15 secondes minimum) et concentré par évaporation puis séché par atomisation. Cette poudre, dépourvue de matière grasse, contenait de l'azote sous forme non protéique essentiellement.

De même, la poudre de lactose était produite à partir d'un sérum ou perméat de protéines sériques. Le lactose isolé par cristallisation était séché sur lit fluidisé puis moulu.

## 1.4. Autres matières premières

### 1.4.1. Acides

L'acide lactique (Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne) se présentait sous forme d'une solution à 85 % d'acide lactique, soit une molarité de  $11,3 \text{ mol.L}^{-1}$ . L'acide citrique monohydraté était fourni sous forme de poudre (Jungbunlauer, Bazel, Suisse). Une solution à  $3,5 \text{ mol.L}^{-1}$  était préparée dans de l'eau déionisée et était conservée 6 mois à température ambiante.

La concentration choisie pour l'acide citrique permettait une dissolution totale de l'acide monohydraté et entraînait une diminution de pH du même ordre de grandeur que celle obtenue avec l'acide lactique à 85 % pour un même volume versé. Ainsi, l'effet dilution lié au type d'acide pouvait être négligé.

L'acide lactique a été choisi car c'est le principal acide produit par les bactéries lactiques. Son  $pK_a$  est de 3,86. L'acide citrique, quant à lui, présente trois  $pK_a$  : 3,1, 4,8 et 6,4 (dans l'eau) avec un fort pouvoir chélatant du calcium (*Chapitre 1 – paragraphe 3.4. Impact de l'ajout d'acide citrique*). De plus, cet acide est couramment utilisé dans la fabrication de mozzarella.

### 1.4.2. Ferments

Des bactéries lactiques ont également été utilisées pour réaliser des acidifications. Le mix F-DVS YF-202 Yo-Flex® (Chr. Hansen, Horsholm, Danemark) permettait d'atteindre un pH de 3,8 dans un lait écrémé avec une acidification relativement rapide (environ cinq heures à  $42^\circ\text{C}$  pour atteindre un pH de 4,6 par exemple). Ce mélange de ferments *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* est utilisé pour la production de yaourts texturés et d'intensité aromatique moyenne. Il produit une faible quantité d'exopolysaccharides. Ce granulats congelé était conservé au congélateur à  $-40^\circ\text{C}$  voire  $-80^\circ\text{C}$  pour le stockage longue durée.

### 1.4.3. Base

De l'hydroxyde de sodium  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  (Merck, Darmstadt, Allemagne) était utilisé pour alcaliniser les formules laitières. Il était stocké à température ambiante.

### 1.4.4. Tampon phosphate $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ pH 7,5 à $50^\circ\text{C}$

Le tampon phosphate  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  utilisé dans les recherches sur le prétraitement thermique était réalisé à partir de deux poudres stockées à température ambiante et réhydratées à  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans de l'eau ultra-pure : disodium hydrogénophosphate dihydraté et sodium dihydrogénophosphate monohydraté (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les proportions du mélange des deux solutions étaient ajustées pour obtenir un pH de 7,5 à  $50^\circ\text{C}$ .

### 1.4.5. Meritose 200<sup>®</sup>

Le Meritose 200<sup>®</sup> (D-glucose fourni par Tereos Syral, Aalst, Belgique sous forme d'une poudre blanche) était stocké à température ambiante. Ce dextrose monohydraté était produit par une hydrolyse enzymatique de l'amidon, suivie de traitements de purification, concentration, cristallisation et séchage. Ses caractéristiques, communiquées dans la fiche technique, étaient les suivantes (Tableau 13) :

Tableau 13 : Composition de la poudre Meritose 200<sup>®</sup> (données fournisseur) (MS = matière sèche)

Caractéristique	Valeur
Humidité (%)	8,7
Dextrose sur MS (%)	> 99,5
Chlorure ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	< 20
Sodium ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	< 50
pH	$3 < \text{pH} < 6$

### 1.4.6. Urée

L'urée (VWR Chemicals, Leuven, Belgique) était conservée sous forme d'une poudre blanche, à température ambiante et en bidon.

## 2. Préparation des formules

Les formules ont toujours été préparées de la même manière. La Figure 21 schématise le protocole suivi pour les travaux sur l'acidification (phase 1). Des variations y ont été apportées dans la deuxième phase de la thèse (portant sur la recherche de voies possibles de stabilisation des protéines lactières acidifiées face au traitement thermique UHT). Un exemple en est également donné avec la Figure 22 ci-contre.

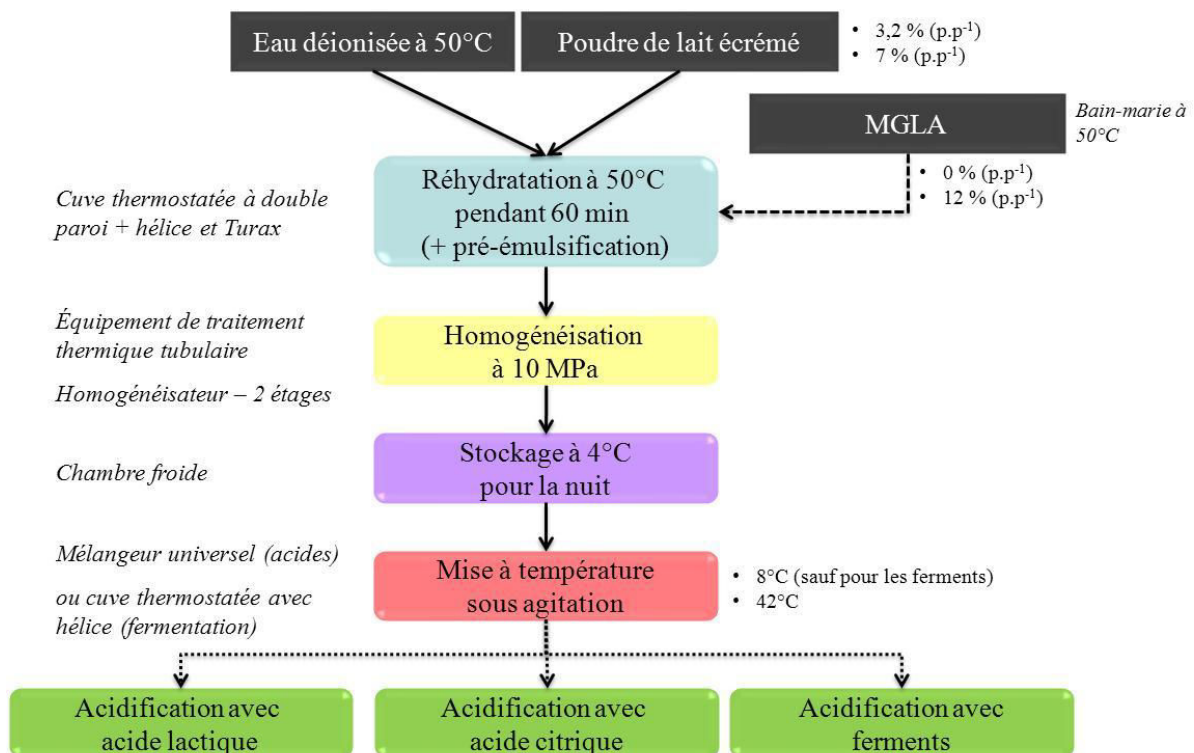


Figure 21 : Protocole d'acidification suivi pour la phase 1





## 2.1. Composition des formules étudiées

### 2.1.1. Formules étudiées dans la phase 1

Quatre formulations différentes ont été étudiées face à l'acidification à 8 ou 42°C avec ajout d'acide citrique ou d'acide lactique ou par fermentation lactique dans la phase 1 de la thèse (Figure 20, Tableau 14).

**Tableau 14 : Teneurs des ingrédients utilisés dans la phase 1 pour chacune des formules acidifiées étudiées (MG = matière grasse, MGLA 32 → source de matière grasse, LEF 100 → source de protéines)**

Nom de la formule	Teneur en MGLA 32 (g.kg <sup>-1</sup> )	Teneur en LEF 100 (g.kg <sup>-1</sup> )	Teneur en eau déionisée (g.kg <sup>-1</sup> )
0 % de MG et 3,2 % de protéines	0	88	912
0 % de MG et 7 % de protéines	0	192	808
12 % de MG et 3,2 % de protéines	120	88	762
12 % de MG et 7 % de protéines	120	192	658

2.1.2. Formules étudiées dans la phase 2

Afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu dans la stabilisation face au traitement thermique UHT, plusieurs formules ont été étudiées dans la phase 2 (Tableau 15).

Tableau 15 : Teneurs des ingrédients utilisés dans la phase 2 pour chacune des formules étudiées (PPCN = phosphocasinat natif, PLE = poudre de lait écrémé,  $\emptyset$  = aucun)

Nom de la formule	Source de protéines et concentration (g.kg <sup>-1</sup> )	Ingrédient complémentaire et concentration (g.kg <sup>-1</sup> )	Solution de dispersion à 50°C
PPCN	PPCN : 25	$\emptyset$	Eau ultra-pure
PPCN*2	PPCN : 50	$\emptyset$	Eau ultra-pure
PPCN + lactose	PPCN : 25	Lactose : 50	Eau ultra-pure
PPCN + lactose*2	PPCN : 25	Lactose : 100	Eau ultra-pure
PPCN + lactose*3	PPCN : 25	Lactose : 150	Eau ultra-pure
PPCN + glucose	PPCN : 25	Glucose : 50	Eau ultra-pure
PPCN + perméat	PPCN : 25	Perméat : 65	Eau ultra-pure
PPCN + perméat*2	PPCN : 25	Perméat : 130	Eau ultra-pure
PPCN + perméat*3	PPCN : 25	Perméat : 195	Eau ultra-pure
PPCN + urée	PPCN : 25	Urée : 260.10 <sup>-3</sup>	Eau ultra-pure
PPCN + tampon PO <sub>4</sub>	PPCN : 25	$\emptyset$	Tampon phosphate 10 mmol.L <sup>-1</sup> pH 7,5
Caséinate	Caséinate : 25	$\emptyset$	Eau ultra-pure
Caséinate + lactose	Caséinate : 25	Lactose : 50	Eau ultra-pure
Lait reconstitué	PLE : 88	$\emptyset$	Eau déionisée
Lait frais écrémé	Lait	$\emptyset$	$\emptyset$

Les justifications des choix majeurs sont les suivantes :

2.1.2.1. Choix du système modèle

La poudre de phosphocasinat natif a été privilégiée à d'autres sources de protéines afin de faciliter la compréhension des mécanismes en jeu. En effet, pour rappel, cette matière

.....

première ne contient quasiment que des micelles de caséines natives, « lavées » des composants de la phase soluble du lait (*Chapitre 2 – paragraphe 1.1.3. Poudre de phosphocaseinate natif (PPCN)*). Sauf mention contraire, la concentration utilisée était celle d'un lait, à savoir  $25 \text{ g.L}^{-1}$ .

#### 2.1.2.2. Choix de la concentration de référence en lactose

La teneur molaire en lysine dans un lait natif a été estimée à environ  $1,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ , en sachant que la masse molaire moyenne des acides aminés composant les caséines est de  $115 \text{ g.mol}^{-1}$ .

La teneur en lactose dans un lait est approximativement de  $1,4 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ , soit environ dix fois supérieure à la teneur en lysine des caséines. Par conséquent, il ne semblait pas nécessaire d'enrichir le lait en lactose *a priori* - même si une réaction d'isomérisation pouvait être en compétition avec la lactosylation (voie L.A.) (*Chapitre 1 – paragraphe 3.2.2. La dégradation du lactose par la voie de Lobrey de Bruyn-Aberda van Ekenstein (voie L.A.)*).

#### 2.1.2.3. Choix de la concentration de référence en perméat

La formule à base de PPCN avec ajout de perméat d'ultrafiltration de lait permettait

- de se rapprocher de la complexité d'un lait écrémé en mimant
  - sa concentration en lactose et
  - l'environnement minéral des micelles de caséines (concentration de 65 g de perméat par kg de formule)
- de la simplifier par l'absence des protéines sériques.

#### 2.1.2.4. Choix du pH initial de référence

La lactosylation correspond à l'attaque nucléophile du groupe CO des glucides par le groupe  $\text{NH}_2$  des acides aminés tels que la lysine. L'état d'ionisation de ces groupes était donc important et la réaction était favorisée à pH légèrement alcalin. Une cible de pH 7,5 à  $50^\circ\text{C}$  a été fixée. Cette valeur était proche des pH choisis dans la littérature scientifique (tampon à pH 7,4 pour Darewicz & Dziuba (2001), pH 8 pour Chen *et al.* (2013 et 2014) par exemple).

## 2.2. Réhydratation des poudres ou écrémage du lait frais

### 2.2.1. Réhydratation des poudres

Les poudres de protéines (PLE, PPCN ou caséinate) étaient dispersées dans de l'eau chauffée à 50°C dans une cuve thermostatée à double paroi. La qualité de l'eau dépendait de l'expérimentation : eau traitée par osmose inverse ou déionisée pour la poudre de lait écrémé, eau ultra-pure ou milliQ pour le PPCN et le caséinate (Tableau 15).

En cas de formulation plus complexe (nécessitant l'ajout de sucre, perméat ou urée), les poudres complémentaires étaient dispersées 10 minutes avant l'ajout de la poudre de protéines afin d'en faciliter la réhydratation.

Le mélange était placé sous agitation hélicoïdale (renforcée par l'action d'un ultraturax) pendant une heure (vitesse adaptée selon la viscosité de la formule afin de former un vortex).

### 2.2.2. Méthodes d'écrémage

Le lait frais récupéré à la ferme était écrémé selon deux méthodes selon les volumes nécessaires :

- Échelle laboratoire (pour des volumes de 2 à 10 L) : centrifugation à 30°C pendant 30 minutes à 3 000 g (centrifugeuse Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter, Villepinte, France), puis élimination de la crème en surface à l'aide d'une spatule en inox
- Échelle pilote (pour des volumes de 10 à 50 L) : utilisation d'une écrémeuse Elecrem 3 (Elecrem, Fresnes, France) à 50°C (débit de 315 L.h<sup>-1</sup>).

Pour certaines analyses après acidification, les échantillons devaient être écrémés également. La technique était similaire : centrifugation à 30°C, 3 000 g pendant 20 minutes (centrifugeuse 3K12, Sigma, Osterode am Harz, Allemagne) puis stockage 15 minutes au congélateur pour solidifier la couche de matière grasse et faciliter sa séparation.

### 2.3. Émulsification de la matière grasse

Dans le cas d'une formule enrichie en matière grasse, la MGLA 32 était mise à fondre en bain-marie à 50°C puis ajoutée au mélange poudres et eau, toujours sous agitation. L'utilisation de l'ultra-turax à 8 000 rpm pendant 15 minutes après l'ajout de la matière grasse permettait de produire une « pré-émulsion » avant l'homogénéisation proprement dite.

### 2.4. Homogénéisation

Le mélange passait dans un pilote de traitement thermique (Armfield Ltd, Hampshire, Royaume Uni) relié à un homogénéisateur Niro Soavi Panda (GEA, Parme, Italie – Figure 23) à 50°C. Afin de stabiliser l'émulsion contre le crémage, les deux étages de l'homogénéisateur étaient utilisés, à 10 et 3 MPa. Cette étape d'homogénéisation permettait également de garantir une meilleure réhydratation des poudres.

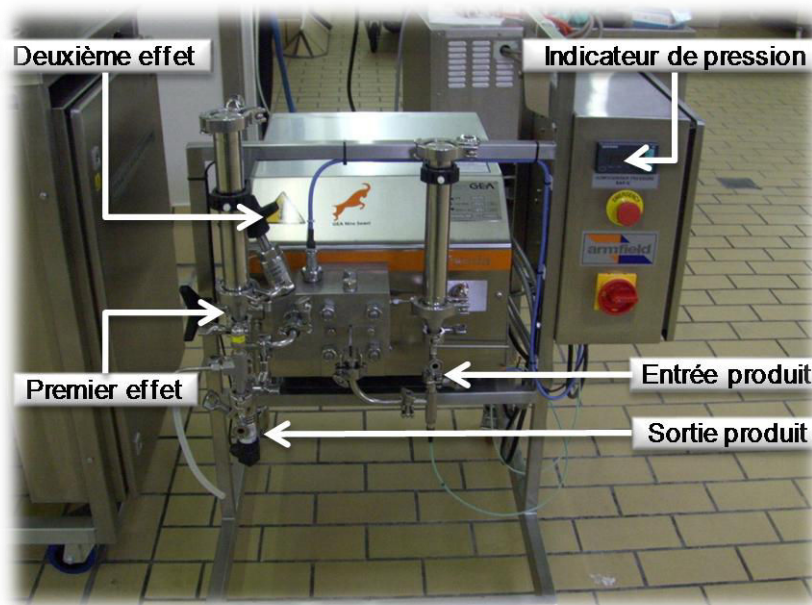


Figure 23 : Photographie de l'homogénéisateur Niro Soavi Panda

Cette étape a été effectuée quelle que soit la formule étudiée (c'est-à-dire même sur un lait frais ou une formule sans matière grasse). La température d'homogénéisation pouvait en revanche être adaptée dans le cadre des recherches sur les voies de stabilisation thermique (phase 2).

## 2.5. Prétraitement de stabilisation

Dans le cadre de l'étude du prétraitement de stabilisation thermique (phase 2), après réhydratation des poudres et avant homogénéisation de la formule, une solution de NaOH à 1 mol.L<sup>-1</sup> était ajoutée pour obtenir un pH de 7,5 à 50°C (sauf mention contraire). En sortie d'homogénéisateur, la suspension chauffée à 90°C était conditionnée dans des flacons en verre. Ces derniers étaient ensuite hermétiquement fermés et placés dans une enceinte climatique Vötsch VC3 0034 (Weiss Technik, Liedekerke, Belgique) à 90°C.

Dans la littérature scientifique, les couples temps - températures testés pour étudier la réaction de glycation sont variés : de 70°C à 150°C pendant 10 minutes à 6 heures (Akillioğlu & Gökmen 2014) ou à 37°C pendant 15 jours (Jindal & Naeem 2013) par exemple. Une température élevée a l'avantage de protéger contre d'éventuelles proliférations bactériennes. Et même si d'un point de vue énergétique un prétraitement à 90°C semble coûteux, selon la fonctionnalité apportée, il peut se révéler réaliste industriellement. Enfin, l'étude portant essentiellement sur les caséines, travailler à une température élevée pour potentiellement accélérer les processus était préférable (et la dénaturation des protéines sériques négligeable, en particulier pour des systèmes majoritairement micellaires).

D'après Bhatt *et al.* (2014), le degré de lactosylation augmente linéairement avec la durée de chauffage. Pour Akillioğlu & Gökmen (2014), le taux de lactosylation n'augmente pas de manière linéaire avec la température. Pour ces auteurs, il augmentait graduellement entre 70 et 130°C, puis peu de différences étaient observables entre 130 et 150°C. De plus, un traitement thermique long (supérieur à plusieurs heures) entraînerait beaucoup de réactions collatérales, compliquant l'interprétation des analyses (Hodge 1953 ; Chen *et al.* 2015). La coloration des échantillons liée aux réactions de Maillard était également à proscrire. Un prétraitement à haute température pendant un temps court était donc préférable. Ainsi, un compromis a dû être trouvé et la durée de chauffage à 90°C a été fixée à 60 minutes pour le protocole de référence.

## 2.6. Stockage

Lors de la première phase de la thèse, après homogénéisation, le batch était divisé en seaux de 3 kg et stocké à 4°C pour la nuit. Dans le cadre de la seconde partie des recherches

(phase 2, portant sur les voies de stabilisation thermique), les flacons étaient maintenus à 90°C afin de procéder au prétraitement de stabilisation puis refroidis sous l'eau courante et stockés en chambre froide à 4°C pour la nuit. Une partie de la suspension (échantillons témoin) était placée en chambre froide juste après l'étape d'homogénéisation.

## 2.7. Acidification

Le lendemain, dans le cas d'un ajout direct d'acide, l'abaissement de pH était réalisé dans un cutter Stephan (Stephan, Lognes, France) conçu pour mélanger, mixer et traiter thermiquement des denrées alimentaires (Figure 24). Après stabilisation thermique de la formule sous agitation (à 8 ou 42°C), l'acide était ajouté et mélangé manuellement. Le pH était vérifié après une durée de stabilisation de 10 minutes sous agitation (moteur et bras racleur à respectivement 20 et 50 % de leur puissance).

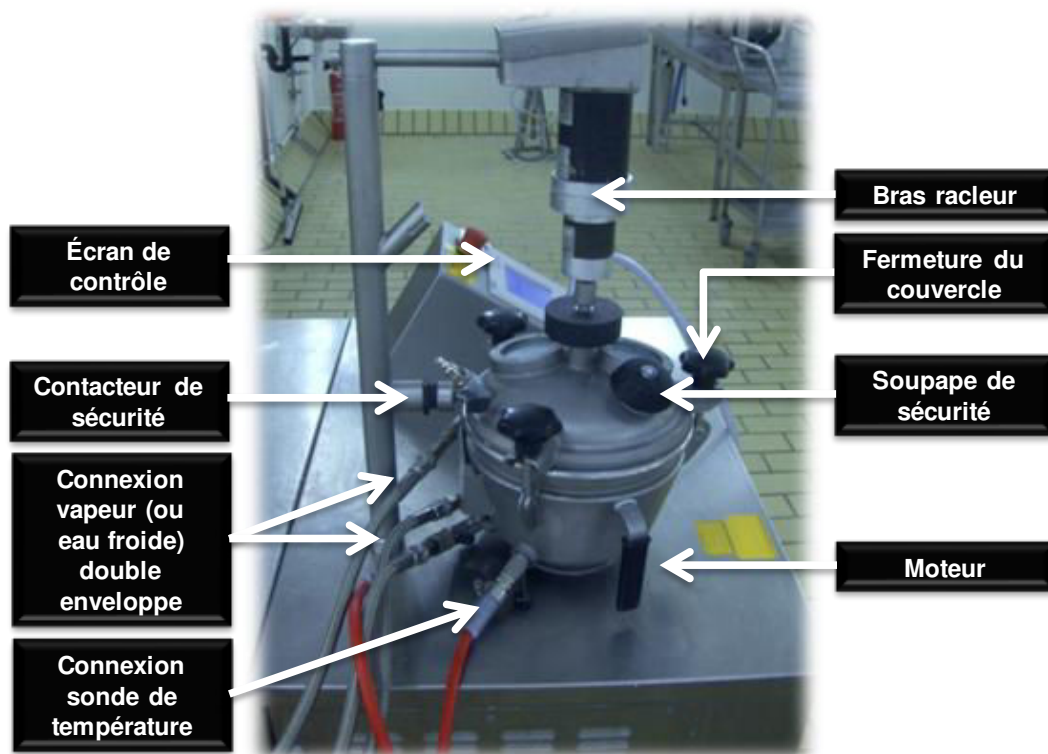


Figure 24 : Photographie du cutter Stephan utilisé pour mélanger la formule lors de l'étape d'acidification à 8 ou 42°C

La fermentation était réalisée à 42°C dans une cuve thermostatée à double parois et surmontée d'un couvercle pour limiter l'évaporation. Le ferment était préalablement

.....

décongelé dans une solution mère de lait G stérile (Standa, Caen, France) à hauteur de 2 % (p.p<sup>-1</sup>) puis inoculé à 0,02 % (p.p<sup>-1</sup>) dans la formule à acidifier. Une fois le pH cible atteint, les ferments étaient inactivés par ajout d'azoture de sodium (Sigma-Aldrich, États-Unis) à 0,09 %.

Les conditions d'acidification testées ont été choisies pour se rapprocher de procédés fromagers comme la production de mozzarella à 8°C et les fermentations thermophiles à 42°C.

Dans le cadre de la phase 2 portant sur la stabilisation des protéines acidifiées face au traitement thermique UHT, l'acidification se faisait exclusivement avec de l'acide lactique. En cas d'essai à l'échelle pilote, l'acide était ajouté à 42°C de la même manière que pour la phase 1 de la thèse. En revanche, pour les tests à l'échelle laboratoire, l'acide était ajouté à température ambiante dans des flacons soumis à une agitation par barreau aimanté.

### **2.8. Traitement thermique**

Les formules acidifiées pouvaient ensuite être traitées à ultra-haute température (UHT). Pour la phase 1, ce traitement se faisait en continu dans un échangeur tubulaire, par chauffage indirect à la vapeur (Armfield Ltd, Hampshire, Royaume-Uni). Le pilote de traitement thermique (Figure 25) se divisait en quatre sections :

1. Une cuve de lancement de 5 L
2. Une section tubulaire de préchauffage d'un volume de 210 mL
3. Une section tubulaire de chambrage
4. Une section tubulaire de refroidissement de 210 mL



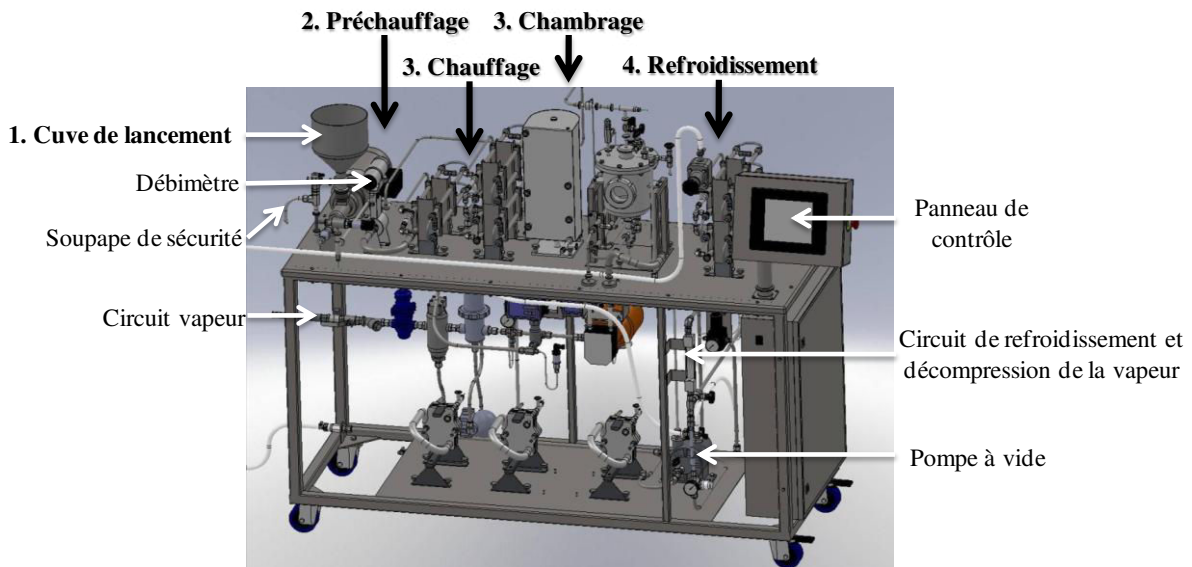


Figure 25 : Schéma représentant l'échangeur pilote de traitement thermique (fournisseur)

Le barème temps-température fixé pour la première phase des travaux était de 120°C pendant 12 secondes. Après ce traitement, les échantillons étaient stockés en chambre froide à 4°C jusqu'à analyse.

Lors de la seconde phase, l'impact du prétraitement à 90°C sur l'indice de stabilité thermique des micelles de caséines acidifiées dans un lait était testé avec un barème de 130°C pendant 10 secondes. Ce traitement a été augmenté (par rapport à la phase 1) car plus fiable d'un point de vue équipement et plus drastique d'un point de vue de l'objectif. Les échantillons étaient ensuite stockés en chambre froide à 4°C jusqu'à analyse.

Les essais sur les formules à base de PPCN ou lors de la recherche de preuves de concept étaient effectués à l'échelle laboratoire, en bain d'huile à 140°C pendant 5 minutes dans des tubes en verre pyrex de 15 mm de diamètre. Après ce traitement UHT, les tubes étaient refroidis dans la glace, puis leur contenu était stocké à 4°C jusqu'à analyse.

Les indices de stabilité calculés à partir des tests en bain d'huile étaient à considérer avec précaution. En effet, en raison d'une cinétique de montée en température plus lente dans ce cas, ce type de traitement thermique était plus drastique qu'un traitement avec un échangeur tubulaire pilote. Cette différence était difficilement quantifiable car il n'a pas été possible de mesurer la température au sein des tubes plongés dans le bain d'huile. De plus,

d'après Sweetsur & White (1975), le gaz contenu dans l'espace de tête d'un tube lors d'un traitement thermique pourrait avoir un effet sur la diminution de pH thermo-induite. Dans leur étude, la chute était d'autant plus rapide que la teneur en dioxygène était importante. La coagulation thermique intervenait aussi plus rapidement. Dans un traitement à l'échelle pilote (ou industrielle), le fluide circule sans contact avec l'air. Le traitement thermique de l'Armfield était donc moins « déstabilisant » qu'un chauffage en bain d'huile.

### 3. Méthodes d'analyses physico-chimiques

La Figure 26 présente les différentes analyses physico-chimiques réalisées lors de la première phase des travaux.

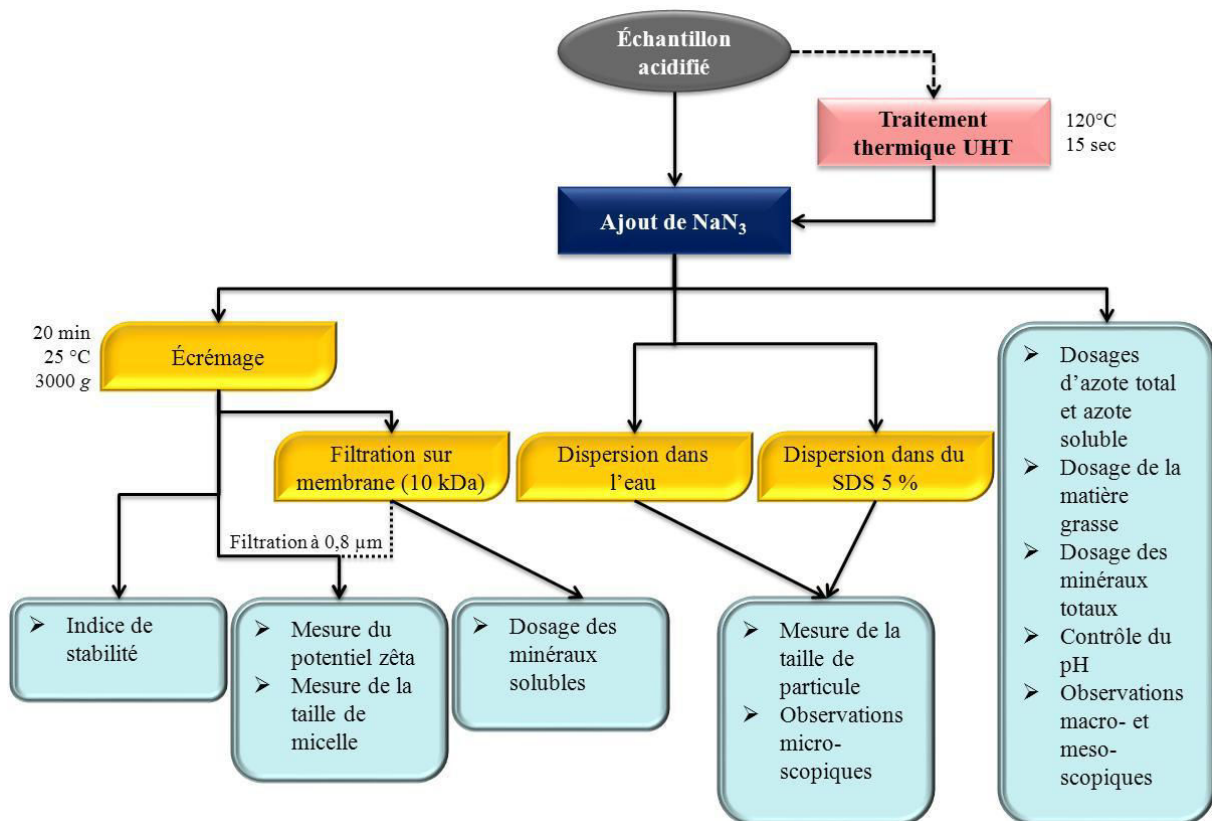
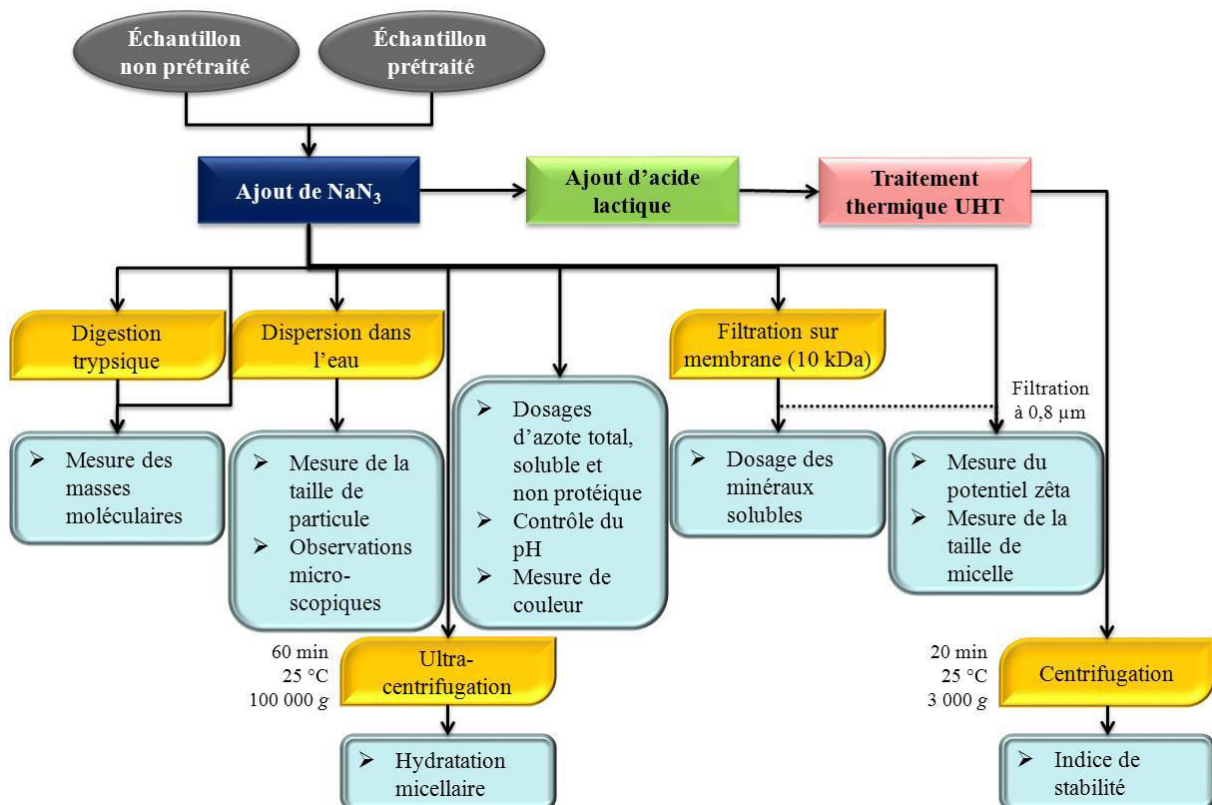


Figure 26 : Programme général des analyses physico-chimiques réalisées lors de la phase 1 (Chapitre 3 – paragraphe 1. Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT) (SDS = dodécylsulfate de sodium)

Alors que la première phase expérimentale s'est exclusivement déroulée à Soredab, la phase de recherche des voies de stabilisation thermique a fait l'objet de nombreuses analyses au sein de l'INRA-STLO. Les techniques employées n'étaient pas exactement les mêmes dans les deux laboratoires mais le principe de mesure restait identique. La deuxième phase de la thèse, plus exploratoire, ne nécessitait pas le suivi systématique d'un plan d'analyse. À titre d'exemple, le programme d'analyses observé lors de l'étude de la lactosylation *sensu stricto* est exposé dans la Figure 27.



**Figure 27 : Programme général des analyses physico-chimiques réalisées lors de la phase 2 (Chapitre 3 – paragraphe 2. Phase 2 : Étude de différentes voies de stabilisation des protéines lactières acidifiées face au traitement thermique ultra-haute température)**

L'objectif était de valider l'effet positif de la lactosylation sur la stabilité thermique des micelles de caséines acidifiées et de mieux comprendre les mécanismes en jeu lors du traitement de stabilisation. Par conséquent, à part l'indice de stabilité thermique calculé après traitement UHT, l'ensemble des analyses était réalisé avant acidification (Figure 27). Outre la modification du  $pH_i$  (but visé), le prétraitement à 90°C pouvait s'accompagner de réactions

parallèles qui ont donc été recherchées. L'ensemble des mesures réalisées a permis de caractériser le système avec différentes approches et à plusieurs échelles.

### 3.1. Mesure du pH

Le suivi du pH lors des acidifications à 8°C ou 42 °C et la mesure du pH final de chaque échantillon à 25°C étaient effectués avec un pH-mètre FE 20 Five Easy™ (Mettler Toledo, Saint Herblain, France). Le pH-mètre était étalonné quotidiennement, à la température de l'échantillon et avec deux tampons (pH 4 et pH 7). La mesure du pH final était effectuée après un stockage des échantillons acidifiés d'au moins une nuit à 4°C et ceux-ci étaient réchauffés à 40°C puis stabilisés à 25°C au moins 30 minutes avant la mesure finale.

### 3.2. Mesure de couleur

Le spectrophotomètre CM-700d/600d (Konica Minolta, Tokyo, Japon) était utilisé en mode SCI (Composante Spéculaire Incluse). Cette mesure permettait d'évaluer la couleur globale, elle était indépendante de l'état de la surface du produit. Un masque de référence (= zone d'illumination) adapté à la mesure d'un liquide était ajouté sur l'appareil. La zone de mesure spécifique correspondante avait un diamètre de 8 mm. L'appareil était ensuite positionné afin de procéder à trois mesures consécutives. La mesure était effectuée le lendemain du prétraitement thermique.

Les valeurs obtenues étaient traduites dans l'espace couleur  $L^*a^*b$  (Figure 28). Le  $L^*$  indique la clarté. Le  $b^*$  définit la place de l'échantillon sur l'axe bleu-jaune et est couramment utilisé comme mesure du brunissement non enzymatique (Nasipour *et al.* 2006). Le  $a^*$  correspond à la coordonnée de chromaticité rouge-verte.

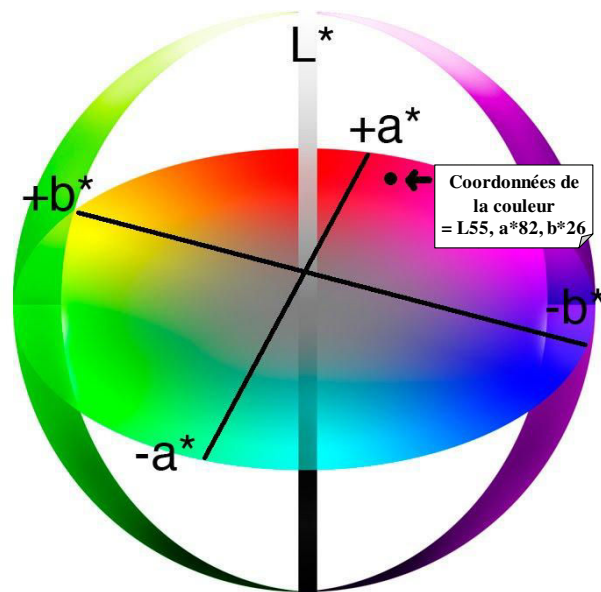


Figure 28 : Caractérisation de la couleur avec le système L\*a\*b\*

### 3.3. Photographies et observations microscopiques et binoculaires

Les photographies à l'échelle mésoscopique ont été prises avec une caméra Olympus DP26-CU branchée sur une loupe binoculaire Olympus de type SZH10 (Rungis, France). Les échantillons étaient versés dans une boîte de Pétri placée sur une surface noire et éclairée par une source de lumière indépendante.

Les photographies à l'échelle microscopique ont été prises avec la même caméra Olympus fixée sur un microscope Olympus de type BHT (Rungis, France). Une goutte d'échantillon était déposée entre lame et lamelle après dilution dans de l'eau déionisée.

L'acquisition et le traitement des images se faisaient *via* la caméra Olympus DP26-CU et le logiciel CellSens (Olympus, Rungis, France), deux jours après l'acidification dans le cadre de la phase 1 de cette thèse.

### 3.4. Mesures des teneurs en azote total, en azote soluble à pH 4,6 et en azote non protéique. Calcul de l'indice de stabilité

Quelques différences existaient entre les laboratoires de Soredab et de l'INRA pour les analyses d'azote. En particulier, alors que la première phase de la thèse s'est appuyée sur la méthode de Dumas, pour la phase de recherche sur les voies de stabilisation thermique, tous les dosages d'azote (total, soluble à pH 4,6 et non protéique) ont été faits suivant la méthode de Kjeldhal. Le principe de cette méthode est exposé dans le paragraphe portant sur le dosage de l'azote non protéique. Pour l'azote total et l'azote soluble à pH 4,6, seule la préparation des échantillons différait.

#### 3.4.1. Dosage de l'azote total et calcul de l'indice de stabilité

L'azote total des échantillons était dosé par la méthode Dumas (1831) avec un analyseur d'azote TruMac N Leco (Leco France, Garges-Les-Gonesse, France). Cette méthode consistait à brûler l'échantillon (environ 0,5 g) sur un cycle de quelques minutes dans un four à haute température (1 200°C) en présence d'oxygène. Les produits de combustion ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_x$ ) étaient entraînés par un gaz vecteur et traversaient différents filtres qui ne laissaient passer que les oxydes d'azote. Ces derniers étaient réduits en azote moléculaire puis analysés par un détecteur de conductivité thermique. Le signal obtenu, correspondant à une différence de potentiel entre le gaz vecteur seul et le gaz vecteur contenant le diazote, permettait de calculer la teneur en azote de la prise d'essai. Les analyses étaient réalisées en double pour chaque échantillon. Pour estimer la concentration en protéines, la teneur en azote était multipliée par un facteur de 6,38 (facteur de Jones, Codex Alimentarius)

Un test pour quantifier la déstabilisation des protéines laitières acidifiées a été développé dans le cadre des travaux rapportés dans ce manuscrit : l'indice de stabilité. Il se définit par le pourcentage de conservation de l'azote dans le surnageant après centrifugation (centrifugeuse 3K12, Sigma, Osterode am Harz, Allemagne) à 3 000 g pendant 20 minutes à 25°C de l'échantillon acidifié. Il est calculé par rapport à la teneur en azote dans le surnageant de l'échantillon contrôle (= non acidifié) soumis aux mêmes traitements (Figure 29).

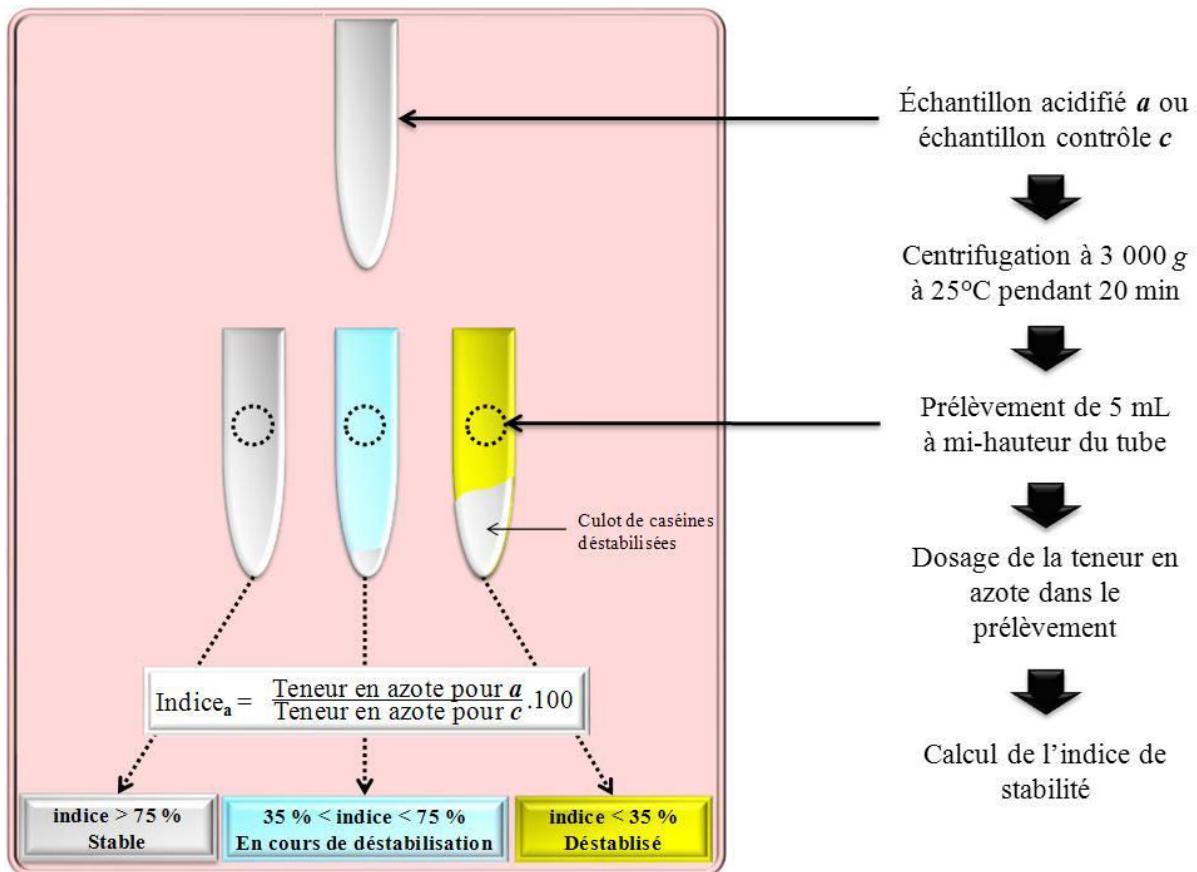


Figure 29 : Protocole de détermination de l'indice de stabilité

Trois classes de stabilité ont été définies empiriquement pour ce test :

1. les échantillons *stables* avec un indice compris entre 100 et 75 %
2. les échantillons *en cours de déstabilisation* avec un indice compris entre 75 et 35 %
3. les échantillons *déstabilisés* avec un indice inférieur à 35 %

### 3.4.2. Dosage de l'azote soluble à pH 4,6

La fraction d'azote soluble contenue dans les échantillons était obtenue par précipitation des caséines à pH 4,6 et filtration. Le fractionnement de chaque échantillon était doublé et dosé afin de contrôler la répétabilité de l'analyse.

La méthode décrite dans la norme internationale ISO 17 997-1 :2004E/IDF 29-1 :2004(E), consistait à diluer l'échantillon au quart avec de l'eau déminéralisée à 40°C et à ajuster le pH à 4,6 avec de l'acide acétique à 1,75 mol.L<sup>-1</sup> (ou de l'acétate de sodium à 1 mol.L<sup>-1</sup> si le pH était inférieur à 4,6). Après 15 minutes dans un bain-marie à 40°C, les échantillons étaient filtrés sur du papier filtre de cellulose Whatman 1 de taille de pores 11 µm (Whatman, Velizy-Villacoublay, France). Le précipité contenait les caséines et les protéines sériques dénaturées et agrégées. L'azote contenu dans le filtrat obtenu était dosé selon la méthode de Dumas décrite dans le paragraphe précédent (aliquot dosé de 2 g). La teneur en azote soluble était calculée selon la formule suivante :

$$NS = \frac{NS_L \cdot m_L \cdot (m_M - m_E)}{V \cdot m_E}$$

où

- $NS$  correspond à la quantité d'azote soluble à pH 4,6 (% g.g<sup>-1</sup>),
- $NS_L$  représente la quantité d'azote soluble mesurée dans la prise d'essai (% g.g<sup>-1</sup>),
- $m_L$  est la masse de la prise d'essai (g),
- $m_M$  est la masse du mélange eau / échantillon acidifié / acide acétique (ou acétate de sodium) (g),
- $m_E$  est la masse de la prise d'essai de l'émulsion (g),
- $V$  est le volume de la prise d'essai (mL).

### 3.4.3. Dosage de l'azote non protéique

Les échantillons peuvent contenir des quantités non négligeables d'azote non protéique (urée, fragments peptidiques, acides aminés, *etc.*). Ce dernier était dosé par la méthode de Kjeldhal (1883) après avoir été isolé de la fraction protéique. Le fractionnement de chaque échantillon était doublé et dosé.

La méthode consistait à précipiter la totalité des protéines à l'acide trichloroacétique 60 % après dilution (au 1/5<sup>ème</sup> environ) de l'échantillon avec de l'eau déminéralisée. Après 30 minutes de décantation, elles étaient séparées de la fraction non protéique par filtration sur



papier filtre GF/A (papier en microfibre de verre : *Glass Free of Ashes*), de diamètre de pores 1,6 µm (Whatman, Velizy-Villacoublay, France).

Le dosage selon la méthode de Kjeldhal se déroulait en trois étapes : minéralisation, distillation et dosage acide - base de l'azote. Lors de la minéralisation (rampe de minéralisation K-437, Buchi, Rungis, France), l'azote organique était transformé en ammonium. Puis, lors de la distillation dans une unité de distillation KjelSampler K-376 (Buchi, Rungis, France), le minéralisât était alcalinisé par l'ajout de soude en excès afin de transformer l'ammonium en sa forme volatile. L'ammonium était entraîné par la vapeur d'eau lors de la distillation. Les vapeurs étaient condensées au contact d'un réfrigérant et recueillies dans une solution d'acide borique (40 g.L<sup>-1</sup>) à pH 4,3. Pour finir, la teneur en azote était déterminée par dosage acide - base de la quantité d'ammoniac *via* l'ajout d'acide chlorhydrique 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. La quantité d'azote non protéique contenue dans les échantillons était calculée à l'aide de la formule suivante :

$$NPN = \frac{M_N \cdot V_f \cdot (V_{blc} - V) \cdot [HCl]}{V_{pm} \cdot m_{pe}}$$

où

- *NPN* correspond à la quantité d'azote non protéique (% g.g<sup>-1</sup>),
- *M<sub>N</sub>* est la masse molaire de l'azote (14 g.mol<sup>-1</sup>),
- *V<sub>f</sub>* est le volume de la fiole (50 mL),
- *V<sub>blc</sub>* est le volume d'HCl versé dans le blanc (L),
- *V* est le volume d'HCl versé dans l'échantillon (L),
- [*HCl*] est la concentration en acide chlorhydrique (0,1 mol.L<sup>-1</sup>),
- *V<sub>pm</sub>* est le volume de la prise d'essai (25 mL),
- *M<sub>pe</sub>* est la masse de la prise d'essai (g).

### 3.5. Mesures des teneurs en minéraux totaux ou solubles

Pour mesurer les concentrations en minéraux dans la phase soluble, chaque échantillon était ultrafiltré à l'aide d'une centrifugation à 1 000 g, à 30 °C pendant environ deux heures

(centrifugeuse 3K12, Sigma, Osterode am Harz, Allemagne) sur un filtre vivaspin 20 ou vivacell 70 (Stedim biotech, Aubagne, France) dont le seuil de coupure était de  $10 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Figure 30), au moins deux heures après acidification et stabilisation thermique à  $25^\circ\text{C}$ . Les méthodes de dosage des minéraux utilisées dans les laboratoires INRA et Soredab étaient différentes.

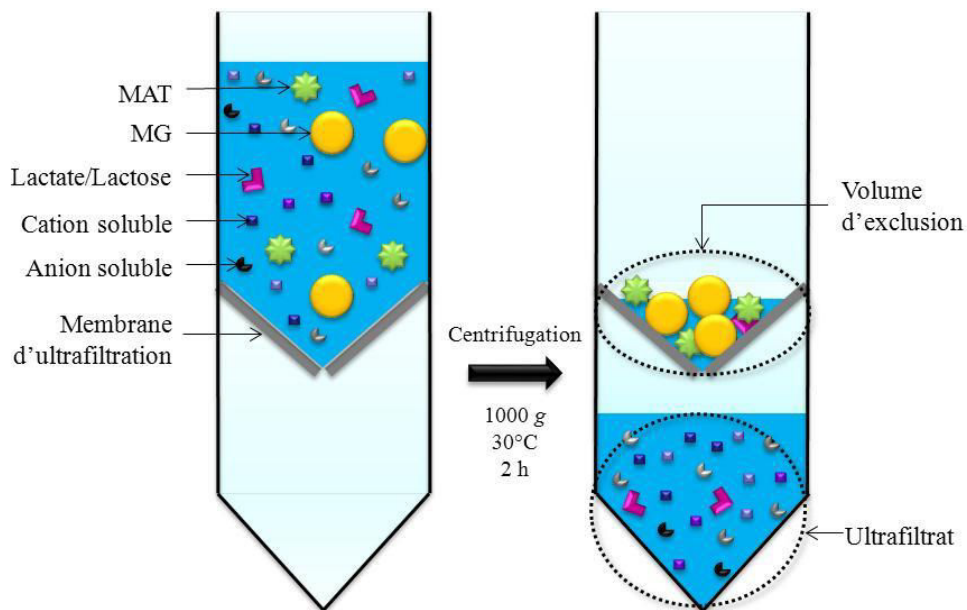


Figure 30 : Ultrafiltration des échantillons (MAT = matière protéique, MG = matière grasse)

### 3.5.1. Méthode utilisée à Soredab pour la première phase de la thèse

Le dosage des minéraux était effectué par spectrométrie d'émission atomique avec le spectromètre ICP-AES Vista Axial (Varian, Beuvry, France) suivant les normes NF ISO 8070 et NF EN 15505. Les échantillons, après minéralisation en présence d'acide nitrique 65 % dans un four micro-onde Multiwave 3000 (Anton Paar, Graz, Autriche) contrôlé en pression et température, étaient introduits sous forme d'aérosol dans un plasma d'argon (environ  $5\,000^\circ\text{C}$ ). Les éléments présents émettaient alors des radiations électromagnétiques (dans l'ultraviolet et le visible) à des longueurs d'ondes spécifiques :

- 443,5 nm pour le calcium
- 766,5 nm pour le potassium
- 278,0 nm pour le magnésium
- 589,6 nm pour le sodium
- 177,4 nm pour le phosphore
- 180,7 nm pour le soufre

Les intensités lumineuses, proportionnelles à la quantité d'éléments présents, étaient mesurées pour chaque longueur d'onde à l'aide d'un détecteur optique (photomultiplicateur). La minéralisation de chaque échantillon était doublée et quantifiée afin de contrôler la répétabilité de l'analyse.

Le calcul des teneurs en minéraux était réalisé par le logiciel ICP expert. Un facteur correctif était ensuite appliqué pour le dosage des minéraux solubles (Pierre & Brulé 1981) (Tableau 16). En effet, la membrane d'ultrafiltration induisait un volume d'exclusion (Figure 30) pris en compte par la formule suivante :

$$x_{corr} = \frac{1000 - \left( \frac{MAT}{1,5} + \frac{MG}{0,9} + \frac{lactate + lactose}{1,5} \right)}{1000 - \frac{lactate + lactose}{1,5}}$$

où *MAT*, *MG* et *lactate + lactose* correspondent respectivement aux teneurs de l'échantillon total en matière protéique, en matière grasse et en lactate et lactose (par défaut 50 g.L<sup>-1</sup>).

**Tableau 16 : Facteurs correctifs utilisés pour calculer les teneurs en minéraux solubles en fonction de la composition de la formule**

Teneur en matière grasse (%)	Teneur en matière azotée totale (%)	Facteur correctif
0	3,2	0,98
0	7	0,95
12	3,2	0,84
12	7	0,81

Afin de mettre en évidence les différences en minéraux solubles, selon la formulation, dans les travaux portant sur l'acidification (phase 1), les données ont été converties en teneurs en minéraux solubilisés, en soustrayant les teneurs en minéraux solubles mesurées dans l'échantillon contrôle (= non acidifié) à celles mesurées dans les échantillons acidifiés correspondants.

Une précaution a été prise pour éviter de biaiser les calculs lors des traitements statistiques. Pour rappel, afin d'augmenter la teneur en protéines, une plus grande quantité de poudre de lait écrémé a été ajoutée. Celle-ci contenait également des minéraux solubles et colloïdaux. Par conséquent, les teneurs en minéraux solubles de la formule contenant 7 % de protéines ont été corrigées par rapport au taux protéique, d'un facteur  $3,2/7$ . Ces données corrigées étaient alors appelées calcium soluble « standardisé » ou phosphore soluble « standardisé ».

### 3.5.2. Méthode utilisée au STLO pour la seconde phase de la thèse

Contrairement à la technique utilisée à Soredab, les équipements de dosage étaient différents pour les cations et les anions. La détermination des teneurs en calcium, magnésium, sodium et potassium se faisait par spectrométrie d'absorption atomique de flamme de longueurs d'onde :

- 422,7 nm pour le calcium
- 285,2 nm pour le magnésium
- 589 nm pour le sodium
- 766,5 nm pour le potassium

à l'aide d'un spectromètre Varian SpectrAA 220 FS (Varian SA, Les Ulis, France). Du chlorure de lanthane et du chlorure de césium étaient ajoutés pour supprimer les interférences et la dilution se faisait avec de l'eau ultra-pure. Le protocole appliqué était celui présenté par Brulé *et al.* (1974). Les concentrations totales en cations étaient mesurées dans les échantillons sans fractionnement préalable et les concentrations en cations de la phase soluble dans les ultrafiltrats (même protocole qu'à Soredab).

Le phosphate inorganique, le citrate et le chlorure étaient dosés par chromatographie ionique avec le système Dionex DX 500 (Dionex, Voisins le Bretonneux, France), d'après le protocole décrit par Gaucheron *et al.* (1996). La séparation des ions de la phase aqueuse se faisait sur une colonne échangeuse d'ions. Avant injection, les échantillons étaient délipidés et déprotéinés (par acide sulfosalicylique puis filtration à  $0,45 \mu\text{m}$  ou par ultrafiltration pour le dosage des anions).

### 3.6. Mesure de la taille de micelle

Le Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Orsay, France) permettait de mesurer le diamètre de particules allant de 0,6 nm à 6 µm. La méthode de diffusion dynamique de la lumière (ou DLS : Dynamic Light Scattering) mesurait le coefficient de diffusion, lié au mouvement Brownien, des particules en suspension. Cette vitesse de diffusion était reliée au rayon hydrodynamique de la particule en mouvement par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k.T}{6.\pi.\eta.R_H}$$

où

- $k$  est la constante de Boltzmann,
- $T$  la température,
- $\eta$  la viscosité du solvant,
- $R_H$  le rayon hydrodynamique.

Le rayon hydrodynamique d'une particule est le rayon d'une sphère dure diffusant à la même vitesse que la particule. Cette valeur prend en compte l'hydratation de la particule ainsi que son éventuel caractère anisotrope (= forme irrégulière). Dans la méthode DLS, un rayon lumineux est émis en direction de l'échantillon et les fluctuations de l'intensité lumineuse résultant de la diffusion du rayon par les particules en suspension sont mesurées. Le logiciel PSW0085 version 6.01 utilisait une fonction d'auto-corrélation qui permettait d'évaluer la vitesse d'évolution de l'intensité du rayon diffusé :

- évolution rapide pour les petites particules se déplaçant rapidement,
- évolution lente pour les grosses particules se déplaçant lentement.

Cette fonction d'auto-corrélation permettait d'obtenir un corrélogramme. Le corrélogramme devait ensuite être traduit, à l'aide d'algorithmes de traitement du signal, soit en diamètre moyen *z-average* (algorithme « *cumulants* ») soit en distribution granulométrique en intensité (algorithme *NNLS* : *non-negative least squares*). D'après le fournisseur, l'écart d'incertitude de mesure dépendait du diamètre de la particule et était de 5 % autour de 200 nm.

Pour les mesures de taille de micelles de caséines, afin d'obtenir une intensité du signal correcte tout en conservant le même environnement que dans l'échantillon complet, les

échantillons étaient dilués cent fois dans leur propre ultrafiltrat. Celui-ci était obtenu par centrifugation sur une membrane au seuil de coupure  $10 \text{ kg.mol}^{-1}$  (Vivaspin 20 ou Vivacell 70, Sartorius Stedim biotech, Aubagne, France) pendant deux heures à  $1\,000 \text{ g}$  et à  $25^\circ\text{C}$ . La prise d'essai diluée et l'ultrafiltrat étaient issus d'échantillons préalablement centrifugés 20 minutes à  $25^\circ\text{C}$  et  $3\,000 \text{ g}$  (étape d'écémage appliquée quelle que soit la composition de l'échantillon). La suspension diluée au  $1/100^{\text{ème}}$  était ensuite laissée à température ambiante pendant au moins 30 minutes afin d'assurer un équilibre correct du système dilué. La suspension était ensuite filtrée sur une membrane dont la taille de pores était de  $0,8 \mu\text{m}$  afin d'éliminer les éventuelles particules de poussière, globules gras résiduels ou gros agrégats protéiques. Enfin, la suspension était introduite dans une cellule adaptée (*capillary cells* DTS1060) et laissée à température ambiante au moins cinq minutes pour laisser le temps aux éventuelles bulles d'air de remonter à la surface. La température de la cellule était maintenue à  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$  pendant toute la durée de la mesure. L'indice de réfraction et de viscosité associés à l'ultrafiltrat était de 1,348 et  $1,187.10^{-3} \text{ Pa.s}$  à  $20^\circ\text{C}$ , respectivement. Les indices de réfraction et d'absorption pour les protéines étaient fixés à 1,450 et 0,001, respectivement. Les paramètres appliqués étaient ceux de Mark-Houwink et le modèle d'analyse était celui intitulé « *protein analysis* » et conçu par le fournisseur pour un calcul optimisé par rapport aux échantillons analysés.

Après un temps d'équilibration thermique de 120 secondes, la mesure de taille était effectuée à un angle de diffraction de  $173^\circ$  et une longueur d'onde de 633 nm. Le diamètre hydrodynamique ( $D_h$ ) *z-average* était calculé selon la relation de Stokes-Einstein en supposant que les particules avaient une forme sphérique et que la viscosité de l'échantillon était celle indiquée pour le dispersant. Les résultats obtenus correspondaient à la moyenne de trois mesures effectuées successivement dans la même cellule et espacées de 30 secondes. L'erreur de mesure de  $D_h$  était de 5 nm en moyenne. L'analyse « *cumulant* » fournissait également l'indice de polydispersité qui correspondait à l'écart-type standard relatif de la distribution de tailles. S'il était supérieur à 0,2, la mesure *z-average* du  $D_h$  était considérée comme non représentative d'une micelle unique (plusieurs pics observés pour un même échantillon) et donc rejetée. Cette mesure était réalisée deux jours après acidification (phase 1) ou prétraitement de stabilisation thermique (phase 2).

### 3.7. Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta correspond à la charge de surface des particules et dépend de l'environnement (pH, force ionique, température). Exprimé en mV, il représente les forces répulsives entre particules et donne donc une indication sur la stabilité d'un système colloïdal. Plus sa valeur absolue est grande (de préférence supérieure à 20 mV), plus le système est stable (Overbeek 1952). Par définition, un potentiel zêta égal à zéro correspond au point isoélectrique, point où le système est le plus instable en théorie.

Le calcul du potentiel zêta se faisait à partir de la mesure de la mobilité électrophorétique  $U_E$  (en  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ ) (Jean *et al.* 2006) et de l'équation de Henry :

$$U_E = \frac{\varepsilon \zeta}{6 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot f(ka),$$

où

- $\varepsilon$  est la constante diélectrique du milieu dispersant (ici fixée à 79),
- $\zeta$  le potentiel zêta de la particule (V),
- $\eta$  la viscosité dynamique de la phase solvante ( $\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ ),
- $f(ka)$  la fonction de Henry où  $k$  = paramètre fonction de la concentration en électrolyte du milieu et  $a$  = rayon de la particule (m).

Dans l'approximation de Smoluchowski,  $f(ka)$  vaut 1,5 (Smoluchowski 1917). La mobilité électrophorétique des particules était obtenue grâce à une électrophorèse de l'échantillon et une mesure de la vitesse des particules en utilisant la vélocimétrie à laser Doppler.

D'après le fournisseur, l'écart d'incertitude de la mesure serait de 10 % pour un standard et ne dépendrait en aucun cas de la taille des particules.

D'un point de vue pratique, la préparation des échantillons pour la mesure du potentiel zêta était la même que celle pour la mesure de taille avec le Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Orsay, France). En effet, la mesure de la mobilité électrophoretique était effectuée sur la même cellule DTS 1060. Ainsi, après un temps de stabilisation de

80 secondes succédant à la mesure du diamètre des particules, un voltage de 50 V était appliqué et la mesure s'opérait. La durée était ajustée par le logiciel pour atteindre un indice de qualité suffisant (au moins 1) mais respectait un minimum de 10 cycles et un maximum de 100 cycles. Le potentiel zêta considéré correspondait à la moyenne de trois lectures effectuées successivement et espacées de 30 secondes. L'erreur de mesure était de  $\pm 1$  mV en moyenne. Le résultat devait avoir un indice de qualité supérieur ou égal à 1 pour être conservé.

### 3.8. Mesure de l'hydratation des culots d'ultracentrifugation

L'hydratation micellaire correspondait à la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation, déterminée après leur dessiccation dans une étuve à 103°C pendant sept heures.

Les échantillons étaient préalablement centrifugés à 100 000 g pendant une heure à 20°C (ultracentrifugeuse Sorvall Discovery 90 SE, Sorvall, Courtaboeuf, France). En raison de leur densité, seules les micelles de caséines sédimentaient. Les culots obtenus (environ 2 g par échantillon) étaient ensuite égouttés (par retournement du tube) une nuit à 4°C, pesés, déshydratés puis pesés une nouvelle fois. La teneur en eau des culots d'ultracentrifugation correspondait à la différence entre les masses mesurées avant et après dessiccation. Elle s'exprimait en g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec.

### 3.9. Mesure des masses moléculaires par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide haute performance

La spectrométrie de masse a été employée pour caractériser les modifications chimiques des caséines dans la phase 2 de ce travail (*Chapitre 3 – paragraphe 2. Phase 2 : Étude de différentes voies de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique ultra-haute température*). Les protéines ou peptides étaient chargés positivement *via* l'abaissement du pH avec de l'acide trifluoroacétique (Sigma Aldrich, Saint Louis, États-Unis). Un gradient d'éluion permettait de séparer les molécules par chromatographie liquide



haute performance (HPLC) en phase inverse avant d'être injectées dans le spectromètre de masse. La composition de ce gradient permettait de séparer les molécules en fonction de leur hydrophobie croissante (phase stationnaire apolaire).

Un spectromètre de masse est composé de quatre parties, à savoir la source, l'analyseur, le détecteur et le traitement du signal (Figure 31).

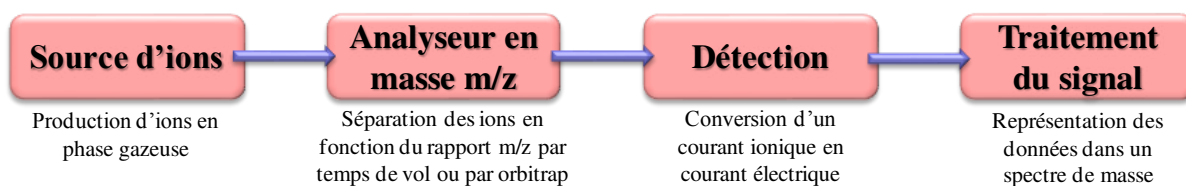


Figure 31 : Structure générale d'un spectromètre de masse

La source émet des molécules ionisées qui sont ensuite purifiées dans l'analyseur. La mesure du  $m/z$  (soit la masse divisée par la charge) se fait au niveau du détecteur.

La spectrométrie de masse a été utilisée pour évaluer les modifications des protéines entières et après leur digestion trypsique.

### 3.9.1. Analyse des protéines entières par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

La caractérisation des protéines entières par HPLC couplée à la spectrométrie de masse permettait de détecter des modifications chimiques recherchées *a priori*, comme des lactosylations.

Un volume de 15  $\mu\text{L}$  d'échantillon était injecté dans un système HPLC 1100 Agilent Technologies (Les Ulis, France) sur une colonne de séparation C4 Grace VYDAC (Columbia, États-Unis), référence 214TP5215, S/N NE010320-10-2, 150 mm de longueur x 2,1 mm de diamètre. La température de la colonne était de 40°C et le débit était de 0,250  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Les tampons utilisés selon le gradient indiqué dans le Tableau 17 avaient la composition suivante :

- Tampon A : 0,106 % d'acide trifluoroacétique dans de l'eau de « qualité masse »

- Tampon B : 80 % d'acétonitrile et 0,1 % d'acide trifluoroacétique dans de l'eau de « qualité masse »

Tableau 17 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation des protéines par chromatographie

Temps (min)	% tampon A	% tampon B
0	63	37
3	63	37
50	20	80
52	10	90
55	10	90
56	63	37
62	63	37

Le couplage entre la chromatographie et la spectrométrie de masse était effectué *via* un capillaire de diamètres interne 75  $\mu\text{m}$  et externe 280  $\mu\text{m}$  et d'une longueur de 60 cm environ. Le débit envoyé vers le spectromètre de masse était réglé par le biais d'un « split » dont la contrepression était fixée de manière à obtenir un débit en sortie de capillaire de 75  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (mesuré avant branchement sur la source d'ion).

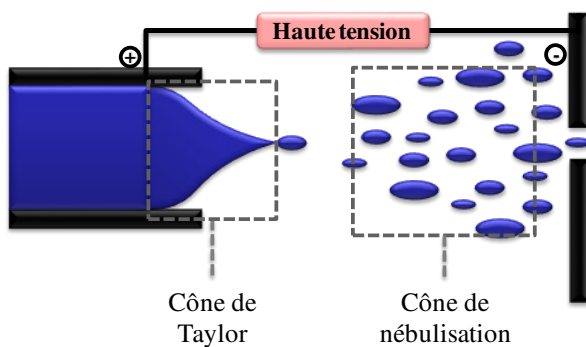


Figure 32 : Source d'ionisation par électrospray

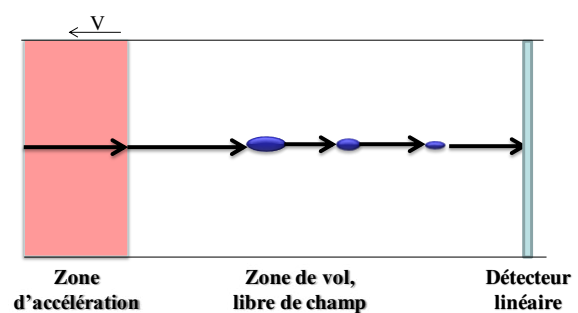


Figure 33 : Trajectoire d'un ion dans un analyseur à temps de vol (TOF) en mode linéaire

Dans le cadre de ce travail, la source utilisée pour l'ionisation des protéines éluées était un électron-spray « *Ion Sprayer* » (ESI) (Figure 32) couplé à un analyseur de type temps de vol (ou TOF : Time Of Flight) (Figure 33). Plus la molécule était petite et/ou chargée

(c'est-à-dire selon le rapport  $m/z$ ), plus elle traversait rapidement l'analyseur avant d'atteindre le détecteur. L'acquisition était effectuée dans la gamme de masse allant de  $m/z$  800 à 3 000 Th à une tension de 5 100 V.

La calibration du TOF était effectuée avec le peptide  $\beta$ -CN (193-209) de la caséine  $\beta$ . Les échantillons étaient dilués dans une solution de dénaturation composée d'urée 4 mol.L<sup>-1</sup>, de trishydroxyméthylaminométhane 10 mmol.L<sup>-1</sup> et de dithiothréitol 10 mmol.L<sup>-1</sup> à pH 7,5 (rapport de 100  $\mu$ L dans 200  $\mu$ L). L'ensemble était placé une heure à 37°C puis stocké à 4°C. Le pH était ajusté autour de 3 avec une solution d'acide trifluoroacétique 5 % avant l'analyse.

### 3.9.2. Analyse des peptides tryptiques par spectrométrie de masse

La caractérisation des peptides tryptiques par spectrométrie de masse permettait de localiser les acides aminés modifiés sur la séquence protéique. Pour cela, une protéolyse des caséines était réalisée avant analyse. Différentes enzymes pouvaient être utilisées pour cette digestion. La trypsine est la plus couramment employée (Chen *et al.* 2013). C'est une endopeptidase à sérine qui a pour particularité de couper au niveau des résidus lysyl et arginyl. Par traitement informatique, la séquence de chaque protéine pouvait être reconstituée à partir des différents fragments obtenus.

Une solution tampon de bicarbonate d'ammonium (Fluka BioChemika, Buchs, Suisse) 20 mmol.L<sup>-1</sup> à pH 8,0 était préparée dans de l'eau ultra-pure. Les échantillons étaient dilués dans le tampon bicarbonate d'ammonium de façon à obtenir 1 mL à une concentration protéique finale de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. La solution enzymatique était préparée extemporanément : 1 mg de trypsine, traité avec de la L-(tosylamido-2-phenyl) éthyle chlorométhyle ketone (TPCK) afin d'éliminer l'activité chymotryptique (Sigma Aldrich, Saint Louis, États-Unis), était dilué dans 5 mL de bicarbonate d'ammonium 20 mmol.L<sup>-1</sup> à pH 8. Un volume de 50  $\mu$ L de cette solution enzymatique était ajouté à la solution protéique (rapport enzyme/substrat de 1/250<sup>ème</sup>). Les échantillons étaient ensuite incubés à 37°C pendant une nuit. Pour arrêter la réaction enzymatique, le pH était abaissé à 2 en ajoutant une solution d'acide trifluoroacétique 20 %. Cet arrêt avait aussi pour but d'inhiber l'auto-hydrolyse de l'enzyme.

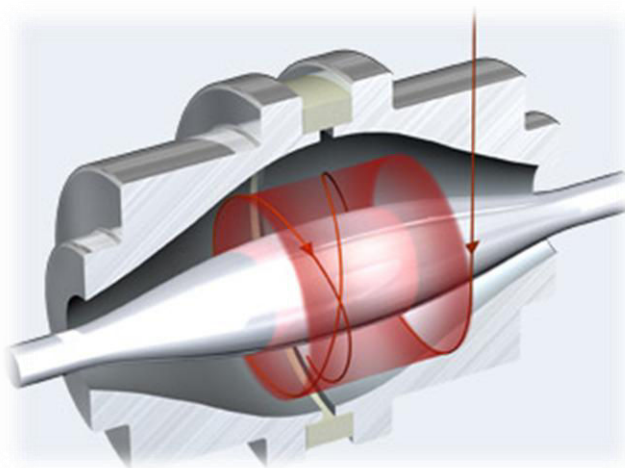
Les échantillons hydrolysés étaient dilués au 1/100<sup>ème</sup> dans le tampon A avant injection. Un volume de 2 µL de chaque échantillon était injecté dans un système nanoLC Dionex U3000-RSLC (Dionex, Amsterdam, Pays-Bas). Celui-ci comprenait une phase de concentration de l'échantillon sur cartouche RP HPLC C18 PepMap 100 (diamètre interne 300 µm ; longueur 5 mm), dont la taille de particules de la phase stationnaire était de 5 µm et la taille de pores de 100 Å, suivi du gradient primaire d'élution à 300 nL.min<sup>-1</sup> sur une colonne de séparation PepMap C18 (diamètre interne 75 µm ; longueur 150 mm) avec des particules de 3 µm de diamètre et des pores de 100 Å de diamètre. Le capillaire d'entrée du spectromètre était chauffé à une température de 250°C. Les tampons utilisés avaient la composition suivante :

- Tampon A : 2 % d'acétonitrile, 0,08 % d'acide méthanoïque et 0,01 % d'acide trifluoroacétique dans de l'eau « de qualité masse »
- Tampon B : 95 % d'acétonitrile, 0,08 % d'acide méthanoïque et 0,01 % d'acide trifluoroacétique dans de l'eau « de qualité masse »

Le gradient d'élution est reporté Tableau 18.

**Tableau 18 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation des peptides par chromatographie**

Temps (min)	% tampon A	% tampon B
0	95	5
5	95	5
60	80	20
90	40	60
92	15	85
95	15	85
96	97	3
105	97	3
105,1	95	5



**Figure 34 : Trajectoire des ions dans un orbitrap (en rouge) : Les ions sont injectés dans l'espace séparé par deux électrodes de forme géométrique parfaitement définie. Suivant son rapport  $m/z$ , l'ion va osciller autour de l'électrode centrale avec une fréquence caractéristique. La mesure de cette fréquence permet d'atteindre une grande précision et de séparer des ions de masses très proches (illustration Thermoscientifique)**

La source utilisée était une source de type nano électro-spray (Proxéon Biosystems A/S, Odense, Danemark) avec une tension optimisée de 2 kV et l'analyseur était un orbitrap (Figure 34). Le spectromètre de masse était un Qexactive (Thermo Scientific, San Jose, États-Unis). La mesure était faite en tandem (MS-MS). Cela signifie que chaque fragment hydrolysé (ions parent) était analysé directement (MS) ou à nouveau fragmenté en ions fils par collision avec un flux d'azote avant d'atteindre le détecteur (MS-MS) (Figure 35).

Les spectres de masse (MS) étaient enregistrés à une résolution de 70 000 entre  $m/z$  250 et 2 000 Th et les fragmentations (MS-MS) étaient réalisées sur les dix ions majoritaires (charges exclues : « non déterminée » et 1+). Après fragmentation d'un ion, le spectre MS-MS était enregistré à une résolution de 17 500 et les ions de même rapport  $m/z$  étaient exclus pendant 15 secondes.

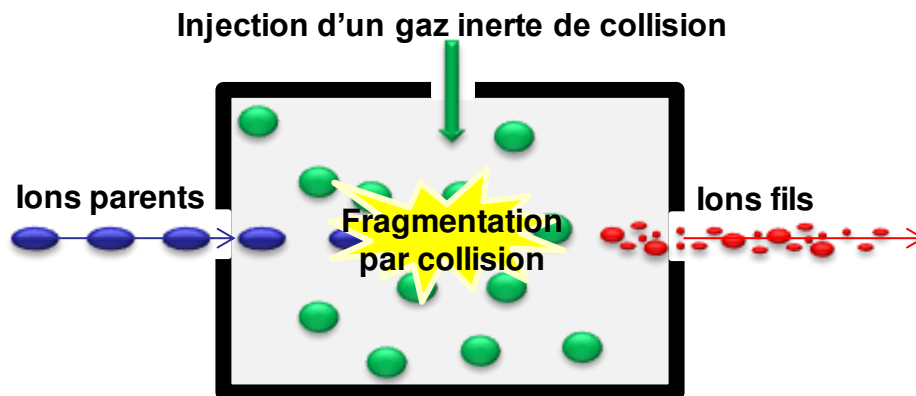


Figure 35 : Fragmentation des ions dans l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS)

### 3.9.3. *Interprétation des chromatogrammes et des spectres de masse*

La comparaison des chromatogrammes à 214 nm n'a pas permis de mettre en évidence de différences entre les échantillons étudiés dans le cadre de la phase 2. Toutes les caséines n'ont pu être identifiées et de nombreux pics en début de chromatogramme n'ont pu être attribués à des molécules particulières. Ils pourraient correspondre à des agrégats thermo-induits ou à des fractions insolubles diverses. Ces résultats ne seront pas montrés. En revanche, l'analyse des spectres de masse après séparation des molécules par chromatographie a permis d'obtenir davantage d'informations.

Les données issues du spectromètre de masse étaient transformées avec MSConvert en fichier .mzXml (peak picking level 1-2) avant d'être interprétées à l'aide du pipeline X!tandem développé par PAPPSO (Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud- Ouest, INRA, Jouy-en-Josas, France, <http://pappso.inra.fr>) et s'appuyant sur les travaux du Global Proteome Machine (<http://www.thegpm.org/TANDEM/index.html>) avec les paramètres suivants :

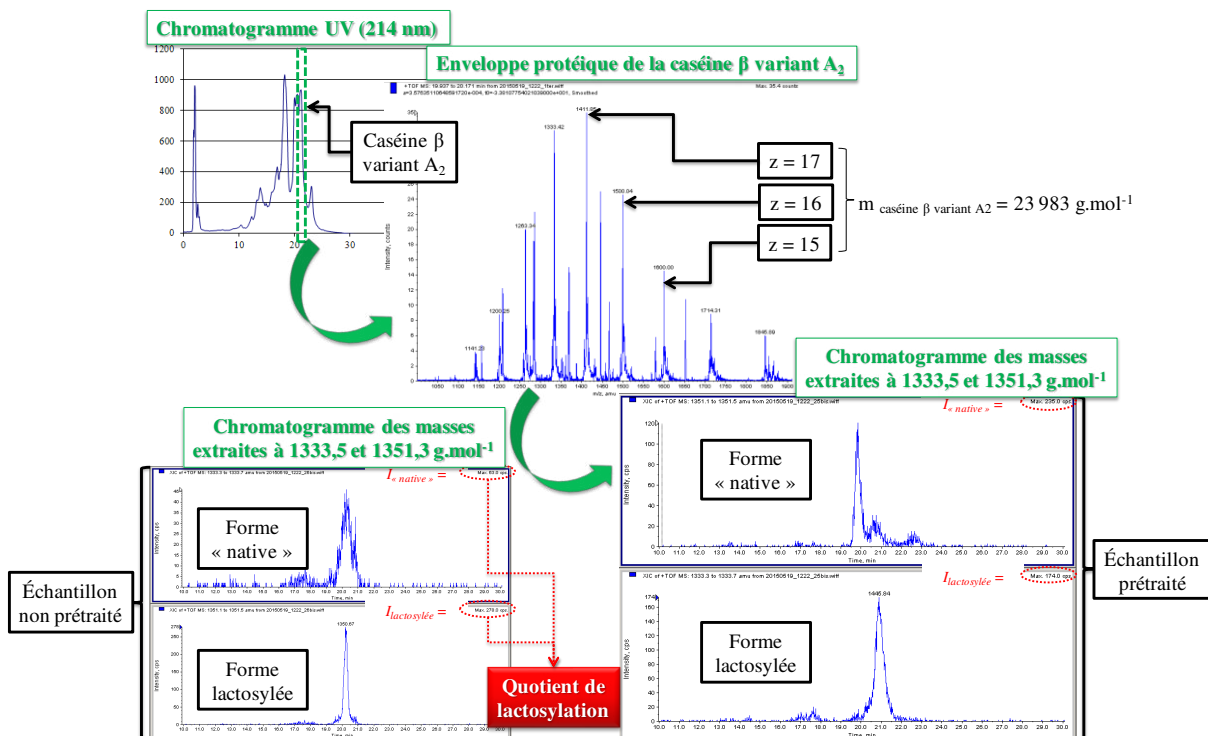
- Coupure enzymatique : Trypsine
- Nombre de coupures manquées autorisées : 2
- Modifications variables recherchées : phosphorylation de la sérine et de la thréonine, oxydation de la méthionine
- Autres modifications recherchées : lactosylation ou glycosylation de la lysine et de l'arginine, transformation de l'asparagine en acide aspartique et de la glutamine

en acide glutamique, transformation de la phosphosérine en déhydroalanine, formation d'un isopeptide entre l'acide aspartique et la lysine

- Précision de masse : 10 ppm (MS), 0,05 g.mol<sup>-1</sup> (MS-MS)
- Validation des identifications : e-value < 0,01
- Banque de données utilisées pour l'identification : banque de données composées des principales protéines du lait et de l'œuf (180 protéines environ) ainsi qu'une banque de données c-Rap (<ftp://ftp.thegpm.org/fasta/c-RAP>) composée des contaminants fréquemment rencontrés lors de ce type d'analyse

Les peptides identifiés étaient ensuite quantifiés dans tous les échantillons à l'aide du logiciel MassChroQ également développé par PAPPSO (Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud- Ouest, INRA, Jouy-en-Josas, France, <http://pappso.inra.fr>)

Les données obtenues par spectrométrie de masse étaient enfin traduites sous forme d'un quotient d'intensité des signaux pour en faciliter l'interprétation (Figure 36).



cet exemple, les masses extraites correspondent à la caséine  $\beta$  variant A<sub>2</sub> à l'état de charge +18 lactosylée ou non.

Pour chaque échantillon et pour chaque caséine identifiée grâce au chromatogramme UV, étaient relevés l'intensité du signal correspondant à la masse molaire de la protéine native ( $I_{native}$ ) et l'intensité du signal émis par la même protéine « mono-lactosylée » ( $I_{lactosylée}$ ), c'est-à-dire celle dont la masse molaire présentait une augmentation de + 324 Da (soit  $M(lactose) - M(H_2O) = 342 - 18 Da$ ) par rapport à la valeur de référence (Morgan *et al.* 1997). Le quotient de lactosylation pour les spectromètres de masse obtenus sans digestion préalable correspondait au rapport  $I_{lactosylée}/I_{native} \cdot 100$  pour chaque variant de caséine identifié (Figure 36).

La quantification par spectrométrie de masse est très délicate et sujette à caution (Fenaille *et al.* 2003). Ces quotients étaient donc à prendre avec précaution puisque la quantité d'ionisation restait aléatoire. Considérer qu'une faible lactosylation a peu ou pas d'effet sur le potentiel d'ionisation est discutable. De même, estimer que le profil de distribution des pics d'ions moléculaires des différentes formes glycosylées dans un spectre reflète leur composition en solution dans un mélange est hypothétique (Siciliano *et al.* 2013). Toutefois, ces deux suppositions ont été validées dans le cadre d'une glycation de lysozyme (Yeboah & Yaylayan 2001) et une analyse qualitative a pu être menée pour les travaux présentés dans ce manuscrit.

Afin de mettre en évidence les différences d'intensité des signaux entre les échantillons (en fonction des différences de masse), pour chaque peptide tryptique de chaque formule, le quotient suivant était calculé :

$$\frac{1 + \log(aire_{formule\ chauffés} + 1)}{1 + \log(aire_{formule\ non\ chauffés} + 1)}$$

Avec ce calcul, une valeur supérieure à 1,1 représentait une variation d'intensité d'un facteur 2 en faveur de l'échantillon « chauffé » (et une valeur inférieure à 0,9 représentait une variation d'intensité d'un facteur 2 en faveur de l'échantillon « non-chauffé »).



### 3.10. Traitements statistiques utilisés dans la phase 1

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (2.15.2)® (R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche). Le traitement de contraste était utilisé de sorte que l'acide citrique et la fermentation thermophile soient comparés à l'addition directe d'acide lactique. Sauf mention contraire, le pH était considéré comme un facteur qualitatif afin de pouvoir appliquer des traitements de type Anova sur les données de mesures quels que soient les facteurs de formulation ou de procédé. Afin de pouvoir expliquer (au sens statistique) l'index de stabilité par les facteurs mesurés, une régression multiple a été appliquée en considérant le pH comme un facteur quantitatif.

# CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

## ***1. Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines lactières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT***

Dans la synthèse bibliographique (*Chapitre 1*), différentes voies de modification des propriétés physico-chimiques des protéines lactières, et en particulier des micelles de caséines, ont été exposées. La formulation et les traitements technologiques peuvent impacter l'état des protéines et leur environnement notamment minéral, avec des répercussions sur la stabilité du produit. Il est donc essentiel pour la communauté scientifique et les industriels laitiers de mieux comprendre les mécanismes en jeu.

Les micelles de caséines sont particulièrement sensibles au pH. Lors de l'acidification, le phosphate de calcium colloïdal se solubilise, entraînant la dissociation des caséines et la formation d'un réseau protéique. Les modifications qui s'opèrent au niveau des micelles de caséines pour conduire à la formation d'un réseau protéique ont lieu à des pH clefs (Figure 17, *Chapitre 1 – paragraphe 3.3. Impact de l'acidification sur les structures et fonctions*

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

micellaires). Certains points de la gamme étudiée dans ce chapitre ont également été choisis pour leur relation avec des produits laitiers :

- pH 6,7 : pH du lait et de la crème natifs
- pH 6,2 : début de la « transition micellaire », pH proche du mascarpone (pH 6,3)
- pH 5,8 : début d'agrégation des micelles de caséines, pH de certains fromages fondus et de la mozzarella
- pH 5,2 : voluminosité et hydratation maximales de la micelle de caséines, solubilisation totale du phosphate inorganique colloïdal
- pH 4,8 : pH des *cream cheeses* voire des crèmes fraîches (pH 4,5)
- pH 4,6 : pH<sub>i</sub> moyen des caséines, pH des yaourts
- pH 3,7 : solubilisation totale du calcium colloïdal, pH minimal des produits d'Elvir

Les protéines sont également sensibles aux traitements thermiques. Les protéines sériques en particulier peuvent se dénaturer et s'agréger entre elles ou avec les caséines. Par conséquent, acidification et traitement ultra-haute température (UHT) peuvent déstabiliser le système. En outre, en présence de matière grasse, les protéines peuvent se placer aux interfaces et modifier les propriétés de l'émulsion. La teneur en matière grasse pourrait donc intervenir dans les mécanismes de déstabilisations acide et thermique.

Si de nombreuses recherches ont porté sur les modifications des protéines induites par l'acidification ou les traitements thermiques, aucune n'a étudié simultanément l'impact de la température d'acidification, des teneurs en matière grasse et en protéines, de la nature de l'acide, et l'impact du traitement thermique UHT, à l'échelle pilote, sur les micelles de caséines acidifiées.

**L'objectif de cette phase 1 était de déterminer les altérations physico-chimiques aux échelles moléculaire et supramoléculaire, micro-, méso- et macro-scopique s'opérant**

- **dans quatre systèmes laitiers formulés à l'échelle pilote et contenant :**
  - **3,2 ou 7 % de protéines et**
  - **0 ou 12 % de matière grasse,**

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

- **lors de leur acidification sur une large gamme de pH :**
  - **de 6,7 à 3,7,**
  
- **à deux températures d'acidification :**
  - **8°C comme dans certains procédés fromagers ou 42°C, température de fermentation,**
  
- **avec différents modes d'acidification :**
  - **par ajout d'acide citrique ou d'acide lactique ou**
  - **par fermentation thermophile (production *in situ* d'acide lactique).**

L'attention s'est essentiellement portée sur la stabilité micellaire, en relation avec les solubilisations minérales et le potentiel zêta des micelles de caséines. Tout d'abord, les impacts de chacun des facteurs d'étude (valeur du pH, température, teneurs en matière grasse et en protéines, nature de l'acide) sont présentés, pour chaque type de mesure (indice de stabilité, potentiel zêta, teneurs calcium et phosphore solubilisés). Comme l'ensemble des conditions étudiées correspondait à 140 combinaisons, certaines données ne sont rapportées que pour un nombre limité d'échantillons, les plus représentatifs des tendances généralement observées. Ensuite, l'impact global de l'ensemble des facteurs est étudié à l'aide de traitements statistiques afin de synthétiser l'information, valider les observations graphiques et hiérarchiser l'impact des différents facteurs. Enfin, la stabilité de chacune des formules acidifiées face au traitement UHT est calculée *via* une évaluation de l'indice de stabilité.

### 1.1. Résultats (phase 1)

#### 1.1.1. *Évolution de l'indice de stabilité et observations aux échelles macro- et méso-scopiques*

La mise au point d'un nouvel indice de stabilité et les résultats qui en ont découlé ont conduit à la définition de trois niveaux de stabilité (*Chapitre 2 – paragraphe 3.4.1. Dosage de l'azote total et calcul de l'indice de stabilité*) rassemblant respectivement :

1. les échantillons stables avec des indices proches de 100 % (cases noires dans le Tableau 19),
2. les échantillons en cours de déstabilisation avec un indice compris entre 75 et 35 % (cases grises dans le Tableau 19),
3. les échantillons déstabilisés avec un indice inférieur à 35 % (cases blanches dans le Tableau 19).

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

**Tableau 19 : Indices de stabilité en pourcentages (calcul exposé dans le *Chapitre 2 – paragraphe 3.4.1. Dosage de l'azote total et calcul de l'indice de stabilité*) en fonction de la teneur en matière grasse (MG), de la teneur en protéines (MP), de la température d'acidification, du mode d'acidification et du pH (case noire = stable, case grise = en cours de déstabilisation, case blanche = déstabilisé)**

Teneur en MG	Teneur en MP	Température	Acide	pH						
				3,7	4,6	4,8	5,2	5,8	6,2	6,7
0 %	3,2 %	42°C	citrique	21	21	22	22	90	95	100
			lactique	20	21	22	23	84	93	100
			ferment	20	20	20	24	96	100	100
		8°C	citrique	25	25	25	71	101	100	100
			lactique	20	20	19	60	93	93	100
			ferment	21	22	24	66	101	99	100
	7 %	42°C	citrique	16	18	19	88	98	101	100
			lactique	17	19	21	77	97	94	100
		8°C	citrique	19	22	25	95	98	100	100
			lactique	20	21	23	100	98	100	100
12 %	3,2 %	42°C	citrique	22	24	24	26	88	96	100
			lactique	25	26	26	26	47	88	100
			ferment	22	26	26	27	27	86	100
		8°C	citrique	23	24	28	26	98	96	100
			lactique	24	27	27	55	98	98	100
			ferment	25	21	21	27	69	88	100
	7 %	42°C	citrique	28	36	32	36	100	101	100
			lactique	27	24	25	29	98	102	100
		8°C	citrique	21	30	27	103	103	103	100
			lactique	23	20	27	95	95	96	100

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

.....

### 1.1.1.1. Influence du pH

Le Tableau 19 présente les indices de stabilité entre pH 3,7 et 6,7 pour chaque teneur en matière grasse, associée à chaque teneur en protéines, combinée à chaque température, selon chaque type d'acide.

Si l'attention est portée sur le pH, il ressort que :

- la majorité des échantillons stables (cases noires) avait un pH supérieur ou égal à 5,8 en absence de matière grasse, et au moins égal à 6,2 avec 12 % de matière grasse,
- dans la gamme de pH 5,8 à 5,2, la plupart des échantillons se déstabilisaient (cases grises voire blanches, confirmées par les observations mésoscopiques Figure 37)
- à pH inférieur ou égal à 4,8, quasiment tous les échantillons étaient déstabilisés.

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

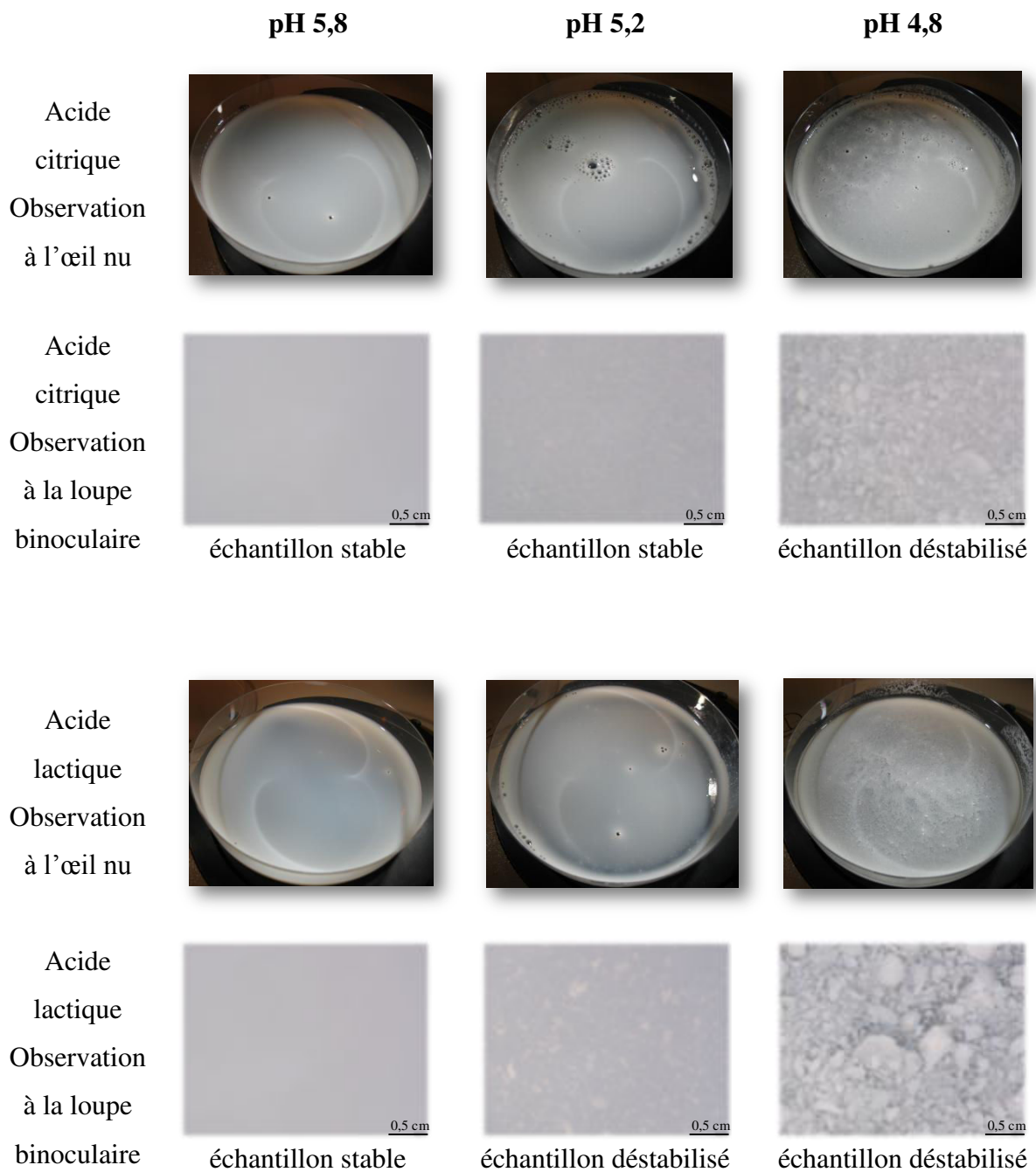


Figure 37 : Observations macroscopiques (diamètre d'une coupelle = 9 cm) et mésoscopiques (échelle sur la photographie) de formules contenant 0 % de matière grasse et 7 % de protéines acidifiées à 42°C avec de l'acide citrique (haut) ou de l'acide lactique (bas)

Pour une même formule mais avec un pH inférieur, l'indice de stabilité ne ressortait jamais significativement supérieur (Tableau 19) : la précipitation de la structure micellaire était irréversible sur la gamme de pH étudiée. Un pH-seuil a donc été déterminé par l'indice



## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

.....

de stabilité et attribué à chaque ensemble de conditions. En dessous de ce pH, le système protéique était déstabilisé.

Bien que la même tendance soit observée quelles que soient les conditions d'acidification, la valeur du pH-seuil était variable selon les formules (Tableau 19). Cet indice était donc utile pour examiner l'impact des facteurs étudiés.

Par exemple, sur la base de cet indice, lors d'une acidification à 8°C de la formule à 0 % de matière grasse et à 3,2 % de protéines, additionnée d'acide lactique, les échantillons étaient :

- stables du pH natif au pH 5,8 → indices de stabilité compris entre 100 et 90 % ;
- en cours de déstabilisation autour de pH 5,2 → indice de stabilité = 60 % ;
- déstabilisés pour un pH inférieur à 5,2 → indices de stabilité autour de 20 % (Tableau 19).

De même, lors d'une acidification à 42°C de la formule à 12 % de matière grasse et à 3,2 % de protéines, additionnée d'acide lactique, les échantillons étaient :

- stables du pH natif au pH 6,2 → indices de stabilité compris entre 100 et 85 % ;
- en cours de déstabilisation autour de pH 5,8 → indice de stabilité = 47 % ;
- déstabilisés pour un pH inférieur à 5,8 → indices de stabilité autour de 25 % (Tableau 19).

Ainsi, dans le premier cas, le pH-seuil était de 5,2, alors qu'il n'était que de 5,8 pour le deuxième ensemble de conditions d'acidification.

Il est à noter que la valeur de l'indice de stabilité n'atteignait jamais 0 %. Cela peut s'expliquer par la présence de composés azotés autres que les micelles de caséines en suspension, non déstabilisés par l'acidification. Les protéines sériques, qui représentent environ 20 % des protéines du lait ne sont pas ou peu déstabilisées par l'acidification et restent dans le surnageant de centrifugation par exemple.

.....

### 1.1.1.2. Influence de la température d'acidification

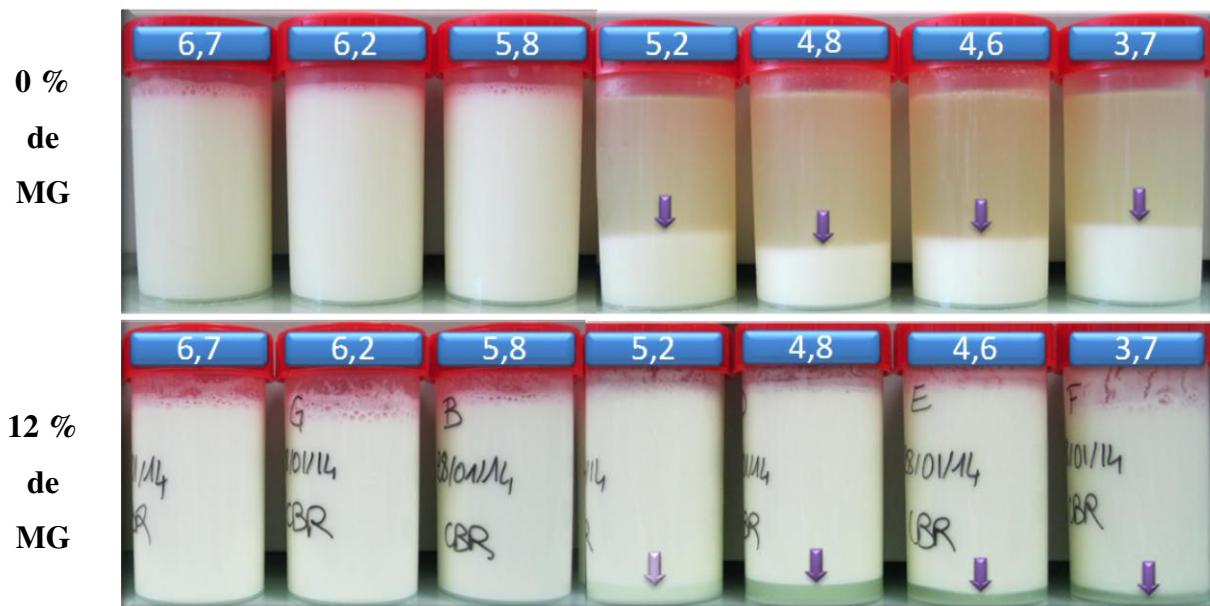
Quelles que soient la formule et la nature de l'acide, le pH-seuil était généralement plus haut quand l'acidification était menée à 42°C qu'à 8°C (Tableau 19). Par exemple, pour la formule contenant 0 % de matière grasse et 3,2 % de protéines, acidifiée avec de l'acide citrique, à 42°C, l'indice de stabilité chutait entre pH 5,8 et pH 5,2 (de 90 à 22 % respectivement) alors qu'à 8°C, il diminuait entre pH 5,2 et pH 4,8 (de 71 à 25 % respectivement) (Tableau 19). D'autres études ont également montré qu'à une température plus haute correspondait un pH de gélification supérieur (Lucey *et al.* 1998 ; Donato *et al.* 2007).

### 1.1.1.3. Influence de la teneur en matière grasse

D'après le Tableau 19, l'indice de stabilité tendait généralement à être inférieur, à un même pH, pour une formule à 12 % de matière grasse par rapport à une formule sans matière grasse. Par exemple, la formule écrémée et contenant 3,2 % de protéines acidifiées à 8°C avec de l'acide citrique jusqu'à pH 5,2, avait un indice de 71 %, alors que la formule correspondante avec 12 % de matière grasse avait un indice de 26 % seulement. La même tendance était observée dans les formules contenant 7 % de protéines.

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT



**Figure 38 :** Comparaison à l'échelle macroscopique (hauteur d'un pot = 10 cm) d'échantillons contenant 3,2 % de protéines acidifiés avec de l'acide citrique à 42°C en fonction de leur teneur en matière grasse (ligne supérieure = 0 % de matière grasse et ligne inférieure = 12 % de matière grasse). Le pH est indiqué dans les cases bleues et la ligne de déphasage est mise en évidence par les flèches violettes.

Il est à noter en revanche que, d'après des observations à l'œil nu, l'émulsion avec matière grasse semblait plus homogène, moins déstabilisée que les échantillons écrémés (Figure 38). Dans ce cas, c'est davantage un phénomène de crémage qui est observé à pH très acide, alors que dans l'autre c'est de la sédimentation.

### 1.1.1.4. Influence de la teneur en protéines

D'après le Tableau 19, l'indice de stabilité chutait à un pH plus haut pour une formule à 3,2 % de protéines par rapport à une formule à 7 % de protéines. En particulier, à pH 5,2, dans les formules sans matière grasse, pour une acidification à 42°C avec de l'acide citrique, les indices de stabilité étaient de 22 et 88 % pour les formules contenant 3,2 et 7 % de protéines, respectivement. De même, pour une acidification avec de l'acide lactique dans les mêmes conditions, les échantillons étaient déjà déstabilisés pour une teneur en protéines de 3,2 % (indice de stabilité = 23 %) alors qu'ils étaient encore stables (indice de stabilité = 77 %) dans la formule contenant 7 % de protéines (Tableau 19). Dans l'étude de Gastaldi *et*

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

al. (1997), les valeurs de pH de déstabilisation étaient de 4,86, 4,75 et 4,65 pour des formules contenant 3,6, 5,4 et 7,2 % de protéines, respectivement. Ces indices confirmaient donc l'amélioration de la stabilité avec la plus forte concentration en protéines.

### 1.1.1.5. Influence du mode d'acidification

D'après le Tableau 19, les formules acidifiées avec l'acide citrique sembleraient être légèrement plus stables que celles obtenues avec l'acide lactique ou par fermentation. À titre d'exemple, dans une formule contenant 12 % de matière grasse et 3,2 % de protéines, acidifiée à 42°C, pour un pH de 5,8, l'indice de stabilité était de 88 % avec l'acide citrique (échantillon stable) contre seulement 47 % avec l'acide lactique (échantillon en cours de déstabilisation) et 27 % avec la fermentation (échantillon déstabilisé).



Figure 39 : Comparaison à l'échelle macroscopique (hauteur d'un pot = 10 cm) d'échantillons contenant 0 % de matière grasse et 7 % de protéines, acidifiés à 42°C en fonction du mode d'acidification (ligne supérieure = avec des ferments et ligne inférieure = avec une solution d'acide lactique). Le pH est indiqué dans les cases bleues et la ligne de déphasage est mise en évidence par les flèches violettes.

Il est à noter que l'addition directe d'acide entraînait un déphasage des échantillons avec sédimentation des protéines alors que la fermentation produisait un gel homogène (Figure 39).

### 1.1.2. Évolution des teneurs en calcium et phosphore solubles

Comme présenté dans la synthèse bibliographique (*Chapitre 1 – paragraphe 2. Caractéristiques et modèles de structure de la micelle de caséines*), la micelle de caséines contient du calcium et du phosphore. L'environnement minéral de la micelle de caséines et la solubilisation de ses minéraux colloïdaux étaient donc des variables importantes à considérer. Les teneurs en minéraux solubilisés ont été calculées pour chaque pH dans les différentes conditions testées (*Chapitre 2 – paragraphe 3.5. Mesures des teneurs en minéraux totaux ou solubles*) : pour chaque formule, température et acide, les teneurs en minéraux solubles de l'échantillon de contrôle (c'est-à-dire non acidifié) étaient soustraites des teneurs en minéraux solubles de l'échantillon acidifié correspondant. Sont présentés ici plus particulièrement les teneurs en calcium et phosphore.

#### 1.1.2.1. Influence du pH

La Figure 40 présente les concentrations en calcium (A) et phosphore (B) solubilisés par une acidification citrique, à 8°C dans une formule contenant 0 % de matière grasse et 3,2 % de protéines. Du pH natif à pH 5,2, les teneurs en calcium et phosphore solubilisés augmentaient de 0 à 647 mg.kg<sup>-1</sup> et 311 mg.kg<sup>-1</sup> respectivement. Alors que la teneur en phosphore solubilisé était maximale à partir de pH 5,3, la teneur en calcium solubilisé tendait à augmenter jusqu'à pH 4,7 où elle atteignait 760 mg.kg<sup>-1</sup>.

Ces courbes étaient globalement les mêmes pour l'ensemble des conditions étudiées (Figure 40 à Figure 43) et en accord avec de nombreux auteurs (Van Hooydonk *et al.* 1986 ; Dalgleish & Law 1989 ; Le Graët & Brulé 1993 ; Gastaldi & Lagaude 1996).

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

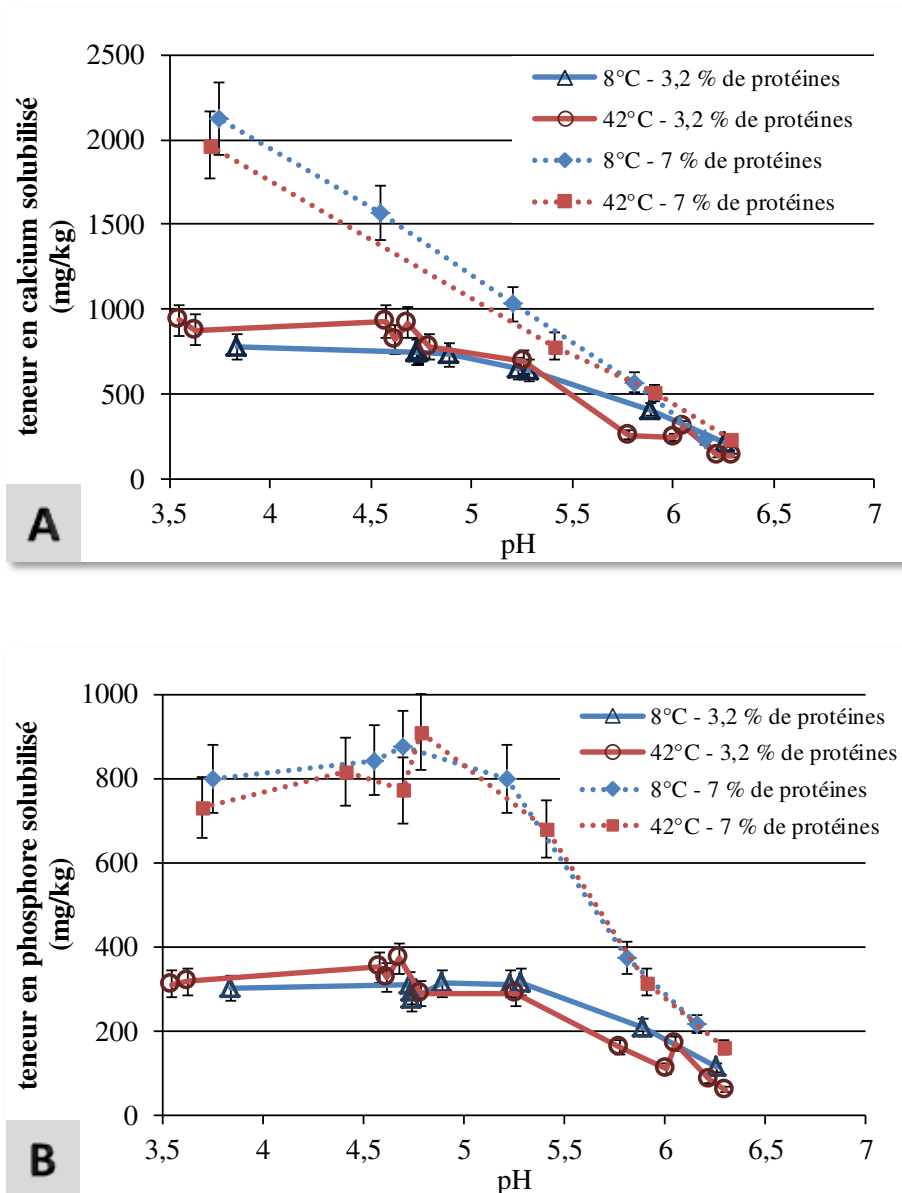


Figure 40 : Impact du pH (entre pH 3,7 et pH natif), de la température d'acidification (8 versus 42 °C) et de la teneur en protéines (3,2 versus 7 %) sur les teneurs en calcium (A) et phosphore (B) solubilisés dans une formule contenant 0 % de matière grasse et acidifiée avec de l'acide citrique (l'incertitude de mesure est de 10 %)



## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

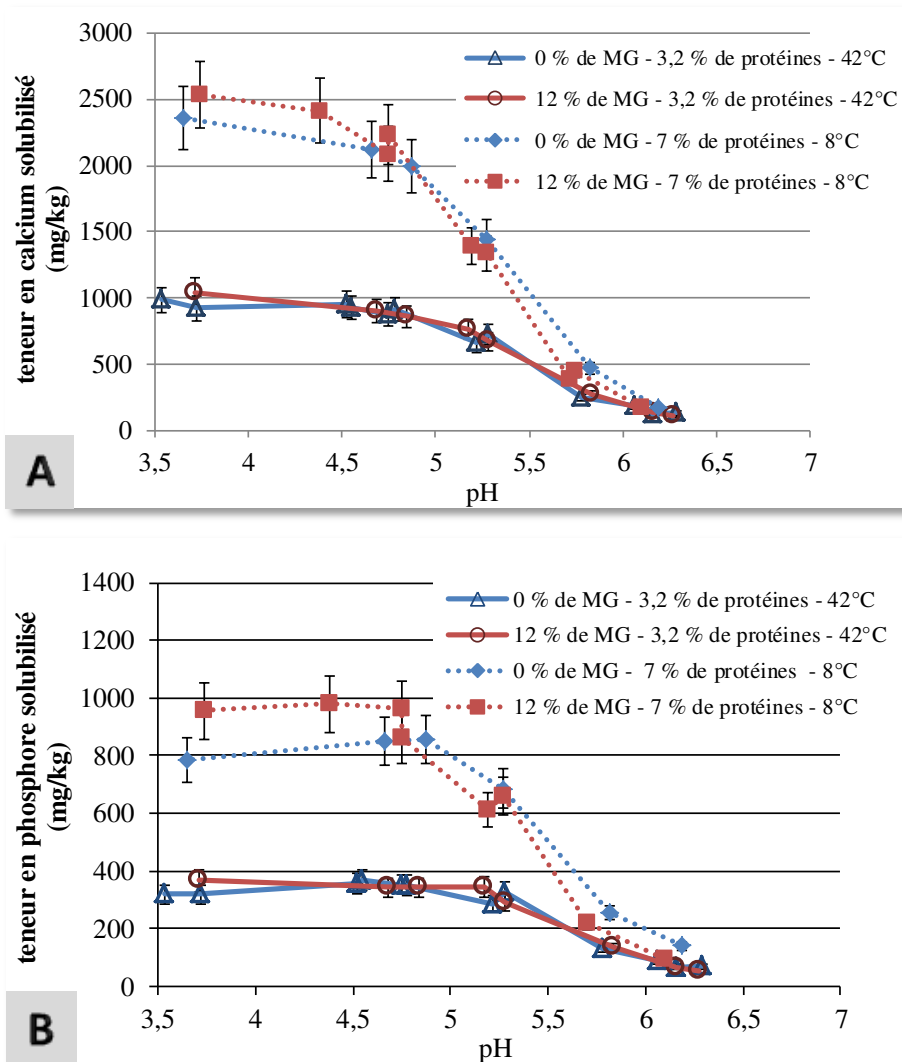


Figure 41 : Impact de la teneur en matière grasse (MG) (0 versus 12 %) et de la température (8 versus 42°C) sur les teneurs en calcium (A) et phosphore (B) solubilisés dans des formules contenant 3,2 ou 7 % de protéines et acidifiées avec de l'acide lactique (l'incertitude de mesure est de 10 %)

### 1.1.2.4. Influence de la teneur en protéines

Pour une formule écrémée acidifiée à 8°C avec de l'acide lactique, les teneurs en calcium et phosphore solubilisés se rapprochaient de leur maximum à un pH plus bas dans une formule contenant 7 % de protéines plutôt que 3,2 %. Ainsi, les teneurs en calcium commençaient à se stabiliser à pH 4,6 au lieu de pH 4,8 dans les formules contenant 0 % de



### CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

matière grasse et 7 *versus* 3,2 % de protéines, respectivement, que ce soit à 8 ou 42°C (Figure 42-A). De même, les teneurs en phosphore solubilisé étaient maximales autour de pH 4,6 - 4,8 pour les formules à 7 % de protéines contre pH 5,2 pour les formules à 3,2 % de protéines et sans matière grasse (Figure 42-B). La même tendance était observée à 8°C, avec l'acide citrique ou la fermentation et avec matière grasse (résultats non montrés).

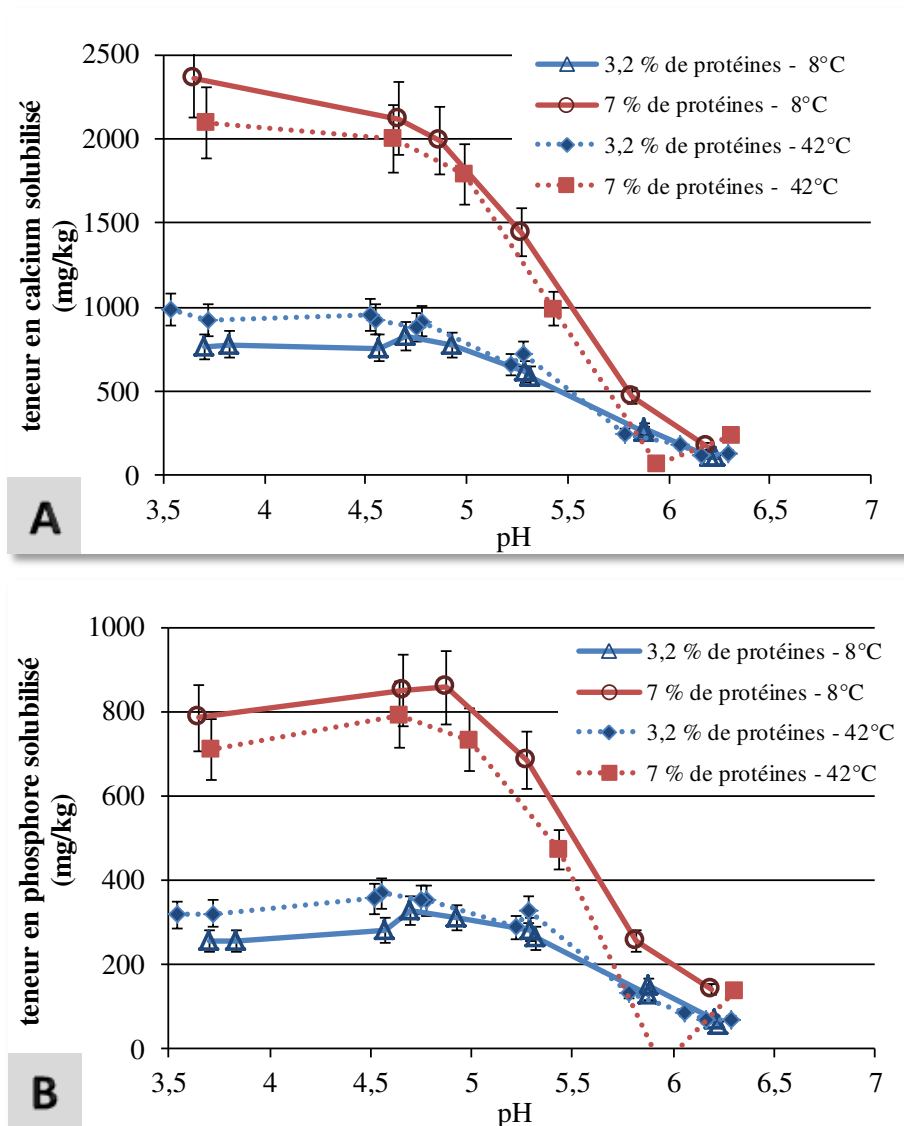


Figure 42 : Impact de la teneur en protéines (3,2 *versus* 7 %) sur les teneurs en calcium (A) et phosphore (B) solubilisés dans une formule contenant 0 % de matière grasse et acidifiée avec de l'acide lactique à 8 ou 42°C (l'incertitude de mesure est de 10 %)

Ces résultats confirmaient ceux rapportés par Le Graët & Gaucheron (1999) et Brulé & Fauquant (1981). Le Graët & Gaucheron (1999) ont en effet montré que les valeurs de pH nécessaires pour atteindre des solubilisations totales du calcium et du phosphore étaient décalées vers des pH plus bas quand la concentration en caséines augmentait. Des résultats comparables ont également été obtenus par Gastaldi *et al.* (1997). Ces auteurs montraient que le phosphate de calcium inorganique colloïdal était totalement solubilisé à un pH plus bas quand la concentration en matière sèche augmentait. Par ailleurs, pour un pH donné durant l'acidification d'un lait (donc inférieur à 6,6), Brulé & Fauquant (1981) observaient une augmentation du pourcentage de calcium colloïdal quand la concentration en protéines était augmentée par ultrafiltration.

### 1.1.2.5. Influence du mode d'acidification

Aucune différence significative en matière de solubilisation minérale (incertitude de mesure d'environ 10 %), n'était distinguable quel que soit le mode d'acidification utilisé (Figure 40 à Figure 43). À titre d'exemple, pour la formule contenant 0 % de matière grasse, 3,2 % de protéines et acidifiée à 42°C, le pH de solubilisation maximale du calcium était de 4,6 et sa teneur augmentait de 0 au pH natif (par définition) à environ 900 mg.kg<sup>-1</sup> quelle que soit la nature de l'acide (Figure 43-A). De même, pour la formule contenant 0 % de matière grasse et 3,2 % de protéines, acidifiée à 42°C, le pH de solubilisation maximale du phosphore était de l'ordre de 5,2 et sa teneur augmentait de 0 au pH natif du lait à environ 350 mg.kg<sup>-1</sup> à pH 5,2, quel que soit le mode d'acidification (Figure 43-B).

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines lactières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

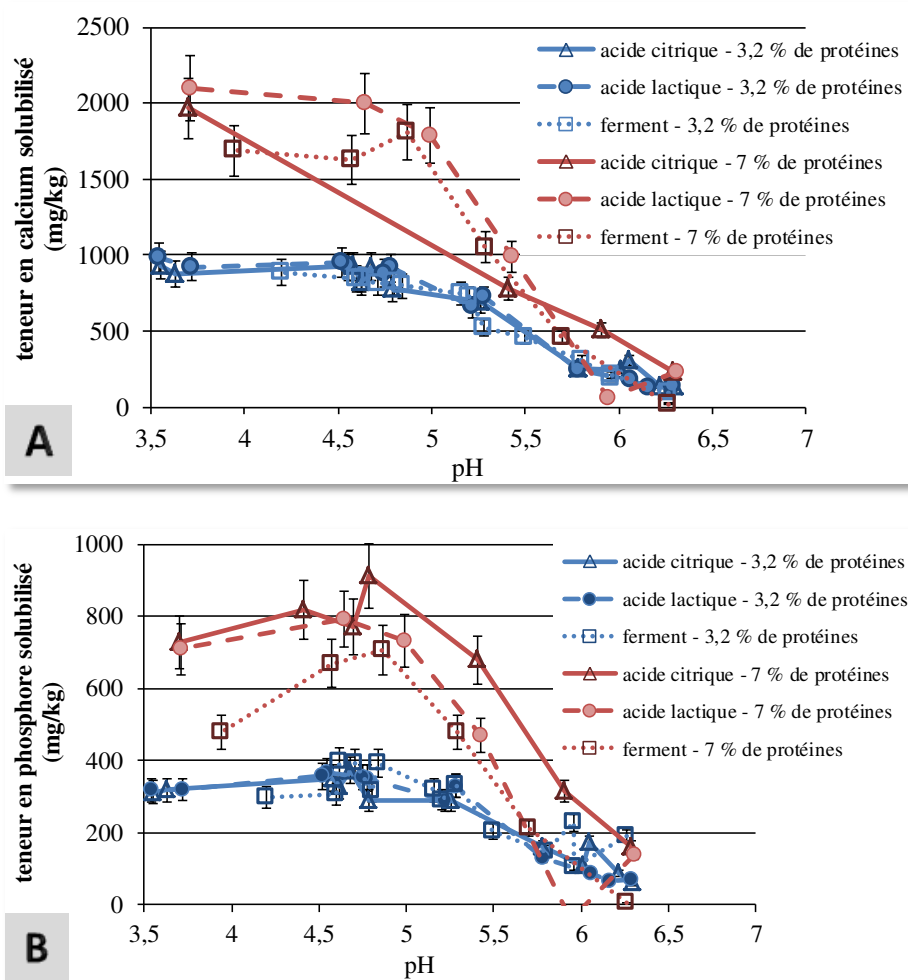


Figure 43 : Impact du mode d'acidification sur les teneurs en calcium (A) et phosphore (B) solubilisés dans une formule contenant 3,2 ou 7 % de protéines, 0 % de matière grasse et acidifiée à 42°C (l'incertitude de mesure est de 10 %)

### 1.1.3. Évolution du potentiel zêta

Le potentiel zêta est un indicateur de la charge de surface des micelles de caséines et donc un indice des interactions électrostatiques (Tableau 20). Les charges négatives sont notamment portées par les groupements carboxyliques des caséines  $\kappa$  et par les groupements phosphate ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). La micelle native a un potentiel zêta de -18 mV dans le lait. Plus cette valeur se rapproche de zéro, moins il y a de charges et plus il y a de risques que les micelles de caséines s'agrègent et se déstabilisent.

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

**Tableau 20 : Potentiel zêta exprimé en mV (N.D. = non déterminé), en fonction de la teneur en matière grasse (MG), de la teneur en protéines (MP), de la température d'acidification, du mode d'acidification et du pH. Plus la couleur des cases est claire, plus le potentiel zêta tend vers des valeurs positives. L'écart-type est indiqué entre parenthèses.**

Teneur en MG	Teneur en MP	Température	Acide	pH						
				3,7	4,6	4,8	5,2	5,8	6,2	6,7
0 %	3,2 %	42°C	citrique	2,9 (±0,4)	-4,8 (±0,3)	-5,2 (±0,9)	-8,6 (±0,4)	-15,1 (±0,4)	-16,8 (±0,7)	-17,3 (±0,8)
			lactique	3,7 (±0,8)	-2,9 (±0,8)	-3,0 (±0,7)	-5,7 (±0,3)	-13,8 (±0,4)	-14,8 (±1)	-17,1 (±0,7)
			ferment	-4,0 (±1)	-3,0 (±0,3)	-5,8 (±0,1)	-8,1 (±0,3)	-13,9 (±1,5)	-15,9 (±1)	-18,7 (±0,2)
		8°C	citrique	1,6 (±1)	-5,6 (±0,7)	-8,3 (±2,1)	-11,9 (±0,9)	-14,2 (±0,7)	-16,7 (±1,1)	-18,7 (±1)
			lactique	5,1 (±0,3)	-3,2 (±1,2)	-4,4 (±1)	-10,3 (±0,4)	-12,6 (±0,6)	-17,0 (±2,1)	-18,3 (±0,3)
			citrique	1,4 (±0,2)	-3,4 (±0,2)	-4,3 (±0,6)	-7,4 (±0,8)	-10,5 (±0,1)	-12,4 (±0,4)	-12,7 (±3,3)
	7 %	42°C	lactique	2,7 (±0,5)	-1,7 (±0,3)	-3,2 (±0)	-5,0 (±0,5)	-10,5 (±0,4)	-12,5 (±0,5)	-11,7 (±0,1)
			ferment	1,9 (±1)	-1,0 (±0,8)	-4,0 (±0,3)	-6,6 (±2,4)	-11,0 (±1,3)	-13,0 (±1)	-11,2 (±3,0)
			citrique	0,8 (±0,1)	-3,6 (±0,8)	-5,6 (±0,9)	-9,0 (±1,3)	-12,0 (±2,1)	-12,1 (±1,2)	-11,9 (±3,5)
		8°C	lactique	1,7 (±1,2)	-0,7 (±0,9)	-3,0 (±0,3)	-10,0 (±1,1)	-11,0 (±0,6)	-12,0 (±1)	-14,1 (±3,8)
			citrique	2,8 (±0,9)	-2,9 (±0,8)	-4,1 (±0,4)	-8,0 (±0,5)	-14,4 (±1,1)	-16,6 (±1,1)	-17,6 (±0,9)
			lactique	N.D.	N.D.	-3,1 (±0,4)	-5,3 (±0,4)	-12,5 (±0,7)	-15,3 (±0,8)	-16,8 (±0,8)
12 %	3,2 %	42°C	ferment	1,86 (±1,6)	N.D.	-4,2 (±0,6)	-7,1 (±0,6)	-10,6 (±0,7)	-14,5 (±0,8)	-16,0 (±0,7)
			citrique	3,7 (±0,5)	-2,6 (±1,1)	-5 (±0,5)	-9,4 (±0,6)	-13,4 (±0,1)	-16,2 (±0,2)	-17,9 (±0,7)
			lactique	5 (±1,1)	-3 (±1,1)	-2 (±0,7)	-10,5 (±0,3)	-15 (±0,7)	-16 (±,5)	N.D.
		8°C	citrique	N.D.	N.D.	-4 (±0,7)	-7,3 (±0,7)	-9 (±0,4)	N.D.	N.D.
			lactique	N.D.	N.D.	-2,5 (±0,5)	-5,4 (±0,6)	-8,4 (±0,3)	N.D.	-10,2 (±0,6)
			ferment	N.D.	N.D.	N.D.	-5,8 (±0,3)	-8,0 (±0,5)	N.D.	-10,5 (±0,6)
	7 %	42°C	citrique	N.D.	N.D.	-5,2 (±0,6)	-7,3 (±0,4)	-9,9 (±0,5)	-10,2 (±1,3)	-11,1 (±0,8)
			lactique	N.D.	N.D.	N.D.	-3,8 (±0,4)	-9 (±0,9)	-9,8 (±0,5)	-10,2 (±0,8)
			ferment	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		8°C	citrique	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
			lactique	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

### 1.1.3.1. Influence du pH

Pour les échantillons contrôles (pH supérieur à 6,5) contenant 0 % de matière grasse et 3,2 % de protéines, le potentiel zêta était inférieur à -17 mV (cases noires dans le Tableau 20). Cette valeur est comparable à celles obtenues dans la littérature (Pearce 1976 ; Dalglish 2011).

Ensuite, avec la baisse du pH, le potentiel zêta devenait progressivement moins négatif, et ce quels que soient la température d'acidification, la teneur en matière grasse ou en protéines ou le mode d'acidification (Tableau 20). Ces résultats étaient concordants avec ceux de Darling & Dickson (1979) qui rapportaient que le potentiel zêta était moins négatif sur la gamme de pH allant de 6,9 à 5,4.

Le potentiel zêta ne semblait pas s'annuler à pH 4,6,  $pH_i$  théorique des caséines. Cela était probablement dû aux difficultés de mesure sur des échantillons contenant peu de « micelles » de caséines ou à cause de l'environnement minéral (dispersant correspondant à l'ultrafiltrat de l'échantillon acidifié).

Enfin, le potentiel zêta atteignait +5,1 mV pour un pH de 3,7 dans la formule contenant 0 % de matière grasse et 3,2 % de protéines acidifiée à 8°C avec de l'acide lactique, par exemple.

### 1.1.3.2. Influence de la température d'acidification

Quelles que soient les conditions, l'impact de la température d'acidification ne semblait pas significatif (Tableau 20). Toutefois, le potentiel zêta tendait à être moins négatif à 42 qu'à 8°C, en particulier pour des pH situés entre 4,6 et 5,8. Par exemple, aux pH 4,6, 4,8 et 5,2 dans la formule sans matière grasse contenant 3,2 % de protéines et acidifiée avec de l'acide citrique (Tableau 20), les potentiels zêta mesurés étaient respectivement de -4,8, -5,2 et -8,6 mV à 42°C contre -5,6, -8,3 et -11,9 mV à 8°C. À notre connaissance, aucune publication n'a rapporté de résultats au sujet de l'impact de la température d'acidification sur le potentiel zêta de micelles de caséines à 20°C.













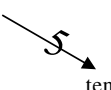
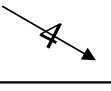



### 1.1.4. Approche multifactorielle

Afin de prendre en considération l'ensemble du jeu de données et d'étudier à la fois l'impact du pH, de la température d'acidification, de la teneur en matière grasse, de la teneur en protéines et du mode d'acidification (soit 140 combinaisons) sur les variables de mesures qu'étaient l'indice de stabilité, le potentiel zêta et les teneurs en minéraux solubles, des traitements statistiques et plus particulièrement des Anovas ont été réalisées (Tableau 21). Chaque colonne correspond à une Anova avec une valeur  $p$ , couramment nommée  $p$ -value, inférieure à  $2,2 \cdot 10^{-16}$ . À moins que leurs  $p$ -values soient au moins aussi petites que celles des facteurs principaux, les interactions étaient négligées.

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

Tableau 21 : Impact des conditions d'acidification (B = pH, teneurs en protéines et en matière grasse, température ou mode d'acidification) sur les caractéristiques micellaires (A = indice de stabilité, potentiel zêta, calcium ou phosphore solubles « standardisés »). Chaque colonne correspond à une Anova avec une  $p$ -value  $< 2,2.10^{-16}$ . \*\*\* correspond à une  $p$ -value  $< 1.10^{-3}$ . Une grosse flèche avec le chiffre 1 indique que la condition B a l'effet le plus fort sur la caractéristique A, une flèche moyenne avec le chiffre 2 indique que la condition B a le deuxième effet le plus fort sur A, une petite flèche avec le chiffre 3 indique le troisième effet B le plus fort sur A, etc. Si la flèche est ascendante, cela signifie que A augmente avec B et si la flèche est descendante, cela signifie que A augmente quand B diminue.

A B	Indice de stabilité	Potentiel zêta	Calcium soluble « standardisé »	Phosphore soluble « standardisé »
pH	 ***	 ***	 ***	 ***
Température	 ***	 ***	 tendance	 tendance
Teneur en protéines	 tendance	 ***	Pas d'impact	Pas d'impact
Teneur en matière grasse	Pas d'impact	 tendance	Pas d'impact	Pas d'impact
Acide citrique (versus acide lactique)	Pas d'impact	 ***	 ***	 tendance
Ferments (versus acide lactique)	Pas d'impact	 ***	Pas d'impact	Pas d'impact
interactions	pH * teneur en protéines	pH * teneur en matière grasse	acide citrique * teneur en protéines	-
Degrés de liberté	140	558	175	177
R <sup>2</sup> ajusté	0,79	0,63	0,84	0,90



## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

Les impacts du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse et de la nature de l'acide sur l'indice de stabilité sont rapportés dans la deuxième colonne du Tableau 21. Le modèle obtenu était de bonne qualité ( $R^2$  ajusté = 0,79) et confirmait que la stabilité de la formule diminuait quand le pH et la teneur en protéines diminuaient et quand la température augmentait. Aucune différence significative n'était mise en évidence selon la teneur en matière grasse ou le mode d'acidification. Une interaction entre le pH et la teneur en protéines apparaissait.

De plus, pH, température d'acidification, teneur en protéines, mode d'acidification avaient un impact significatif sur le potentiel zêta (Tableau 21). Le modèle testé était de qualité moyenne ( $R^2$  ajusté = 0,63) et confirmait que le potentiel zêta était significativement moins négatif quand le pH diminuait, la teneur en protéines augmentait, la température augmentait ou si de l'acide citrique ou une fermentation était utilisée au lieu d'un ajout d'acide lactique. L'ajout de matière grasse tendrait à diminuer le potentiel zêta. Il y avait une interaction entre pH et matière grasse car certaines analyses, aux pH très acides, n'ont pu être réalisées. En effet, malgré une filtration préalable à 0,8  $\mu\text{m}$ , la mesure de potentiel zêta était difficile en présence de matière grasse, et encore plus à pH très acide. Lorsque le traitement statistique était appliqué uniquement au jeu de données issues des formules dépourvues de matière grasse, les résultats étaient similaires mais la qualité du modèle augmentée ( $R^2$  ajusté = 0,93) (résultats non montrés).

De même, les possibles impacts du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéine et en matière grasse et de la nature de l'acide sur les teneurs en calcium et en phosphore solubles ont été étudiés statistiquement. Les modèles appliqués étaient de bonne qualité (respectivement  $R^2$  ajusté = 0,82 et 0,90 pour le calcium et le phosphore). Ils confirmaient que les teneurs en calcium et phosphore solubles augmentaient quand le pH diminuait. De plus, les teneurs en calcium et phosphore solubles étaient significativement et respectivement inférieure et supérieure en présence d'acide citrique *versus* acide lactique. La différence entre fermentation et ajout d'acide lactique était en revanche négligeable. Ce traitement statistique confirmait également l'absence d'impact de la teneur en matière grasse sur les teneurs en calcium et en phosphore solubles. En ce qui concerne la température d'acidification et la teneur en protéines, aucun effet significatif sur les teneurs en calcium et

en phosphore solubles n'était validé statistiquement. Une simple tendance montrant que les teneurs en minéraux solubles augmentaient à froid était suggérée par le modèle statistique. Celle-ci apparaissait quand les données des formules additionnées de 12 % de matière grasse étaient prises en considération (Tableau 21). Des interactions étaient révélées par l'Anova. Pour le calcium soluble, elle apparaissait entre l'acide citrique et la teneur en protéines. Une reprecipitation plus importante du calcium soluble « standardisé » avait lieu dans la formule contenant 7 % de protéines et acidifiée avec l'acide citrique. Pour le phosphore soluble, l'interaction apparaissait entre la teneur en protéines et le pH. En effet, pour un pH supérieur ou égal à 5,2, il y avait davantage de phosphore soluble « standardisé » dans la formule contenant 3,2 % de protéines comparée à la formule enrichie. En revanche, pour un pH inférieur à 5,2, c'était dans la formule contenant 7 % de protéines qu'il y avait davantage de phosphore soluble « standardisé ». Koutina *et al.* (2014) ont également rapporté que les équilibres minéraux étaient très sensibles aux fluctuations de pH, de teneurs en protéines ou de température par exemple.

### **1.1.5. Étude de la stabilité des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique UHT : point de départ pour la phase 2**

Quelle que soit la composition de la formule (teneurs en protéines ou en matière grasse), la température d'acidification (8 ou 42°C) ou le mode d'acidification (ajout direct d'acide lactique ou d'acide citrique ou fermentation), dès pH 6,2 (point d'acidification le plus élevé de la gamme étudiée dans la phase 1), à l'échelle pilote le traitement thermique de 120°C pendant 12 secondes entraînait une déstabilisation du système. Celle-ci se traduisait par la formation de grains (parfois bruns-orangés en raison du « gratinage » dans le tube de chambrage) en sortie d'équipement voire d'un colmatage de ce dernier pour des pH inférieurs (par exemple pH 5,8). Les indices de stabilité thermique étaient donc invariablement inférieurs à 35 %.

### 1.2. Discussion (phase 1)

#### 1.2.1. Influence du pH

L'impact du pH s'explique essentiellement par la réduction des charges négatives sur les caséines due à la protonation des groupements ionisables, notamment les groupements carboxyliques et phosphate (*Chapitre 1*).

Comme attendu, la diminution du pH a impacté négativement l'indice de stabilité (Tableau 19 et Tableau 21) : les solutions se déstabilisaient d'autant plus que le pH était bas. Jusqu'à pH 6,2, les micelles de caséines étaient insuffisamment déstabilisées pour sédimenter lors de leur centrifugation. L'indice de stabilité était alors supérieur à 85 % (cases noires du Tableau 19). Les micelles de caséines contenaient les plus hautes teneurs en phosphate de calcium et présentaient une charge nette très négative.

Avec la baisse du pH, la charge négative nette des caséines était progressivement réduite (diminution du potentiel zêta). Les micelles se repoussant moins, une agrégation des micelles de caséines par interactions hydrophobes et interactions hydrogène et électrostatiques était induite (Béal & Sodini 2003). De plus, les nanoclusters de phosphate de calcium étaient solubilisés et donc les liaisons entre caséines étaient affaiblies (Figure 40 à Figure 43). Les caséines étant moins maintenues entre elles (*Chapitre 1*), la stabilité micellaire diminuait. Comme la taille des agrégats était plus grande que celle des micelles de caséines individuelles, les agrégats sédimentaient par centrifugation et l'indice de stabilité diminuait (Tableau 19).

En diminuant encore plus le pH (jusqu'à pH 3,7 par exemple), le potentiel zêta devenait positif car la protonation des résidus portés par les caséines se poursuivait. Celui-ci n'avait cependant pas une valeur assez élevée pour permettre une « resolubilisation » des caséines agrégées et une hypothétique augmentation de l'indice de stabilité.

### 1.2.2. Influence de la température d'acidification

Une augmentation de la température d'acidification (8 *versus* 42°C) conduisait à une diminution de l'indice de stabilité (Tableau 19 et Tableau 21) et à une augmentation du potentiel zêta (Tableau 20 et Tableau 21). Plusieurs hypothèses peuvent être discutées :

1) **Le pH dépend de la température.** Celui associé aux échantillons correspondait au pH mesuré à la température de l'acidification (avec un pH-mètre étalonné sur des solutions tampon de même température). Or, une fois revenu à 25°C, le pH avait tendance à être légèrement inférieur pour l'acidification à 8°C et supérieur pour l'acidification à 42°C. Par conséquent, cette légère différence n'allait pas dans le sens d'une déstabilisation acide favorisée à « chaud ».

2) L'augmentation de la température, et donc de la **mobilité brownienne**, augmenterait la fréquence des collisions et favoriserait donc davantage les interactions entre caséines à 42 plutôt qu'à 8°C.

3) D'après Koutina *et al.* (2014), des cassures/ouvertures dans la structure micellaire ou des réarrangements entre caséines seraient plus susceptibles de se produire à chaud qu'à froid. De plus, les **interactions hydrophobes** augmenteraient avec l'élévation de la température (Koutina *et al.* 2014), ce qui expliquerait une agrégation favorisée à 42°C (*versus* 8°C).

4) La **solubilisation de la caséine  $\beta$**  lors de l'acidification à 8°C (Pierre & Brulé 1981), bien que réversible, pourrait aussi changer la répartition des charges à la surface des micelles. Ces modifications expliqueraient pourquoi le potentiel zêta, bien que mesuré à 20°C, était plus négatif pour une acidification à 8 qu'à 42°C. Il est aussi possible que cette dissociation partielle de la caséine  $\beta$  à 8°C modifie la structure micellaire, la rendant plus « malléable » et donc moins sensible à une déstabilisation (Marchin *et al.* 2007).

5) La **solubilisation des minéraux** par acidification pourrait être qualitativement différente à froid pour des raisons **cinétiques**. Plus progressive, elle pourrait permettre une réorganisation des caséines permettant une plus grande stabilité micellaire. Cependant, d'après Liu *et al.* (1993), ce processus est assez rapide dans tous les cas.

6) À basse température (autour de 8°C), la teneur en minéraux solubles tendait à être supérieure. La force ionique tendrait donc à être supérieure, les sérines (résidus polaires)

pourraient être plus exposées, les micelles de caséines seraient plus « relâchées », les répulsions stériques et électrostatiques stabiliseraient ainsi la suspension.

### 1.2.3. Influence de l'ajout de matière grasse

Visuellement, les échantillons avec matière grasse et acidifiés semblaient plus stables que les échantillons écrémés et acidifiés (Figure 38). Toutefois, cet aspect plus homogène à l'échelle macroscopique serait dû aux caractéristiques physiques de l'émulsion. L'ajout de matière grasse augmentait la viscosité de la formule et la présence de globules gras tendrait à favoriser la constitution de petits agrégats lipoprotéiques répartis dans la suspension laitière. Ainsi, dans les formules écrémées, les protéines déstabilisées « sédimentaient » rapidement alors qu'avec matière grasse les protéines adsorbées aux globules gras et déstabilisées « crémaient » (densité de la matière grasse de 0,9) (Figure 44). En réalité, l'indice de stabilité diminuait à l'instar des formules écrémées car l'application d'une force centrifuge (3 000 g pendant 20 minutes) rendait négligeable cette différence. De plus, la teneur en matière sèche étant supérieure, l'espace disponible pour les micelles serait moindre et l'agrégation finalement favorisée (Figure 44).

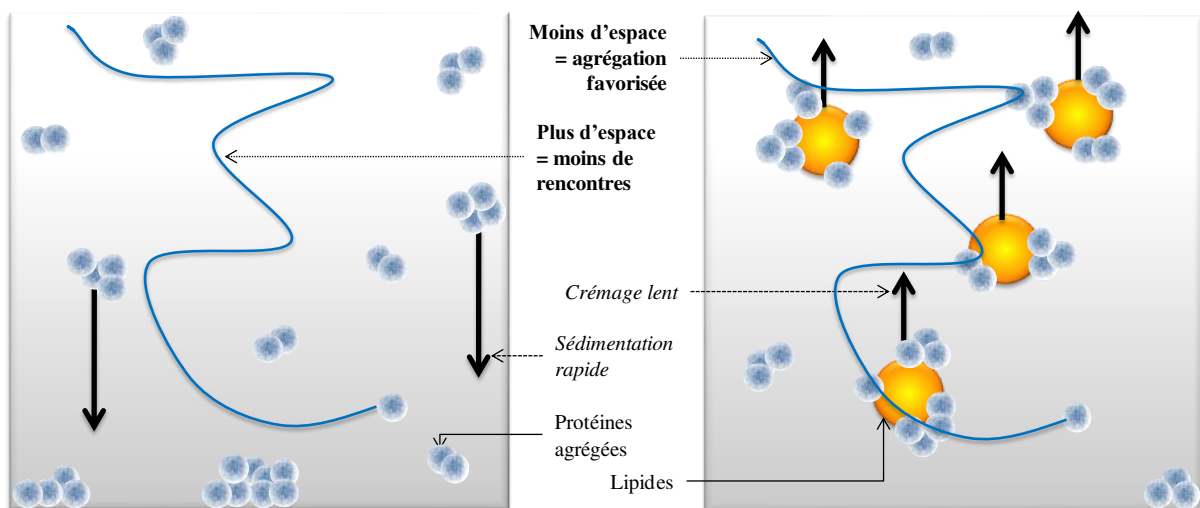


Figure 44 : Schéma de l'impact probable de la matière grasse (ronds jaunes, à droite) sur une formule protéique acidifiée.

L'absence d'impact de la matière grasse sur la teneur en minéraux solubilisés était attendue puisque son apport ne pouvait en rien changer les équilibres minéraux, *a priori*.

L'absence d'impact sur le potentiel zêta peut se justifier par une absence d'interaction de la matière grasse avec les charges des micelles. L'adsorption des micelles de caséines sur la surface des gouttelettes lipidiques lors de l'homogénéisation ne modifierait pas leur propre potentiel de surface. Une autre hypothèse consisterait à supposer que les charges des globules gras entreraient en jeu et masqueraient les effets sur les charges des protéines. Il faut toutefois noter que, même s'il ne peut être assuré qu'aucune matière grasse résiduelle n'était présente, la mesure de potentiel zêta se faisait après filtration à 0,8 µm afin de quantifier le potentiel de surface des micelles et non celui des gouttelettes lipidiques. Cela impliquait néanmoins aussi une modification de l'environnement des caséines.

À froid, une plus grande solubilité des minéraux est rapportée dans la littérature scientifique (Koutina *et al.* 2014). Dans notre cas, celle-ci est peu visible puisque les échantillons sont stabilisés à 25°C après acidification et avant filtration. En revanche en présence de matière grasse, une légère augmentation peut être relevée. Cela pourrait être :

- causé par un rééquilibrage plus long dans cette formule plus complexe ou
- mis en relation avec une plus grande concentration en minéraux solubles dans l'ultrafiltrat en présence de matière grasse (volume d'exclusion corrigé par le calcul après analyse), ce qui accentuerait des phénomènes non significatifs dans une formule écrémée.

### 1.2.4. Influence de la teneur en protéines

Comme attendu, il y avait davantage de minéraux dans la formule contenant 7 % de protéines que dans celle en contenant 3,2 % (Figure 40 à Figure 43). Cette augmentation était due à la plus grande quantité de poudre de lait écrémé ajoutée et donc à la plus grande force ionique dans la formule enrichie (environ 134 contre 71 mmol.L<sup>-1</sup> respectivement pour les formules à 7 contre 3,2 % de protéines, d'après une simulation avec le logiciel Milk Salt GLM (INRA, Rennes, France)).

.....

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines lactières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

Le potentiel zêta était moins négatif avec 7 % de protéines qu'avec 3,2 % (Tableau 20 et Tableau 21). L'écrantage des charges dû aux minéraux en concentration supérieure dans la formule enrichie impliquerait cette charge de surface supérieure pour les micelles de caséines de la formule à 7 % de protéines (*versus* 3,2 %).

Pour pouvoir comparer les équilibres dans des formules aux teneurs en protéines différentes, les teneurs en minéraux solubles ont été « standardisées » (*Chapitre 2 – paragraphe 3.5. Mesures des teneurs en minéraux totaux ou solubles*). Même si ce n'était pas significatif, une tendance à avoir proportionnellement moins de minéraux solubilisés dans les formules contenant 7 % que dans celles contenant 3,2 % de protéines a été observée (Tableau 21). Une hypothèse pour expliquer cette moindre déminéralisation micellaire dans la formule enrichie en protéines pourrait se fonder sur la constante de solubilité. Celle-ci n'étant pas modifiée et le lait étant déjà saturé, les concentrations en minéraux de la phase soluble ne pourraient augmenter linéairement avec la concentration en protéines. D'autre part, d'après Gastaldi *et al.* (1997), le pouvoir tampon maximal était augmenté et déplacé vers des valeurs de pH plus faibles avec l'augmentation de la teneur en protéines. Si une moindre solubilisation minérale pour un pH donné était observée avec une concentration en protéines plus élevée, cela pourrait signifier que ce sont d'abord les résidus des protéines qui fixeraient les ions H<sup>+</sup>. De plus, cette différence en minéraux solubles était observée pour un pH supérieur à 5,2, ce qui correspondait globalement au pH-seuil de déstabilisation. Le phosphate de calcium colloïdal serait donc moins impacté par l'acidification grâce au pouvoir tampon des protéines. C'est la moindre déminéralisation micellaire qui expliquerait une meilleure résistance de la structure des micelles face à la déstabilisation acide dans une formule plus concentrée en protéines (7 % *versus* 3,2 %, Tableau 19 et Tableau 21).

Finalement, pour qu'un enrichissement en protéines entraîne une déstabilisation plus rapide du système (ce qui est couramment admis), il faudrait probablement se rapprocher de teneurs plaçant le système dans une configuration de *close-packing* (au moins 150 g.L<sup>-1</sup> de PPCN, Bouchoux *et al.* 2009).

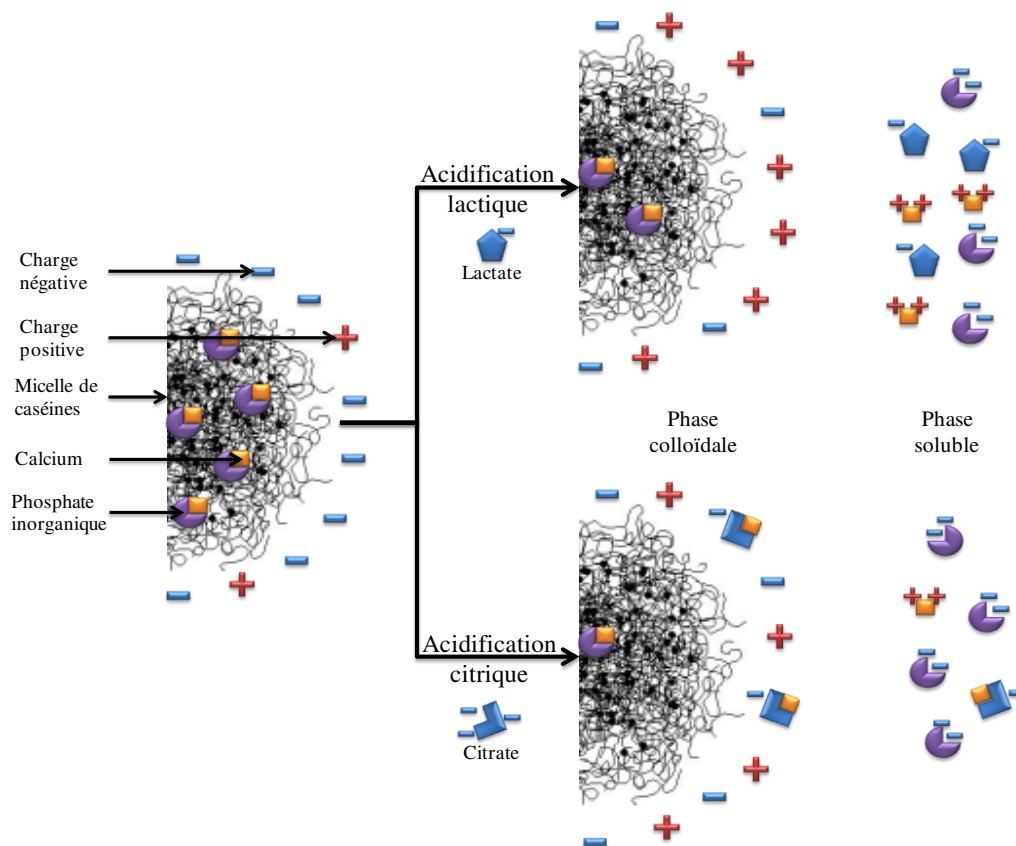
### 1.2.5. Influence du type d'acide

Le mode d'acidification impactait à la fois le potentiel zêta et les teneurs en calcium et phosphore solubilisés (*Chapitre 3 – paragraphes 1.1.2.5 et 1.1.3.5*). Ces différences entre acides pourraient être reliées à leurs propriétés chimiques.

L'acide citrique est un chélateur du calcium avec trois  $pK_a$  : 3, 4,1 et 4,8 dans le lait (Walstra & Jenness 1984). Il favorisait donc la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal. La teneur en phosphate solubilisé apparaissait statistiquement supérieure dans le cas d'une acidification avec cet acide plutôt qu'avec l'acide lactique (Tableau 21). La teneur en calcium était inférieure dans la phase soluble. Les ions  $Ca^{2+}$  pourraient former avec le citrate des complexes chargés négativement. Deux hypothèses pourraient expliquer pourquoi le potentiel zêta était plus négatif avec l'acide citrique qu'avec l'acide lactique pour un même pH :

1. D'après Pitowksi *et al.* (2008) cette différence serait due à une réduction des interactions entre les résidus phosphoséryl et le calcium.
2. Le complexe anionique citrate de calcium serait en interaction avec les résidus de caséines chargés positivement en raison de l'acidification (Figure 45).





**Figure 45 :** Schématisation hypothétique de l'impact de la nature de l'acide sur la micelle lors d'une baisse de pH. Le complexe anionique citrate de calcium (bloc bleu et orange) serait en interaction avec les résidus de caséines chargés positivement en raison de l'acidification. Avec l'acide lactique, les ions calcium ayant quitté la structure micellaire et le lactate seraient dans la phase soluble ce qui ne limiterait pas l'augmentation du potentiel zêta.

Les différences observées entre les échantillons acidifiés chimiquement et biologiquement (potentiel zêta plus négatif avec fermentation au lieu d'ajout d'acide lactique par exemple) s'expliqueraient par une cinétique d'acidification très différente. La vitesse d'acidification affecterait les cinétiques de solubilisation du phosphate de calcium colloïdal, de dissociation des caséines, d'agrégation/coagulation des micelles altérées ce qui conduirait à des « gels » organisés différemment. Avec l'ajout d'acide, le pH final du système pouvait être atteint plus rapidement que par fermentation (quelques minutes *versus* quelques heures). Malgré l'agitation, l'acidification serait relativement localisée, modifierait les micelles de manière hétérogène. Le système aurait moins le temps de se réorganiser face à l'ajout instantané d'acide. Avec la fermentation et donc une production d'acide *in situ*, l'acidification

serait plus homogène et progressive. Elle modifierait un plus grand nombre de micelles mais dans une moindre mesure.

### 1.2.6. Approche holistique de l'indice de stabilité

L'étude de chaque facteur de formulation ou procédé, successivement, a permis de proposer des hypothèses explicatives pour comprendre leurs effets individuellement sur chaque caractéristique micellaire mesurée (stabilité, charge et minéralisation) ; mais les données obtenues pouvaient être traitées d'une manière différente. Une modélisation de l'indice de stabilité en relation avec les mesures de pH, potentiel zêta et teneurs en minéraux solubilisés a aussi été tentée. Une régression multiple avec ces trois facteurs explicatifs mettait en évidence l'impact significatif du pH ( $p$ -value du modèle  $< 2.10^{-16}$  et  $Pr_{pH} (>|t|) = 1,9.10^{-5}$ ) mais la qualité de ce modèle n'était pas très élevée ( $R^2$  ajusté = 0,63). Le deuxième facteur le plus important était le potentiel zêta.

Pouvoir proposer un modèle statistique permettant de prédire la stabilité des micelles, par exemple au travers de l'indice de stabilité, pour tous types de facteur de formulation ou de procédé constituait une perspective désirable. Pouvoir déterminer quels facteurs avaient le plus de poids semblait également intéressant. Un premier essai a été tenté à partir des données acquises au cours de ce travail. La connaissance du pH, de la teneur en protéines et de la température donnait des indications quant à la stabilité du système laitier (Tableau 21). La déstabilisation du système était davantage probable quand le pH était bas et/ou quand la teneur en protéine était faible et/ou quand la température d'acidification était élevée (dans les gammes étudiées ici). De plus, l'impact du pH était le plus important dans le mécanisme de déstabilisation des micelles ; même s'il pouvait être influencé par la teneur en protéines et la température. La nature de l'acide (ajout d'acide citrique et fermentation *versus* addition d'acide lactique) n'était pas un facteur majeur quand l'ensemble des résultats était pris en compte dans une analyse globale des données. Elle avait un impact moindre sur l'indice de stabilité (non significatif à un niveau de 0,1 %). Il en était de même pour la teneur en matière grasse. Comme dans les modèles précédents, une interaction pH-protéines apparaissait.

### 1.3. Conclusion de la phase 1

Cette première phase a permis d'étudier l'impact de cinq facteurs sur la stabilité de suspensions laitières acidifiées : le pH, la température, les teneurs en matière grasse et en protéines et le mode d'acidification. Six faits marquants peuvent être retenus des expérimentations menées :

- 1) La **baisse du pH a conduit à une précipitation des caséines** qui devenaient progressivement moins chargées, moins minéralisées et ainsi déstabilisées.
- 2) La formule laitière était **plus stable quand elle était acidifiée à 8 qu'à 42°C**. Les explications possibles mettaient principalement en jeu les différences au niveau de la solubilisation minérale et des interactions (notamment hydrophobes) entre caséines.
- 3) Le potentiel **zêta était différemment impacté par la nature de l'acide** : moins négatif avec de l'acide lactique au lieu de l'acide citrique. Les propriétés chimiques des acides (pouvoir chélatant,  $pK_a$  et cinétique de diffusion) ont été proposées comme clés explicatives.
- 4) Les formules **enrichies en protéines (teneur de 7 versus 3,2 %) étaient plus stables face à l'acidification**. Cette différence s'expliquerait par des teneurs en minéraux supérieures (en particulier dans les micelles) dans la formule à 7 %.
- 5) Bien que la matière grasse permette de garder des échantillons acidifiés visuellement homogènes, les micelles de caséines étaient déstabilisées comme dans les formules écrémées. La **matière grasse intervenait uniquement d'un point de vue structurel** (émulsion et crémage plutôt que sédimentation à pH très acide) et non biochimique (inerte vis-à-vis de l'acidification des micelles).
- 6) Quelles que soient les conditions d'acidification choisies, à l'échelle pilote, les échantillons étaient **tous déstabilisés par un traitement thermique ultra-haute température dès pH 6,2** (premier point de la gamme d'acidification).

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 1 : Étude de la déstabilisation, à échelle pilote, des protéines laitières acidifiées : influence du pH, de la température d'acidification, des teneurs en protéines et en matière grasse, de la nature des acides et impact du traitement UHT

.....

Ainsi, cette étude a montré qu'il était possible de moduler la stabilité des protéines laitières en fonction des facteurs de formulation et procédé. Cela nous a permis de poser un cadre pour la suite de la thèse en fixant des conditions d'acidification pour l'étude des voies de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique UHT. En effet, en considérant que les solutions de stabilisation thermique efficaces dans les « **pires conditions d'acidification** » le seraient tout autant dans des conditions plus favorables, les paramètres suivants ont été conservés pour la phase 2 :

*un ajout direct d'acide lactique, à 42°C, dans une formulation contenant 3,2 % de protéines et sans matière grasse.*

L'impact de la teneur en matière grasse semblait négligeable (mais celle-ci compliquait les analyses et a donc été écartée des formulations dans la phase 2). À l'inverse, d'un point de vue industriel, **les meilleures conditions pour préserver la stabilité des protéines laitières étaient :**

*une acidification à 8°C, avec de l'acide citrique, pour des formules à 7 % de protéines.*

Pour améliorer le modèle mécanistique (voire statistique) de la déstabilisation acide, des mesures complémentaires seraient utiles : dosage des caséines dans la phase soluble, suivi cinétique de la solubilisation des minéraux, mesure de l'hydratation micellaire par exemple.

## ***2. Phase 2 : Étude de différentes voies de stabilisation des protéines lactières acidifiées face au traitement thermique ultra-haute température***

Les deux objectifs des recherches menées dans la seconde phase de la thèse étaient de :

1. trouver des solutions pour pouvoir appliquer un traitement ultra-haute température (UHT) à des produits contenant des micelles de caséines ayant un pH inférieur ou égal à 6,2 sans les déstabiliser ;
2. comprendre les mécanismes en jeu lors du traitement de stabilisation et lors du traitement UHT.

### **2.1. Stratégie de recherche des voies de stabilisation des protéines lactières acidifiées face au traitement thermique UHT**

Étant donné que les caséines sont les protéines majoritaires du lait et les plus sensibles à l'acidification, il semblait judicieux de travailler sur deux facteurs majeurs conditionnant leur stabilité en cherchant :

1. à abaisser leur pH;
2. à modifier leur environnement.

Comme exposé dans la synthèse bibliographique (*Chapitre 1 – paragraphe 3.2.1. La réaction de glycation*), la lactosylation pourrait permettre d'améliorer la stabilité des protéines acidifiées en « bloquant » les groupements porteurs de charges positives sur des acides aminés comme la lysine. Dans un premier temps, la réaction a été étudiée en système modèle (base poudre de phosphocaséinate natif (PPCN) à 25 g.L<sup>-1</sup>). Plusieurs essais ont été menés afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu (Figure 46) et de faciliter l'optimisation du traitement de stabilisation industriellement. Les questions auxquels ces expérimentations devaient répondre sont posées dans la Figure 46.

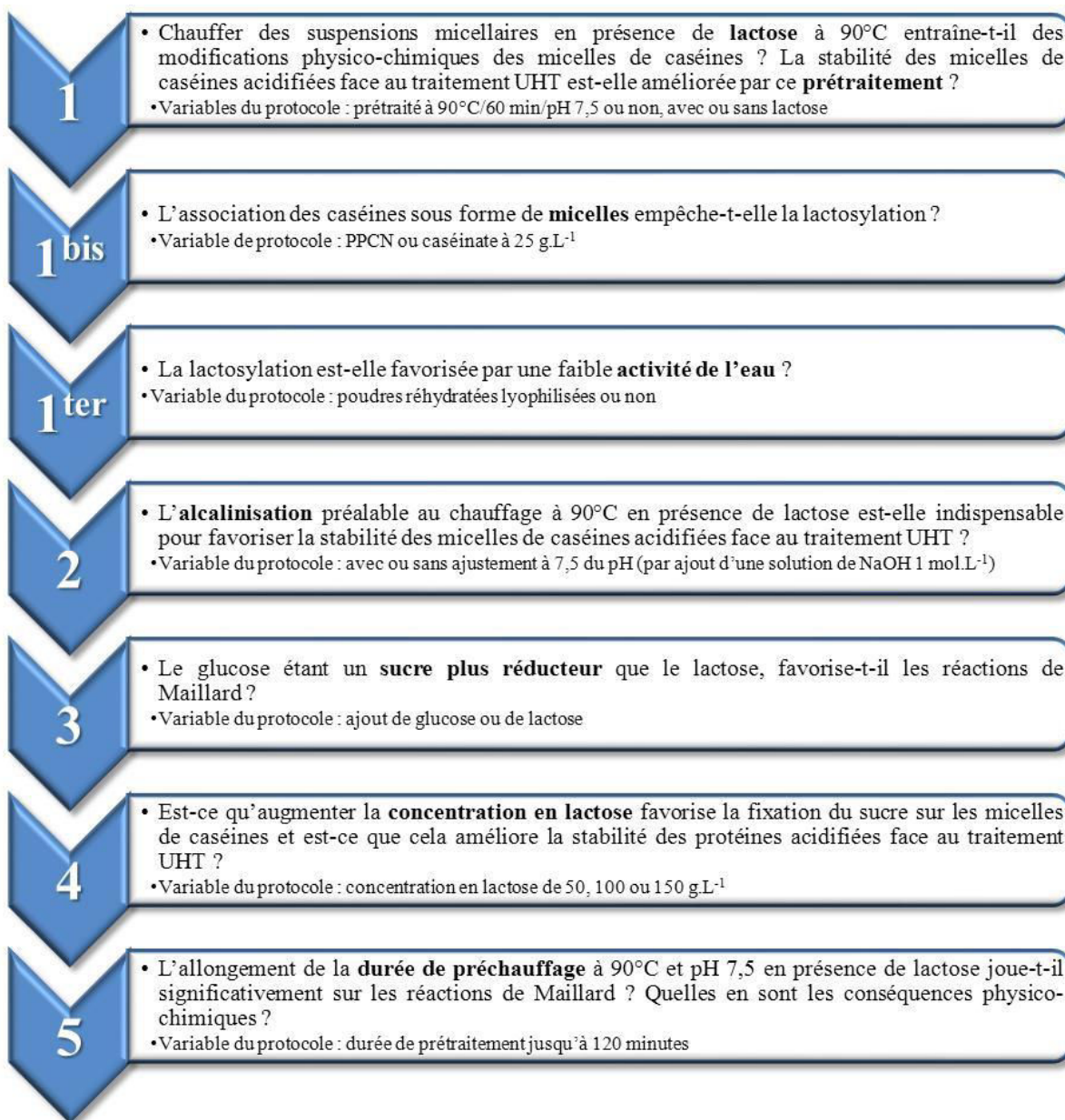
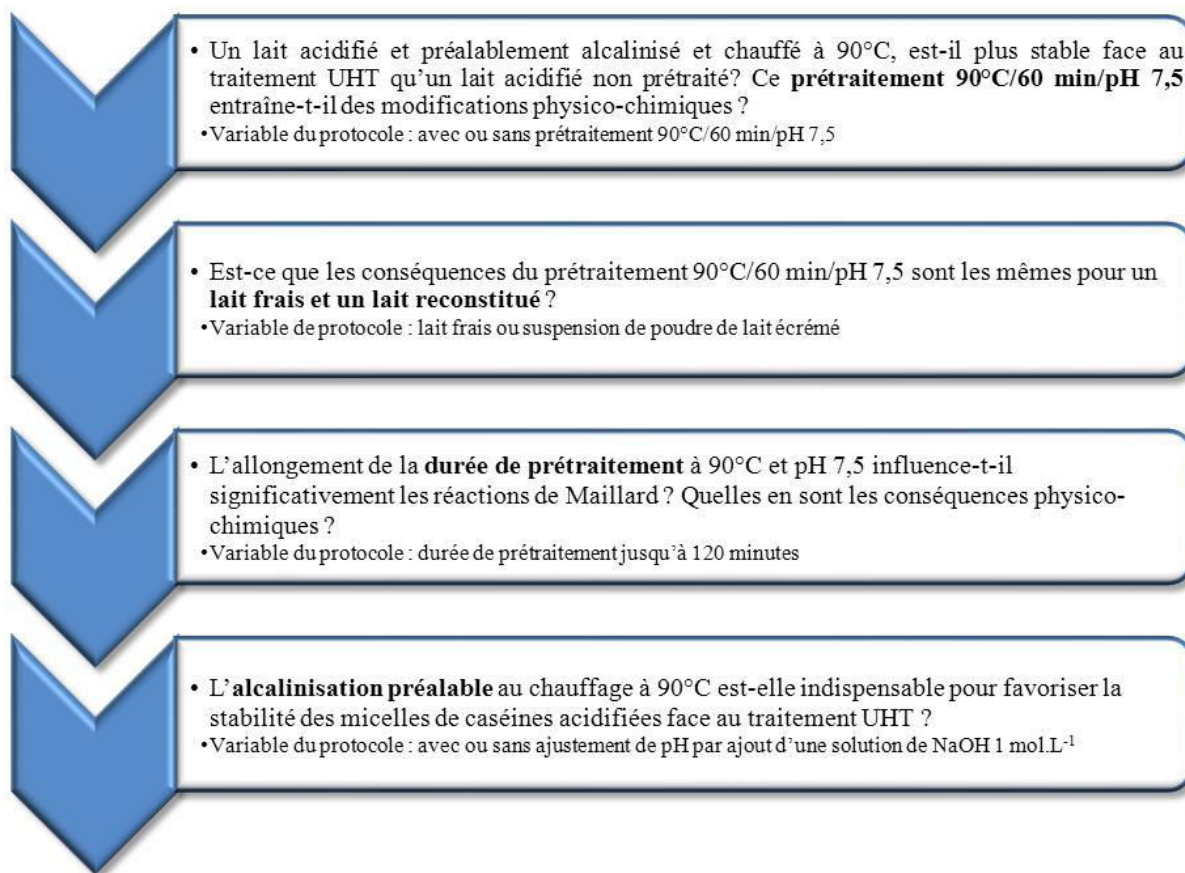


Figure 46 : Étude du traitement de lactosylation des micelles de caséines : hypothèses et facteurs testés

Comme le prétraitement thermique du PPCN en présence de lactose ne permettait pas d'atteindre des pH d'acidification assez bas (cible visée : pH 6,2) sans entraîner de déstabilisation après traitement UHT (*Chapitre 3 – phase 2 - paragraphe 2.2. Traitement de lactosylation des caséines*), des essais ont été réalisés avec du lait (*Chapitre 3 – paragraphe 2.3. Application du traitement de lactosylation sur du lait*). Cela devait également permettre de vérifier que les résultats obtenus en milieu modèle étaient transposables à des systèmes plus proches de la réalité industrielle (Figure 47).



**Figure 47 : Étude du traitement de lactosylation pour un lait : hypothèses et facteurs testés**

Comme exposé dans ce manuscrit (*Chapitre 3 – paragraphe 2.3. Application du traitement de lactosylation sur du lait*), dans le lait, les caséines acidifiées étaient effectivement plus stables face au traitement UHT après un préchauffage (en présence du lactose naturellement contenu dans le lait) à 90°C pendant 60 minutes. Par conséquent, les recherches se sont poursuivies en se concentrant sur les autres composants de cet aliment : l'azote et les minéraux. Comme pour l'étude de la lactosylation, plusieurs essais (toujours avec du PPCN) ont été menés (Figure 48).

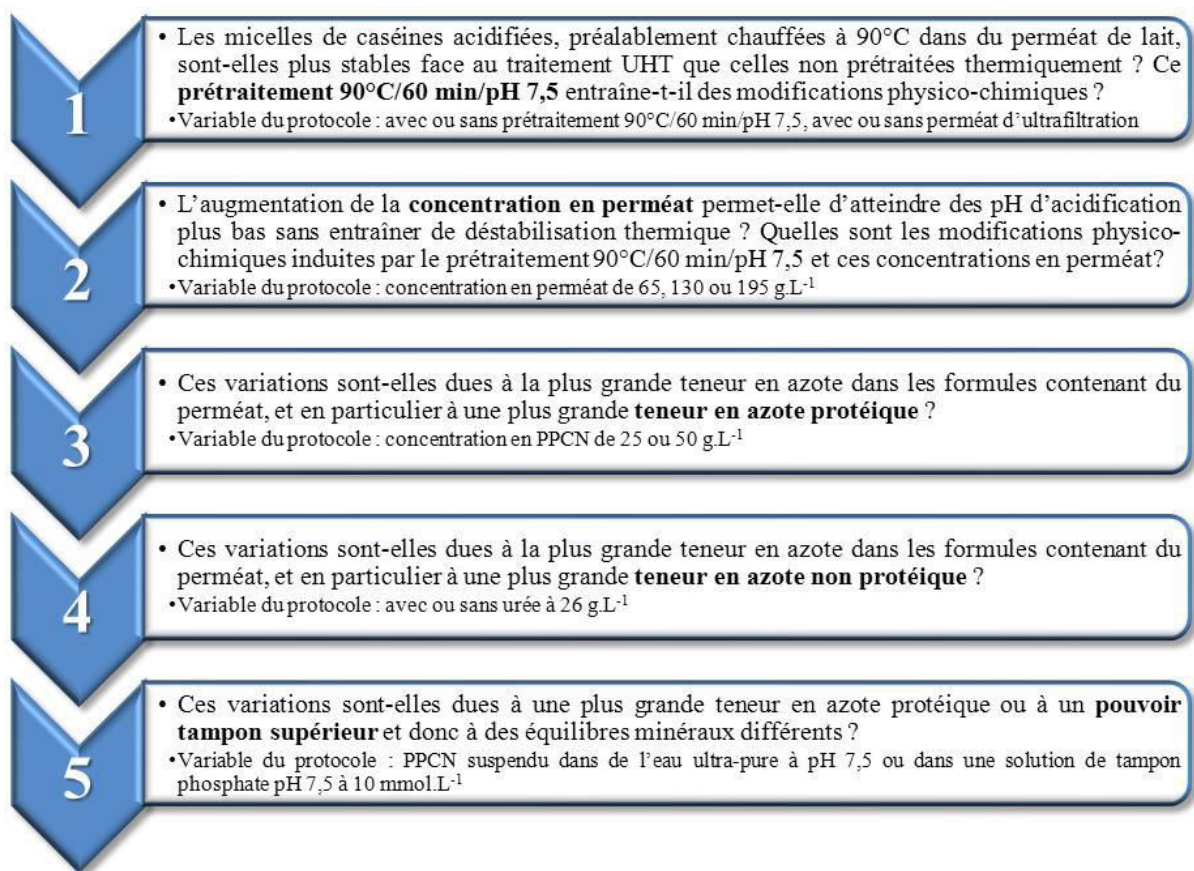


Figure 48 : Étude de l'environnement physico-chimique et notamment des rôles de l'azote et des minéraux dans le prétraitement thermique : hypothèses et facteurs testés

Ces essais ont permis de préciser les autres voies possibles de stabilisation des micelles de caséines acidifiées face au traitement thermique UHT et d'en comprendre les mécanismes.

## 2.2. Traitement de lactosylation des caséines

En chauffant du lait, la fonction réductrice du lactose pourrait réagir avec les fonctions amines des résidus des acides aminés qui en sont porteurs et ainsi diminuer le pH<sub>i</sub> des micelles de caséines. Par ailleurs, utiliser cette voie réactionnelle (plutôt aisée à mettre en place) industriellement pourrait s'intégrer dans une démarche *clean label* (pas d'ajout d'ingrédient supplémentaire puisque le lactose est naturellement présent dans le lait).



2.2.1. Étude de la lactosylation en système modèle

Afin de se focaliser sur la réaction de lactosylation des caséines, deux formules modèles contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN dans de l'eau ultra-pure ont été étudiées : sans sucre (formule témoin et contrôle de l'impact du prétraitement thermique) et avec 50 g.L<sup>-1</sup> de lactose (pour tester la fixation de ce sucre réducteur avec une concentration similaire à celle d'un lait). Les résultats obtenus sur ces deux formules sont discutés par rapport à l'impact du chauffage à 90°C puis en comparant les différences liées à la formulation.

Deux expérimentations complémentaires ont été menées : avec du caséinate (à la place du PPCN) et avec une formule lyophilisée après réhydratation (*versus* la formule témoin seulement réhydratée).

2.2.1.1. Résultats & Discussion

2.2.1.1.1. Indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile)

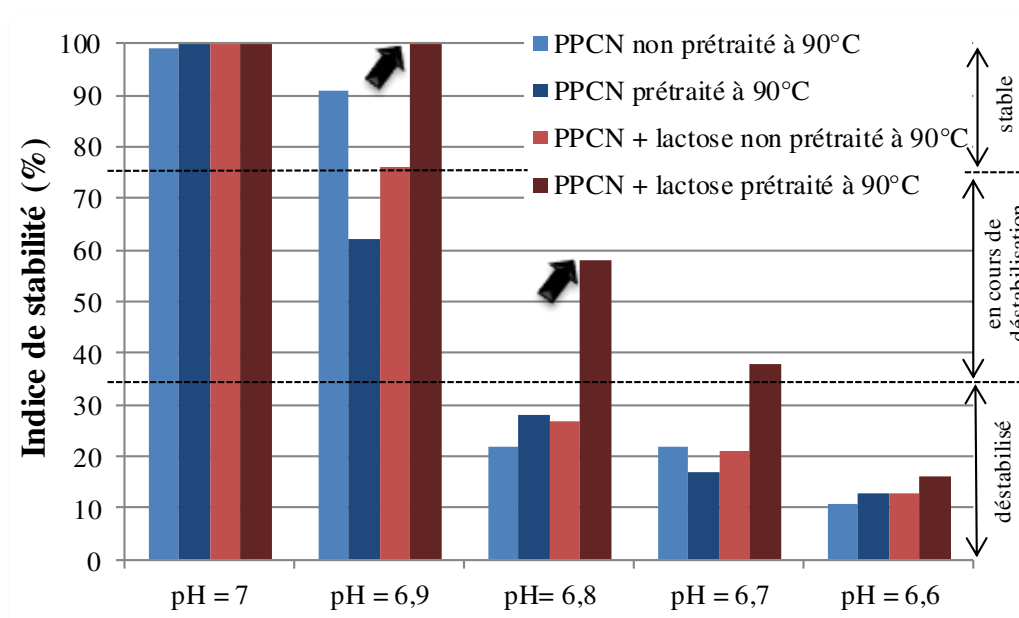


Figure 49 : Impact du prétraitement 90°C/60 min et pH 7,5 sur l'indice de stabilité thermique (traitements « UHT » réalisés en bain d'huile après acidification), en fonction du pH, dans des formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN sans (colonnes bleues) et avec (colonnes rouges) lactose

Pour la formule témoin (sans lactose), l'indice de stabilité thermique était de 91 contre 62 % à pH 6,9 respectivement sans et avec prétraitement thermique. Pour la formule contenant 50 g.L<sup>-1</sup> de lactose, l'indice était de 76 contre 100 % à pH 6,9 et de 27 contre 58 % à pH 6,8, respectivement sans et avec traitement de stabilisation. D'autre part, à pH 6,9 et sans prétraitement, l'indice de stabilité était de 91 contre 76 % pour les formules respectivement sans et avec lactose.

Par conséquent, ces résultats indiquaient que le prétraitement à 90°C pendant 60 minutes de la formule sans sucre n'améliorait pas, voire diminuait la stabilité des micelles de caséines acidifiées face au traitement UHT (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). À l'opposé, le prétraitement thermique appliqué aux formules contenant du lactose améliorait la stabilité micellaire (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). En revanche, en absence de traitement de stabilisation, l'ajout de lactose diminuait la stabilité face au traitement UHT, en particulier à pH 6,9.

Ces résultats suggéraient donc :

- 1) un effet négatif du prétraitement à 90°C pendant une heure de micelles de caséines seules, dû à des modifications thermo-induites non déterminées ;
- 2) un effet négatif du lactose en absence d'un traitement de stabilisation, probablement dû aux propriétés physico-chimiques de ce sucre et en particulier à sa capacité à réagir selon la voie de L.A. lors du traitement UHT ;
- 3) **un effet positif du prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 de micelles de caséines en présence de lactose - ce qui tendrait à valider l'hypothèse de départ** selon laquelle la lactosylation améliorerait la stabilité thermique des protéines.

D'autre part, les valeurs de pH doivent être considérées de manière relative car elles sont fortement impactées par la formulation. Ainsi, un lait non acidifié a un pH de 6,7 et n'est pas déstabilisé par un traitement UHT au contraire d'une formule à base de PPCN (dont le pH « natif » est plus élevé). L'environnement des micelles joue un rôle essentiel sur leur physico-chimie et les valeurs de pH atteintes dans les milieux modèles ne correspondaient pas aux pH « atteignables » pour des formules plus complexes comme un lait cru. Lorsque la force ionique de la phase dispersante diminue (celle d'une formule à 25g.L<sup>-1</sup> de PPCN est environ

25 fois inférieure à celle du lait), les  $pH_i$  des caséines augmentent et le pH de précipitation isoélectrique est donc plus élevé. Par conséquent, l'amélioration apportée par le prétraitement 90°C/ 60 min/ pH 7,5 en présence de lactose était visible au travers du delta de pH avant déstabilisation par le traitement UHT.

### 2.2.1.1.2. Couleur

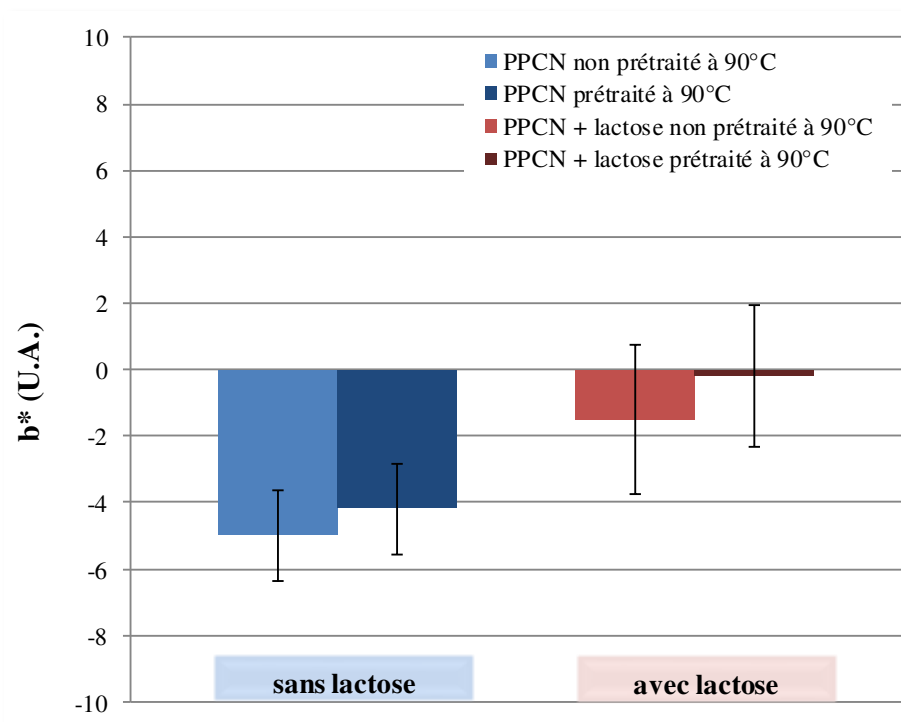


Figure 50 : Impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur la dimension b\* de la couleur (U.A. : unités arbitraires) dans des formules à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN contenant ou non du lactose, avant acidification (moyennes de 3 essais différents)

Les mesures effectuées avec le spectrophotomètre confirmaient les observations faites visuellement, à savoir qu'après une heure à 90°C, les échantillons, avec ou sans lactose, n'avaient pas significativement changé de couleur (Figure 50). D'autre part, les échantillons avec lactose avaient une valeur de b\* moins négative (-1,5 ±2,3 contre -5,0 ±1,3) que la formule témoin sans sucre (valeurs mesurées avant prétraitement thermique).

Ces résultats ne signifiaient pas que les réactions de Maillard – et plus particulièrement la lactosylation – n’avaient pas été initiées mais plutôt que les pigments bruns appelés mélanoides n’étaient pas encore formés (Hodge 1953 ; Baptista & Carvalho 2004 ; Corzo-Martinez *et al.* 2010). D’autre part, la couleur jaune de la poudre de lactose explique que les formules qui en contenaient soient légèrement plus teintées.

### 2.2.1.1.3. *pH*

La variation de pH entre les échantillons prétraités à 90°C pendant une heure et ceux n’ayant pas subi ce traitement était de  $0,01 \pm 0,09$  unité pH pour la formule témoin et de  $-0,05 \pm 0,03$  pour la formule contenant du lactose (moyennes et écarts-types mesurés sur quatre essais différents). Alors que le pH ne variait pas significativement dans la formule sans lactose ajouté, il tendait à diminuer dans la formule en contenant.

La dégradation thermique du lactose, productrice d’acides comme l’acide formique (*Chapitre 1 – paragraphe 3.2.2. La dégradation du lactose par la voie de Lobrey de Bruyn-Aberda van Ekenstein (voie L.A.)*), expliquerait le plus probablement cette tendance à la baisse pour le pH. Les réactions de Maillard pourraient aussi y contribuer car la dégradation du résidu lactulosyllysine lié à une protéine donne comme produits majoritaires du galactose et de l’acide formique (Berg & Van Boekel 1994).

### 2.2.1.1.4. *Potentiel zêta*

Après un prétraitement de 60 minutes à 90°C, aucune différence significative de potentiel zêta n’était mise en évidence, que ce soit dans la formule témoin (potentiel zêta  $\approx -25$  mV) ou dans celle contenant du lactose (potentiel zêta  $\approx -22$  mV). D’autre part, le potentiel zêta était légèrement moins négatif en présence de sucre ( $-21,3 \pm 1,3$  contre  $-25,4 \pm 1,8$  mV sans prétraitement thermique).

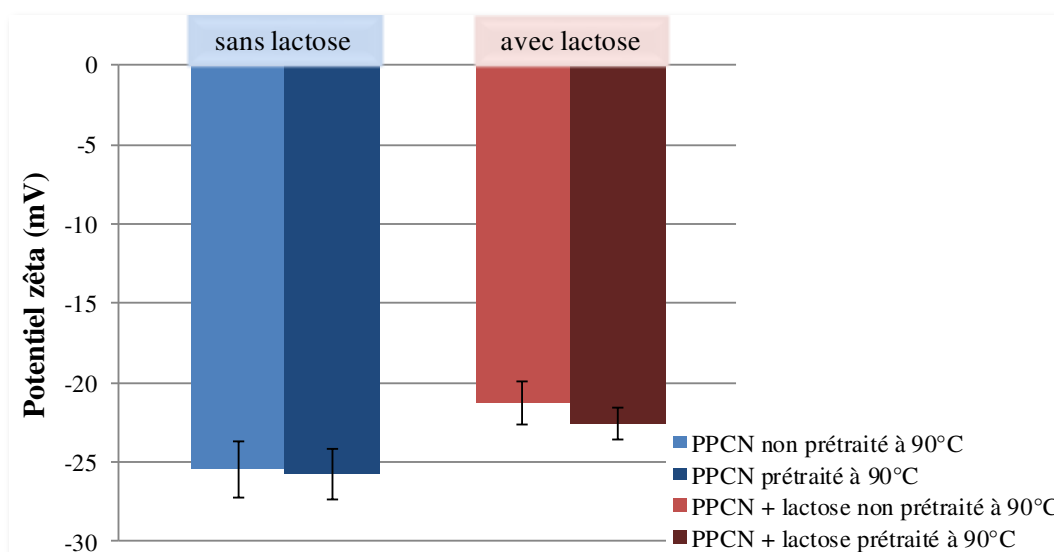


Figure 51 : Impact du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes à pH 7,5 sur le potentiel zêta micellaire dans des formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN avec et sans lactose (moyennes sur 4 essais différents)

Le potentiel zêta dans un lait écrémé est d'environ -20 mV (Walstra & Jenness 1984). Ici, il était plus négatif (Figure 51). La formule à base de PPCN présente un environnement physico-chimique des micelles de caséine différent. En effet, la force ionique de la formule modèle est bien inférieure à celle d'un lait cru (Famelart *et al.* 1996) et l'écrantage des charges par les minéraux est donc moindre d'où des potentiels zêta plus négatifs que la valeur de référence.

Le traitement de lactosylation avait pour but d'abaisser le p*H*<sub>i</sub> des caséines ce qui pourrait se traduire par une charge nette de surface des micelles plus négative. Cette hypothèse était basée sur les études d'O'Connell & Fox (1999) qui ont mis en évidence une augmentation de la charge nette négative d'un caséinate de sodium chauffé en présence de lactose. D'après Darewicz & Dziuba (1998), après 15 jours de glycosylation de la caséine β bovine en présence de glucose, le p*H*<sub>i</sub> de la protéine était augmenté mais la mobilité électrophorétique quasiment inchangée (malgré une amélioration de la stabilité thermique). Par conséquent, l'absence de modification mesurée ici n'impliquait pas nécessairement que le p*H*<sub>i</sub> des caséines n'avait pas été abaissé. Trois hypothèses pouvaient être émises :

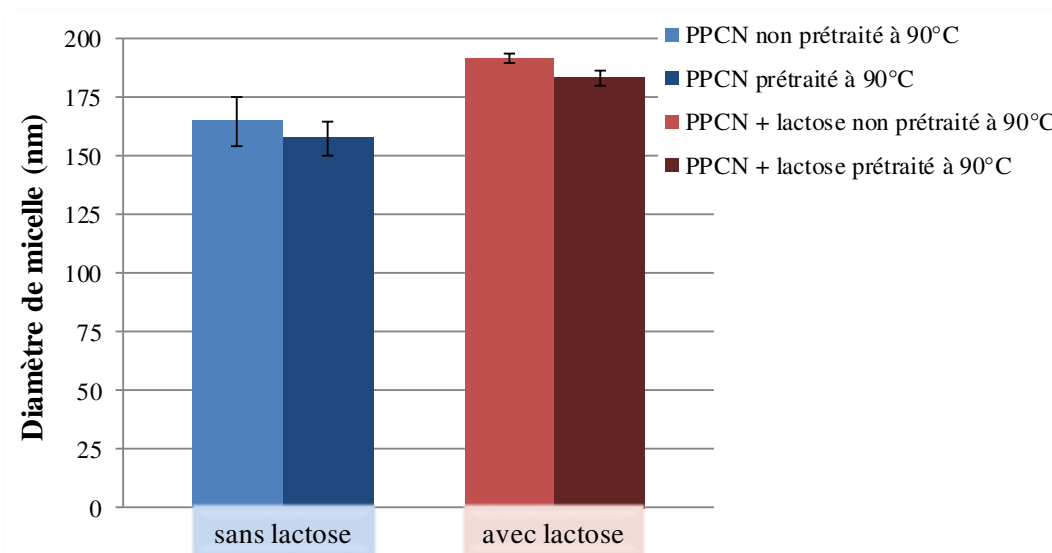
1. Il n'y aurait pas de lactosylation malgré le prétraitement thermique à 90°C pendant 60 minutes en présence de 50 g.L<sup>-1</sup> de lactose.
2. La lactosylation ne serait pas détectable parce que l'appareil de mesure ne serait pas assez sensible ou la méthode pas adaptée.
3. La fixation du lactose se ferait à l'intérieur de la micelle de caséines et ne modifierait donc pas sa charge de surface.

Il est difficile de trouver une cause à la légère différence de potentiel zêta observée entre les formules avec et sans sucre. Le lactose est neutre d'un point de vue électrique. Il ne contribue pas au pouvoir tampon (sinon cela aurait nécessité l'ajout d'une quantité significativement supérieure d'hydroxyde de sodium pour atteindre le pH 7,5 et aurait éventuellement introduit un biais). L'ajout de lactose en revanche augmente la viscosité de l'ultrafiltrat puisqu'une solution à 5 % de lactose a une viscosité  $\eta$  de 1,15 contre 1,00 mPa.s<sup>-1</sup> à 20°C pour de l'eau (Morison & Mackay 2001). Cela ralentirait donc la mobilité électrophorétique (*Chapitre 2 – paragraphe 3.7. Mesure du potentiel zêta*). La différence de constante diélectrique pourrait aussi contribuer à ce décalage. En effet, le potentiel zêta, issu de la mobilité électrophorétique, est calculé d'après la formule suivante :  $U_E = \frac{\varepsilon \zeta}{6 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot f(ka)$ , où  $\varepsilon$  est la constante diélectrique du milieu dispersant. Cette constante a été fixée à 79 quel que soit le milieu dispersant alors que l'ajout de lactose la diminuerait  $\partial \varepsilon / \partial [\text{lactose}] = -8,2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  par rapport à de l'eau pure, Arnold *et al.* 1993). Enfin, une taille de micelle  $a$  supérieure (Figure 52) pourrait aussi jouer dans le calcul.

#### 2.2.1.1.5. Taille de particules

Le diamètre moyen des micelles n'était pas significativement modifié par le prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 dans la formule sans lactose : 165 ±10 contre 158 ±7 nm avec prétraitement (Figure 52). Le profil de distribution de tailles était également similaire avec une polydispersité de 0,13 ±0,04 contre 0,10 ±0,02 avec prétraitement. Le diamètre des micelles tendait à diminuer en présence de lactose (réduction d'environ 10 nm) : 192 ±2 nm contre 183 ±3 nm avec prétraitement (Figure 52). La polydispersité était la même que pour

l'échantillon sans lactose :  $0,13 \pm 0,01$  contre  $0,10 \pm 0,02$  avec prétraitement. La taille des particules dans la formule additionnée de lactose était légèrement supérieure à celle mesurée dans la formule témoin : respectivement  $192 \pm 2$  et  $165 \pm 10$  nm avant prétraitement (Figure 52).



**Figure 52 : Impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur le diamètre des particules de formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN, sans et avec du lactose, avant acidification et traitement UHT (moyennes sur 4 essais différents)**

Le diamètre moyen des micelles dans un lait est autour de 200 nm (voire 210 nm à pH 7,5 pour du PPCN à 32 g.L<sup>-1</sup> dans l'étude de Famelart *et al.* (1996)). Ici, il était compris entre 160 et 190 nm environ (Figure 52). Cette taille légèrement inférieure pourrait être due à la composition de l'environnement micellaire, moins riche dans ces formules modèles que dans un lait cru et différent de celui de l'étude de Famelart *et al.* (1996) (dilution au 1/300<sup>ème</sup> avec un tampon Dalglish pour la mesure).

D'après Tran Le *et al.* (2007) et Anema & Li (2003), la diminution de taille de micelles chauffées (de 1 à 15 minutes, de 75 à 100°C) indiquerait une solubilisation partielle des caséines  $\kappa$  (de 23 % du total à pH 6,7) ou une augmentation de densité des micelles de caséines initialement « gonflées ». Le prétraitement à 90°C pourrait causer une « contraction » micellaire associée à des réorganisations des interactions hydrophobes et ioniques (dus à des variations réversibles lors du chauffage). Cela modifierait la structure interne de la micelle, expliquant sa diminution de diamètre (Anema & Li 2003).

La présence de sucre pourrait favoriser les interactions hydrophiles, en particulier à la surface des micelles et au niveau des caséines  $\kappa$  qui se déploieraient alors davantage (Figure 53). Cette hypothèse expliquerait l'augmentation de diamètre hydrodynamique observée dans la formule avec lactose.

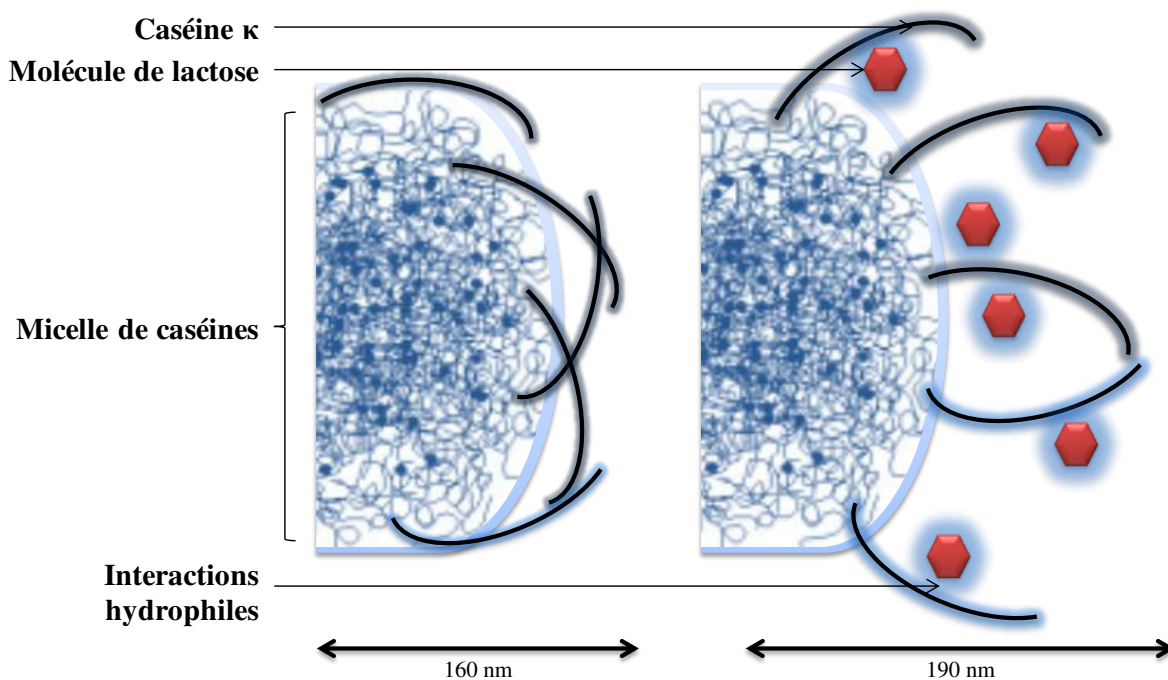


Figure 53 : Schéma explicatif hypothétique de l'augmentation de taille de micelle avec l'ajout de lactose

La diminution de constante diélectrique avec l'ajout de lactose pourrait aussi avoir un impact, soit en modifiant les interactions, soit en biaisant le calcul puisque l'indice de réfraction  $n$  (ici fixé à 1,348) dépend de celle-ci ( $n^2 = \epsilon/\epsilon_0$ ) où  $\epsilon$  est la permittivité diélectrique de la solution et  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide).

#### 2.2.1.1.6. Teneurs en eau des culots d'ultracentrifugation

La teneur en eau des culots d'ultracentrifugation était légèrement diminuée par le prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 dans la formule sans lactose :  $2,52 \pm 0,12$  contre  $2,16 \pm 0,17$  g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec après chauffage (Figure 54). La tendance à la baisse était plus visible dans la formule contenant du lactose :  $2,29 \pm 0,05$  contre  $2,05 \pm 0,06$  g d'eau.g<sup>-1</sup> de



culot sec après prétraitement (Figure 54). D'autre part, la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation était légèrement plus faible en présence de sucre avant prétraitement thermique :  $2,29 \pm 0,05$  contre  $2,52 \pm 0,12$  g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec dans la formule sans lactose.

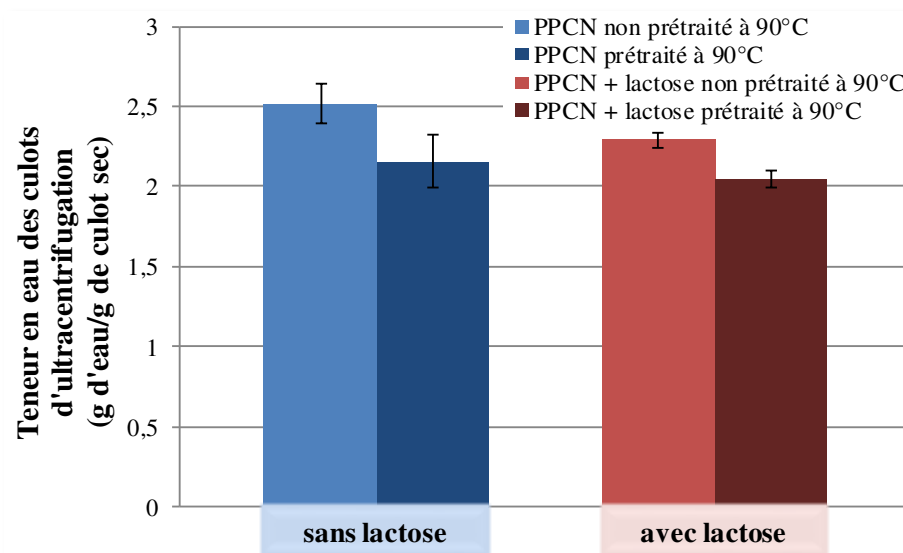


Figure 54 : Impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation dans des formules à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN contenant ou non du lactose (moyennes sur 4 essais différents)

La teneur en eau des culots d'ultracentrifugation est de 2,2 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec dans une suspension de PPCN (Famelart *et al.* 1996). Celles mesurées ici étaient donc en accord avec cette valeur (Figure 54).

Cette diminution de teneur en eau des culots d'ultracentrifugation après prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 traduisait une modification dans la structure micellaire. Elle tendrait à confirmer l'hypothèse d'Anema & Li (2003). En effet, la caséine  $\kappa$  est très hydrophile (Chapitre 1 – paragraphe 1.1.1. Les caséines) ; par conséquent, sa solubilisation dans le surnageant d'ultracentrifugation causée par le chauffage à 90°C pourrait expliquer la diminution de teneur en eau des culots. Une autre hypothèse pourrait être qu'une « déshydratation » de la micelle serait induite par le prétraitement thermique, avec « libération » des molécules d'eau qui « gonfleraient » la micelle de caséines (impact sur la taille) et faciliteraient le déploiement des parties hydrophiles (impact sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation) (Figure 55). Enfin, d'après Singh et Fox (1987), la diminution

d'hydratation micellaire traduirait une réassociation des micelles de caséines consécutive à une dissociation réversible qui se produirait au cours du traitement thermique. D'après Singh *et al.* (1996), cette dissociation affaiblirait les interactions entre caséines à l'intérieur de l'édifice micellaire et donc les interactions de l'eau avec la micelle.

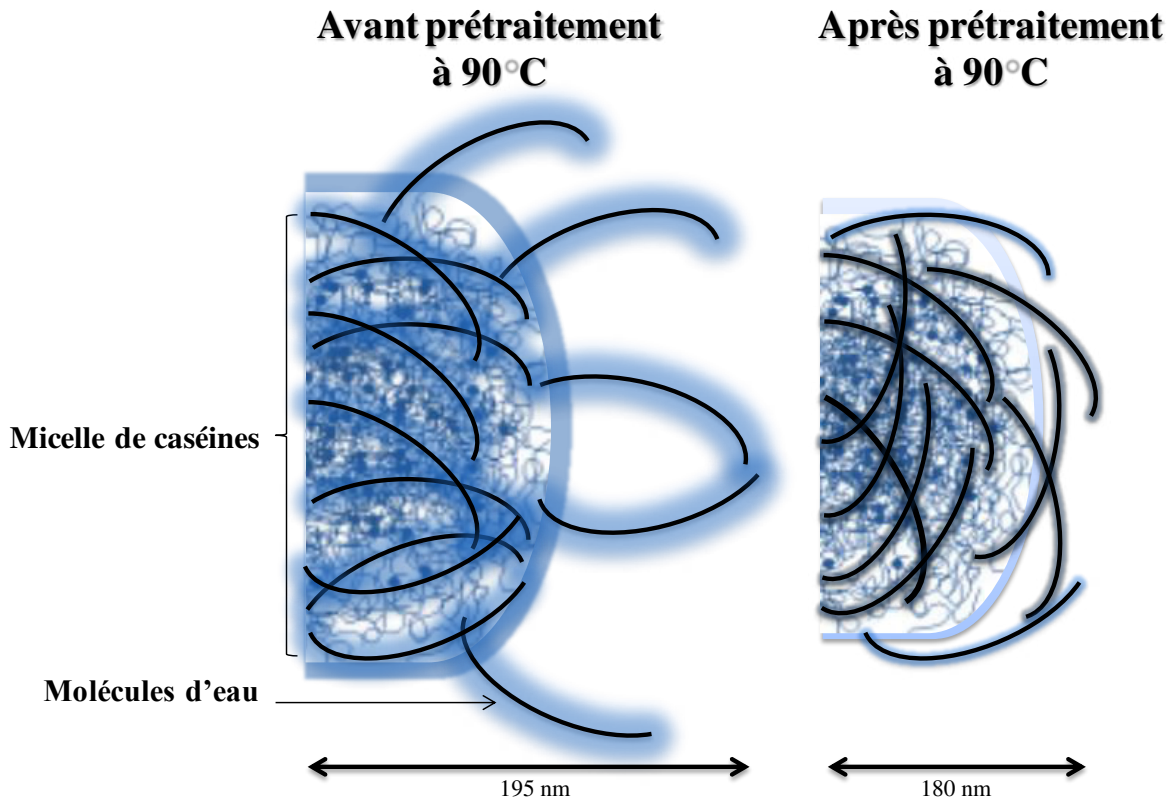


Figure 55 : Schématisation de l'impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur l'hydratation de la micelle de caséines (valeurs correspondant à la formule PPCN + lactose)

D'autre part, la caséine  $\kappa$  possède 9 lysines et 5 arginines, sites potentiels de lactosylation (*Chapitre 1 – paragraphe 1.1.1. Les caséines*). La fixation du lactose sur cette caséine, devenant alors encore plus hydrophile, pourrait accentuer les phénomènes de « déshydratation » et de diminution de taille micellaires observés dans la formule PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup>. En effet, la lactosylation pourrait favoriser la solubilisation de la caséine  $\kappa$  ou apporter une gêne stérique à la réintégration de cette caséine (porteuse de groupements hydrophiles) après sa solubilisation thermo-induite.

2.2.1.1.7. Teneurs en azote

La teneur en azote non protéique était d'environ  $5.10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$  de produit pour tous les échantillons. La poudre de PPCN ne contenant quasiment pas d'azote non protéique, cette valeur était très faible. Une augmentation après prétraitement à  $90^{\circ}\text{C}$  pendant 60 minutes aurait traduit une protéolyse thermique (Gaucheron *et al.* 2001), ici négligeable.

2.2.1.1.8. Teneurs en calcium et phosphate solubles

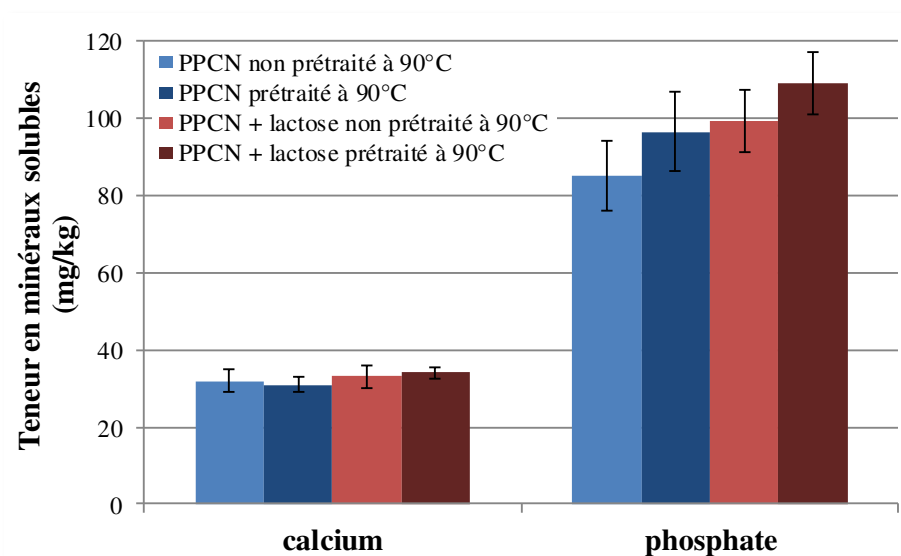


Figure 56 : Impact du prétraitement à  $90^{\circ}\text{C}$  et pH 7,5 pendant 60 minutes sur les teneurs en calcium et phosphate solubles dans des formules contenant  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de PPCN sans ou avec lactose (moyennes sur 3 essais différents)

La teneur en calcium soluble ne variait pas de manière significative suite au prétraitement  $90^{\circ}\text{C}/60 \text{ min}/\text{pH } 7,5$ , que la formule contienne ou non du lactose : environ  $30 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Figure 56). De même, la teneur en phosphate inorganique soluble ne variait pas significativement selon les échantillons : environ  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Figure 56). Toutefois, une tendance à l'augmentation du fait de la combinaison prétraitement thermique et ajout de lactose peut être relevée pour le phosphate :  $109 \pm 8$  contre  $85 \pm 9 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour la formule sans lactose et non chauffée (Figure 56).

Les formules étudiées correspondaient à des micelles de caséines suspendues dans de l'eau ultra-pure (additionnée ou non de lactose). Les teneurs obtenues en minéraux solubles étaient donc très faibles comparées à celles rapportées pour un lait : environ 30 mg.kg<sup>-1</sup> contre 300 mg.kg<sup>-1</sup> pour le calcium soluble et 100 mg.kg<sup>-1</sup> contre 450 mg.kg<sup>-1</sup> pour le phosphate inorganique soluble (Le Graët & Brulé 1993).

Aucune modification significative et irréversible des concentrations en calcium et en phosphate inorganique, causée par le prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5, n'a pu être mise en évidence. Cette absence de variation dans les teneurs en minéraux solubles (observée également pour les ions sodium, potassium, magnésium, chlore et citrate solubles) ne signifiait pas qu'aucune précipitation ou solubilisation réversible n'ait eu lieu lors du prétraitement thermique ni que l'organisation des minéraux n'ait pas été modifiée de manière irréversible au sein de la micelle, ce qui impacterait les autres caractéristiques physico-chimiques de cette suprastructure (organisation des caséines et répartitions des charges par exemple). D'autre part, cette absence de variation indiquerait que la baisse de pH après prétraitement à 90°C ne serait pas due à une déphosphorylation des caséines ou à une précipitation du phosphate de calcium ( $3 \text{Ca}^{2+} + 2 \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 2 \text{H}^+$ , Walstra & Jenness 1984).

### 2.2.1.1.9. *Lactosylation des caséines*

L'analyse des protéines entières et des peptides tryptiques par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse a permis de déterminer quelles caséines pouvaient être lactosylées et sur quels acides aminés.

#### 2.2.1.1.9.1. *Analyse des caséines*

L'analyse des spectres de masse après séparation des molécules par chromatographie a permis d'obtenir de nombreuses données traduites sous forme de quotients pour en faciliter la lecture (*Chapitre 2 – paragraphe 3.9.3. Interprétation des chromatogrammes et des spectres de masse*).

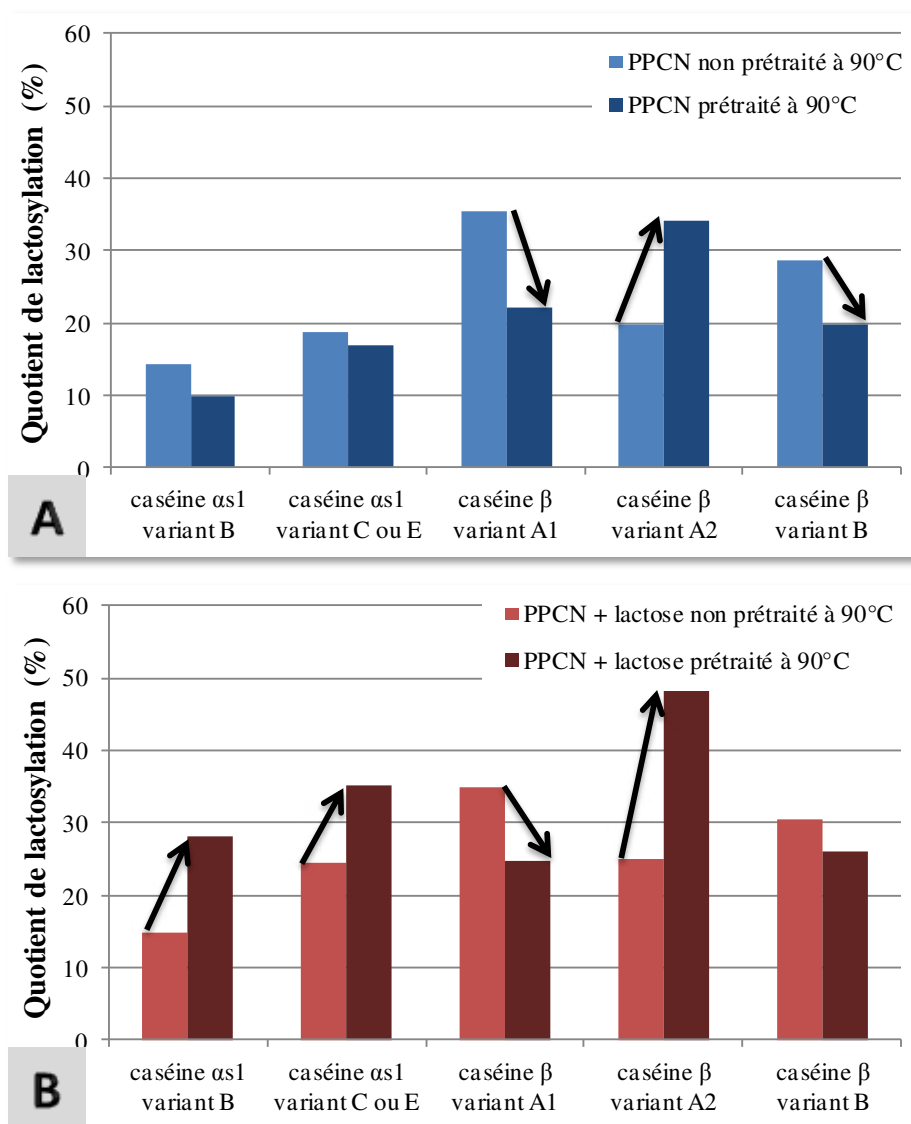


Figure 57 : Impact du prétraitement à 90°C et pH 7,5 pendant 60 minutes sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse des caséines dans la formule témoin contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN, sans (A) et avec lactose (B).

Dans la formule témoin, aucune variation de quotient n'était attendue ; pourtant des différences ont été observées (Figure 57-A), même dans ces échantillons *a priori* dépourvus de lactose (Chapitre 2 – paragraphe 1.1.3. Poudre de phosphocaseinate natif (PPCN)). Après un prétraitement à 90°C pendant 60 minutes, il ressortait que :

- l'intensité des signaux de la caséine  $\alpha_{s1}$  variant B et des caséines  $\beta$  variants A<sub>1</sub> et B lactosylées rapportée à celle des signaux des caséines non modifiées était plus faible qu'avant traitement de stabilisation.

- l'intensité du signal de la caséine  $\beta$  variant A<sub>2</sub> lactosylée rapportée à celle du signal de la protéine native était plus importante.

La diminution des quotients de lactosylation dans la formule sans lactose pourrait s'expliquer par le mode de production du PPCN. En effet, sa fabrication a nécessité un séchage par atomisation (Pierre *et al.* 1992 ; Schuck *et al.* 1994) qui générerait des lactosylations de caséines. Le prétraitement thermique pourrait accentuer l'avancement des réactions de Maillard préalablement amorcées et augmenter la masse molaire de ces protéines lactosylées avant même cette expérimentation. En effet, cette voie réactionnelle induit des mécanismes de condensation, polymérisation, oxydation, élimination et dégradation des molécules (*Chapitre 1 – paragraphe 3.2.1. La réaction de glycation*). À l'opposé, l'augmentation du quotient de lactosylation pourrait être due au lactose résiduel contenu dans la poudre de PPCN et qui se fixerait notamment sur la caséine  $\beta$  variant A<sub>2</sub>.

Même s'il était difficile d'interpréter les variations observées dans la formule sans lactose, celles-ci ont servi de référence pour étudier celles relevées dans les autres formules.

En présence de lactose (Figure 57-B), après prétraitement à 90°C pendant 60 minutes,

- l'intensité des signaux des caséines  $\alpha_{s1}$  variants B et C ou E lactosylées rapportée à celle de ces mêmes variants était plus élevée.
- l'intensité des signaux des caséines  $\beta$  variants A<sub>1</sub> et B lactosylées rapportée à celle des signaux des protéines non modifiées tendait à être plus faible.
- l'intensité du signal de la caséine  $\beta$  variant A<sub>2</sub> lactosylée rapportée à celle du signal de la protéine native était plus élevée.

D'après la Figure 57, la présence de lactose augmentait les proportions de caséines lactosylées comparées aux caséines natives, conformément aux attentes. Cette augmentation pourrait être causée par un taux de lactosylation de certains sites plus important ou un nombre de sites lactosylés différents plus grand.

De plus, les résultats obtenus en présence de lactose (comme pour la formule témoin) suggéraient une lactosylation « variant spécifique ». Plusieurs explications peuvent être envisagées :

- Le variant A<sub>2</sub> de la caséine  $\beta$  et le variant B de la caséine  $\alpha_{s1}$  sont les variants les plus abondants (Corzo-Martinez *et al.* 2010 ; Farrell *et al.* 2004) et seraient donc plus susceptibles de présenter des formes lactosylées.
- La composition en acides aminés pourrait induire une plus ou moins grande facilité d'ionisation qui se répercuterait dans l'intensité des signaux.
- Les différences de séquences en acides aminés pourraient aussi expliquer ces écarts de niveaux de lactosylation en modifiant l'accessibilité des résidus « lactosylables » dans la micelle de caséines. En effet, d'après Farrell *et al.* (2004), le variant A de la caséine  $\alpha_{s1}$  est moins hydrophobe que les autres par exemple, ce qui pourrait influencer sa conformation dans la micelle de caséines.

Seules les caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  ont pu être identifiées par spectrométrie de masse. Ce sont les cibles privilégiées de la lactosylation car elles constituent des sources abondantes de groupements  $\epsilon$ -amines accessibles sur les résidus lysyls (protéines laitières majoritaires) (Chapitre 1 – paragraphe 1.1.1. Les caséines ; Scaloni *et al.* 2002 ; Bhatt *et al.* 2014). De plus, comme observé dans l'étude de Corzo-Martinez *et al.* (2010), la caséine  $\alpha_{s2}$  s'ioniserait mal.

### 2.2.1.1.9.2. Analyse des peptides tryptiques

Comme pour l'analyse des caséines, les données obtenues avec les peptides tryptiques ont été traduites sous forme de quotients (Chapitre 2 – paragraphe 3.9.3. Interprétation des chromatogrammes et des spectres de masse).

Pour la formule sans lactose, une seule lactosylation a pu être mise en évidence après prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 : la lysine en position 191 sur la caséine  $\alpha_{s2}$  était porteuse d'une masse supplémentaire de 324 Da (quotient de 1,20). Des désamidations de glutamine en positions 127, 142 et 159 ou d'asparagine en position 171 sur la caséine  $\alpha_{s1}$ , des désamidations d'asparagine en positions 86 et 115 sur la caséine  $\alpha_{s2}$  ont également été

détectées. Toutefois celles-ci ont pu être causées par la préparation des échantillons pour l'analyse.

Pour la formule contenant du lactose, une seule lactosylation a été mise en évidence après prétraitement thermique : la lysine en position 119 sur la caséine  $\alpha_{s1}$  était porteuse d'une charge supplémentaire de 324 Da (quotient de 1,26). Ce faible niveau de lactosylation corroborait les travaux de Léonil *et al.* (1997) qui montraient que la caséine  $\beta$  n'était pas lactosylée après un chauffage de 3 heures à 70°C et à pH 6,8. Des désamidations d'asparagine en positions 126 et 184 ou de glutamine en positions 117, 142, 155 et 159 sur la caséine  $\alpha_{s1}$  ou une désamidation d'une asparagine en position 115 sur la caséine  $\alpha_{s2}$  ont également été relevées. Là encore, il se peut que ces modifications n'aient pas été provoquées par le chauffage à 90°C. Dans la suite du manuscrit ces modifications ne sont donc pas rapportées.

Préciser la localisation des lactosylations au niveau supramoléculaire est difficile car la structure de la micelle n'est pas précisément définie (*Chapitre 1 – paragraphe 2. Caractéristiques et modèles de structure de la micelle de caséines*). Même la structure secondaire des caséines est controversée (Horne 2002). Associer des lactosylations à des zones particulières de la conformation des caséines (zones hydrophobes ou feuillet  $\alpha$  par exemple) est donc discutable et aucune hypothèse n'est proposée dans ce manuscrit.

Au regard de ces résultats, les caséines semblaient peu réagir avec le lactose malgré le prétraitement thermique. Akillioğlu & Gökmen (2014) ont suggéré une hypothèse explicative pour cette difficulté à lactosyler les caséines. Les ions calcium (agents de réticulation au niveau des caséines) pourraient apporter une gêne stérique et rendre difficile la liaison entre les composés carbonylés et les groupements amines sur les molécules protéiques. Néanmoins, la protection des ions calcium n'était pas mise en évidence dans leur étude pour les premières étapes des réactions de Maillard (soit pour la lactosylation proprement dite) car leur argumentation s'appuyait sur une plus grande production de N- $\epsilon$ -carboxyméthyl lysine, molécule libérée au niveau des étapes les plus avancées dans les réactions de Maillard. Un rôle similaire pourrait être envisagé pour le phosphate (Figure 58). En effet, d'après Ter Horst



(1963, repris dans Visser *et al.* 1979), le phosphate de calcium complexerait avec les groupements  $\text{NH}_3^+$  de la lysine ou de l'arginine dans une structure qui ressemblerait à  $(\text{caséine-NH}_3^+)-\text{PO}_4^{3-}-\text{Ca}^{2+}$ .

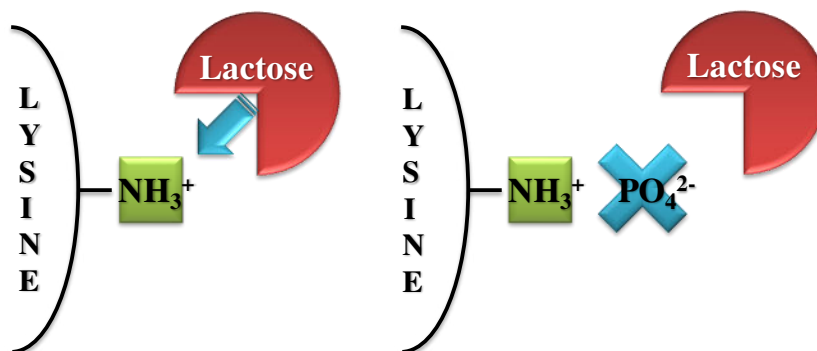


Figure 58 : Hypothèse sur le rôle protecteur du phosphate dans la micelle de caséines face à la lactosylation

Deux autres hypothèses ont été envisagées :

1. La structure micellaire n'était pas favorable à la lactosylation des caséines en raison de difficultés d'accessibilité des résidus « lactosylables » au sein de cet agencement supra-moléculaire..
2. Les conditions physico-chimiques n'étaient pas favorables à la réaction de lactosylation.

Deux études complémentaires ont donc été menées pour tester ces hypothèses.

#### 2.2.1.1.9.3. Étude sur du caséinate

L'association des caséines sous forme micellaire, comme avec le PPCN, pourrait limiter la lactosylation des caséines. Récemment, Siciliano *et al.* (2013) et Akillioglu & Gökmen (2014) ont en effet montré que les structures agrégées comme les « complexes » de caséines et les micelles physiquement modifiées (par cisaillement ou hautes pressions par exemple) étaient moins sujettes à la glycation. D'après Darewicz & Dziuba (2001) et Scaloni

et al. (2002), les caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  ne posséderaient qu'un nombre limité de résidus pouvant être lactosylés : ceux situés sur des parties accessibles ou flexibles des caséines.

Les caséinates sont des mélanges des quatre molécules de caséines agrégées entre elles mais selon une structure différente et plus petite que celle de la micelle de caséines. Ce sont des agrégats ayant une taille d'environ 30 nm (*versus* 200 nm pour la micelle) et ne contenant pas de phosphate de calcium micellaire (Tableau 11).

Le même protocole que précédemment a été suivi, mais en utilisant du caséinate à la place du PPCN.

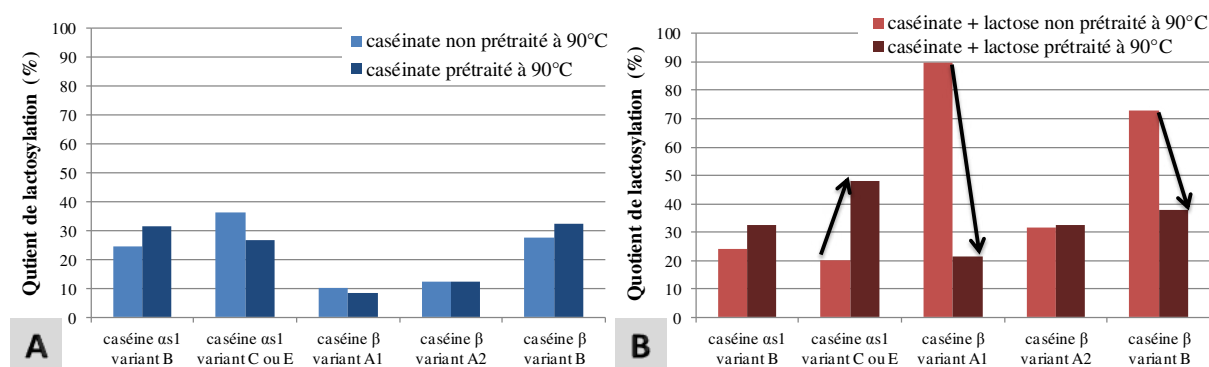


Figure 59 : Impact du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes à pH 7,5 sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse des caséines dans la formule contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de caséinate sans (A) et avec lactose (B)

Dans le témoin sans lactose, il ne semblait pas y avoir de différence significative entre les quotients selon qu'un prétraitement thermique ait été appliqué au caséinate ou non (Figure 59-A). La caséine  $\alpha_{s1}$  variant B tendait à être plus lactosylée après prétraitement même si aucun sucre n'avait été ajouté, et le quotient diminuait pour le variant C ou E. L'augmentation de lactosylation pourrait être due à du lactose résiduel dans la poudre de caséinate qui aurait réagi.

Pour la formule caséinate avec lactose (Figure 59-B), à part pour la caséine  $\alpha_{s1}$  variant C ou E, la comparaison des quotients n'a pas révélé de lactosylation après prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5. Il tendait même à montrer que les échantillons étaient plus lactosylés sans prétraitement (caséines  $\beta$  variants A<sub>1</sub> et B).

Ces analyses sur caséines entières (en présence de lactose) n'ont pas permis de valider l'hypothèse selon laquelle la faible lactosylation serait due à l'association des caséines sous forme de micelles. Pour véritablement utiliser des caséines sous forme monomériques, il faudrait travailler à une teneur en caséinate inférieure à sa concentration micellaire critique de 4 g.L<sup>-1</sup> environ (contre 25 g.L<sup>-1</sup> ici). Par conséquent, même dans cette expérimentation, les caséines étaient associées.

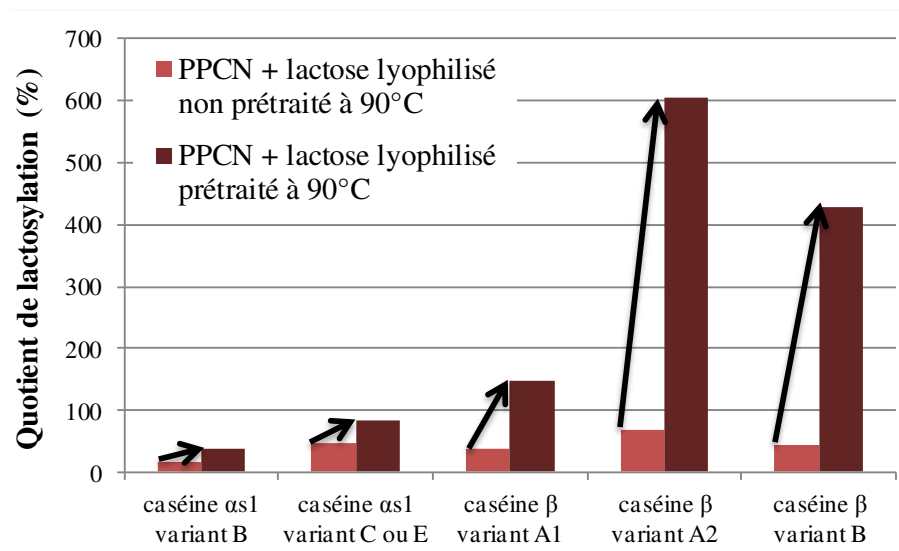
La comparaison des signaux obtenus avec les peptides tryptiques (obtenus après prétraitement thermique ou non) a permis de mettre en évidence une lactosylation au niveau de la lysine en position 80 (quotient de 1,14) sur la caséine  $\alpha_{s2}$ , dans le cas de la formule contenant du lactose. Aucune lactosylation n'a pu être mise en évidence pour la formule contenant uniquement des caséinates.

D'après les données obtenues par spectrométrie de masse des caséines ou des peptides tryptiques, passer d'une structure micellaire (PPCN) à une structure agrégée plus petite (caséinate) n'a donc pas permis d'améliorer la lactosylation des caséines.

#### 2.2.1.1.9.4. Étude en conditions « déshydratées »

Un des leviers physicochimiques pour favoriser les réactions de lactosylation consisterait à diminuer la teneur en eau du milieu. D'après Liu *et al.* (2012), la gamme optimale d'activités de l'eau pour les réactions de Maillard s'étendrait de 0,5 à 0,8. Trop d'eau empêcherait les réactions de déshydratation sachant que la première étape dans la réaction de glycation est une condensation entre un groupement amine d'une caséine et le groupement carbonyle du sucre, qui libère une molécule d'eau. À l'inverse, un milieu trop déshydraté limiterait la mobilité des réactants. La glycation par chauffage dans une formule avec une faible activité de l'eau est donc une méthode permettant d'avoir un bon taux réactionnel et les études menées sur la glycosylation le sont souvent sur des poudres (Liu & Zhong 2013 ; Akilloğlu & Gökmen 2014). Thomsen *et al.* (2012) concluent même que l'activité de l'eau avait plus d'impact qu'une augmentation de pH entre 5 et 7 sur la lactosylation de la  $\beta$ -lactoglobuline.

Dans le but de favoriser la lactosylation, un essai a donc été réalisé avec des poudres lyophilisées. Le protocole était similaire à celui de l'étude en conditions « hydratées ». Les poudres de PPCN et de lactose étaient mélangées dans un rapport massique de 1/2 (comme précédemment) et suspendues dans de l'eau ultra-pure à 50°C. Le pH était ajusté à 7,5 *via* l'ajout de la solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. Après 60 minutes de réhydratation, la formule était homogénéisée à 50°C puis refroidie, congelée et lyophilisée. L'étape de réhydratation-lyophilisation était nécessaire car le lactose sous forme cristalline ne peut réagir. Les fonctions réductrices sont en effet bloquées par l'association des molécules de sucre. Une partie de la poudre était placée 60 minutes à 90°C, l'autre moitié restait à température ambiante. Enfin, les deux échantillons étaient stockés à -18°C jusqu'à leur réhydratation pour analyse par chromatographie couplée au spectromètre de masse.



**Figure 60 : Impact du prétraitement thermique 90°C/60 min/pH 7,5 sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par analyse par spectrométrie de masse des caséines dans une poudre contenant PPCN et lactose avec un rapport massique de 1 pour 2**

En conditions « sèches », la lactosylation des caséines était favorisée (Figure 60). Les caséines α<sub>s1</sub> et β étaient lactosylées avec des intensités différentes (et importantes pour les différents variants de la caséine β). À titre d'exemple, le quotient de lactosylation pour la caséine β variant A<sub>2</sub> était de 604 après prétraitement thermique contre 67 sans chauffage.

La comparaison des signaux obtenus avec les peptides tryptiques a permis de mettre en évidence des lactosylations au niveau de

- la caséine  $\alpha_{s1}$  sur les lysines en positions 7 (quotient de 1,46), 36 (quotient de 1,15), 70 (quotient de 1,14), 111 (quotient de 1,14) et 119 (quotient de 1,18) ;
- la caséine  $\alpha_{s2}$  sur les lysines en positions 80 (quotient de 1,18) et 191 (quotient de 1,22) ;
- la caséine  $\beta$  sur les lysines en positions 113 (quotient de 1,18) et 176 (quotient de 1,18). D'ailleurs, Darewicz & Dziuba (2001) avaient également mis en évidence des glycosylations préférentielles des lysines au niveau de la partie N-terminale de cette caséine.

Le prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 avait également entraîné un brunissement visible à l'œil nu de la poudre contenant PPCN et lactose, montrant un plus grand avancement dans les réactions de Maillard. Ces résultats confirmaient des études précédentes comme celle de Morgan *et al.* (1998) qui concluait que la réaction de condensation amino-carbonyl sur la  $\beta$ -lactoglobuline était vingt fois supérieure avec une activité de l'eau basse ( $a_w = 0,65$ ) comparée à un milieu aqueux (activité de l'eau voisine de 1).

### 2.2.1.2. Conclusion

**Le prétraitement (90°C pendant 60 minutes à pH 7,5) d'une suspension de PPCN en présence de lactose a permis d'améliorer légèrement la stabilité des micelles de caséines acidifiées face au traitement thermique UHT (Erreur ! Source du renvoi introuvable.).**

D'après Darewicz & Dziuba (2001), Scaloni *et al.* (2002) puis Bhatt *et al.* (2014), la lactosylation des caséines modifie leur conformation et leur structure secondaire, en particulier pour les caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$ . La lactosylation apporte une gêne stérique (Bhatt *et al.* 2014 ; Chen *et al.* 2015) potentiellement stabilisatrice (en plus d'une diminution du nombre de charges positives).

.....

Ce traitement de stabilisation ne modifiait pas significativement ni la couleur, ni le potentiel zêta, ni les teneurs en azote, ni les teneurs en minéraux solubles. Il tendait à induire de légères diminutions de pH, de taille de micelles et de teneur en eau des culots d'ultracentrifugation. D'après les analyses de spectrométrie de masse, la lactosylation des micelles de caséines en présence de lactose dans un rapport massique de 1/2 après prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) était peu intense. Ce n'est **pas l'association sous forme de micelle mais plutôt l'excès d'eau qui limiterait cette réaction chimique** comme l'ont montré les expérimentations avec caséinate et lyophilisation (Figure 59 et Figure 60).

### 2.2.2. Étude de l'impact de l'alcalinisation dans le prétraitement

#### 2.2.2.1. Stratégie expérimentale pour l'étude de l'impact de l'alcalinisation en milieu modèle

Pour mieux comprendre l'impact de l'augmentation du pH sur la lactosylation, deux formules modèles (PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup> avec lactose à 50 g.L<sup>-1</sup> dans de l'eau ultra-pure) ont été comparées. L'une avait son pH ajusté à 7,5 à 50°C par ajout de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>, tandis que l'autre restait à pH 7,0. Cette étude devait aussi répondre à la question suivante : « l'ajout de soude est-il nécessaire à la réaction de lactosylation ? ». En effet, l'ajout d'une base n'était pas souhaité pour des raisons réglementaires, d'étiquetage (démarche *clean label*), économiques et pratiques.

#### 2.2.2.2. Résultats & Discussion

##### 2.2.2.2.1. Indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile)

À pH 6,9, après prétraitement (90°C/60 min), l'indice de stabilité thermique de l'échantillon non alcalinisé était inférieur à celui de l'échantillon à pH préalablement ajusté : respectivement autour de 75 contre 100 %. De même, à pH 6,8, avec un prétraitement, la formule sans alcalinisation était déstabilisée (indice = 32 %) alors que l'échantillon avec soude était en cours de déstabilisation (indice = 58 %) après traitement UHT. D'autre part,

sans prétraitement, l'échantillon non alcalinisé était moins stable que la formule avec NaOH (Figure 61).

De plus, à pH 6,9, dans les échantillons prétraité à 90°C, l'indice de stabilité thermique était de 81 % avec lactose mais sans alcalinisation contre 62 % sans lactose mais avec ajustement de pH à 7,5. Ils étaient tous deux inférieurs à 35 % dès pH 6,8.

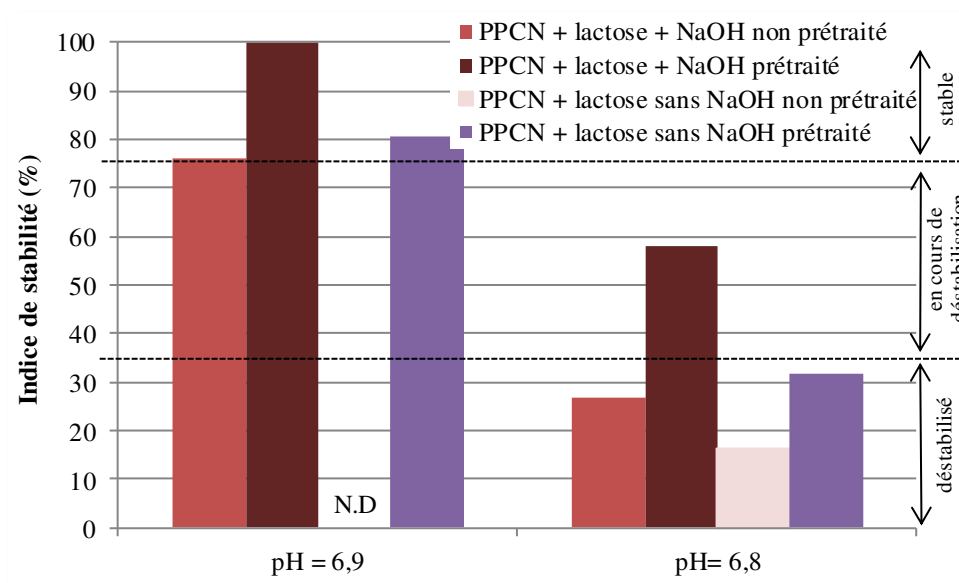


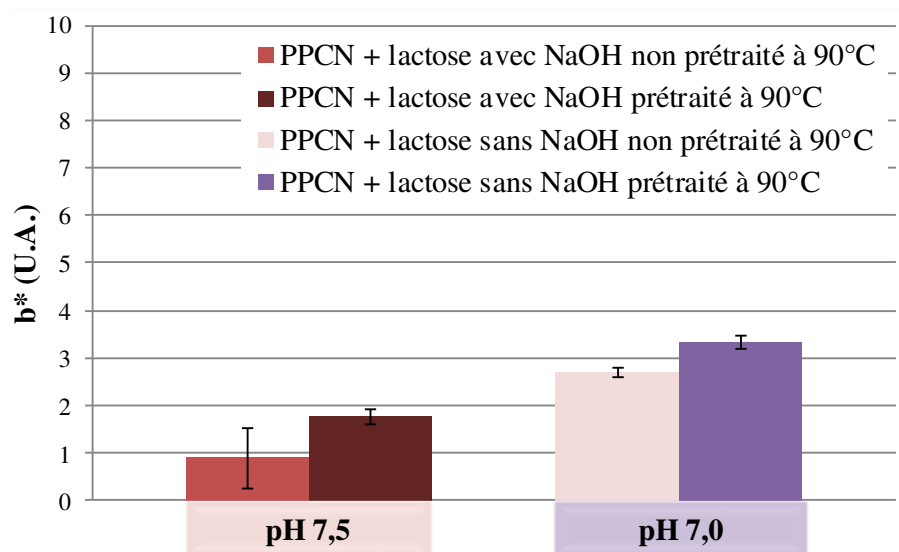
Figure 61 : Impacts du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes et de l'alcalinisation sur l'indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile), dans des formules contenant PPCN et lactose et acidifiées à pH 6,9 et 6,8.

Le traitement de stabilisation était donc plus efficace si le pH était préalablement ajusté à 7,5 (Figure 61). D'autre part, sans prétraitement (90°C/60 min), l'alcalinisation semblait participer à l'amélioration de la stabilité des micelles de caséines acidifiées face au traitement UHT.

De plus, la comparaison des indices de stabilité thermique (Figure 61) semblait montrer que la très légère amélioration apportée grâce à la combinaison du prétraitement à 90°C avec lactose (mais sans soude) était plus importante que celle causée par la combinaison du prétraitement à 90°C avec alcalinisation (mais sans lactose).

2.2.2.2.2. *Couleur*

Dans la formule sans soude, le prétraitement (90°C/60 min) induisait une légère augmentation de  $b^*$ , passant de  $2,7 \pm 0,1$  à  $3,3 \pm 0,1$  respectivement avant et après prétraitement. La tendance observée était similaire dans l'échantillon à pH 7,5 (Figure 62). Ces différences de brunissement après prétraitement thermique n'étaient pas visibles à l'œil nu. Les résultats obtenus étaient donc conformes aux attentes sensorielles.



**Figure 62 : Impacts du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes et de l'alcalinisation sur le brunissement (U.A. : unités arbitraires) de formules contenant PPCN et lactose avant acidification (moyennes sur 3 mesures).**

2.2.2.2.3. *pH*

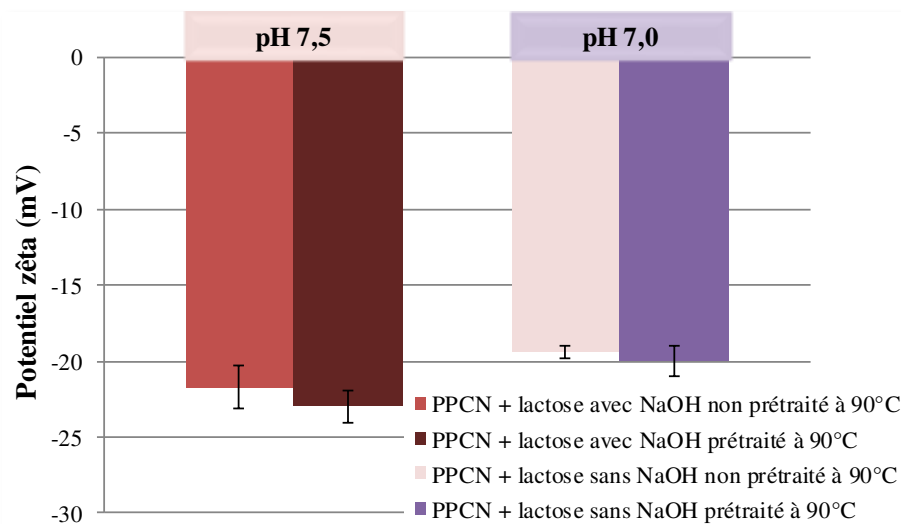
Aucune variation significative du pH n'a pu être mesurée après prétraitement dans le cas de la solution non alcalinisée, tout comme pour la formule au pH ajusté à 7,5.

2.2.2.2.4. *Potentiel zêta*

Que la formule PPCN + lactose ait été alcalinisée ou non, le prétraitement (90°C/60 min) ne diminuait pas significativement le potentiel zêta des micelles de caséines. L'alcalinisation de la suspension PPCN + lactose induisait un potentiel zêta des micelles de



caséines plus négatif que dans la formule sans ajustement de pH : environ -22 contre -20 mV (Figure 63).



**Figure 63 : Impacts du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes et de l'alcalinisation sur le potentiel zêta dans des formules contenant PPCN et lactose (moyennes sur 3 mesures)**

Ahmad *et al.* (2009) avaient également mesuré un potentiel zêta de -20 mV à pH 6,7 contre -24 mV à pH 10,8. L'état d'ionisation des protéines dépend du pH. Les groupements  $\epsilon$ -amine de la lysine, imidazol de l'histidine, phénol de la tyrosine ou sulphydryl de la cystéine avaient probablement une ionisation réduite par exemple. Il est même possible que les parties glycosidiques des caséines  $\kappa$  aient été plus ionisées (Ahmad *et al.* 2009). Ces changements d'ionisation cumulés augmenteraient la charge négative nette des caséines (Vaia *et al.* 2006).

En revanche, que les échantillons aient été alcalinisés ou pas, l'impact du prétraitement (90°C/60 min) sur le potentiel zêta semblait négligeable.

#### 2.2.2.2.5. Taille de particules

La taille des micelles était de 185 nm environ. Aucune différence significative n'était observée que ce soit avec ou sans alcalinisation ou que les échantillons aient été soumis ou non à un prétraitement (90°C/60 min). La polydispersité était également similaire dans tous les échantillons (autour de 0,12).

Dans l'étude d'Ahmad *et al.* (2009), avec l'augmentation de pH, la taille de micelles dans un lait diminuait et des agrégats de 6 µm apparaissaient. Toutefois, l'alcalinisation était plus importante dans leur étude qu'ici (pH augmenté jusqu'à 10) et la matrice étudiée était plus complexe (lait *versus* PPCN).

#### 2.2.2.2.6. Teneurs en eau des culots d'ultracentrifugation

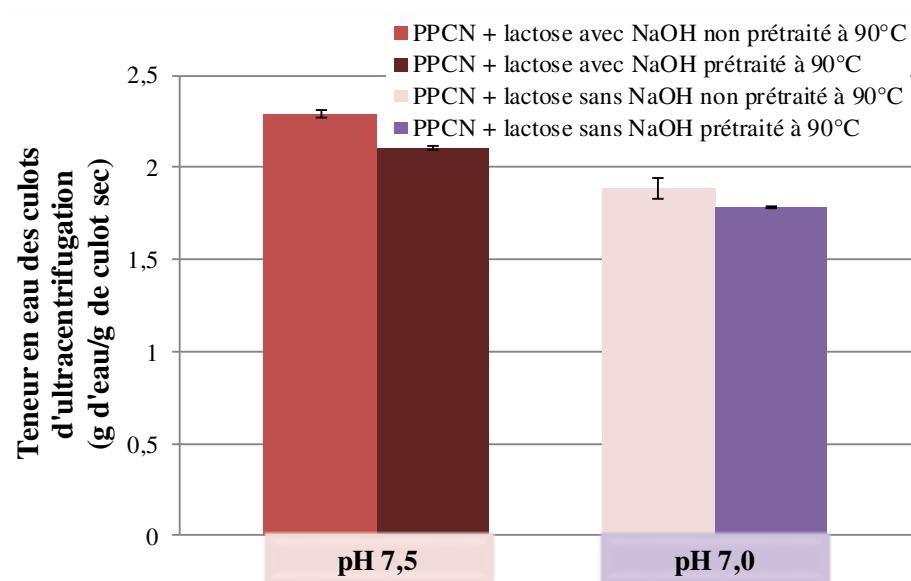


Figure 64 : Impacts du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes et de l'alcalinisation sur l'hydratation micellaire dans des formules contenant PPCN et lactose avant acidification (moyennes sur 2 mesures)

Les teneurs en eau des culots d'ultracentrifugation diminuaient à cause du prétraitement : baisse de 0,19 et 0,10 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec respectivement avec et sans alcalinisation (Figure 64). Elles étaient de 2,28 ±0,02 contre 1,88 ±0,06 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec dans des échantillons non prétraités (90°C/60 min), respectivement avec et sans ajustement de pH.

La diminution d'hydratation, qui était observée en présence de soude après prétraitement, se retrouvait aussi en absence d'ajustement de pH mais dans une proportion légèrement plus faible (environ 5 contre 8 % dans l'échantillon avec l'ajout de NaOH). L'alcalinisation favoriserait donc le mécanisme à l'origine de cette « perte d'eau » de la micelle de caséine causée par le prétraitement thermique.

Ahmad *et al.* (2009) avaient aussi observé une augmentation d'hydratation micellaire entre pH 6,7 et 8,6. Cette différence ne pouvait être reliée à une augmentation d'aire en surface des micelles de caséines puisque le diamètre des particules était le même (*Chapitre 3 – paragraphe 2.2.2.2.5. Taille de particules*). La modification de la structure micellaire avec l'alcalinisation (notamment visible au travers de la clarification de la suspension, Ahmad *et al.* 2009) induirait des changements dans les interactions entre l'eau et les caséines, ce qui induirait cette augmentation d'hydratation.

2.2.2.2.7. *Teneurs en minéraux solubles*

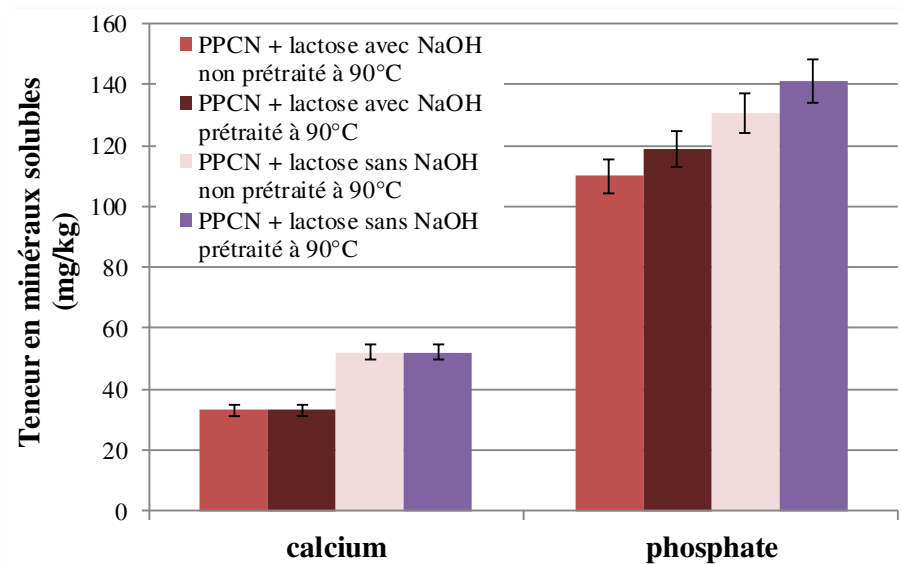


Figure 65 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de l'alcalinisation sur les teneurs en calcium et phosphate solubles dans des formules contenant PPCN et lactose avant acidification (écart-type de 5 %)

Le prétraitement (90°C/60 min) ne modifiait pas significativement les teneurs en minéraux solubles, que le pH soit de 7,5 ou de 7,0 (Figure 65). La tendance à une solubilisation thermo-induite du phosphate se retrouvait dans les deux formules avec ou sans alcalinisation préalable : respectivement 110 ±1 puis 119 ±3 et 130 ±1 puis 141 mg.kg<sup>-1</sup> après prétraitement. L'alcalinisation des suspensions de PPCN + lactose diminuait leur teneur en minéraux solubles : environ 30 contre 50 mg.kg<sup>-1</sup> pour le calcium soluble et environ 110 contre 130 mg.kg<sup>-1</sup> pour le phosphore soluble, dans les échantillons avec et sans soude respectivement (Figure 65).

Ces résultats confirmaient ceux d'Ahmad *et al.* (2009) qui mettaient en évidence une diminution des teneurs en minéraux solubles avec l'augmentation du pH. Avec l'alcalinisation, l'état d'ionisation du phosphore inorganique change, la forme  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  diminuant au profit de la forme  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Figure 4). Celle-ci a une plus grande affinité pour le calcium ( $642 \text{ M}^{-1}$ ) comparée celle pour l'ion dihydrogénophosphate ( $11 \text{ M}^{-1}$ ) (Walstra & Jenness 1984) et cette forme doublement ionisée peut être considérée comme un chélateur du calcium. Puisque d'après Van Dijk (1991), le phosphate de calcium micellaire n'est pas impacté par l'alcalinisation, il est probable que le calcium interagissant exclusivement avec les résidus phosphoséryl des caséines ait été piégé par le phosphate pour former un sel de phosphate de calcium. Comme le phosphate de calcium de la phase aqueuse du lait est saturé et que les quantités de calcium et de phosphore inorganique de la phase aqueuse diminuaient avec l'alcalinisation, une précipitation de ce sel a été proposée. D'après Ahmad *et al.* (2009), le phosphate de calcium ainsi formé serait directement associé aux protéines, soit au niveau de sites de nucléation initialement présents soit en se liant au phosphate de calcium micellaire. Toutefois ce raisonnement n'est peut-être pas transposable ici car les teneurs en minéraux étaient beaucoup plus faibles que dans l'étude d'Ahmad *et al.* (2009).

### 2.2.2.2.8. Teneurs en azote

Comme attendu, que le pH ait été ajusté ou non, que les échantillons aient été prétraités ( $90^\circ\text{C}/60 \text{ min}$ ) ou non, les teneurs en azote total et en azote non protéiques restaient les mêmes. La protéolyse thermique était négligeable (résultats non montrés).

### 2.2.2.2.9. Lactosylation des caséines

#### 2.2.2.2.9.1. Analyse des caséines

Les quotients d'intensité des signaux obtenus dans les formules, alcalinisées ou non, étaient différents (Figure 66). En particulier, les rapports des intensités des signaux produits par les caséines lactosylées et non lactosylées n'étaient pas significativement modifiés par le

prétraitement thermique dans la formule au pH non ajusté contrairement aux échantillons alcalinisés (Figure 66).

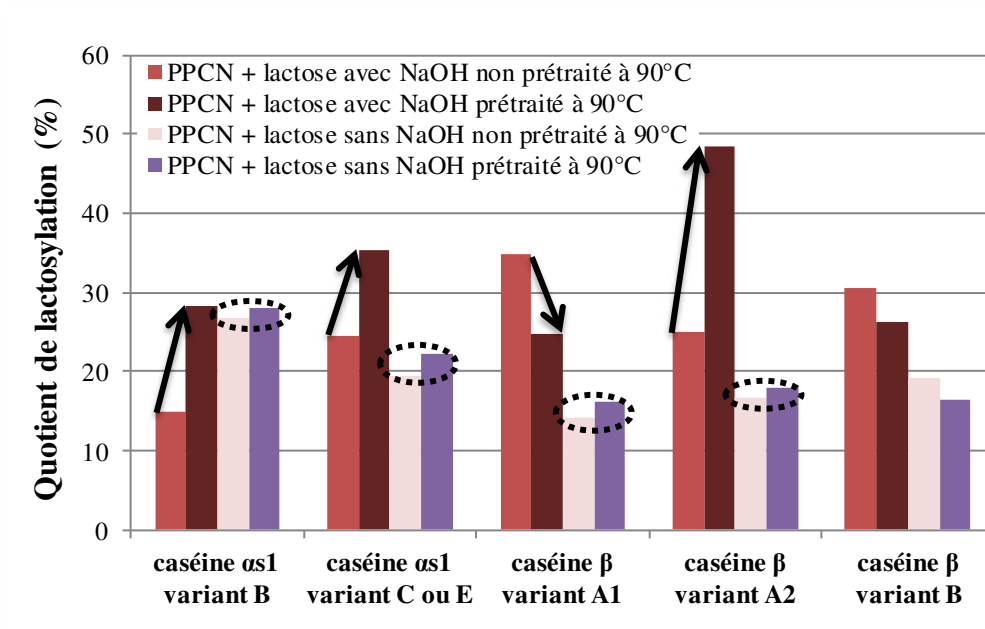


Figure 66 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de l'alcalinisation sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse des caséines dans les formules contenant PPCN et lactose

L'analyse par spectrométrie de masse des caséines confirmait que les modifications chimiques induites par le prétraitement étaient favorisées par une alcalinisation préalable.

#### 2.2.2.2.9.2. Analyse des peptides tryptiques

Alors que des lactosylations pouvaient être détectées par spectrométrie de masse sur les peptides tryptiques de la formule contenant PPCN et lactose, alcalinisée et prétraitée à 90°C pendant 60 minutes (lysine 132 sur la caséine  $\alpha_{s1}$  et lysine 91 sur la caséine  $\alpha_{s2}$ ), aucune lactosylation n'apparaissait dans la formule au pH non ajusté. Les rapports d'intensité des signaux suggéraient que l'échantillon non prétraité avait davantage de résidus lysyls lactosylés (par rapport à la quantité de peptides natifs).

Ces résultats confirmaient donc que la lactosylation était favorisée par une alcalinisation préalable de la suspension de PPCN et lactose.

### 2.2.2.3. Conclusion

Alcaliniser la suspension de PPCN et de lactose en ajoutant une solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> a modifié plusieurs variables avant même le prétraitement (90°C/60 min) :

- La couleur : clarification ;
- Le potentiel zêta : charge nette plus négative ;
- La teneur en eau des culots d’ultracentrifugation : hydratation micellaire supérieure ;
- Les teneurs en calcium et phosphate solubles : augmentation probable de la minéralisation des micelles.

Ainsi, l’**alcalinisation** de la suspension de PPCN et lactose en modifiant les équilibres minéraux, l’ionisation des molécules et la structure de la micelle de caséines a permis de **favoriser la réaction de lactosylation** au cours du prétraitement et d’**améliorer la stabilité** des protéines acidifiées face au traitement UHT (tests en bain d’huile).

Un moyen de s’affranchir de l’ajout d’une base, tout en gardant un bon taux de lactosylation, pourrait être de favoriser la réaction différemment, par exemple en utilisant une molécule plus réactive que le lactose.

### 2.2.3. Étude de la glycosylation face à la lactosylation en système modèle

Chen *et al.* (2015) ont montré que la structure du sucre (taille, position du groupement carbonyle, état de charge) avait un effet sur la stabilité thermique de la  $\beta$ -lactoglobuline. La taille du sucre jouait également sur la cinétique de la glycation qui était réduite avec l’augmentation de la masse molaire du glucide (Chen *et al.* 2013). Selon plusieurs études (Chevalier *et al.* 2001a ; Fenaille 2003 ; Liu & Zhong 2013), le lactose génère peu de glycation (résultats obtenus sur  $\beta$ -lactoglobuline et albumine sérique bovine). Par conséquent, pour optimiser la réaction de fixation du sucre sur les caséines, une autre source a été recherchée. Un essai a été réalisé avec un monosaccharide plus réducteur, et donc

potentiellement plus réactif : le glucose (Lee *et al.* 1979 ; Chevalier *et al.* 2001a ; Chen *et al.* 2013). D'après Chevalier *et al.* (2001a), plus la chaîne carbonée du sucre est courte, plus la forme ouverte de cette chaîne est présente et plus le sucre réagit avec les groupements amines des protéines. Dans leur étude, ils montraient également que la glycosylation permettait de réduire le pHi de la  $\beta$ -lactoglobuline.

Le protocole était le même que précédemment, à l'exception de l'ajustement de pH qui n'était pas appliqué (l'objectif étant de savoir si l'augmentation du pouvoir réducteur pouvait compenser l'absence d'alcalinisation) (Figure 22, *Chapitre 2 – paragraphe 2. Préparation des formules*). Pour conserver la même teneur en matière sèche, la même concentration en sucre a été utilisée (soit 50 g.L<sup>-1</sup> glucose ou lactose). Toutefois, la masse molaire du glucose étant inférieure à celle du lactose (180 g.mol<sup>-1</sup> contre 342 g.mol<sup>-1</sup>), la concentration molaire de celui-ci était quasiment deux fois supérieure à l'échantillon de référence.

Par ailleurs, le glucose pouvant être issu de l'hydrolyse du lactose (Baptista & Carvalho 2004), cet ingrédient pourrait potentiellement être considéré comme *clean label*. Son pouvoir sucrant reste également assez proche de celui du lactose. Cette étude avait donc également un intérêt industriel.

### 2.2.3.1. Résultats & Discussion

#### 2.2.3.1.1. Indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile)

Alors qu'à pH 6,9 l'indice de stabilité de la formule avec lactose était de 81 % après le prétraitement 90°C/60 min/pH 7,0 (échantillon stable), celui de la formule avec glucose n'était que de 23 % (échantillon déstabilisé). Le prétraitement de stabilisation avec ce sucre pourtant plus réducteur était donc inefficace.

#### 2.2.3.1.2. Couleur

Le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0) n'entraînait aucune différence significative de couleur dans la formule contenant PPCN et glucose :  $b^* = -2,7 \pm 0,5$  avant, puis  $-2,3 \pm 0,2$  après prétraitement (Figure 67). Avant prétraitement, la valeur de  $b^*$  était de  $-2,7 \pm 0,5$  contre  $2,7 \pm 0,1$  pour le glucose et le lactose respectivement.

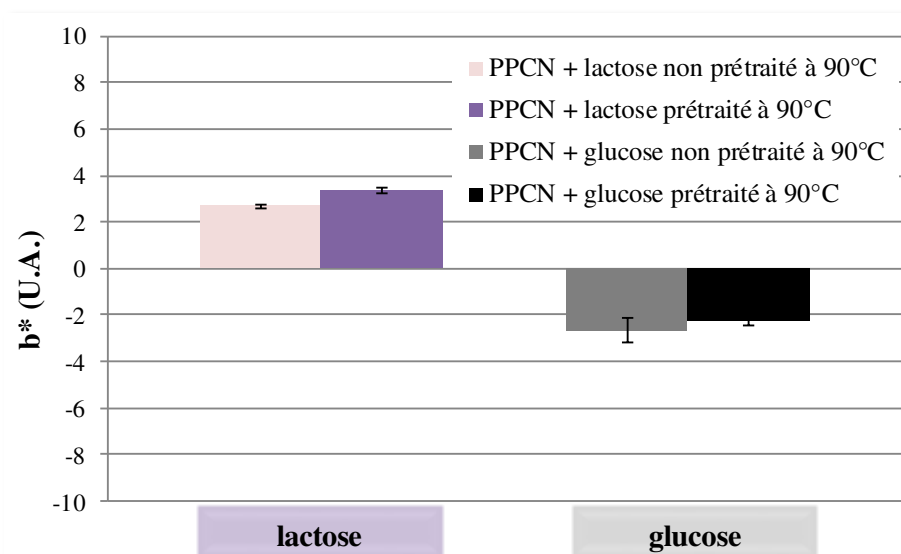


Figure 67 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0) et du type de sucre (lactose ou glucose) sur la dimension b\* (U.A. : unités arbitraires) de formules contenant du PPCN et sans ajout de soude avant acidification (moyennes sur 3 mesures)

L'absence de variation avec le prétraitement dans la formule avec glucose était similaire à celle avec lactose. Par conséquent, la substitution du sucre ne permettait pas d'accélérer sensiblement les réactions de Maillard. La source de glucide avait néanmoins un impact sur la couleur. Cette différence entre les deux formules s'expliquait essentiellement par la teinte des poudres : jaune pour le lactose et blanche pour le glucose.

#### 2.2.3.1.3. pH

Que ce soit dans la formule contenant du lactose ou celle contenant du glucose, le pH ne variait pas avec le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0).

#### 2.2.3.1.4. Potentiel zêta

Que ce soit dans la formule contenant du lactose ou celle contenant du glucose, le potentiel zêta ne variait pas avec le prétraitement et restait proche de -20 mV.



2.2.3.1.5. Taille de particules

Le diamètre des micelles était similaire que la formule contienne du lactose ou du glucose et que l'échantillon ait été prétraité ou non :  $187 \pm 3$  contre  $179 \pm 3$  nm respectivement, pour le lactose et le glucose (sans prétraitement).

2.2.3.1.6. Teneurs en eau des culots d'ultracentrifugation

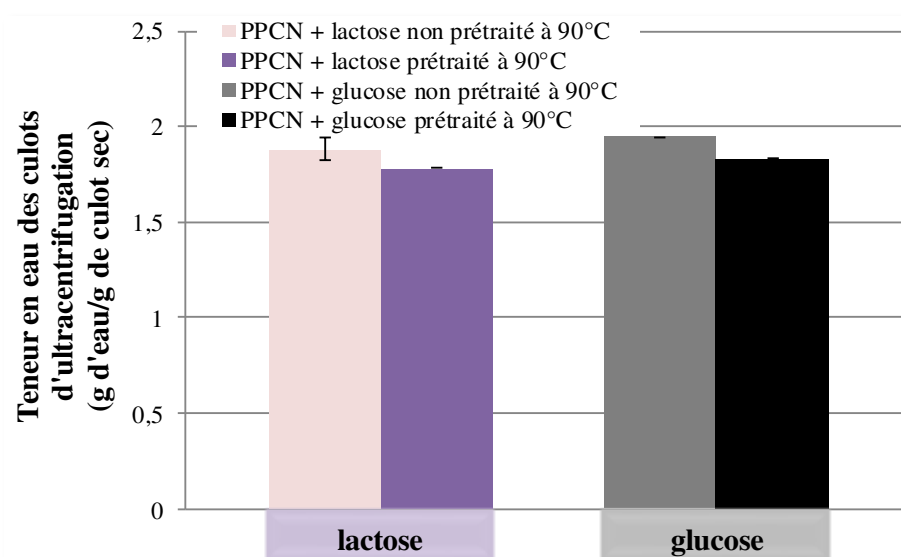


Figure 68 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0) et du type de sucre (lactose ou glucose) sur l'hydratation micellaire dans des formules contenant du PPCN et sans ajout de soude, avant acidification (moyennes sur 2 mesures)

Une légère diminution d'hydratation micellaire après le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0) était observée quel que soit le sucre réducteur : baisse de 1,88 à 1,78 et de 1,94 à 1,83 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec pour les formules contenant lactose et glucose respectivement. De même, les teneurs en eau des culots d'ultracentrifugation étaient similaires que les formules contiennent du lactose ou du glucose : environ 1,9 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec (Figure 68).

La substitution du lactose par le glucose (pour une même concentration massique mais une concentration molaire deux fois supérieure) ne modifiait donc pas significativement ni la

teneur en eau des culots d'ultracentrifugation, ni l'impact du prétraitement thermique sur cette dernière.

2.2.3.1.7. *Teneurs en azote et minéraux solubles*

Les teneurs en azote et minéraux solubles n'étaient pas impactées par le choix du sucre réducteur, comme attendu (résultats non montrés).

2.2.3.1.8. *Glycation des caséines*

2.2.3.1.8.1. *Analyse des caséines*

Aucune caséine porteuse d'une masse supplémentaire de +162 Da (correspondant à la fixation d'une molécule de glucose avec la libération d'une molécule d'eau, soit 180 - 18 Da) n'était détectée par spectrométrie de masse sur caséines dans la formule contenant du glucose. En revanche, des augmentations de +324 Da (soit 2 molécules de glucose) ont été détectées. Quelle que soit la caséine, le quotient d'intensité des signaux en rapport avec la variation de 324 Da était supérieur après prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0) de la formule contenant PPCN et glucose (Figure 69).

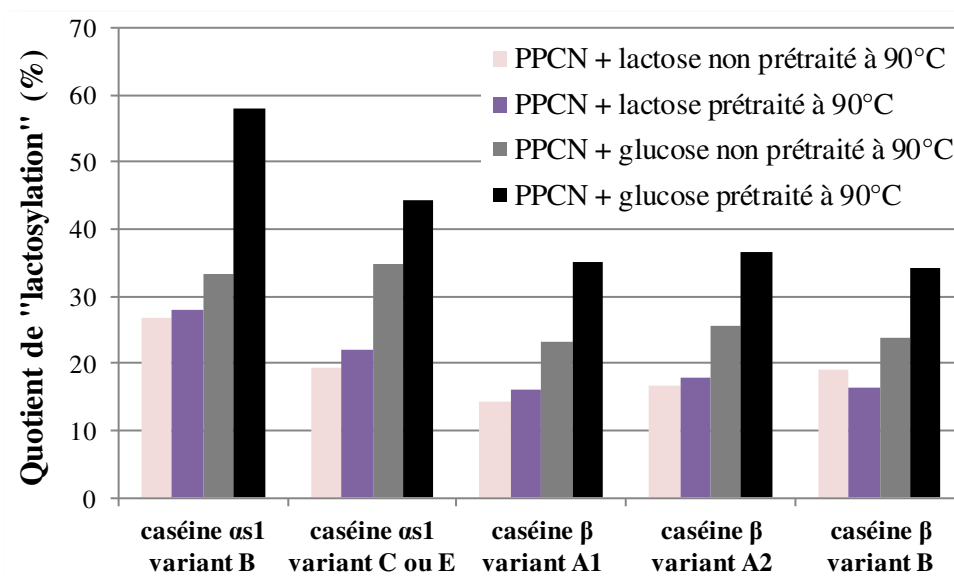


Figure 69 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0) et du type de sucre (lactose ou glucose) sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse des caséines dans les formules contenant du PPCN et sans ajout de soude

L'absence de détection de glycosylation après prétraitement pourrait être causée par une mauvaise ionisation et donc un signal trop faible de ces molécules « mono-glycosylées ». De plus, le prétraitement thermique pourrait entraîner une condensation du glucose en maltose dont la masse molaire est identique à celle du lactose et dont la fixation a donc été relevée en observant la même différence de masse de +324 Da (Sugisawa & Edo 1966). Il semblerait que l'augmentation du pouvoir réducteur du glucide ait favorisé la glycation des caséines.

### 2.2.3.1.8.2. Analyse des peptides tryptiques

Aucune lactosylation n'a été mise en évidence dans la formule PPCN + lactose. En revanche, dans la formule PPCN + glucose, des différences de + 324 Da ont été détectées sur des lysines de la caséine  $\alpha_{s2}$  en positions 91 (quotient de 7,31) et 113 (quotient de 7,92). La fixation d'une molécule de glucose a aussi été détectée sur la lysine en position 76 (quotient de 7,04) de la caséine  $\alpha_{s2}$ .

Ces résultats sont difficilement explicables (condensation de deux molécules de glucose en maltose ?) mais confirment les observations faites avec les données obtenues par spectrométrie de masse des caséines entières.

### 2.2.3.2. Conclusion

La **substitution du lactose par du glucose n'a pas permis d'améliorer la stabilité** des caséines acidifiées face au traitement UHT (tests en bain d'huile). Elle n'a pas non plus modifié le pH, le potentiel zêta, la taille de particule, l'hydratation micellaire ou les teneurs en azote et minéraux solubles. La fixation d'une molécule de glucose sur la caséine  $\alpha_{s2}$  (en position 76) a pu être mise en évidence. Des différences de +324 Da ont également été détectées sur les caséines  $\alpha_{s2}$ .

Si le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,0) en présence de glucose n'a pas permis d'améliorer la stabilité des caséines acidifiées face au traitement thermique UHT, c'était peut-être parce que le glucose est une plus petite molécule que le lactose (mono- *versus* disaccharide). Or, d'après l'étude de Chen *et al.* (2015) portant sur la  $\beta$ -lactoglobuline, plus la

taille du sucre est grande (comparaisons entre ribose, glucose, maltose, maltotriose, fructose et acide galacturonique), plus l'amélioration de la stabilité thermique est significative. L'explication pour cette différence résiderait dans une gêne stérique plus importante qui empêcherait la formation d'agrégats durant le chauffage à haute température. Le pH pourrait aussi avoir un impact *per se* (pas d'ajout de soude dans cette expérimentation).

Ainsi, l'augmentation des quotients de glycation (validant l'hypothèse d'une plus grande réactivité du glucose) n'a pas suffi à retrouver l'effet positif observé avec le lactose prétraité à pH 7,5, sur la stabilité thermique. L'objectif visé n'a donc pas pu être atteint avec le glucose.

### 2.2.4. Étude de l'impact de la teneur en lactose

D'après Evangelisti *et al.* (1994), le taux de lactosylation dépend du quotient protéines-lactose. De même, O'Brien et Morrissey (1989 a et b, cité par O'Brien 1997) avancent qu'un excès de sucres réducteurs par rapport aux composés aminés a une action promotrice des réactions de Maillard.

Même si la concentration molaire en lactose était largement supérieure à celle en lysines caséiniques, une étude a donc été menée en la multipliant par deux ([lactose] = 100 g.L<sup>-1</sup>) ou par trois ([lactose] = 150 g.L<sup>-1</sup>). Comme précédemment, le PPCN était utilisé comme source de caséines et le pH était ajusté à 7,5 à 50°C avec une solution de NaOH à 1 mol.L<sup>-1</sup>.

#### 2.2.4.1. Résultats & Discussion

##### 2.2.4.1.1. Indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile)

Après le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5), l'augmentation de la teneur en lactose entraînait une diminution de la stabilité des micelles de caséines acidifiées face au traitement UHT (Figure 70). Ainsi, à pH 6,9, pour les formules prétraitées, les indices de stabilité étaient respectivement de 100 (échantillon stable), 58 (échantillon en voie de déstabilisation) et 36 %

(échantillon quasiment déstabilisé) pour des teneurs en lactose respectivement de 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup>. De même sans prétraitement, l'augmentation de la teneur en lactose entraînait une dégradation de l'indice de stabilité (Figure 70). À pH 6,9, sans prétraitement, les indices de stabilité étaient de 76, 33 et 27 % pour respectivement les formules contenant 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> de lactose.

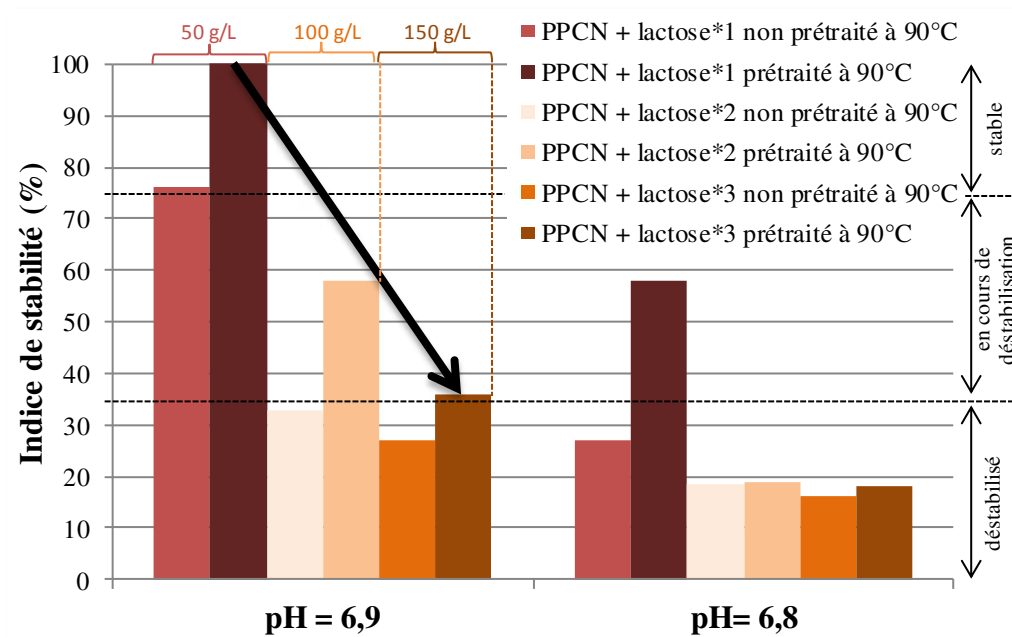


Figure 70 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (\*1 = 50 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 100 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 150 g.L<sup>-1</sup>) sur l'indice de stabilité (tests en bain d'huile) après acidification à pH 6,9 et 6,8

Par conséquent, même si la lactosylation pouvait (éventuellement) être favorisée par un enrichissement en lactose et même si un prétraitement était appliqué, un ajout de sucre était déconseillé dans une stratégie de stabilisation des protéines acidifiées face au traitement UHT. D'après Sweetsur & White (1975), lors d'un traitement thermique, 50 % de l'acidité générée par l'augmentation de température sont dus au sucre. Ainsi, l'excès de lactose déstabiliserait les micelles de caséines par une acidification thermo-induite.

2.2.4.1.2. Couleur

Alors qu'aucune différence significative de  $b^*$  n'était mise en évidence dans l'échantillon à 50 g.L<sup>-1</sup> de lactose avec ou sans prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5), dans les formules à 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> le prétraitement semblait avoir une influence sur la couleur (Figure 71). La variation était du même ordre de grandeur pour les deux formules enrichies, passant de  $-5,6 \pm 0,8$  à  $-3,2 \pm 0,5$  et de  $-4,7 \pm 0,1$  à  $-2,9 \pm 0,2$  respectivement sans et avec prétraitement et pour des concentrations en lactose de 100 et 150 g.L<sup>-1</sup>. La teneur en lactose modifiait significativement la valeur de  $b^*$  (Figure 71) :  $0,9 \pm 0,6$ ,  $-5,6 \pm 0,8$  et  $-4,7 \pm 0,1$  respectivement pour [lactose] = 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup>, sans prétraitement.

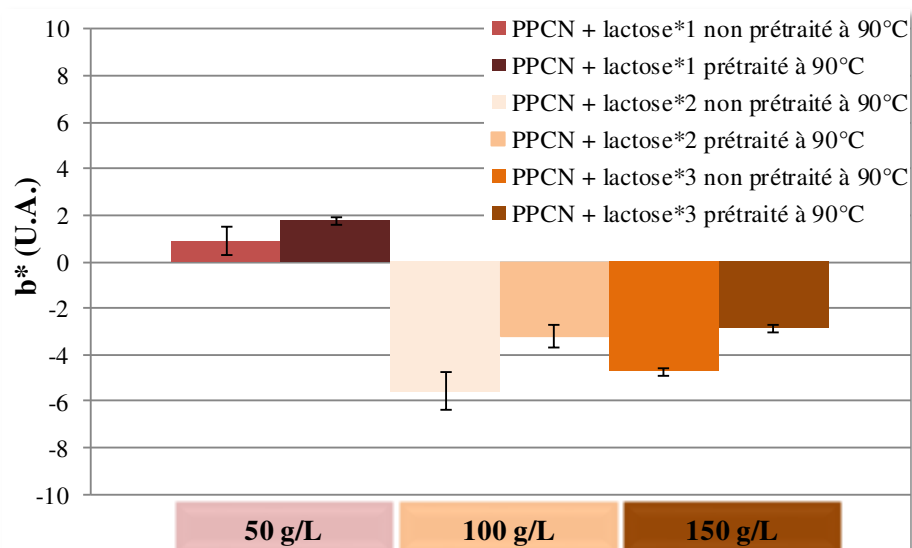


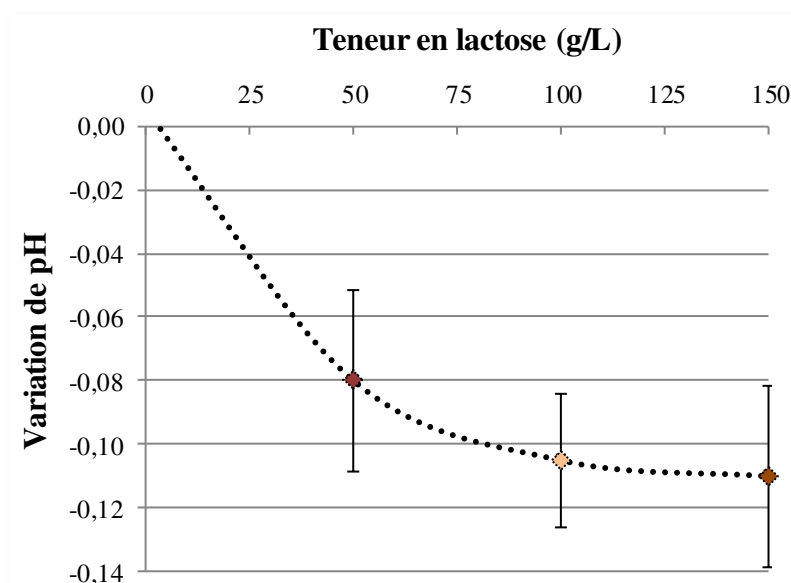
Figure 71 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (\*1 = 50 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 100 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 150 g.L<sup>-1</sup>) sur le brunissement (U.A. : unités arbitraires, moyennes de  $b^*$  sur 3 mesures) avant acidification

La différence de couleur des échantillons selon la teneur en lactose avait pour origine la variabilité entre sacs de poudres (différents entre la formule 50 g.L<sup>-1</sup> d'une part et 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> d'autre part). Toutefois, le brunissement observé pour les formules à 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> de lactose suggérait que le rapport lactose-protéines avait effectivement un impact sur les réactions de lactosylation. Evangelisti *et al.* (1994) avaient fait la même observation dans des formules infantiles. L'augmentation de la teneur en sucre pourrait donc accélérer les

réactions de Maillard et ainsi favoriser la formation de mélanoidines (*Chapitre 1 – paragraphe 3.2.1. La réaction de glycation*).

#### 2.2.4.1.3. pH

La variation de pH, après prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5), n'était pas significativement différente selon la concentration en sucre (Figure 72). Une tendance à la baisse avec l'augmentation de la teneur en lactose pouvait toutefois être notée.



**Figure 72 : Impact de la teneur en lactose sur la variation de pH causée par le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) (moyennes sur 2 essais)**

La dégradation thermique du lactose étant productrice d'acidité (*Chapitre 1 – paragraphe 3.2. Impact du traitement thermique sur les glucides*), elle expliquerait cette tendance à une baisse de pH corrélée à la teneur en sucre.

2.2.4.1.4. Potentiel zêta

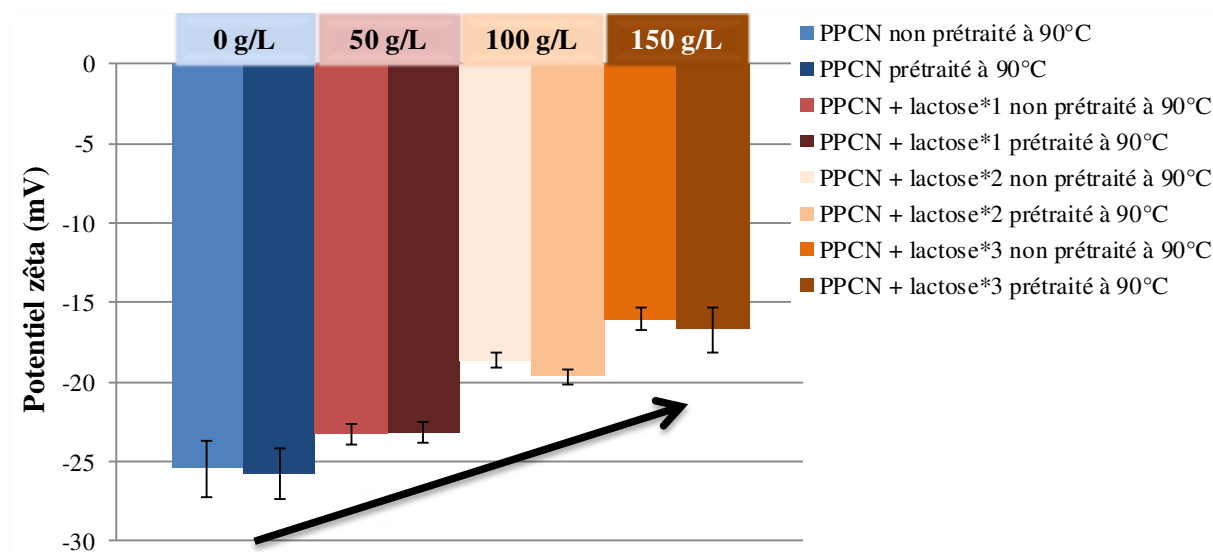


Figure 73 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (\*1 = 50 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 100 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 150 g.L<sup>-1</sup>) sur le potentiel zêta (moyenne sur 3 mesures)

Quelle que soit la teneur en lactose, le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) ne modifiait pas significativement le potentiel zêta des micelles de caséines (Figure 73). En revanche, plus la teneur en lactose était élevée, moins le potentiel zêta était négatif (Figure 73). En effet, avant prétraitement, ils étaient de -23 ± 0,7, -19 ± 0,5 et -16 ± 0,7 mV pour des formules contenant respectivement 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> de lactose.

L'augmentation du potentiel zêta avec la concentration en lactose (Figure 73) pourrait être liée aux variations de viscosité, de taille de particules (Figure 74) et de constante diélectrique. En effet, à 20°C, la viscosité de solutions de lactose passe de 1,15 à 1,36 et 1,66 mPa.s<sup>-1</sup> pour des concentrations de 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> respectivement (Morison & Mackay 2001) et la permittivité diminue linéairement avec la concentration en lactose (Arnold *et al.* 1993).



## 2.2.4.1.5. Taille de particules

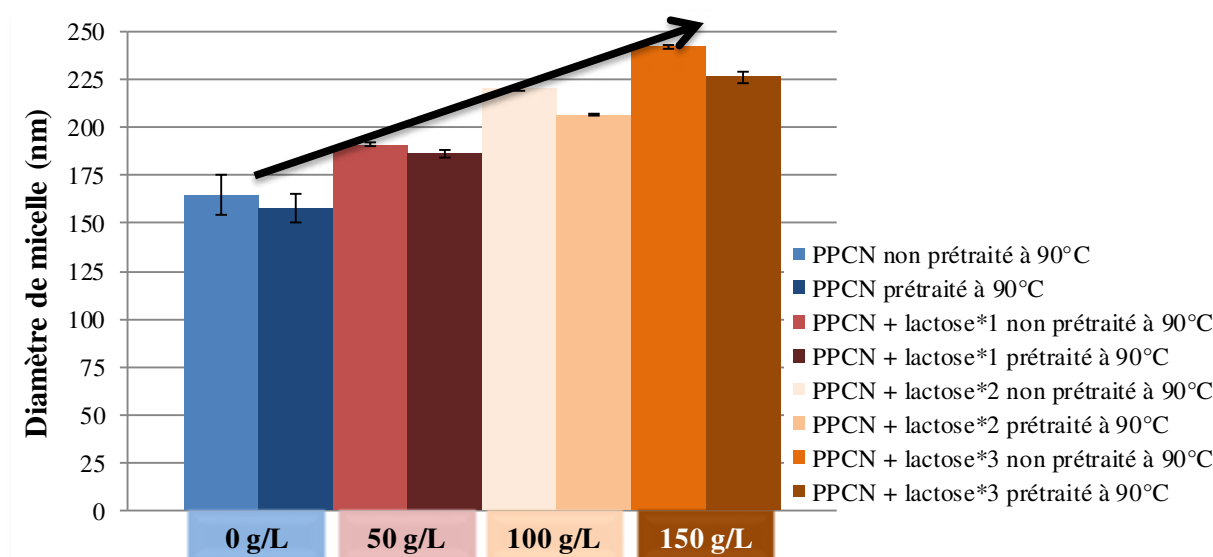


Figure 74 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (\*1 = 50 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 100 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 150 g.L<sup>-1</sup>) sur le diamètre des particules, avant acidification (moyenne sur 3 mesures)

La faible tendance à une diminution de taille observée avec le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) dans la formule contenant 50 g.L<sup>-1</sup> de lactose était accentuée dans les formules enrichies en sucre (Figure 74) : réduction de 5, 14 et 16 nm respectivement pour les formules contenant 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> de lactose après chauffage à 90°C pendant 60 minutes. Plus la teneur en lactose était élevée, plus la taille de particules était grande (Figure 74). En effet, avant prétraitement, les diamètres micellaires étaient de 191 ±1, 221 ±1 et 243 ±1 nm pour des formules contenant respectivement 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> de lactose. La polydispersité était d'environ 0,13 dans les trois formules.

L'augmentation de taille des particules avec la teneur en lactose s'explique sans doute de la même manière que lors de la comparaison des formules avec et sans lactose (*Chapitre 3 – paragraphe 2.2.1. Étude de la lactosylation en système modèle*, Figure 53) : la présence de lactose favoriserait les interactions hydrophiles, en particulier à la surface des micelles et les caséines  $\kappa$  se déploieraient alors davantage. L'influence de la concentration en lactose sur la constante diélectrique et donc sur l'indice de réfraction du milieu dispersant pourrait aussi biaiser un peu la mesure.

2.2.4.1.6. Teneur en eau des culots d'ultracentrifugation

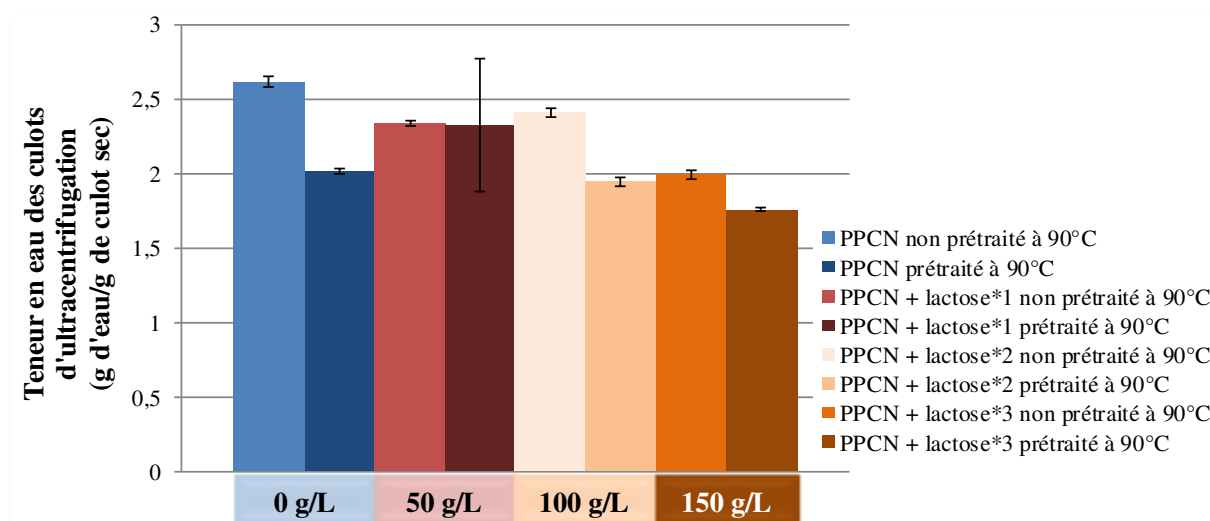


Figure 75 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (\*1 = 50 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 100 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 150 g.L<sup>-1</sup>) sur l'hydratation micellaire (moyenne sur 2 mesures)

La diminution de teneur en eau des culots d'ultracentrifugation, après prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5), était de 0,46 et 0,23 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec respectivement dans les formules à 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> de lactose (Figure 75). La teneur en eau des culots d'ultracentrifugation était proche de 2,4 ±0,05 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec pour les formules contenant 50 ou 100 g.L<sup>-1</sup> de lactose contre 2,0 ±0,03 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec pour la formule la plus enrichie.

L'écart-type de mesure pour l'échantillon à 50 g.L<sup>-1</sup> de lactose, prétraité (90°C/60 min/pH 7,5), était important sur cet essai mais d'autres expérimentations (*Chapitre 3 – paragraphe 2.2.1.1.6. Teneurs en eau des culots d'ultracentrifugation*) ont aussi mis en évidence cette diminution d'hydratation micellaire dans cette formule (perte de 0,25 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec). La comparaison des teneurs en eau des culots d'ultracentrifugation avant prétraitement ne révélait pas de relation linéaire entre l'hydratation micellaire et la teneur en lactose (Figure 75). Il est difficile d'y trouver une explication.

La diminution d'hydratation micellaire causée par le prétraitement étant plus importante pour l'échantillon sans lactose (0,6 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec), il est possible que les molécules de sucres, parce qu'elles sont hydrophiles, retiennent davantage l'eau dans les

culots d'ultracentrifugation étuvés. Le lactose limiterait cette « déshydratation thermo-induite ».

#### 2.2.4.1.7. Lactosylation des caséines

##### 2.2.4.1.7.1. Analyse des caséines

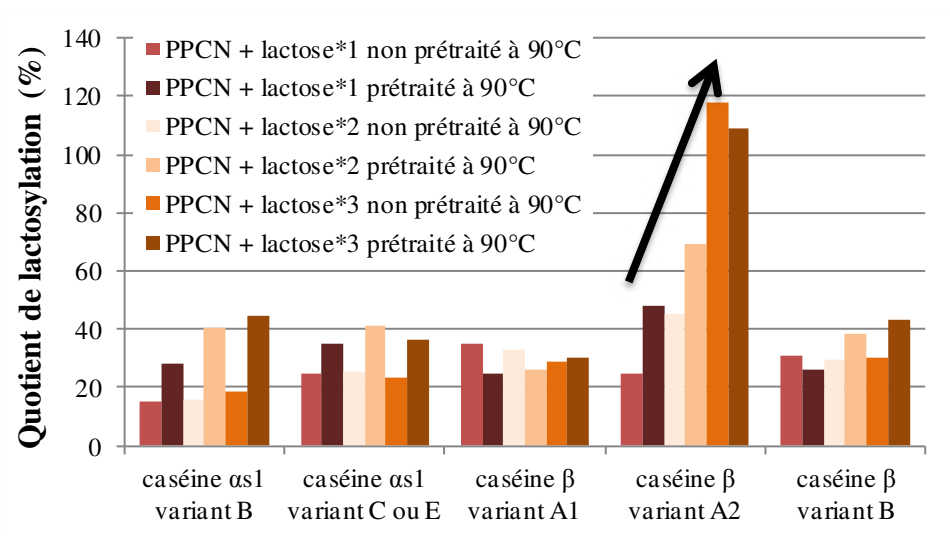


Figure 76 : Impacts du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en lactose (\*1 = 50 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 100 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 150 g.L<sup>-1</sup>) sur les quotients de lactosylation (analyse des caséines par spectrométrie de masse)

Avant prétraitement thermique, les quotients de lactosylation étaient similaires quelle que soit la teneur en lactose et quelle que soit la caséine à l'exception de la caséine  $\beta$  variant A<sub>2</sub> où les rapports augmentaient avec la concentration en sucre (Figure 76).

Les variations de quotient d'intensité des signaux émis par les caséines ayant une masse molaire augmentée de +324 Da dépendaient de la caséine et de son variant. Ainsi, après prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5), plusieurs observations pouvaient être faites :

- Sur la caséine  $\alpha_{s1}$ 
  - variant B, la lactosylation semblait augmenter avec la teneur en lactose : quotient de 28, 40 et 45 % respectivement pour des concentrations de 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> de lactose.

- variant C ou E, les résultats étaient similaires quelle que soit la teneur en sucre.
- Sur la caséine  $\beta$ 
  - variant A<sub>1</sub>, la diminution du quotient de lactosylation semblait s'atténuer avec l'augmentation de la teneur en lactose.
  - variant A<sub>2</sub>, le quotient augmentait pour les formules à 50 et 100 g.L<sup>-1</sup> mais diminuait pour la formule la plus concentrée en sucre.
  - variant B, le quotient augmentait avec la teneur en lactose : 26, 38 et 43 % pour des concentrations de 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> respectivement.

De manière générale, augmenter la teneur en sucre favorisait la lactosylation des caséines dans une formule contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et au pH ajusté à 7,5 à 50°C.

### 2.2.4.1.7.2. Analyse des peptides tryptiques

Dans la formule contenant 50 g.L<sup>-1</sup> de lactose, seule la lysine de la caséine  $\alpha_{s1}$  en position 119 (quotient de 1,26) semblait être lactosylée. En revanche, dans les formules enrichies en sucre, plusieurs lysines pouvaient être alourdis de 324 Da suite au prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) : sur la caséine  $\alpha_{s1}$  en position 119 (quotients de 1,11 et 1,19) et sur la caséine  $\alpha_{s2}$  en positions 113 (quotients de 1,23 et 1,20), 188 (quotients de 1,17 et 1,10) et 191 (quotients de 1,15 et 1,18) (quotients respectivement attribués aux échantillons contenant 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> de lactose). Dans la formule où la concentration en lactose avait été multipliée par deux, des lactosylations plus intenses après traitement de stabilisation étaient aussi détectées sur la caséine  $\alpha_{s2}$  en positions 80 (quotient de 1,12) et 173 (quotient de 1,13) et sur la caséine  $\beta$  en positions 113 (quotient de 1,12) et 176 (quotient de 1,12). Pour la formule ayant une teneur en lactose de 150 g.L<sup>-1</sup>, une modification de +324 Da était détectée sur la lysine de la caséine  $\alpha_{s1}$  en position 7 (quotient de 1,24).

### 2.2.4.2. Conclusion

Augmenter la teneur en lactose de 50 à 150 g.L<sup>-1</sup> modifiait plusieurs variables :

- La couleur : suspension plus jaune (lié à la couleur des poudres) et brunissement un peu plus intense après prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) ;
- Le pH : une tendance à s'acidifier davantage à cause de la dégradation thermique du lactose plus concentré (*Chapitre 1 – paragraphe 3.2.2. La dégradation du lactose par la voie de Lobrey de Bruyn-Aberda van Ekenstein (voie L.A.)*) ;
- Le potentiel zêta : moins négatif (mais pas d'impact significatif du traitement de stabilisation) ;
- La taille de particules : diamètre des micelles en augmentation (et diminution avec le prétraitement quelle que soit la teneur en sucre) ;
- La fixation du lactose sur les caséines : lactosylation plus intense d'après les données obtenues par spectrométrie de masse.

En revanche, les teneurs en eau des culots d'ultracentrifugation étaient proches pour les formules à 50 et 100 g.L<sup>-1</sup> de lactose et inférieure à 150 g.L<sup>-1</sup> et une même tendance à la diminution de l'hydratation micellaire était observée avec le prétraitement de stabilisation.

Ainsi, **augmenter le rapport lactose - protéines** intensifierait les phénomènes en jeu lors du traitement de stabilisation. Toutefois, cela **n'améliorait pas la stabilité** des micelles de caséines acidifiées face au traitement thermique UHT, en milieu modèle.

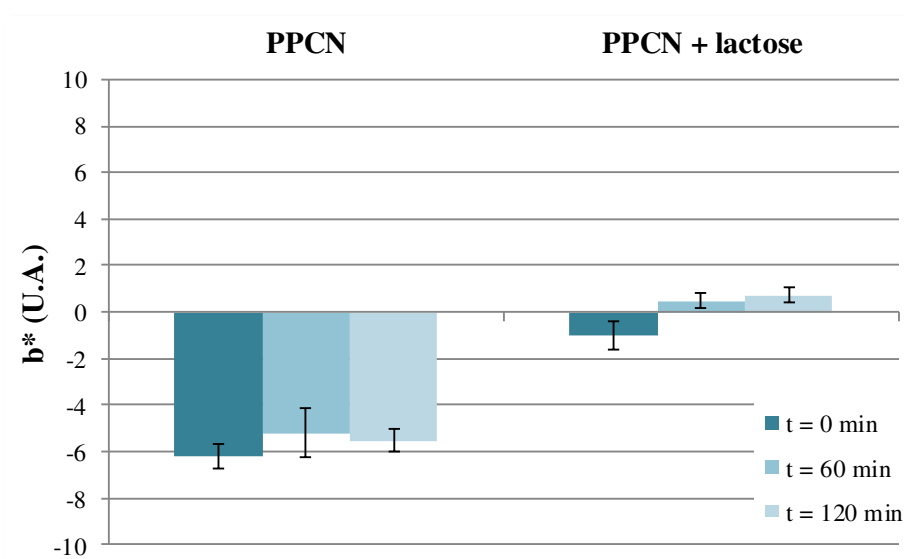
### 2.2.5. Étude de l'impact de la durée de prétraitement à 90°C

Afin d'avoir une approche cinétique de la lactosylation, les analyses ont également été réalisées après des durées de chauffage à 90°C allant de 0 à 120 minutes. L'allongement de la durée de prétraitement avait pour objectif de favoriser les réactions et donc d'intensifier les fluctuations des variables mesurées. Cette étude a été réalisée sur des formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN avec ou sans lactose à 50 g.L<sup>-1</sup>. Le calcul des indices de stabilité et les

analyses par spectrométrie de masse n'ont pas été réalisés dans la cadre de cette expérimentation plus « exploratoire ».

### 2.2.5.1. Résultats & Discussion

#### 2.2.5.1.1. Couleur



**Figure 77 : Impact de la durée de prétraitement à 90°C/pH 7,5 sur la valeur de  $b^*$  (U.A. : unités arbitraires) dans des formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et sans ou avec lactose à 50 g.L<sup>-1</sup> (moyenne de 3 mesures pour  $t = 120$  min et sur 6 mesures pour  $t = 0$  et 60 min)**

Dans la formule sans lactose, la durée de prétraitement n'avait pas d'influence significative sur la dimension  $b^*$  de la couleur (Figure 77). En revanche, pour la formule avec lactose, l'échantillon brunissait légèrement au bout d'une heure ( $b^* = -1,0 \pm 0,6$  à  $t = 0$  min contre  $+0,5 \pm 0,4$  à  $t = 60$  min) et n'évoluait quasiment plus après ( $b^* = +0,7 \pm 0,3$  à  $t = 120$  min).

Ces résultats suggèrent que le stade avancé des réactions de Maillard ne commençait à être atteint que dans la formule contenant du sucre et à partir de 60 minutes de prétraitement.

### 2.2.5.1.2. *pH*

Comme exposé dans le *Chapitre 3 – paragraphe 2.2.1.1.3. pH*, le pH ne variait pas significativement entre  $t = 0$  et 60 minutes dans la formule témoin et tendait à diminuer légèrement entre  $t = 0$  et 60 minutes en présence de lactose. Après deux heures de prétraitement  $90^{\circ}\text{C}/\text{pH } 7,5$ , la baisse était plus significative :  $-0,07$  dans la formule contenant uniquement du PPCN et  $-0,10$  dans la formule avec lactose.

L'acidification ne serait pas due qu'à la réaction de lactosylation et à la dégradation thermique du lactose mais elle serait aussi causée par des mécanismes thermo-induits (*Chapitre 1 – paragraphe 3. Impacts de quelques modifications physico-chimiques sur les micelles de caséines*) puisque la baisse de pH était également observée dans la formule témoin. Chauffer les échantillons jusqu'à deux heures à  $90^{\circ}\text{C}$  aurait donc des conséquences autres que l'avancement des réactions de Maillard.

### 2.2.5.1.3. *Potentiel zêta*

Le potentiel zêta était inférieur dans la formule avec lactose, comparé à celui de celle n'en contenant pas, quelle que soit la durée du prétraitement (autour de  $-22$  contre  $-26$  mV). Même après deux heures de prétraitement, dans les formules sans ou avec lactose, le potentiel zêta ne variait pas significativement.

## 2.2.5.1.4. Taille de particules

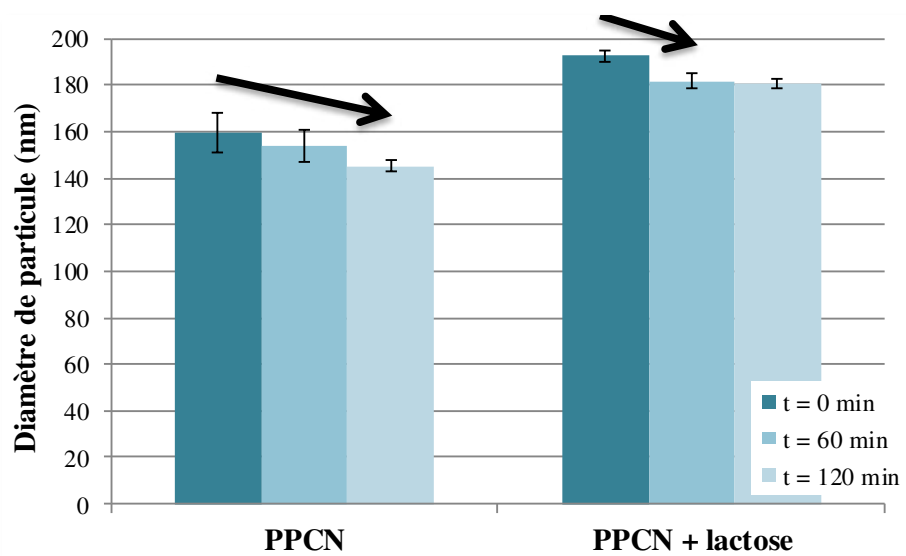


Figure 78 : Impact de la durée de prétraitement à 90°C/pH 7,5 sur le diamètre des particules (en nm) de formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN sans ou avec lactose à 50 g.L<sup>-1</sup>, avant acidification (moyenne de 3 mesures pour t = 120 min et sur 6 mesures pour t = 0 et 60 min)

Alors que la taille de particule n'était pas significativement impactée par le prétraitement à 90°C pendant 60 minutes dans la formule témoin (Figure 78), une tendance à la baisse tendait à apparaître au bout de deux heures de chauffage : diamètre de 160 ± 8 nm à t = 0 min contre 154 ± 7 et 145 ± 2 nm à t = 60 et 120 minutes respectivement.

Dans la formule contenant 50 g.L<sup>-1</sup> de lactose, augmenter la durée du prétraitement jusqu'à 120 minutes n'accroissait pas la diminution de diamètre observée après 60 minutes : diamètres de 192 ± 2, 182 ± 3, 180 ± 2 nm à t = 0, 60 et 120 minutes respectivement.

Comme la diminution du diamètre des micelles était observée dans la formule témoin et dans celle contenant du lactose, mais que cette baisse n'apparaissait pas après les mêmes durées de chauffage à 90°C, l'action d'au moins deux mécanismes différents pourrait être supposée, l'un dû au chauffage et l'autre impliqué par la présence du sucre.



## 2.2.5.1.5. Teneur en eau des culots d'ultracentrifugation

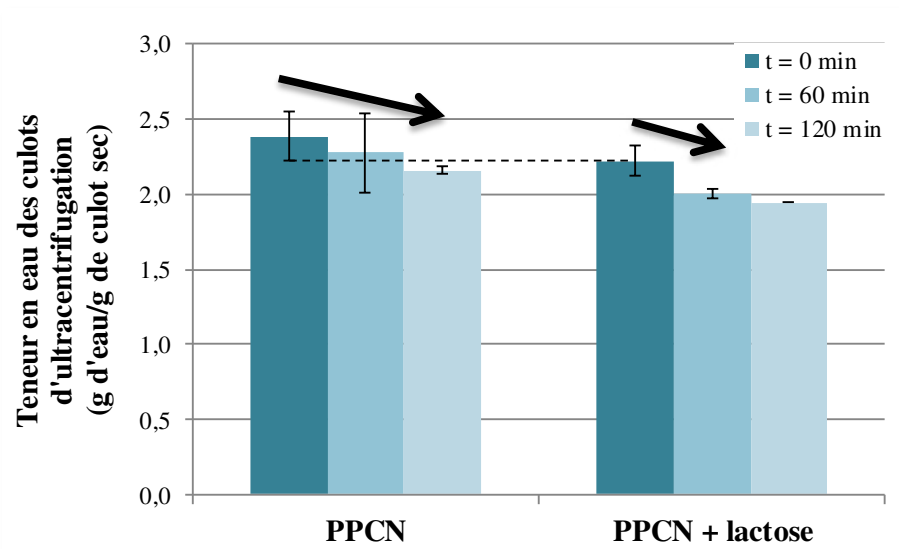


Figure 79 : Impact de la durée de prétraitement à 90°C/pH 7,5 sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation (g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec) dans des formules contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et sans ou avec lactose à 50 g.L<sup>-1</sup>, avant acidification (moyenne de 2 mesures pour t = 120 min et sur 4 mesures pour t = 0 et 60 min)

La diminution de la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation, surtout détectée dans la formule contenant du lactose, était sans doute due aux réactions de Maillard, et peu au chauffage à 90°C *sensu stricto*, puisque l'échantillon témoin était peu impacté.

## 2.2.5.1.6. Teneurs en azote et en minéraux solubles

Aucune différence significative au niveau des concentrations en azote (total et non protéique) n'a pu être détectée selon la durée du prétraitement (de 0 à 120 minutes) et selon la teneur en lactose de l'échantillon (0 ou 50 g.L<sup>-1</sup>).

Avec une incertitude de mesure de 10 %, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence au niveau des teneurs en minéraux solubles selon la durée du prétraitement (de 0 à 120 minutes) et selon la teneur en lactose de l'échantillon (0 ou 50 g.L<sup>-1</sup>).

### 2.2.5.2. Conclusion

L'étude des modifications induites au cours du temps par le prétraitement à 90°C a permis de mettre en lumière plusieurs éléments sur les :

- Mesures de couleur : le brunissement ( $b^*$ ) augmentait dans la formule contenant du lactose au bout de 60 minutes de chauffage alors qu'au bout de deux heures celui de la formule témoin n'était pas modifié. Cette variation était donc vraisemblablement due aux réactions de Maillard.
- Mesures de pH : une légère acidification (amorcée au bout de 60 minutes en présence de lactose) apparaissait après 120 minutes de prétraitement dans les deux formules, suggérant un impact du chauffage *per se* sur le pH (modification des équilibres minéraux et en particulier au niveau du phosphate tricalcique ? désamidation ?) et non pas seulement des réactions de Maillard ou de la dégradation selon la voie de L.A.
- Mesures du potentiel zêta : après 120 minutes de prétraitement, aucune modification significative de la charge de surface ne pouvait être mise en évidence, que la formule contienne du lactose ou non.
- Mesures de taille de particules : une diminution du diamètre de micelles apparaissait au bout de 120 minutes de prétraitement que la formule contienne du lactose ou non. Cette diminution serait induite par le chauffage à 90°C en lui-même. Toutefois, la tendance étant visible plus rapidement dans la formule contenant du lactose, le sucre réducteur aurait aussi un rôle propre dans cette baisse, que ce soit en accélérant le phénomène (solubilisation de la caséine  $\kappa$  ?) ou en intervenant par le biais d'un autre mécanisme à déterminer.
- Mesures de teneur en eau des culots d'ultracentrifugation : la diminution d'hydratation micellaire, détectée surtout dans la formule contenant du lactose, était sans doute principalement due aux réactions de Maillard.

Ainsi, prolonger la durée du prétraitement à 90°C n'a pas permis de mettre en évidence de différences au niveau du potentiel zêta ou des teneurs en azote et minéraux solubles mais a confirmé des tendances déjà observées au bout de 60 minutes dans la formule

avec lactose : diminution de la taille et de l'hydratation micellaire. La comparaison des données avec la formule témoin (sans sucre réducteur) a permis de distinguer les modifications uniquement dues au chauffage de celles causées par la présence du lactose. Des interactions ou mécanismes parallèles ne sont pas à exclure en présence de sucre.

### 2.3. Application du traitement de lactosylation sur du lait

Des essais avec du lait reconstitué (avec de la poudre de lait écrémé (PLE) réhydratée) et du lait frais écrémé ont aussi été mis en place pour se rapprocher des conditions industrielles. Les données obtenues sur ces formules plus complexes d'un point de vue composition sont plus difficiles à interpréter. En particulier, contrairement à une formule à base de PPCN, un lait, reconstitué ou frais, contient des minéraux, du citrate, des protéines sériques et davantage d'azote non protéique en plus des micelles de caséines. De nombreux mécanismes parallèles et interactions supplémentaires pouvaient donc entrer en jeu.

Afin de pouvoir traiter des données comparables à celles obtenues avec les formules à base de PPCN, le même protocole a été suivi pour le lait (frais ou reconstitué). Dans le cas d'un lait frais, l'étape de réhydratation des poudres à 50°C pendant une heure a simplement été remplacée par un maintien du produit à cette même température, sous agitation, pendant 60 minutes. Selon les expérimentations, le pH était ajusté à 7,5 à l'aide de la solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> ou non et la durée du prétraitement a également été étudiée.

2.3.1.1. Résultats & Discussion

2.3.1.1.1. Indice de stabilité thermique

Tableau 22 : Indices de stabilité thermique en fonction du type de lait, de l'ajout ou non de solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>, du barème de prétraitement thermique (Ø = aucun prétraitement), du pH d'acidification, du mode de traitement UHT (laboratoire = bain d'huile, pilote = échangeur tubulaire)

Type de lait	Alcalinisation préalable au prétraitement	Prétraitement thermique	pH	Échelle du traitement UHT	Indice de stabilité
Frais	Non	Ø	6,3	Laboratoire	15
Frais	Non	90°C/60 min	6,3	Laboratoire	24
Frais	Oui	90°C/60 min	6,3	Laboratoire	67
Reconstitué	Oui	90°C/120 min	6,3	Pilote	72
Reconstitué	Oui	Ø	6,3	Pilote	49
Reconstitué	Oui	90°C/120 min	6,2	Pilote	< 35
Frais	Oui	90°C/60 min	6,2	Laboratoire	42
Frais	Oui	Ø	6,2	Laboratoire	21
Frais	Oui	90°C/75 min	6,2	Pilote	66
Frais	Non	90°C/75 min	6,2	Pilote	24
Frais	Oui	Ø	6,2	Pilote	45

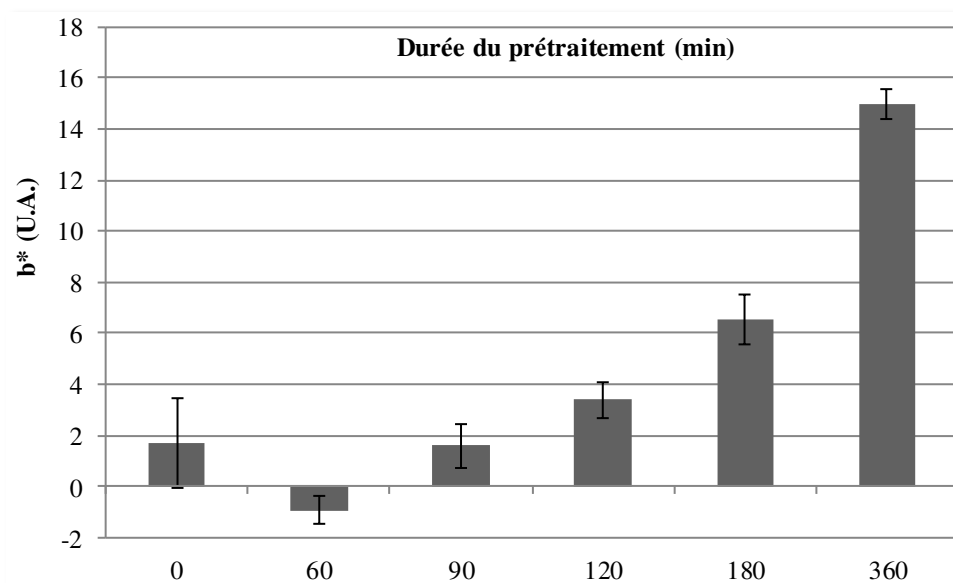
Pour un pH de 6,3, l'indice de stabilité (test en bain d'huile) d'un lait frais était de 15 % sans ajustement de pH ni prétraitement thermique préalables. Avec prétraitement, l'indice de stabilité était de 24 % en absence d'alcalinisation contre 67 % pour un échantillon de lait frais alcalinisé. Toujours à pH 6,3, l'indice de stabilité (test avec un échangeur tubulaire) d'un lait reconstitué alcalinisé était de 72 contre 49 % respectivement avec et sans prétraitement pendant 120 minutes.

À pH 6,2, l'indice de stabilité (test en bain d'huile) d'un lait frais alcalinisé était multiplié par 2 comparé à un échantillon non prétraité : soit 42 contre 21 %. De même, pour un pH de 6,2, les indices (test avec un échangeur tubulaire) étaient de 66 contre 24 % après un

prétraitement de 75 minutes à 90°C d'un lait frais respectivement avec et sans ajout de NaOH, et de 45 % avec ajout de soude mais sans prétraitement. Le chauffage à 90°C pendant 120 minutes d'un lait reconstitué n'a pas permis d'atteindre la cible de pH 6,2 sans déstabilisation thermique (indice de stabilité inférieur à 35 % avec un échangeur tubulaire).

Un prétraitement à 90°C couplé à l'alcalinisation améliorerait la stabilité d'un lait frais et d'un lait reconstitué acidifiés face au traitement UHT, que ce soit à l'échelle laboratoire (test en bain d'huile) ou à l'échelle pilote (test avec un échangeur tubulaire).

### 2.3.1.1.2. Couleur



**Figure 80 : Impact de la durée de prétraitement à 90°C (entre 0 et 360 minutes) sur le brunissement (b\*, U.A. : unités arbitraires) d'un lait reconstitué au pH ajusté par ajout de solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>, avant acidification (moyennes sur 1 à 3 essais)**

Les mesures de couleurs ont été réalisées à différents temps sur les quatre formules (lait frais ou lait reconstitué, avec ou sans ajustement à pH 7,5). Pour plus de clarté, seule la « cinétique » sur la formule à base de poudre de lait écrémé et dont le pH a été ajusté par la soude est présentée dans la Figure 80.

L'augmentation de la valeur de  $b^*$  s'accroît surtout à partir de 120 minutes de prétraitement à 90°C (Figure 80).

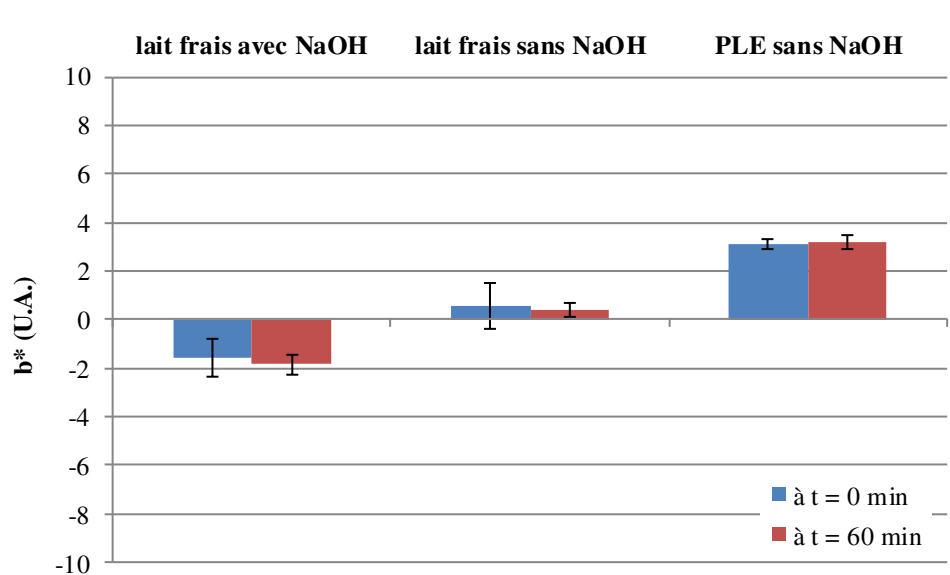


Figure 81 : Impact de la durée de prétraitement à 90°C sur le brunissement ( $b^*$ ) d'un lait frais ou reconstitué (PLE = poudre de lait écrémé) avec un pH ajusté par ajout de solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> ou non, avant acidification (moyennes sur 1 à 3 essais)

D'après la Figure 81, il n'y avait pas d'impact significatif du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes sur la couleur d'un lait frais ou reconstitué, avec un pH ajusté ou non.

Si un brunissement non enzymatique avait lieu dans le lait, il n'était pas visible à l'œil nu après un prétraitement de 60 minutes (temps de référence pour le protocole). La durée fixée pour le protocole général était donc également applicable sur le lait.

#### 2.3.1.1.3. pH

Quelle que soit la formule, plus la durée du prétraitement thermique était longue, plus le pH diminuait (Figure 82). Cette baisse était du même ordre de grandeur pour un lait frais et un lait reconstitué si le pH était ajusté. Elle était beaucoup plus faible en absence de soude : à t = 60 min, les diminutions étaient respectivement de 0,07 et 0,03 unité avec et sans ajout de base (différence qui s'accroît avec l'allongement de la durée de prétraitement).

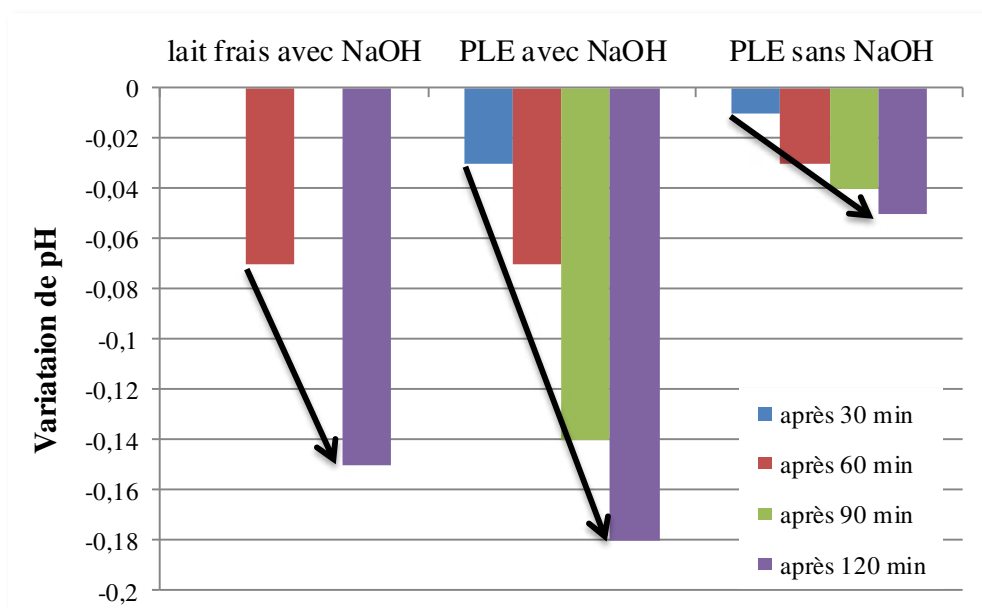


Figure 82 : Impact de la durée de prétraitement sur le pH d'un lait frais au pH ajusté et d'un lait reconstitué (PLE = poudre de lait écrémé) avec ou sans ajustement à la soude, avant acidification

La diminution de pH observée dans un lait tendait à être plus prononcée que dans une formule ne contenant que du PPCN : à  $t = 60$  min, la variation était non significative pour la formule PPCN à  $25 \text{ g.L}^{-1}$  et était de  $-0,07$  pour un lait (contre  $-0,05$  pour la formule contenant PPCN et lactose). L'acidification serait donc essentiellement induite par la présence de lactose. L'ajout de NaOH renforcerait ces variations ( $-0,18$  versus  $-0,05$  après 120 minutes à  $90^\circ\text{C}$ , respectivement avec ou sans alcalinisation du lait reconstitué) en modifiant la structure de la micelle et donc l'accessibilité des groupements ionisables.

#### 2.3.1.1.4. Potentiel zêta

Les particules d'un lait frais et d'un lait reconstitué avaient des potentiels zêta similaires (Figure 83) :  $-17,3 \pm 0,9$  et  $-18,7 \pm 1,1$  mV respectivement (à  $t = 0$  min). Quelle que soit la formule, avec ou sans ajustement de pH, le potentiel zêta n'était pas significativement impacté par la durée de prétraitement (Figure 83). L'alcalinisation ne modifiait pas significativement la charge de surface de la micelle :  $-18,6 \pm 0,9$  mV à  $t = 0$  min pour la formule à base de PLE et sans ajustement de pH.

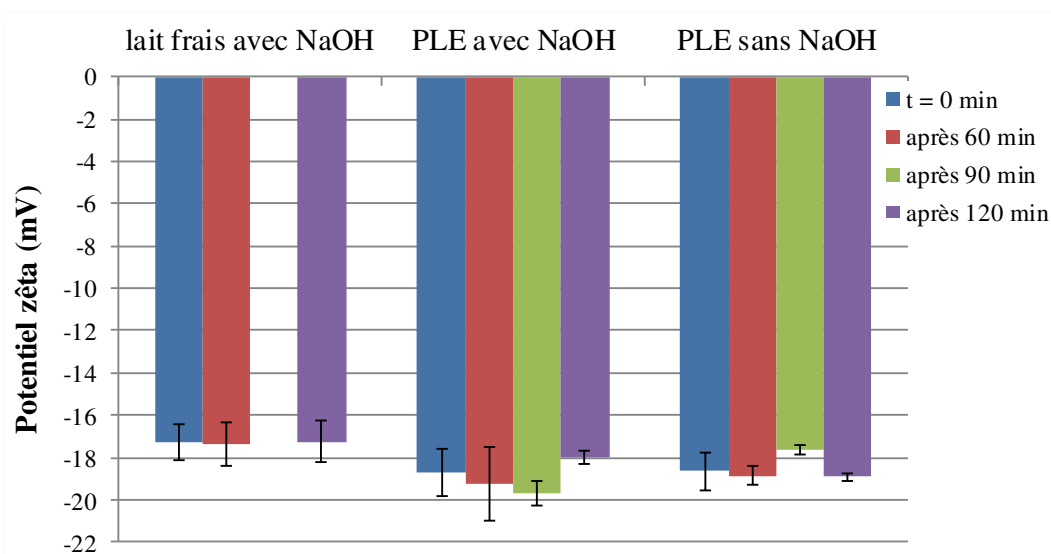


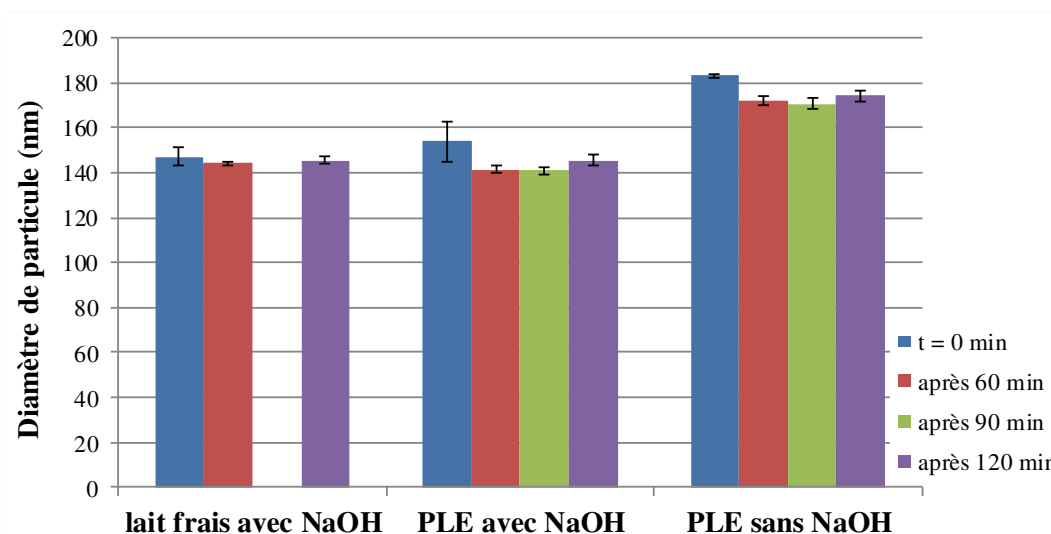
Figure 83 : Impact de la durée de chauffage sur le potentiel zêta dans un lait frais au pH ajusté et dans un lait reconstitué (PLE = poudre de lait écrémé) avec ou sans ajout de la solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>, avant acidification (moyennes sur 3 à 15 mesures)

Pour rappel, dans la formule modèle à base de PPCN, le potentiel zêta était plus négatif avec ajout de soude (Figure 63) : environ -22 mV contre -20 mV dans la formule PPCN + lactose respectivement avec et sans alcalinisation. Par conséquent, les modifications apportées par l'ajout de NaOH n'étaient pas exactement les mêmes dans la formule modèle et dans un lait. Cela s'explique certainement par des pouvoirs tampons distincts dus à des équilibres salins différents entre les deux systèmes.

#### 2.3.1.1.5. Taille de particules

Quelle que soit la formule, avec ou sans alcalinisation, la taille de particules n'était pas significativement impactée par la durée de prétraitement (Figure 84). Le diamètre de micelle tendait néanmoins à diminuer entre t = 0 et 90 minutes, en particulier dans le lait reconstitué et non alcalinisé : 183 ±1 nm sans chauffage contre 171 ±2 nm après un prétraitement de 90 minutes à 90°C. Puis, la taille tendait à augmenter légèrement après 120 minutes de prétraitement (par exemple 174 ±3 nm pour le lait reconstitué et non alcalinisé) sans pour autant modifier l'indice de polydispersité (toujours de 0,1 pour le lait reconstitué et non alcalinisé).





**Figure 84 :** Impact de la durée de chauffage sur la taille de particule dans un lait frais au pH ajusté et dans un lait reconstitué (PLE = poudre de lait écrémé) avec ou sans ajout de la solution de NaOH à 1 mol.L<sup>-1</sup>, avant acidification (moyennes sur 3 à 15 mesures)

Les diamètres de micelle étaient similaires, dans le cas d'un pH ajusté, pour le lait frais et le lait reconstitué (Figure 84). Par exemple, à t = 0 min, les diamètres étaient de 147 ± 4 et 154 ± 9 nm, respectivement. La taille des particules était diminuée par l'alcalinisation dans un lait reconstitué : diamètre de 183 ± 1 nm à t = 0 min, soit une différence de 29 nm.

Dans la formule contenant PPCN et lactose, le diamètre de micelle tendait également à diminuer après un prétraitement de 60 minutes (baisse de 10 nm) mais n'était pas impacté par l'alcalinisation. Par conséquent, la diminution de diamètre serait en lien avec le chauffage à 90°C des micelles de caséines en présence de lactose alors que la différence de diamètre due à l'ajout de la solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> serait causée par la complexité de la composition d'un lait (présence de minéraux solubles, d'azote non protéique et de protéines sériques entre autres). Le niveau de dénaturation des protéines sériques ne dépend pas du pH (Anema & Li 2003). En revanche, à pH alcalin, les protéines sériques dénaturées se fixent moins sur les micelles de caséines (Corredig & Dalgleish 1996 ; Anema & Li 2003). Selon Smits & van Brouwershaven (1980), dans un système modèle laitier chauffé à 90°C, 83 % de la β-lactoglobuline s'associent aux micelles de caséines à pH 5,8, 44 % à pH 6,8 et 24 % à pH 7,3. Ces différences seraient à relier en partie à la solubilisation de la caséine κ à un pH supérieur à 6,7. Des différences de protocole pourraient expliquer cette divergence entre la

formule à base de PPCN et le lait. En effet, même s'il n'était pas stocké à 90°C, la température du lait reconstitué avait été augmentée jusqu'à 90°C avant homogénéisation puis refroidissement progressif à 4°C. Par conséquent, les protéines sériques se fixant moins sur les caséines à pH 7,5, le diamètre des particules était diminué en cas d'alcalinisation. L'impact des différences de constantes diélectriques précédemment évoqué pourrait également jouer ici.

### 2.3.1.1.6. *Teneur en eau des culots d'ultracentrifugation*

La teneur en eau des culots d'ultracentrifugation était de  $3,82 \pm 0,06$ ,  $3,83 \pm 0,01$  et  $3,75 \pm 0,01$  g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec pour un lait frais chauffé respectivement pendant 0, 60 et 120 minutes.

Des teneurs différentes en minéraux colloïdaux entre les systèmes lait et PPCN pourraient expliquer l'écart d'hydratation micellaire relevé avant même prétraitement à 90°C (à savoir une teneur de 3,82 contre  $2,29 \pm 0,05$  g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec respectivement pour le lait et la formule PPCN + lactose). Les micelles seraient plus riches en minéraux dans le cas du lait et pourraient mieux retenir les molécules d'eau. De plus, l'hydratation micellaire diminuait de 0,24 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec dès 60 minutes de prétraitement dans la formule contenant PPCN et lactose. Par conséquent, soit le mécanisme à l'origine de cette réduction était freiné par la composition plus complexe du lait (présence de minéraux, citrate et protéines sériques), soit il était différent dans les deux formules. Il est possible que les protéines sériques dénaturées, en se fixant sur les caséines, contrebalançaient l'effet « desséchant » du prétraitement thermique. Une fois toutes celles-ci dénaturées, elles ne permettaient plus d'augmenter l'hydrophilie de la micelle de caséines et la baisse de teneur en eau des culots d'ultracentrifugation observée dans les formules modèles devenait également détectable dans un lait.

### 2.3.1.1.7. *Teneurs en azote*

Dans un lait frais alcalinisé, la teneur en azote total n'était pas impactée par une durée de prétraitement allant de 0 à 120 minutes ( $5,6$  g.L<sup>-1</sup> d'azote). De plus, la teneur en azote non protéique passait de 0,247 à 0,249 puis 0,277 g.L<sup>-1</sup> à t = 0, 60 et 120 minutes respectivement.

.....

Avec le prétraitement, la teneur en azote soluble à pH 4,6 passait de 0,73 à 0,52 g.L<sup>-1</sup> après 60 minutes à 90°C (*idem* après 120 minutes).

La teneur en azote non protéique n'était pas significativement impactée par un prétraitement de 60 minutes mais tendait à augmenter avec la durée de chauffage à 90°C du lait. Ainsi, il y avait davantage de protéolyse dans un système complexe que dans une formule modèle à base de PPCN (ou alors, la quantité d'azote étant légèrement supérieure, les variations deviendraient significatives d'un point de vue analytique). Comme attendu, le prétraitement dénaturait une partie des protéines sériques. Si la teneur en azote soluble à pH 4,6 ne correspondait pas à la teneur en azote non protéique après un prétraitement de 60 ou 120 minutes à 90°C, c'est parce que les protéines sériques dénaturées à pH alcalin ne se fixaient pas toutes sur les micelles de caséines (Corredig & Dalgleish 1996 ; Anema & Li 2003). Elles pouvaient donc être dosées dans le filtrat à pH 4,6 malgré leur dénaturation.

### 2.3.1.1.8. Teneurs en calcium et phosphate solubles

Les teneurs en calcium et phosphate solubles ne variaient pas significativement pour une durée de chauffage allant de 0 à 120 minutes. Elles étaient de 194 ±5 et 725 ±25 mg.kg<sup>-1</sup> respectivement. Tout comme pour la formule à base de PPCN, le prétraitement d'un lait n'entraînait donc pas de modification irréversible des teneurs en minéraux solubles.

### 2.3.1.2. Conclusion

Les données obtenues avec le lait frais et le lait reconstitué étaient similaires. La plupart des mesures ont confirmé les observations réalisées avec le système modèle (PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup> et lactose à 50 g.L<sup>-1</sup>), avec parfois des nuances :

- Calcul de l'indice de stabilité : comme dans la formule modèle, le couplage de l'alcalinisation et du prétraitement à 90°C permettait d'améliorer la stabilité des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique UHT. En raison de leurs compositions différentes (minéraux, citrate, protéines sériques...), les valeurs de pH associées aux indices de stabilité n'étaient pas comparables.

- Mesure de couleur : comme dans la formule modèle, la couleur restait relativement stable pour un prétraitement jusqu'à 60 minutes mais le brunissement commençait à s'accroître au bout de deux heures.
- Mesure de pH : l'acidification augmentait avec l'allongement de la durée de prétraitement mais de manière plus sensible dans un lait que dans la formule contenant PPCN et lactose.
- Mesure du potentiel zêta : la charge de surface des micelles n'était pas modifiée par le prétraitement. Contrairement à la formule contenant uniquement PPCN et lactose, l'alcalinisation préalable n'abaissait pas le potentiel zêta.
- Mesure de taille : le diamètre de micelles tendait à diminuer pour un temps de prétraitement à 90°C inférieur à 90 minutes. Contrairement à la formule modèle où la taille de particule était similaire avec ou sans ajout de soude, dans un lait elle était diminuée par l'alcalinisation.
- Mesure de la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation : l'hydratation micellaire tendait à diminuer après une durée de prétraitement plus longue (supérieure à 60 minutes) dans un lait que pour la formule contenant PPCN et lactose.
- Mesure des teneurs en azote : comme pour la formule à base de PPCN, les teneurs en azote total et non protéique restaient stables avec un prétraitement à 90°C de 60 minutes. Les protéines sériques (en quantité non négligeable uniquement dans le lait) étaient dénaturées par le chauffage imposé.
- Dosage des minéraux solubles : les teneurs en calcium et phosphate solubles n'étaient pas significativement et irréversiblement modifiées par un prétraitement à 90°C allant jusqu'à 120 minutes.

Par conséquent, bien que les mécanismes en jeu dans un lait ne soient pas exactement les mêmes que ceux en action dans la formule contenant du PPCN et du lactose, le prétraitement pendant 60 minutes avec une alcalinisation préalable permettait d'améliorer la stabilité des protéines laitières acidifiées face au traitement UHT. Cette confirmation dans un milieu plus complexe (minéraux, citrate, protéines sériques...) a aussi été réalisée à l'échelle pilote avec un échangeur tubulaire pouvant imposer un traitement UHT de 130°C pendant 10 secondes, plus proche de la réalité industrielle.

### 2.3.2. Conclusion de l'étude sur la lactosylation des caséines & perspectives

**Le traitement de stabilisation consistant à chauffer à 90°C, pendant une heure, des caséines en présence de lactose, à pH 7,5, a permis d'améliorer l'indice de stabilité thermique.** Ce prétraitement entraînait des faibles diminutions de pH, de diamètre des micelles et d'hydratation micellaire sans modifier significativement et de manière irréversible la couleur, le potentiel zêta micellaire, les teneurs en azote et en minéraux solubles.

**Les modifications thermo-induites pouvaient être accentuées en augmentant la durée de prétraitement, la teneur en lactose, le pH (par ajout de soude jusqu'à pH 7,5) ou en diminuant la teneur en eau du milieu.** Cette étude n'a pas mis en évidence une plus grande fixation du sucre malgré une substitution du lactose par du glucose (pourtant plus réducteur).

En perspective, une autre manière de favoriser l'abaissement du  $pH_i$  par glycosylation serait d'utiliser un sucre chargé négativement comme l'acide galacturonique. L'ajout de cette molécule a amélioré la stabilité thermique de la  $\beta$ -lactoglobuline (température de dénaturation passant de 76,1°C à 86,2°C) (Chen *et al.* 2015). L'emploi de polysaccharides de « grande taille » apporterait sans doute une gêne stérique supérieure pouvant prévenir la formation d'agrégats lors d'un traitement thermique à température élevée. De même, utiliser des sucres plus réactifs que le lactose ou le glucose tels l'arabinose ou le ribose pourrait être intéressant d'un point de vue scientifique sachant que l'impact fonctionnel de la glycation dépend aussi du sucre (Chevalier *et al.* 2001b ; Haar *et al.* 2011). Toutefois, ces sucres n'étant pas issus d'une matière première laitière, ils avaient été exclus du cadre de ce travail dès la mise en place du projet. D'un point de vue industriel il était préférable de travailler avec des ingrédients laitiers pour des soucis d'étiquetage (démarche *clean label*).

Les données obtenues ont mis en évidence des modifications non seulement dues à la présence de lactose mais aussi provoquées par le prétraitement thermique à 90°C lui-même. De plus, les variations observées dans un lait et le pH minimal de stabilité atteint n'étaient pas les mêmes que dans une formule contenant du PPCN et du lactose. Par conséquent, l'étude de ce prétraitement pouvait être approfondie en se concentrant sur les paramètres distinguant le lait du PPCN (objet du *chapitre 3 – paragraphe 2.4.*).

## 2.4. Étude du rôle de l'azote et des minéraux dans le prétraitement thermique des caséines micellaires

### 2.4.1. *Choix des conditions expérimentales et protocole*

Le prétraitement de stabilisation défini dans la partie précédente (*Chapitre 3 - paragraphe 2.3. Application du traitement de lactosylation sur du lait*) a permis une légère amélioration de la stabilité des protéines acidifiées face au traitement UHT. Il a donc été décidé de préciser le rôle de l'environnement sur la stabilité thermique des micelles de caséines. Les conditions expérimentales sont restées les mêmes. La nature des poudres et la durée de prétraitement pouvaient varier ponctuellement selon la question étudiée mais le pH des suspensions était toujours de 7,5 à 50°C (avant prétraitement). Les interrogations suivantes ont été soulevées :

1. Quel est l'impact du prétraitement à 90°C sur une formule dépourvue de protéine sérique ? → étude d'une formule à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et 65 g.L<sup>-1</sup> de perméat d'ultrafiltration de lait
2. Quel est l'impact de la teneur en perméat ? → étude de formules à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN additionnées de 65, 130 ou 195 g.L<sup>-1</sup> de perméat d'ultrafiltration de lait
3. Quel est l'impact de la teneur en protéines ? → étude d'une formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN
4. Quel est l'impact de la teneur en azote ? → étude d'une formule à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et 26 g.L<sup>-1</sup> d'urée
5. Quel est l'impact du pouvoir tampon ? → étude d'une formule à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN suspendus dans un tampon phosphate 10 mmol.L<sup>-1</sup> de pH 7,5 à 50°C

2.4.2. Étude du prétraitement thermique dans une formule dépourvue de protéines sériques : PPCN + perméat

2.4.2.1. Résultats & Discussion

2.4.2.1.1. Indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile)

À pH 6,2, l'indice de stabilité thermique (test en bain d'huile) était de 65 % (échantillon en cours de déstabilisation) sans prétraitement contre 85 % (échantillon stable) après chauffage à 90°C pendant 60 minutes. Grâce à l'ajout de perméat au PPCN et au prétraitement, le pH de 6,1 était atteint sans déstabilisation complète après traitement UHT (Figure 85).

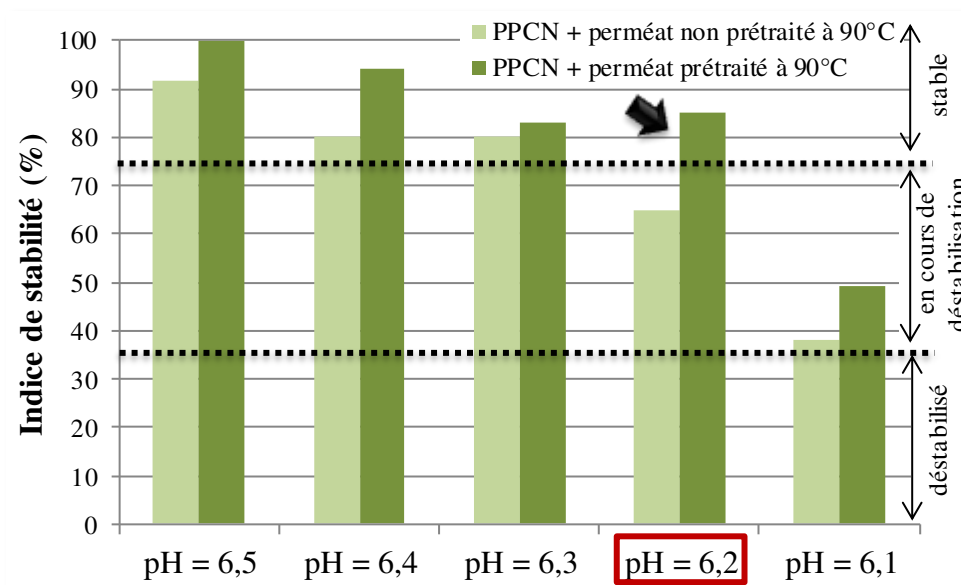


Figure 85 : Impact du prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 d'une formule contenant PPCN et perméat sur l'indice de stabilité thermique des protéines acidifiées, en fonction du pH d'acidification (tests en bain d'huile)

Le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) d'une formule contenant PPCN et perméat avait un impact positif sur la stabilité des micelles de caséines acidifiées face au traitement UHT. En outre, cela constituait une amélioration par rapport à la formule PPCN et lactose et par rapport au lait cru (pH minimal avant déstabilisation inférieur en présence de perméat).

2.4.2.1.2. *Couleur*

Le prétraitement ne modifiait pas significativement la couleur de la formule contenant PPCN et perméat :  $b^* = -1,0 \pm 0,4$  contre  $-1,0 \pm 0,7$  respectivement avant et après chauffage à 90°C pendant 60 minutes.

Cette observation était la même que celles faites pour la formule modèle PPCN + lactose et pour le lait frais écrémé après un prétraitement de 60 minutes à 90°C. Il n’y avait donc pas d’accélération sensible des réactions de Maillard.

2.4.2.1.3. *pH*

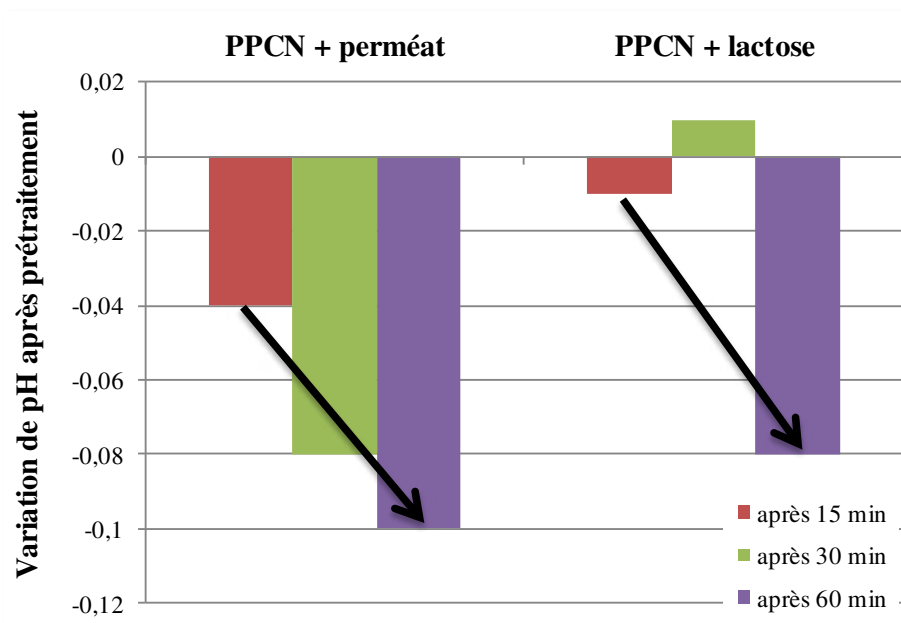


Figure 86 : Impact de la durée du prétraitement à 90°C sur le pH d'une formule simplifiée contenant PPCN et perméat, et comparaison avec une formule modèle contenant PPCN et lactose, avant acidification

Le prétraitement d’une formule contenant PPCN et perméat entraînait une diminution de 0,1 unité de pH en 60 minutes (Figure 86).



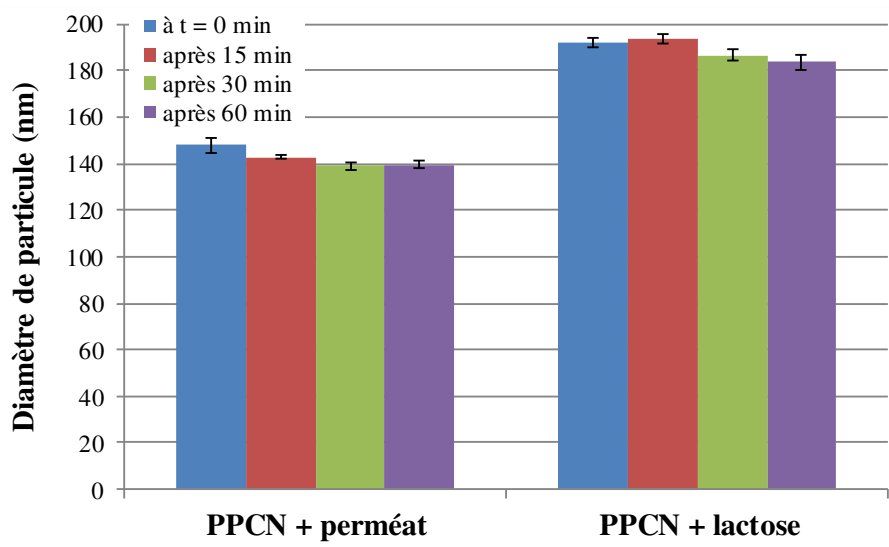
L'acidification après une heure de prétraitement était de -0,08 et -0,07 unité pH respectivement pour la formule avec lactose et pour le lait. Il n'y avait donc pas d'influence significative de la composition de la phase soluble (bien que l'acidification semble moins linéaire dans la formule PPCN + lactose).

#### 2.4.2.1.4. *Potentiel zêta*

Que ce soit pour la formule PPCN + perméat, pour la formule PPCN + lactose ou pour du lait, le potentiel zêta n'était pas significativement impacté par le prétraitement. L'ajout de perméat à la place du lactose diminuait la charge nette négative à la surface des micelles : -16 contre -21 mV. Le potentiel zêta mesuré dans un lait frais écrémé était proche de la formule PPCN + perméat (-17 mV).

Les mêmes hypothèses que pour la formule modèle PPCN + lactose peuvent être émises pour expliquer l'absence de variation de la charge de surface avec le prétraitement (localisation des sites lactosylés, sensibilité de mesure). L'augmentation de potentiel zêta observée dans la formule PPCN + perméat, par rapport à la formule PPCN + lactose, s'expliquerait par un écrantage des charges négatives à la surface des micelles de caséines par les minéraux présents dans le perméat (Famelart *et al.* 1996).

## 2.4.2.1.5. Taille de particules



**Figure 87 : Impact de la durée du prétraitement à 90°C/pH 7,5 sur le diamètre des particules d'une formule contenant PPCN et perméat, et comparaison avec une formule modèle PPCN + lactose, avant acidification (moyennes sur 2 à 6 mesures)**

Le diamètre des particules, dans une formule simplifiée contenant PPCN et perméat, tendait à diminuer avec l'allongement de la durée de prétraitement (Figure 87). Sur un laps de temps allant de 0 à 30 min, la réduction était de 9 nm. Cette diminution semblait se stabiliser au bout de 30 minutes pour atteindre  $139 \pm 2$  nm. L'indice de polydispersité restait stable tout au long du prétraitement ( $< 0,15$ ). La taille des particules était inférieure dans la formule PPCN + perméat comparée à celle mesurée dans la formule PPCN + lactose (Figure 87). Sans prétraitement, elle était de  $148 \pm 3$  contre  $192 \pm 2$  nm, respectivement.

La tendance à la diminution de diamètre, au cours du temps, confirmait les observations précédentes (Figure 78 et Figure 84). Cette baisse s'arrêtait au bout d'environ une demi-heure de prétraitement, comme dans le lait (mais au bout de 60 minutes dans cette formule plus complexe). Dans les formules contenant du PPCN sans ou avec lactose, la réduction se poursuivait au-delà de ces durées (essais jusqu'à deux heures) mais la taille de micelle n'atteignait pas la valeur aussi basse de 140 nm.

La présence d'une concentration plus élevée en minéraux pourrait expliquer le diamètre de micelle inférieur dans la formule PPCN + perméat *versus* PPCN + lactose (valeurs plus faibles aussi observées dans le lait frais :  $147 \pm 4$  nm à  $t = 0$  min). L'écrantage des charges négatives micellaires pourrait diminuer le diamètre hydrodynamique de la micelle de caséines.

#### 2.4.2.1.6. Teneur en eau des culots d'ultracentrifugation

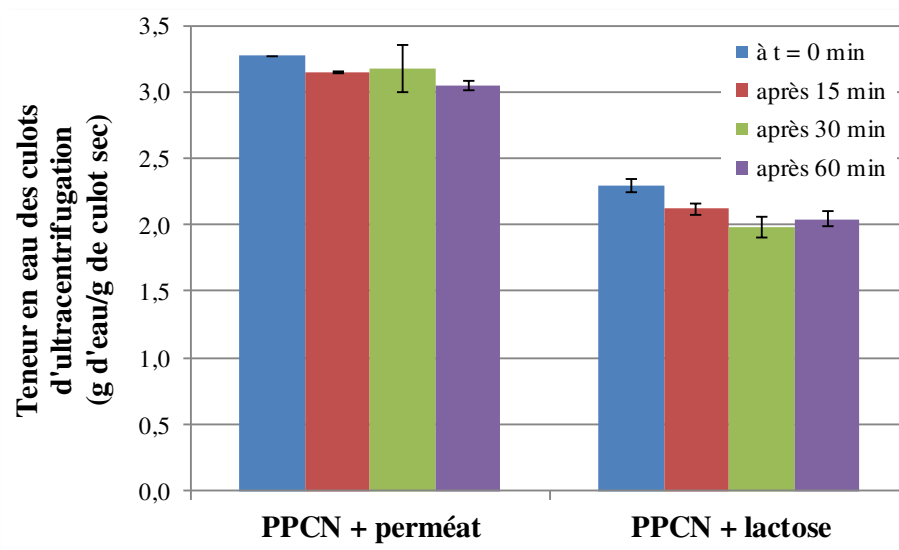


Figure 88 : Impact de la durée du prétraitement à 90°C sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation dans une formule contenant PPCN et perméat et comparaison avec une formule modèle PPCN + lactose, avant acidification (moyennes sur 2 à 7 mesures)

La teneur en eau des culots d'ultracentrifugation tendait à diminuer avec le prétraitement à 90°C de la formule contenant PPCN et perméat (Figure 88) et ce dès 15 minutes de chauffage. Après 60 minutes, l'hydratation micellaire diminuait de  $0,22$  g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec par rapport à l'essai non prétraité ( $t = 0$  min).

La teneur en eau des culots d'ultracentrifugation de la formule PPCN + perméat était inférieure à celle d'un lait frais et supérieure à celles des formules PPCN + lactose et PPCN seul : respectivement  $3,27$ ,  $3,82 \pm 0,06$ ,  $2,29 \pm 0,05$  et  $2,26 \pm 0,04$  g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec à  $t = 0$  min. Famelart *et al.* (1996) avaient obtenu des teneurs d'environ  $2,2$  et  $1,9$  g d'eau.g<sup>-1</sup> de

culot sec pour une formule contenant du PPCN dans un ultrafiltrat de lait et une formule de PPCN seul, respectivement (avec un protocole de mesure similaire et à pH 7,0).

Cette baisse au cours du prétraitement était donc similaire à celle mesurée dans la formule modèle PPCN + lactose mais était largement supérieure à celle d'un lait frais.

La présence de minéraux serait responsable de la plus grande hydratation micellaire dans le cas de la formule PPCN + perméat *versus* les formules PPCN sans et avec lactose. Outre la composition minérale plus riche du perméat d'ultrafiltration (Tableau 12), il fallait ajouter une plus grande quantité de solution NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> pour atteindre le pH de 7,5 dans cette formule. Or, les changements de structure micellaire probablement dus à des échanges partiels du calcium des clusters de phosphate de calcium par le sodium et l'augmentation de l'ionisation des caséines due à la diminution des coefficients d'activité expliqueraient cette plus grande rétention d'eau (Famelart *et al.* 1996). D'autres éléments pourraient jouer sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation, notamment les molécules organiques comme les protéines sériques, et expliquer pourquoi l'hydratation micellaire était plus élevée dans un lait que dans la formule PPCN + perméat.

### 2.4.2.1.7. Teneurs en azote

La teneur en azote non protéique était stable, entre t = 0 et 60 minutes, pour la formule contenant PPCN et perméat. La valeur moyenne était de 0,31 ±0,02 g.L<sup>-1</sup> d'azote non protéique. Aucune protéolyse thermique significative n'était donc mise en évidence.

La teneur en azote soluble à pH 4,6 ne variait pas significativement non plus, entre t = 0 et 60 minutes. Elle était en moyenne de 0,51 ±0,01 g.L<sup>-1</sup>. Aucune dénaturation n'était détectée puisque le perméat contenait très peu de protéines sériques.

### 2.4.2.1.8. Teneurs en minéraux solubles

Avec une incertitude de mesure de 10 %, aucune différence significative des concentrations en minéraux solubles n'était mise en évidence dans la formule contenant PPCN et perméat et chauffée entre 0 et 60 minutes. La concentration en calcium était de 224 ±8 mg.kg<sup>-1</sup> et celle en phosphate de 760 ±10 mg.kg<sup>-1</sup> en moyenne. Elles étaient proches de

celles mesurées dans le lait ( $194 \pm 5$  et  $725 \pm 25$  mg.kg<sup>-1</sup> respectivement pour le calcium et le phosphate solubles).

2.4.2.1.9. Lactosylation des caséines

2.4.2.1.9.1. Analyse des caséines

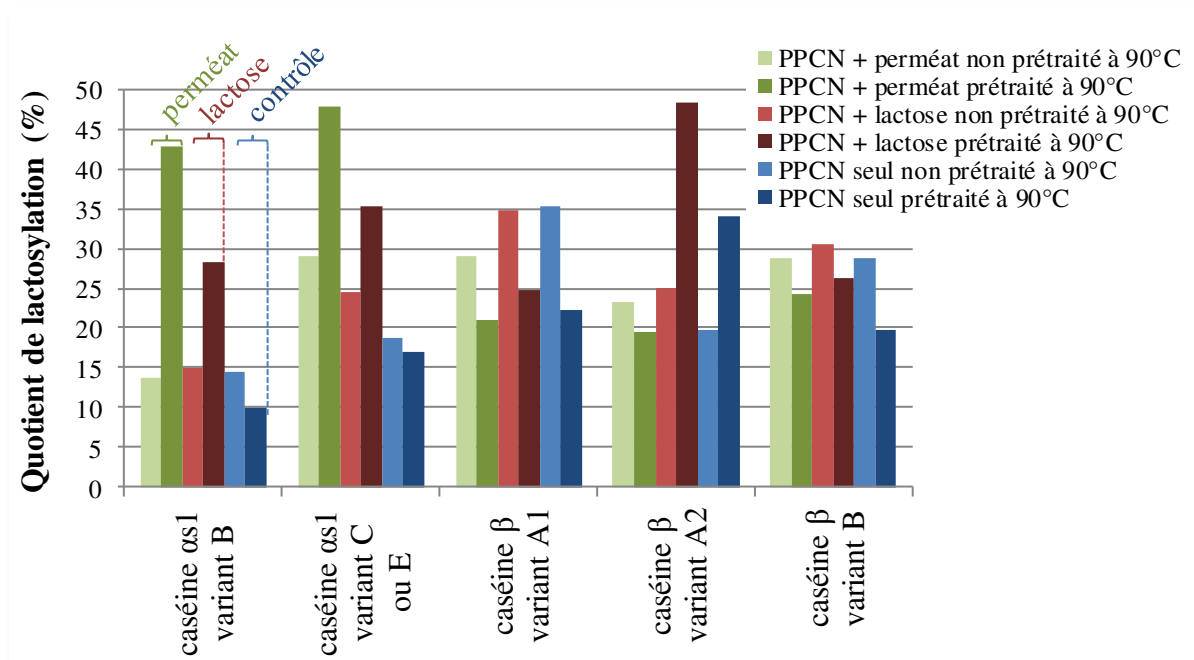


Figure 89 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur les quotients d’intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse dans la formule simplifiée PPCN + perméat et comparaison avec les formules modèle (PPCN + lactose) et contrôle (PPCN seul)

Pour une formule contenant PPCN et perméat, après prétraitement, le quotient d’intensité des signaux était plus élevé sur les caséines α<sub>s1</sub> variants B et C ou E, ce qui suggérait des lactosylations (Figure 89). En revanche pour la caséine β, le rapport des quotients s’inversait, quel que soit le variant (Figure 89). Toutefois la différence était moins grande et probablement non significative.

Les données obtenues avec les formules PPCN + perméat et PPCN + lactose étaient similaires, à l’exception de la caséine β variant A<sub>2</sub> (Figure 89). Cette similitude suggèrerait

que la présence de minéraux et d'azote non protéique (présents dans le perméat et non dans le lactose) avait peu d'impact sur le niveau de lactosylation.

### 2.4.2.1.9.2. Analyse des peptides tryptiques

L'analyse des peptides tryptiques a mis en évidence des lactosylations après prétraitement de la caséine  $\alpha_{s1}$  en position 7 (quotient de 7,64) et de la caséine  $\alpha_{s2}$  en positions 91 (quotient de 7,49), 113 (quotient de 6,98), 173 (quotient de 1,14) et 191 (quotient de 1,16). La formule témoin contenant uniquement du PPCN avait également une masse supplémentaire de 324 Da sur la lysine 191 de la caséine  $\alpha_{s2}$ . En revanche, dans la formule modèle PPCN + lactose, seul le résidu de la lysine 119 de la caséine  $\alpha_{s1}$  était lactosylé.

Ainsi, le nombre de sites de lactosylation détecté était plus important dans la formule PPCN + perméat que dans la formule PPCN + lactose (5 contre 1). Les minéraux ou la plus grande concentration en azote non protéique faciliteraient la fixation du lactose sur certaines lysines, sans doute moins accessibles dans la formule modèle que dans la formule avec perméat. La plus grande teneur en eau des micelles de caséine pourrait aussi faciliter la migration des réactifs et produits de la réaction de lactosylation et ainsi en favoriser l'avancement.

### 2.4.2.2. Conclusion

Le prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 d'une formule simplifiée contenant PPCN et perméat a amélioré l'indice de stabilité des micelles de caséines acidifiées face au traitement UHT (tests en bain d'huile) et permis d'obtenir les résultats suivants sur :

- La couleur : pas de brunissement avec un prétraitement pendant 60 minutes. Les réactions de Maillard ne semblaient donc pas favorisées par rapport aux formules étudiées précédemment.
- Le pH : une acidification progressive avec l'allongement de la durée du prétraitement. Cette baisse de pH n'était pas significativement différente de celles mesurées dans les formules précédemment étudiées.
- Le potentiel zêta, les teneurs en azote et minéraux solubles : à l'instar des précédents essais, aucun impact visible sur ces variables.

- La taille des particules : diminution du diamètre des micelles jusqu'à 140 nm pendant les 30 premières minutes de prétraitement.
- La teneur en eau des culots d'ultracentrifugation : tendance à une diminution de l'hydratation micellaire avec le prétraitement, comme dans les autres formules.
- Les masses molaires des caséines :
  - lactosylations plus visibles sur la caséine  $\alpha_{s1}$  que sur la caséine  $\beta$  après prétraitement pendant 60 minutes,
  - identification de cinq lysines lactosylées différentes.

Les différences de lactosylation entre les formules étudiées (PPCN seul, PPCN + lactose, PPCN + perméat) pourraient expliquer une meilleure stabilité des protéines acidifiées face au traitement UHT dans le cas de la suspension PPCN + perméat, mais ce n'est probablement pas la seule raison. Outre ces modifications apportées par le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5), ces essais ont mis en évidence l'impact de la composition de la formule sur différentes variables. Ainsi, le pH atteint avant déstabilisation des micelles de caséines acidifiées par traitement UHT était plus bas, le potentiel zêta micellaire était moins négatif, la taille de micelle était inférieure et la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation était supérieure, dans la formule PPCN + perméat comparée à la formule PPCN + lactose. Ces différences provenaient de la composition du perméat qui contenait des minéraux, du citrate et de l'azote non protéique. Pour distinguer les effets de ces trois éléments et approfondir les recherches, des essais complémentaires ont été menés (paragraphe suivants).

### **2.4.3. Étude de l'impact de la teneur en perméat sur le prétraitement**

Une étude de Haug *et al.* (2009) a montré que la stabilité thermique (évaluée par calorimétrie différentielle à balayage) de la  $\beta$ -lactoglobuline, en milieu concentré, était améliorée en augmentant la force ionique du milieu. Des tests avec une teneur en perméat multipliée par deux (130 g.L<sup>-1</sup>) ou par trois (195 g.L<sup>-1</sup>) ont donc également été réalisés.

#### **2.4.3.1. Résultats & Discussion**

2.4.3.1.1. Indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile)

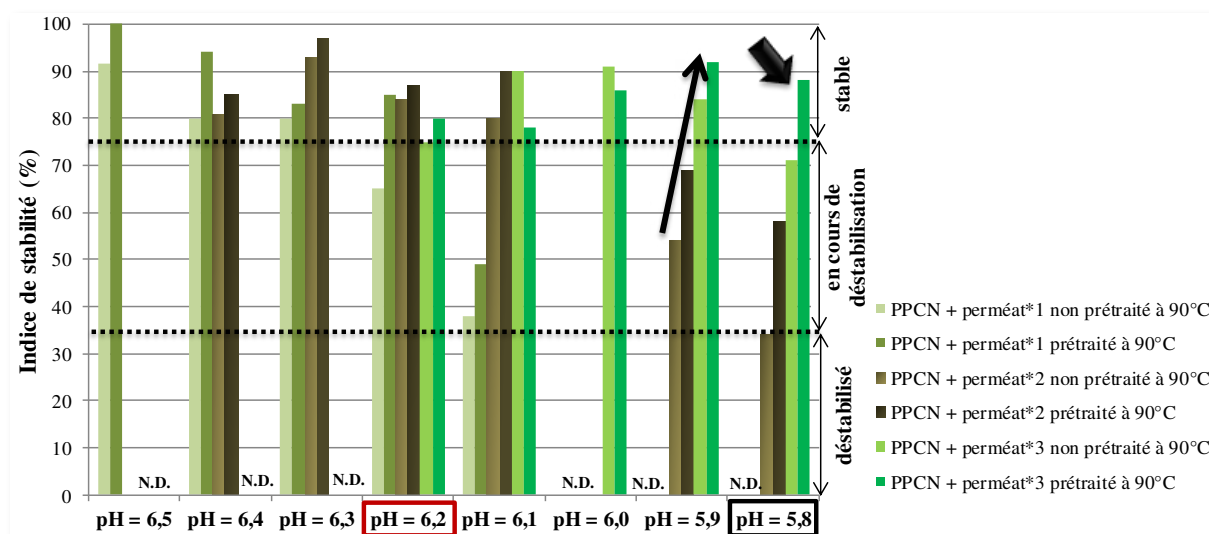


Figure 90 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en perméat (\*1 = 65 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 130 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 195 g.L<sup>-1</sup>) sur l'indice de stabilité des protéines acidifiées (tests en bain d'huile), en fonction du pH d'acidification (N.D. = non déterminé)

Sans prétraitement, à pH 6,1, les indices de stabilité thermique (tests en bain d'huile) étaient de 38 % pour la formule de référence PPCN + perméat\*1, 80 % pour la formule PPCN + perméat\*2 et 90 % pour la formule PPCN + perméat\*3. À pH 5,8, avec un prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5), la formule PPCN + perméat\*1 était déstabilisée (indice < 35 %), tandis que la formule à la concentration en perméat multipliée par deux était en cours de déstabilisation (indice de 58 %) et la formule la plus riche en perméat était stable (indice de 88 %).

De manière générale, quelle que soit la teneur en perméat (entre 65 et 195 g.L<sup>-1</sup>), le prétraitement améliorait la stabilité face au traitement UHT (Figure 90). La combinaison d'un prétraitement à 90°C de 60 min, d'une alcalinisation à pH 7,5 et d'un enrichissement en perméat permettait d'acidifier des protéines, sans entraîner de déstabilisation par traitement UHT, jusqu'à des pH jamais atteints avec les formules précédemment étudiées (minimum atteint de 6,3 avec du lait, *Chapitre 3 – paragraphe 2.3.1.1.1. Indice de stabilité thermique*). De plus, l'ajout de perméat à lui seul semblait stabiliser les micelles de caséines. En effet, sans prétraitement, une amélioration de la stabilité des micelles de caséines acidifiées face au



traitement UHT en bain d'huile était visible. Cette augmentation de stabilité ne semblait pas causée par une plus grande concentration en lactose puisque l'étude portant sur l'impact de sa teneur avait mis en évidence un effet négatif de l'enrichissement. Cette amélioration serait plutôt liée à une plus grande teneur en minéraux, en citrate ou en azote non protéique, trois éléments apportés par la poudre de perméat. D'ailleurs, d'après Sweetsur & White (1975), l'influence stabilisatrice du phosphate et du citrate pourrait excéder le pouvoir déstabilisant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , phénomène qui serait accentué avec la concentration.

#### 2.4.3.1.2. Couleur

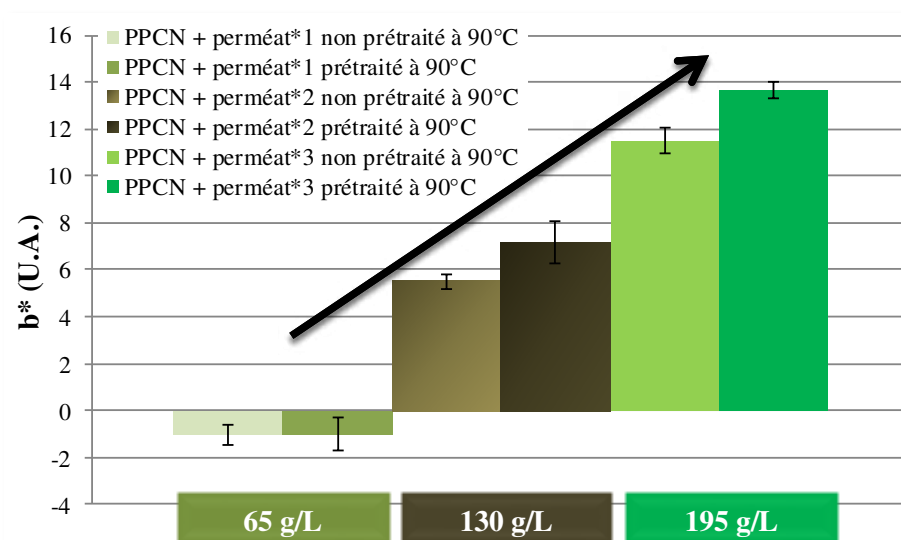


Figure 91 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en perméat (\*1 = 65 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 130 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 195 g.L<sup>-1</sup>) sur la dimension b\*(U.A. : unités arbitraires) de la couleur, avant acidification (moyennes sur 3 à 9 mesures)

Alors que le brunissement n'était pas significatif après le prétraitement appliqué à la formule de référence PPCN + perméat\*1 ( $b^* = -1,03 \pm 0,40$  contre  $-1,00 \pm 0,69$  à  $t = 0$  et 60 minutes respectivement), celui-ci entraînait une augmentation de la valeur de  $b^*$  dans les formules plus concentrées : respectivement  $5,50 \pm 0,33$  contre  $7,18 \pm 0,90$  pour PPCN + perméat\*2 et  $11,49 \pm 0,55$  contre  $13,65 \pm 0,37$  pour PPCN + perméat\*3 à  $t = 0$  min et 60 minutes.

L'impact de la teneur en perméat sur la couleur était dû à la poudre elle-même (jaune). Le plus fort brunissement observé avec les formules les plus concentrées en perméat, suggérait que les réactions de Maillard atteignaient un stade plus avancé en cas d'enrichissement. Ces observations sur la formule PPCN + perméat ont également été rapportées dans l'étude portant sur la concentration en lactose (*Chapitre 3 – paragraphe 2.2.4. Étude de l'impact de la teneur en lactose*). Ces variations pourraient être dues à l'enrichissement en sucre corrélé à l'enrichissement en perméat (Tableau 12).

#### 2.4.3.1.3. pH

Contrairement au léger effet de la concentration en lactose observé sur la diminution de pH, la multiplication par deux ou par trois de la concentration en perméat n'entraînait pas d'augmentation de l'acidification après 60 minutes de prétraitement. Par conséquent, l'augmentation de la concentration en lactose par ajout de perméat serait contrebalancée d'un point de vue diminution de pH par l'ajout parallèle de minéraux (en particulier de phosphate inorganique) et de citrate qui augmenteraient le pouvoir tampon de la solution.

#### 2.4.3.1.4. Potentiel zêta

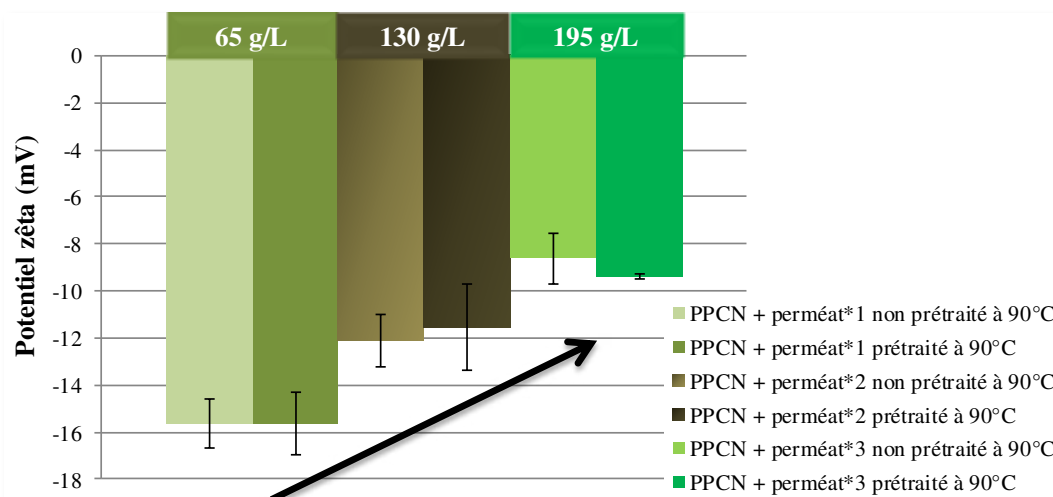


Figure 92 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en perméat (\*1 = 65 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 130 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 195 g.L<sup>-1</sup>) sur le potentiel zêta (moyennes de 3 à 9 mesures)

Quelle que soit la teneur en perméat, le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) n'abaissait pas significativement le potentiel zêta (Figure 92). En revanche, augmenter la teneur en perméat diminuait la charge négative nette à la surface de la micelle de caséines : respectivement -15,6 ±1,0, -12,1 ±1,1 et -8,6 ±1,1 mV à t = 0 min pour les formules PPCN + perméat\*1, \*2 et \*3.

Le potentiel zêta devenait moins négatif parce que l'enrichissement en perméat et donc en minéraux augmentait la force ionique et écrantait les charges négatives micellaires. La modification de la constante diélectrique du milieu pourrait aussi avoir un impact. D'après ces mesures, l'amélioration de la stabilité des micelles de caséines acidifiées face au traitement thermique UHT n'était pas due à une augmentation des répulsions électrostatiques à la surface de ces suprastructures (valeur absolue de la charge inférieure dans les formules enrichies et pourtant plus stables).

2.4.3.1.5. Taille de particules

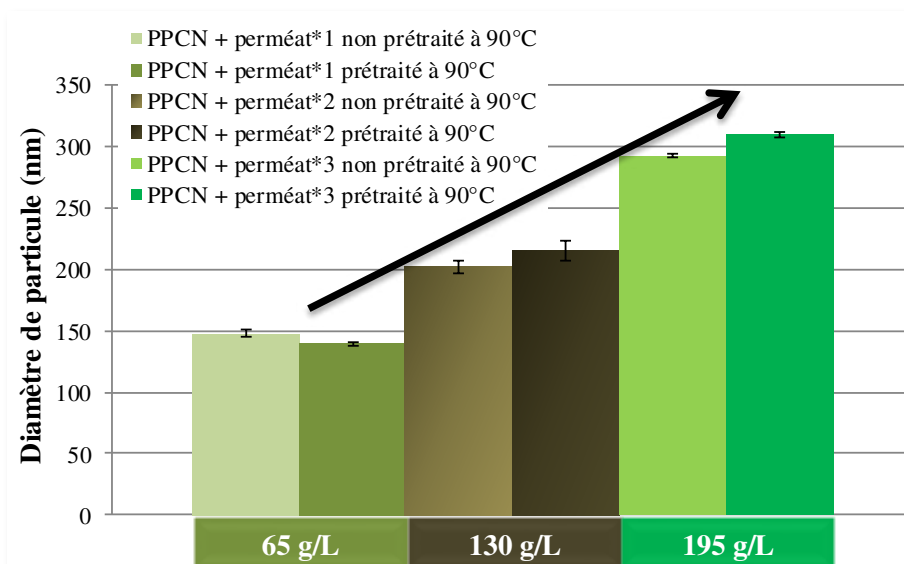


Figure 93 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en perméat (\*1 = 65 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 130 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 195 g.L<sup>-1</sup>) sur le diamètre des particules (moyennes de 3 à 9 mesures)

Les formules enrichies en perméat (à 130 et 195 g.L<sup>-1</sup>) contenaient des micelles qui tendaient à être plus grosses après prétraitement thermique (respectivement 215 ±8 et 309 ±2 nm) et ce sans augmentation de la polydispersité des distributions. Le diamètre des particules augmentait avec la concentration en perméat (Figure 93) : respectivement 148 ±3, 202 ±5 et 293 ±1 nm à t = 0 min pour une concentration en perméat multipliée par 1, 2 et 3.

L'augmentation du diamètre des particules avait aussi été observée lors de l'enrichissement en lactose mais dans une moindre mesure : passage de 191 ±1 à 221 ±1 et 243 ±1 nm pour des formules contenant respectivement 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> de lactose. Cette augmentation de taille avec le perméat pourrait être due à une augmentation de la force ionique (en plus de la teneur en sucre apporté par l'enrichissement en perméat).

L'augmentation du diamètre des micelles due au prétraitement, dans les formules contenant 130 et 195 g.L<sup>-1</sup> de perméat, allait à l'opposé de la diminution observée dans le lait après ce même prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et serait donc due à la composition spécifique du perméat. D'ailleurs, cette augmentation de taille micellaire n'avait pas été mise en évidence lors de l'enrichissement en lactose non plus.

Multiplier la teneur en perméat par deux ou trois a augmenté la teneur en minéraux solubles des suspensions de PPCN et a nécessité un ajout plus important de soude pour obtenir un pH de 7,5. L'augmentation d'ionisation des caséines due à la diminution des coefficients d'activité pourrait expliquer cette augmentation de voluminosité (Famelart *et al.* 1996). La modification de la constante diélectrique du dispersant pourrait aussi avoir un impact.

### 2.4.3.1.6. Teneur en eau des culots d'ultracentrifugation

Quelle que soit la teneur en perméat, la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation tendait à diminuer après le prétraitement (Figure 94). Avant prétraitement, elle était de 3,54 ±0,23, 2,72 ±0,03 et 2,10 ±0,00 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec pour les formules PPCN + perméat\*1, \*2 et \*3, respectivement.

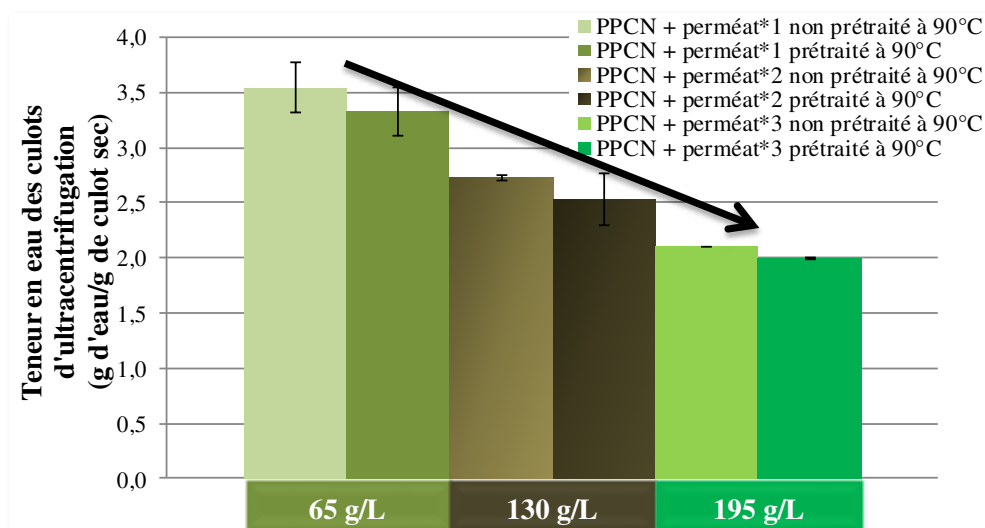


Figure 94 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) et de la teneur en perméat (\*1 = 65 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 130 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 195 g.L<sup>-1</sup>) sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation (moyennes sur 2 à 6 mesures)

Ainsi, plus la concentration en perméat était élevée, plus l'hydratation micellaire diminuait. À l'instar de la baisse de la charge nette négative de surface des micelles, la diminution de la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation pourrait être liée à l'augmentation de la force ionique et à la réduction subséquente des attractions hydrophiles (= répulsions hydrophobes) (Philippe *et al.* 2005). Un enrichissement en minéraux dans le lait *versus* les formules à base de PPCN avait été proposé pour expliquer la plus grande teneur en eau des culots d'ultracentrifugation. Cette hypothèse est donc partiellement remise en cause par ces résultats (qui ne permettent pas néanmoins de déterminer la composition minérale micellaire).

#### 2.4.3.1.7. Lactosylation des caséines

##### 2.4.3.1.7.1. Analyse des caséines

L'impact du prétraitement sur les quotients d'intensité des signaux différait selon les teneurs en perméat et les caséines considérées (Figure 95). La relation n'était pas linéaire et en particulier :

- Pour la caséine  $\alpha_{s1}$  variant B, le prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 entraînait une lactosylation significative quelle que soit la teneur en perméat.
- Pour la caséine  $\alpha_{s1}$  variant C ou E, le prétraitement thermique augmentait le quotient de lactosylation dans les formules PPCN + perméat \*1 et \*3 mais avait peu d'impact dans la formule où le perméat était multiplié par deux.
- Pour les caséines  $\beta$  variant A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et B, le prétraitement ne favorisait pas la lactosylation dans la formule de référence contrairement aux formules enrichies en perméat.

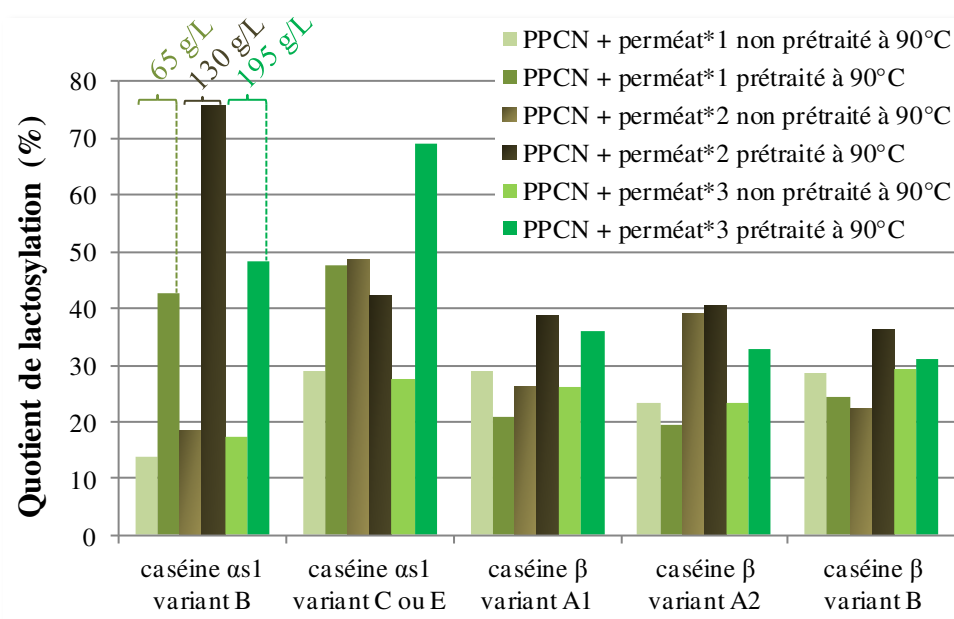


Figure 95 : Impact du prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 et de la teneur en perméat (\*1 = 65 g.L<sup>-1</sup>, \*2 = 130 g.L<sup>-1</sup> et \*3 = 195 g.L<sup>-1</sup>) sur les quotients d'intensité des signaux obtenus par spectrométrie de masse

De manière générale, augmenter la teneur en perméat (de 65 à 195 g.L<sup>-1</sup>, mais en particulier pour une teneur multipliée par deux) augmentait le quotient de lactosylation, tout comme dans les formules enrichies en lactose.

#### 2.4.3.1.7.2. Analyse des peptides tryptiques

La lactosylation du résidu lysyl en position 7 sur la caséine  $\alpha_{s1}$  était détectée dans les formules PPCN + perméat\*1 et \*3. L'augmentation de masse de 324 Da après prétraitement était visible sur les lysines de la caséine  $\alpha_{s2}$  en positions 91, 113 et 173 pour les trois formules

étudiées. Les deux formules enrichies en perméat avaient significativement plus de lactosylations sur la lysine en position 80 sur la caséine  $\alpha_{s2}$  après prétraitement. La lactosylation de la lysine 191 de la caséine  $\alpha_{s2}$  n'a été mise en évidence que dans la formule de référence (PPCN + perméat\*1). Les lactosylations de la caséine  $\alpha_{s2}$  en positions 181 et 188 n'ont été détectées que dans la formule PPCN + perméat\*2.

De manière générale, il y avait une variété croissante de localisations pour la lactosylation des résidus lysyls dans les formules PPCN + perméat\*1, PPCN + perméat\*3 et PPCN + perméat\*2 (respectivement 4, 5 et 6 sites de lactosylation).

### 2.4.3.2. Conclusion

L'enrichissement en perméat a amélioré la stabilité des micelles de caséines acidifiées. L'ajout de 195 g.L<sup>-1</sup> de perméat à une suspension à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN, alcalinisée à pH 7,5 et prétraitée à 90°C pendant 60 min, a permis d'acidifier jusqu'à pH 5,8 les micelles de caséines puis de les traiter à ultra-haute température (en bain d'huile) tout en conservant leur stabilité.

Grâce à la comparaison avec l'étude de l'effet de la concentration en lactose, les variations rapportées avec l'augmentation de la teneur en perméat pouvaient être attribuées à la composition sucrée et/ou à l'environnement minéral et azoté. Ainsi, le brunissement, la diminution de la charge nette négative micellaire, l'élévation de l'intensité du signal des caséines ayant une charge additionnelle de +324 Da et la plus grande variété de lysines lactosylées étaient sans doute dues à l'augmentation de la concentration en lactose. À l'opposé, l'apport de minéraux et d'azote aurait un effet tampon face à l'acidification thermo-induite en présence de sucre et stabilisateur face au traitement UHT. L'augmentation de taille de particules et la diminution de l'hydratation micellaire observées avec la multiplication par deux ou trois de la teneur en lactose étaient encore plus sensibles avec le perméat.

L'impact du prétraitement 90°C/60 min/pH 7,5 pouvait varier selon la teneur en perméat d'ultrafiltration. Ainsi, l'enrichissement en perméat induisait un brunissement après 60 minutes de prétraitement dans les formules PPCN + perméat\*2 et \*3 (signe d'une accélération des réactions de Maillard). La taille des micelles avait tendance à augmenter, au lieu de diminuer comme dans la formule de référence PPCN + perméat\*1, après

prétraitement. Les quotients de lactosylation déterminés par spectrométrie de masse montraient une tendance générale à l'augmentation du taux de fixation du lactose après prétraitement dans les formules enrichies en perméat. En revanche, l'impact du prétraitement sur la variation de pH, la stabilité du potentiel zêta et la tendance à la baisse de la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation était similaire dans les trois formules.

#### 2.4.4. Étude de l'impact de la teneur en protéines sur le prétraitement

Augmenter la teneur en minéraux et en azote en multipliant la teneur en perméat par deux ou trois avait un effet positif sur l'indice de stabilité thermique. Augmenter ces deux concentrations pouvait également se faire en augmentant la concentration en PPCN. Dans ce cas, la nature des minéraux et de l'azote apportés différait puisqu'ils avaient respectivement une origine micellaire et une nature protéique. En augmentant la teneur en micelles de caséines, le pouvoir tampon de la suspension était augmenté (Salaün *et al.* 2005), hypothèse à tester pour améliorer la stabilité thermique des formules acidifiées.

##### 2.4.4.1. Résultats & Discussion

##### 2.4.4.1.1. Indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile)

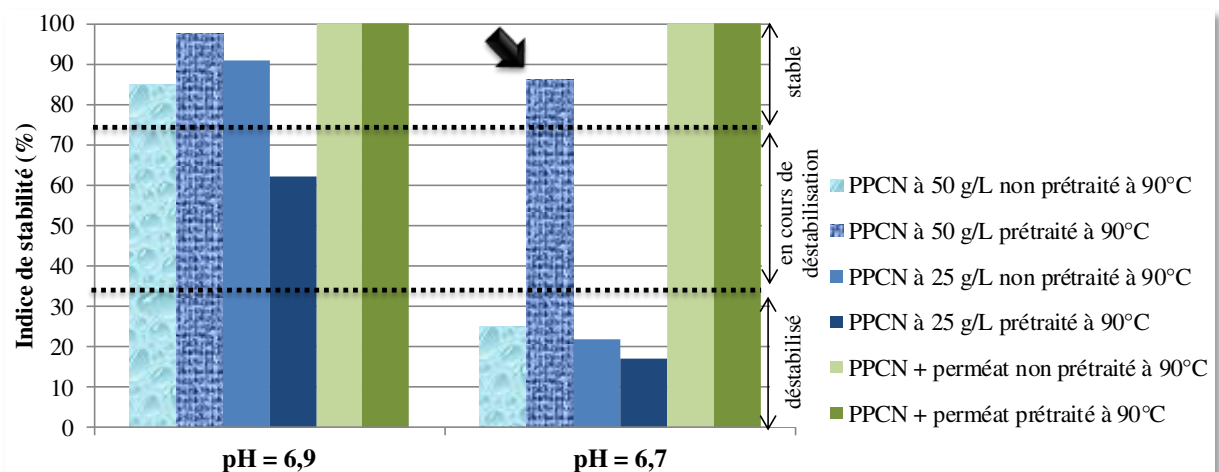


Figure 96 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur l'indice de stabilité d'une formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et comparaison avec les formules PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup> et PPCN + perméat (tests en bain d'huile)



Après prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5), l'indice de stabilité thermique était significativement supérieur à celui mesuré dans l'échantillon non prétraité pour la formule contenant 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN (Figure 96). Par exemple, à pH 6,7, il était de 86 % (échantillon stable) avec prétraitement contre seulement 25 % (échantillon déstabilisé) sans. Sans prétraitement, l'indice était similaire que la concentration en PPCN soit de 25 ou 50 g.L<sup>-1</sup> (Figure 96). La formule PPCN + perméat permettait d'atteindre des pH plus bas sans pour autant entraîner de déstabilisation des micelles de caséines acidifiées par traitement UHT en bain d'huile (à pH 6,7, indices de stabilité de 100 % avec ou sans prétraitement).

L'amélioration de la stabilité des micelles de caséines acidifiées face au traitement thermique UHT était donc également observée après un prétraitement en absence de lactose (mais avec une plus grande concentration en PPCN). L'augmentation de la teneur en micelles de caséines, associée à un chauffage de 60 minutes à 90°C, avait un effet stabilisateur moindre que l'ajout de perméat associé à ce même prétraitement thermique. Par conséquent, l'effet du lactose pourrait être complémentaire ou les équilibres minéraux plus favorables dans le cas de la formule avec perméat de lait (*Chapitre 3 – paragraphe 2.4.2.1.1. Indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile)*).

2.4.4.1.2. Couleur

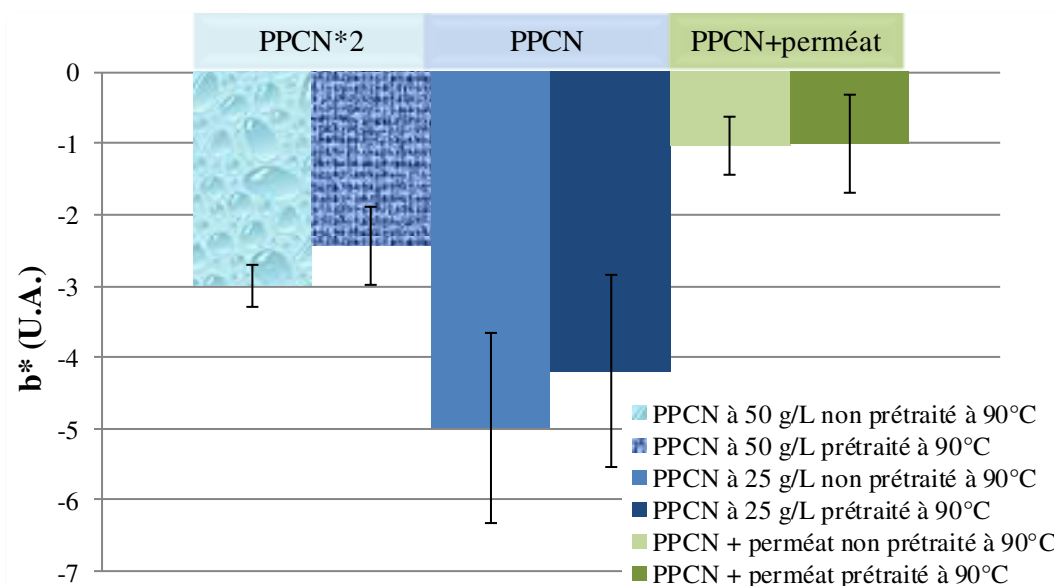


Figure 97 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur le brunissement (b\*, U.A. : unités arbitraires) d'une formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et comparaison avec les formules PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup> et PPCN + perméat (moyennes sur 3 mesures)

Le prétraitement thermique n'entraînait pas de variation significative de la couleur pour la formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN (Figure 97). L'enrichissement en PPCN diminuait la valeur de b\* par rapport à la formule témoin : -3,0 ± 0,3 contre -5,0 ± 1,3 avant prétraitement (Figure 97).

Aucun brunissement n'était attendu puisque la formule PPCN 50 g.L<sup>-1</sup> était dépourvue de lactose. Ce b\* inférieur avec la plus grande teneur en protéines (PPCN à 50 *versus* 25 g.L<sup>-1</sup>), en revanche, s'expliquerait par la plus grande concentration en micelles de caséines (responsables de la blancheur du lait).

2.4.4.1.3. *pH*

Le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) ne modifiait pas significativement le pH de la suspension à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN. Dans la formule témoin (PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup>) aussi le pH restait stable.

2.4.4.1.4. *Potentiel zêta*

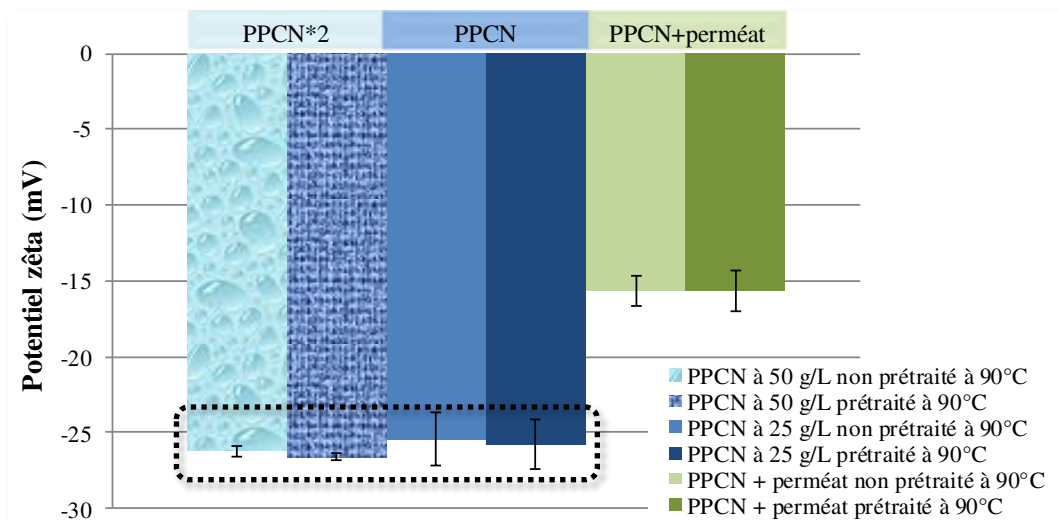


Figure 98 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur le potentiel zêta d'une formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et comparaison avec les formules PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup> et PPCN + perméat (moyennes sur 3 mesures minimum)

Comme attendu en absence de sucre, le prétraitement thermique n'avait pas d'impact significatif sur le potentiel zêta dans la formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN (Figure 98). Les potentiels zêta étaient similaires dans les formules contenant 25 et 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN (Figure 98). En revanche, la suspension de PPCN dans le perméat de lait avait un potentiel zêta moins négatif que la formule enrichie en PPCN : -15,6 ± 1,0 contre -26,2 ± 0,3 mV respectivement.

La multiplication par deux de la concentration en micelles de caséines n'avait donc pas d'impact sur la charge de surface. L'apport de minéraux dans la formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN était moindre que dans la formule avec perméat de lait (*Chapitre 3 – paragraphe*

2.4.2.1.4. *Potentiel zêta*) et par conséquent l'écrantage des charges dû aux minéraux était moins visible.

2.4.4.1.5. *Taille de particules*

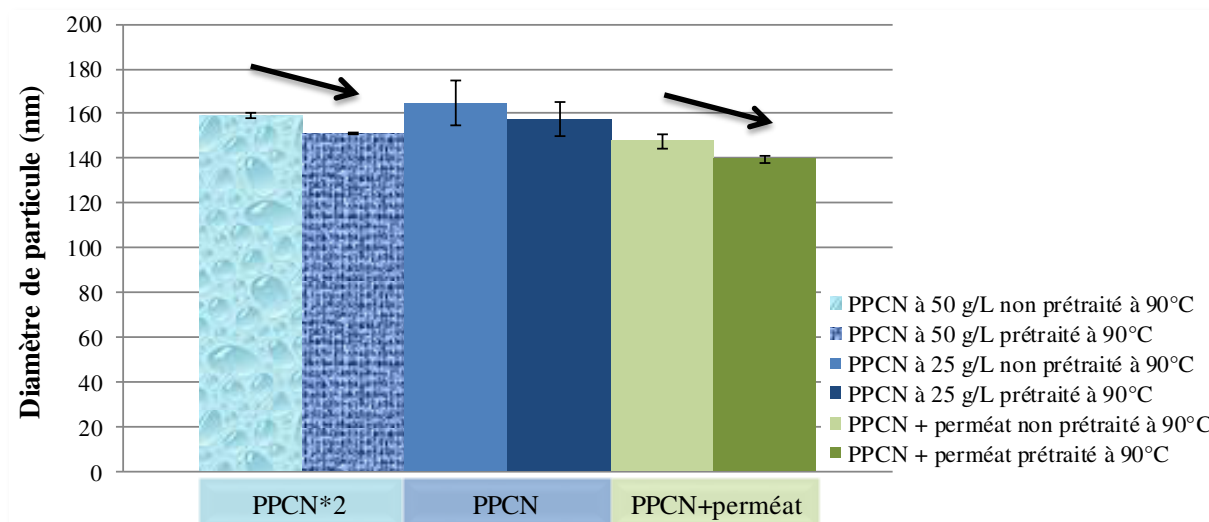


Figure 99 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur le diamètre des particules d'une formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et comparaison avec les formules PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup> et PPCN + perméat (moyennes sur 3 mesures minimum)

Le prétraitement réduisait le diamètre des particules de 8 nm dans la formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN (Figure 99). Cette baisse était observée dans le même ordre de grandeur pour la formule PPCN + lactose ou le lait reconstitué par exemple (Figure 52 et Figure 84) mais pas de manière significative dans la formule à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN.

La taille des micelles dans la formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN était intermédiaire entre la formule témoin à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et la formule PPCN + perméat (Figure 99). Cela pourrait s'expliquer par la force ionique intermédiaire entre ces deux formules.

2.4.4.1.6. Teneur en eau des culots d'ultracentrifugation

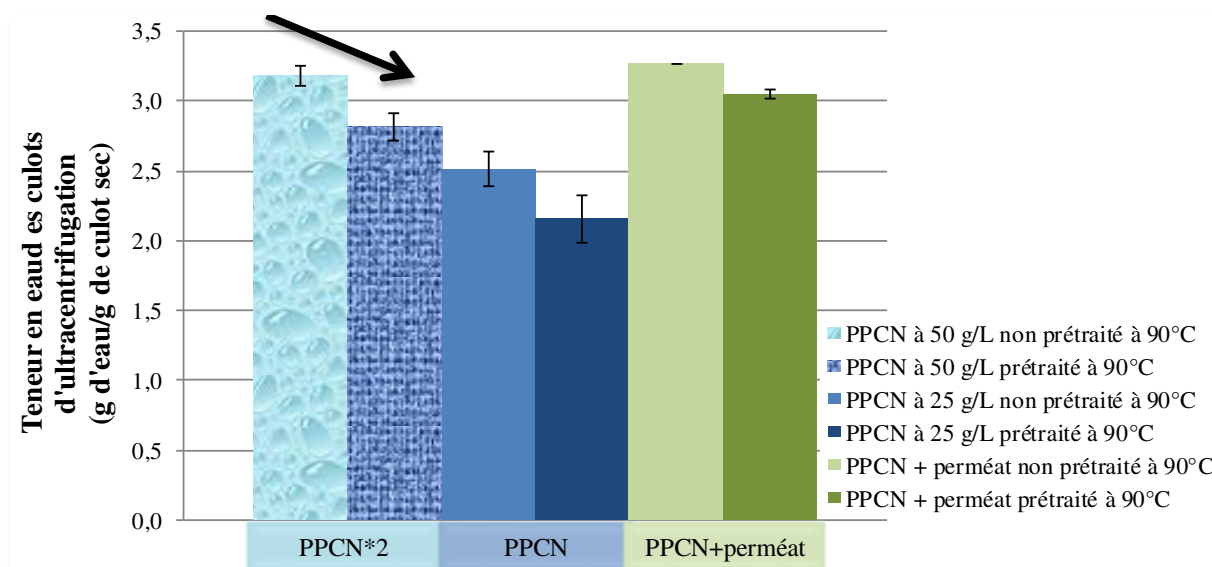


Figure 100 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation d'une formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et comparaison avec les formules PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup> et PPCN + perméat (moyennes sur 2 mesures)

Le prétraitement de la formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN diminuait la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation de 0,36 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec (Figure 100). Avant prétraitement, la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation de la formule 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN était supérieure à celle de la formule à 25 g.L<sup>-1</sup> (2,52 ±0,12 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec) et proche de celle de la formule PPCN + perméat (3,18 ±0,07 et 3,27 ±0,00 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec respectivement).

La baisse de teneur en eau des culots d'ultracentrifugation après prétraitement était observée dans toutes les formules, quelle que soit leur composition, mais était plus faible en présence de lactose (pour un prétraitement de 60 minutes) : 0,24, 0,22 et 0 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culot sec respectivement pour les formules contenant PPCN et lactose, PPCN et perméat et pour un lait frais écrémé. Le lactose, molécule hydrophile, pourrait limiter cette perte en eau. La plus grande hydratation micellaire dans les formules PPCN\*2 et PPCN + perméat pourrait avoir comme origine une force ionique supérieure à celle de la formule à 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN.

### 2.4.4.1.7. *Teneurs en azote*

Les formules ne contenant que du PPCN avaient de faibles teneurs en azote non protéique, c'est-à-dire inférieures à  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ . La formule avec perméat d'ultrafiltration de lait avait une teneur plus de cinq fois supérieure :  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ . Dans tous les cas, aucune protéolyse thermique significative n'était provoquée par le prétraitement thermique de la formule enrichie en protéines.

### 2.4.4.1.8. *Teneurs en minéraux solubles*

Les teneurs en minéraux solubles n'étaient pas impactées de manière irréversible par le prétraitement ( $90^\circ\text{C}/60 \text{ min}/\text{pH } 7,5$ ) dans la formule à  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de PPCN. Les teneurs en minéraux solubles étaient similaires dans les deux formules (contenant 50 ou  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de PPCN) : 30 et  $109 \text{ mg.L}^{-1}$  de calcium et phosphate solubles respectivement.

L'absence d'impact du prétraitement thermique sur les teneurs en minéraux solubles avait été observée dans toutes les autres formules également. Les teneurs en minéraux solubles plus élevées dans la formule avec perméat de lait ( $218$  et  $638 \text{ mg.L}^{-1}$  de calcium et phosphate soluble respectivement) pourraient expliquer les différences de potentiel zêta micellaire et de taille des particules avec la formule à  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de PPCN.

D'après les mesures rapportées ici, enrichir la suspension en micelles de caséines ne modifiait pas les teneurs en minéraux de la phase soluble. Cela indiquerait

- qu'il n'y avait pas de solubilisation des minéraux de la phase colloïdale ;
- que la teneur en phosphate de calcium micellaire était plus élevée dans la formule enrichie en PPCN.

### 2.4.4.2. *Conclusion*

**Enrichir la suspension en micelles de caséines et appliquer le prétraitement à  $90^\circ\text{C}$  a amélioré l'indice de stabilité thermique.** La formule contenant  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de PPCN se rapprochait davantage tantôt de la formule à  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de PPCN, tantôt de la formule contenant  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de PPCN et du perméat de lait. Ainsi, avec le prétraitement thermique de 60 minutes à  $90^\circ\text{C}$  et pH 7,5, tout comme dans la formule témoin :

- la formule enrichie en PPCN ne subissait pas d'acidification,
- le potentiel zêta des micelles de caséines restait stable à -26 mV,
- la taille des micelles diminuait légèrement autour de 160 nm,
- les concentrations en calcium et phosphate solubles restaient stables autour de 30 et 109 mg.L<sup>-1</sup> respectivement.

En revanche, la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation était supérieure et plus proche de la formule avec perméat. Le prétraitement de la formule enrichie en PPCN améliorait la stabilité des micelles de caséines acidifiées face au traitement UHT, à l'instar de la formule avec perméat. Les couleurs de la suspension à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et des deux autres formules évoluaient peu.

Cette étude suggère que, outre la composition de la phase solvante, la structure et la composition micellaire interne, induites par le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5), joueraient un rôle dans la stabilisation face au traitement UHT. Une plus grande teneur en minéraux solubles ou en azote non protéique pourrait également améliorer la stabilité thermique des micelles de caséines acidifiées et ainsi permettre d'atteindre des pH aussi bas qu'avec l'ajout de perméat sans entraîner de déstabilisation avec le traitement UHT.

### 2.4.5. Étude de l'impact de la teneur en azote dans le prétraitement

Le perméat contenait une quantité non négligeable d'azote non protéique. Pour étudier l'impact de cet élément, un essai enrichi avec de l'urée (un des composés majoritaires de l'azote non protéique, environ 41 %, *Chapitre 1 – paragraphe 1.1.3. Substances azotées non protéiques*) a été réalisé.

Cette stratégie était confortée par plusieurs travaux effectués il y a plus de 35 ans. D'après Fox *et al.* (1980), l'effet stabilisateur de l'urée est la conséquence de sa dégradation thermique en CO<sub>2</sub> et NH<sub>3</sub>. Le CO<sub>2</sub> libéré en équilibre acido-basique avec HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> neutraliserait le milieu et donc stabiliserait les micelles de caséines en limitant les baisses de pH thermo-induites grâce à l'augmentation du pouvoir tampon. D'après Sweetser & White (1981) et Metwalli *et al.* (1998), cette amélioration proviendrait de la formation d'homocitrulline *via* le

complexe intermédiaire cyanate-caséines (probablement dus aux groupements ε-amine des résidus lysyls).

La teneur en urée a été fixée de manière à avoir la même concentration en azote total que dans la formule à 50 g.L<sup>-1</sup> de PPCN (dans laquelle un effet significatif du prétraitement thermique sur l'indice de stabilité avait été mis en évidence).

### 2.4.5.1. Résultats & Discussion

#### 2.4.5.1.1. Indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile)

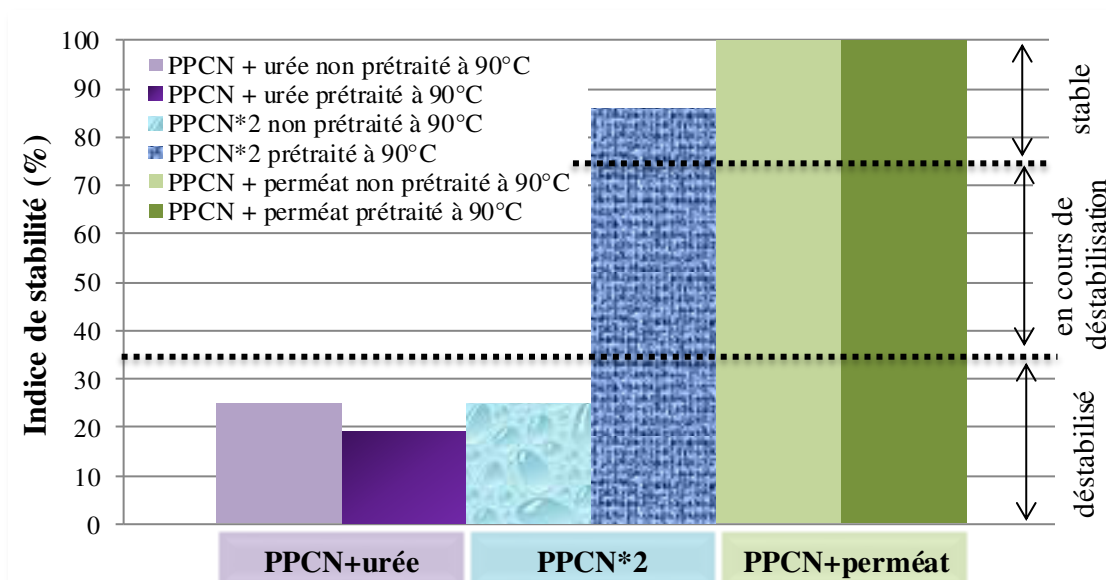


Figure 101 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur l'indice de stabilité d'une formule contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et de l'urée, et comparaison avec les formules PPCN à 50 g.L<sup>-1</sup> et PPCN + perméat, à pH 6,7 (tests en bain d'huile)

Aucun impact de l'ajout d'urée ou du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la formule PPCN + urée n'était mis en évidence sur l'indice de stabilité thermique des micelles de caséines acidifiées (Figure 101).

Ces observations suggéraient que l'apport d'azote non protéique par le perméat n'avait pas d'impact direct sur l'indice de stabilité. Ce serait les minéraux qui auraient un effet bénéfique sur la stabilité thermique des protéines acidifiées. De la même manière, dans la



formule PPCN à 50 g.L<sup>-1</sup>, ce serait plus l'apport d'azote protéique (ou des minéraux contenus dans les micelles de caséines) que l'apport d'azote en lui-même qui aiderait à améliorer la stabilité des protéines acidifiées face au traitement UHT.

#### 2.4.5.1.2. Couleur

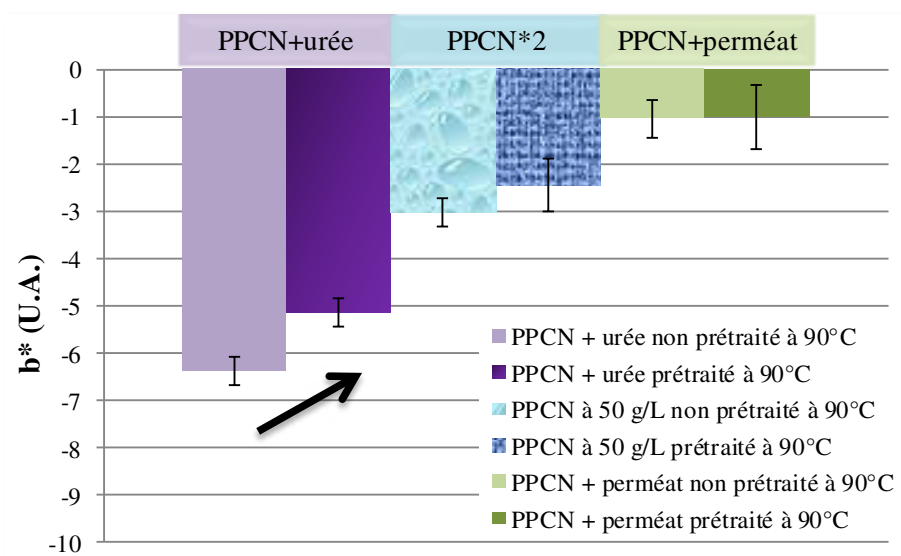


Figure 102 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur le brunissement (b\*, U.A. : unités arbitraires) d'une formule contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et de l'urée et comparaison avec les formules PPCN à 50 g.L<sup>-1</sup> et PPCN + perméat, avant acidification (moyennes sur 3 mesures)

La formule PPCN + urée tendait à brunir, passant de -6,4 ± 0,3 à -5,2 ± 0,3 avec le prétraitement. De plus, l'urée avait un impact non négligeable sur la couleur en entraînant un « bleuissement » de la suspension (valeur de b\* bien plus négative que dans toutes les autres formules testées précédemment, Figure 102).

Alors que l'impact du prétraitement était négligeable dans les formules dépourvues de lactose (voire en présence de perméat), avec un prétraitement de 60 minutes à 90°C en présence d'urée, la suspension brunissait. De plus, l'ajout d'urée semblait avoir un impact sur les propriétés physico-chimiques de la suspension (couleur différente avant chauffage). Cela confirmerait un rôle de l'urée dans les mécanismes en jeu lors du chauffage à 90°C.

2.4.5.1.3. *pH*

Le pH ne variait pas significativement avec le prétraitement thermique dans la formule contenant PPCN et urée, comme dans toutes les formules dépourvues de lactose.

2.4.5.1.4. *Potentiel zêta*

Comme dans toutes les autres formules, le prétraitement n'avait pas d'impact significatif sur la valeur du potentiel zêta des micelles de caséines dans la formule contenant PPCN et urée. La charge de surface des micelles de caséines contenues dans la formule PPCN + urée était la même que dans les formules PPCN à 25 ou 50 g.L<sup>-1</sup>, à savoir de -26 mV. Ces résultats étaient conformes aux attentes.

2.4.5.1.5. *Taille de particules*

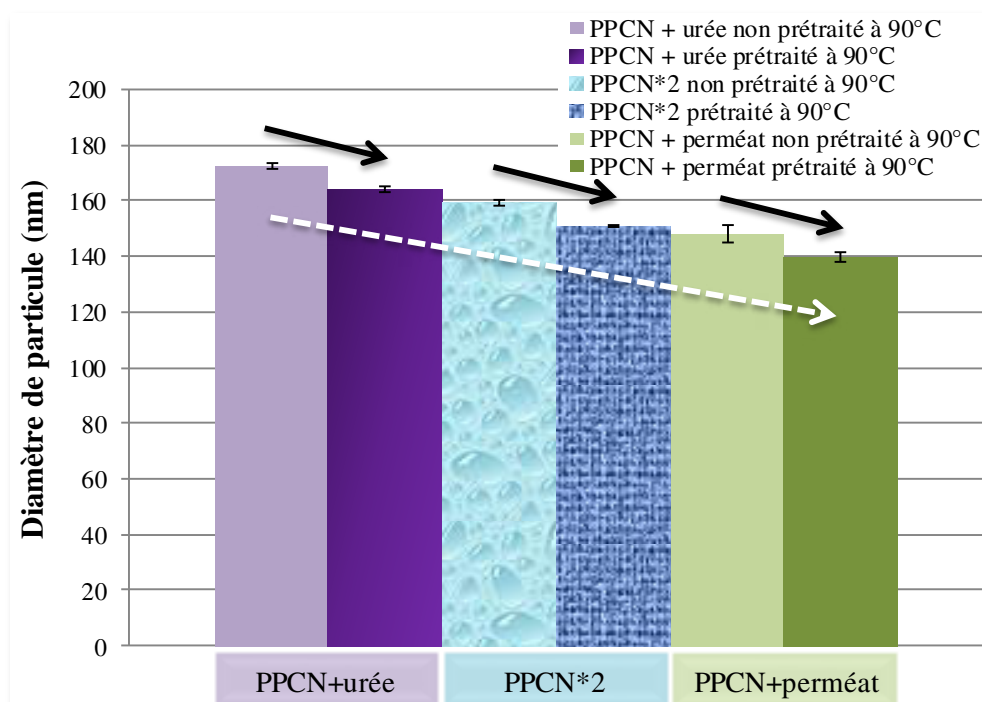


Figure 103 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la taille des particules d'une formule contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et de l'urée, et comparaison avec les formules PPCN à 50 g.L<sup>-1</sup> et PPCN + perméat, avant acidification (moyennes sur 3 mesures)

Comme dans la majorité des formules, pour la suspension de PPCN additionnée d'urée, le prétraitement induisait une tendance à la réduction du diamètre des particules (Figure 103) sans pour autant modifier l'indice de polydispersité. La taille des particules apparaissait décroissante en comparant les formules PPCN + urée, PPCN\*2 et PPCN + perméat : respectivement  $172,3 \pm 0,9$ ,  $159,3 \pm 1,0$  et  $147,8 \pm 3,1$  nm sans prétraitement. Le diamètre des particules étant similaire dans les formules PPCN à  $25 \text{ g.L}^{-1}$  et PPCN + urée, l'ajout d'urée à  $0,26 \text{ g.L}^{-1}$  n'impactait pas la taille des micelles.

#### 2.4.5.1.6. Teneur en eau des culots d'ultracentrifugation

Le prétraitement induisait une diminution de la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation de la suspension de PPCN additionnée d'urée (Figure 104). Cette baisse était du même ordre de grandeur que dans les formules contenant uniquement du PPCN, à savoir environ  $0,35 \text{ g d'eau.g}^{-1}$  de culot sec.

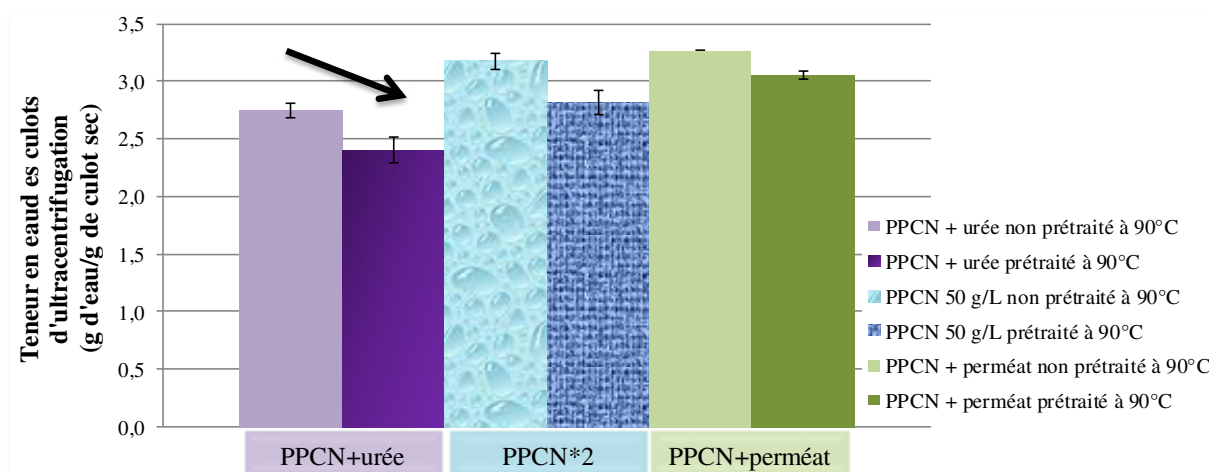


Figure 104 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la teneur en eau du culot d'ultracentrifugation d'une formule contenant  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de PPCN et de l'urée, et comparaison avec les formules PPCN à  $50 \text{ g.L}^{-1}$  et PPCN + perméat, avant acidification (moyennes sur 2 mesures)

L'ajout d'urée entraînait une légère augmentation de la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation par rapport à la formule témoin à  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de PPCN :  $2,75 \pm 0,06$  contre  $2,52 \pm 0,12$  respectivement. Toutefois l'hydratation micellaire restait inférieure à celle de la formule enrichie en PPCN (et à même teneur en azote) qui était de  $3,18 \pm 0,07 \text{ g d'eau.g}^{-1}$  de

culot sec. Les minéraux auraient sans doute plus d'impact que les molécules azotées sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation.

### 2.4.5.2. Conclusion

L'impact positif de l'urée, sur la stabilité thermique des micelles de caséines acidifiées, n'a pas pu être confirmé avec la formule à base d'ingrédients modèles. Les résultats obtenus avec la formule contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN et de l'urée étaient très proches de ceux de la formule témoin contenant 25 g.L<sup>-1</sup> de PPCN (à l'exception de la valeur de b\*).

Cet essai a permis de pouvoir **écarter l'hypothèse selon laquelle l'azote** (non protéique apporté par le perméat ou celui lié à l'enrichissement en PPCN) **était responsable de l'amélioration** de stabilité des protéines laitières acidifiées après prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) face au traitement UHT en bain d'huile. Ce serait donc l'ajout de minéraux couplé au prétraitement qui permettrait d'augmenter cet indice de stabilité thermique.

### 2.4.6. Étude de l'impact du pouvoir tampon dans le prétraitement

Les formules où l'impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) était positif sur la stabilité thermique des protéines acidifiées (ajout de perméat ou enrichissement en PPCN), avait un pouvoir tampon supérieur aux formules moins stables face au traitement UHT. Pour distinguer le rôle de ce pouvoir tampon de l'impact de l'ajout de lactose, de citrate et d'azote, un essai a été réalisé dans un tampon phosphate 10 mmol.L<sup>-1</sup> ayant un pH de 7,5 à 50°C. Le phosphate a été choisi car c'est un des composants majeurs contribuant au pouvoir tampon. La concentration en phosphate pour la phase solvante de la suspension correspondait à celle de la phase aqueuse du lait.

2.4.6.1. Résultats & Discussion

2.4.6.1.1. Indice de stabilité thermique (tests en bain d'huile)

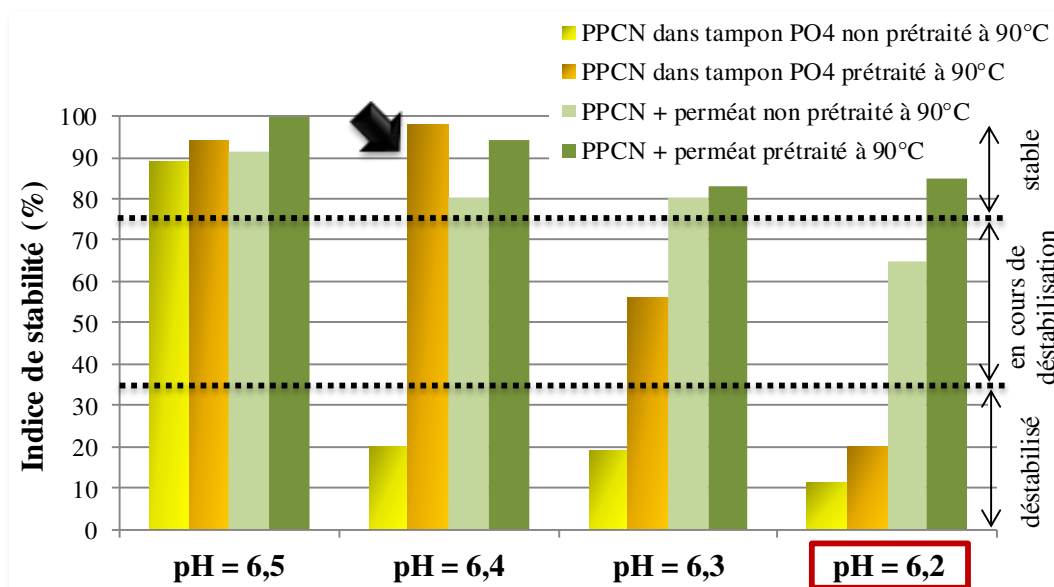


Figure 105 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur l'indice de stabilité d'une suspension de PPCN dans un tampon phosphate 10 mmol.L<sup>-1</sup> et comparaison avec la formule PPCN + perméat, en fonction du pH d'acidification (tests en bain d'huile)

Le prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) améliorait l'indice de stabilité thermique de la suspension de PPCN dans le tampon phosphate (Figure 105). Par exemple, à pH 6,4, l'indice était de 20 (échantillon déstabilisé) contre 98 % (échantillon stable) respectivement sans et avec prétraitement. De plus, pour une suspension de PPCN dans de l'eau ultra-pure, avec ou sans prétraitement, les échantillons étaient déstabilisés dès pH 6,8. La dispersion du PPCN dans un tampon phosphate 10 mmol.L<sup>-1</sup> améliorait la stabilité des micelles de caséines acidifiées sans même le prétraitement puisque l'indice était de 89 % à pH 6,5 dans l'échantillon non chauffé.

L'utilisation d'une solution tampon phosphate pH 7,5 au lieu de perméat de lait ajusté au même pH par ajout d'une solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> ne permettait pas d'atteindre des pH aussi bas sans entraîner de déstabilisation des micelles de caséines par traitement thermique UHT. En effet, à pH 6,2 les indices de stabilité de la formule PPCN + perméat et de la

suspension de PPCN dans le tampon phosphate 10 mmol.L<sup>-1</sup>, après prétraitement thermique, étaient respectivement de 85 (échantillon stable) contre 20 % (échantillon déstabilisé).

Par conséquent, la stabilisation des micelles de caséines acidifiées face au traitement UHT, apportée par le tampon phosphate 10 mmol.L<sup>-1</sup> à pH 7,5 à 50°C, n'était pas équivalente à celle du perméat de lait à la composition plus complexe. Les phosphates apportés par le tampon participeraient à l'amélioration de la stabilité, mais d'autres minéraux ou molécules ioniques dans le perméat y contribueraient significativement, par exemple le citrate. La lactosylation pourrait aussi concourir à cette augmentation de stabilité thermique.

#### 2.4.6.1.2. Couleur

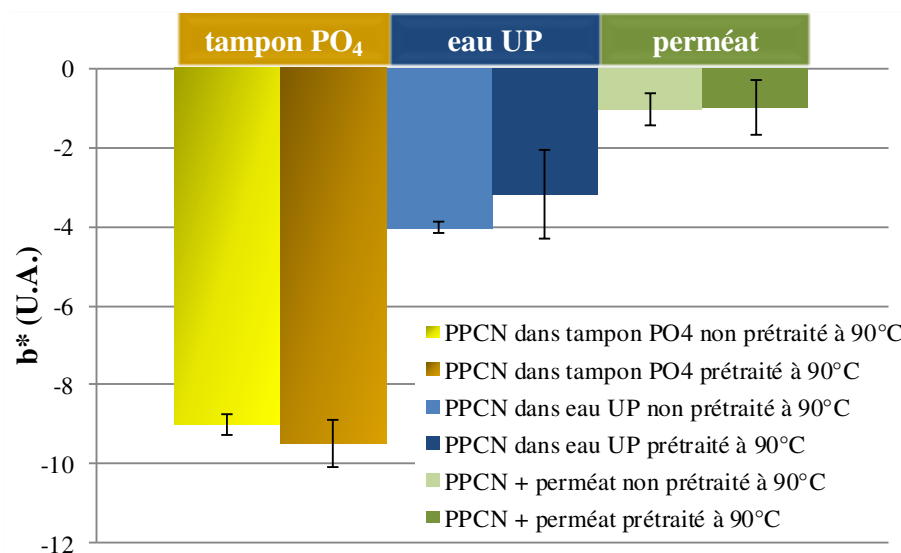


Figure 106 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la couleur (U.A. : unités arbitraires) d'une suspension de PPCN dans un tampon phosphate (PO<sub>4</sub>) 10 mmol.L<sup>-1</sup>, et comparaison avec les formules PPCN dans eau ultra-pure (UP) et PPCN + perméat, avant acidification (moyennes sur 3 mesures)

Le prétraitement n'avait pas d'impact significatif sur la couleur de la suspension de PPCN dans un tampon phosphate 10 mmol.L<sup>-1</sup> à pH 7,5 (Figure 106).

La valeur de b\* était très faible dans la formule contenant le tampon phosphate (environ -9) comparée aux autres essais. Cela pourrait traduire une modification de la structure des micelles dans cet environnement.

2.4.6.1.3. *pH*

Le prétraitement n'avait aucune influence sur le pH de la suspension de PPCN dans un tampon phosphate 10 mmol.L<sup>-1</sup>, comme pour toutes les autres formules dépourvues de lactose.

2.4.6.1.4. *Potentiel zêta*

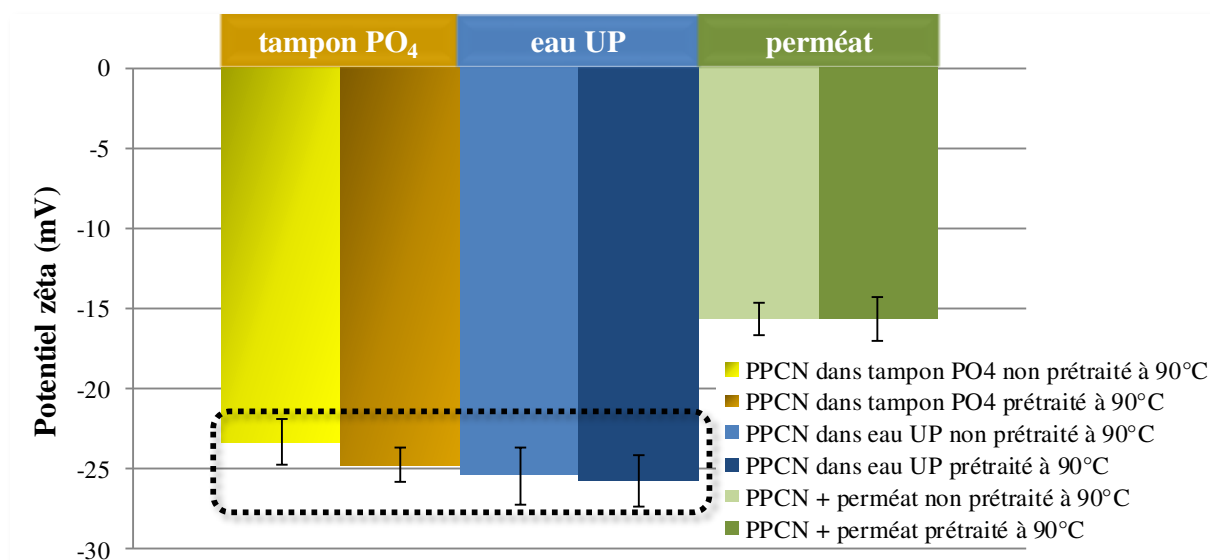


Figure 107 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur le potentiel zêta d'une suspension de PPCN dans un tampon phosphate (PO<sub>4</sub>) 10 mmol.L<sup>-1</sup> et comparaison avec les formules PPCN dans eau ultra-pure (UP) et PPCN + perméat (moyennes sur 3 mesures)

Comme dans tous les essais réalisés précédemment, le prétraitement n'avait pas d'impact significatif sur le potentiel zêta des particules de la formule avec tampon phosphate (Figure 107). De plus, pour un pH de 7,5 à 50°C, la charge nette de surface des micelles de caséines était similaire pour la suspension de PPCN additionnée de soude et pour la formule de PPCN suspendu dans une solution tampon (Figure 107).

Dans la formule PPCN + perméat, le potentiel zêta des micelles était moins négatif que pour la formule PPCN dans tampon phosphate : -15,6 ± 1,0 contre -23,4 ± 1,4 mV respectivement. La concentration en cations et donc la force ionique étaient aussi plus élevées dans la formule avec le perméat d'ultrafiltration de lait, d'où un écrantage des charges





phosphate 10 mmol.L<sup>-1</sup> (Figure 109). Cette diminution était significative et était respectivement deux et trois fois supérieure à celles déterminées pour la suspension de PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup> dans l'eau ultra-pure et pour la formule PPCN + perméat : 0,61 contre 0,36 et 0,22 g d'eau.g<sup>-1</sup> de culots sec respectivement. Sans prétraitement, l'hydratation micellaire dans la suspension était similaire à celle calculée dans la formule PPCN + perméat (Figure 109).

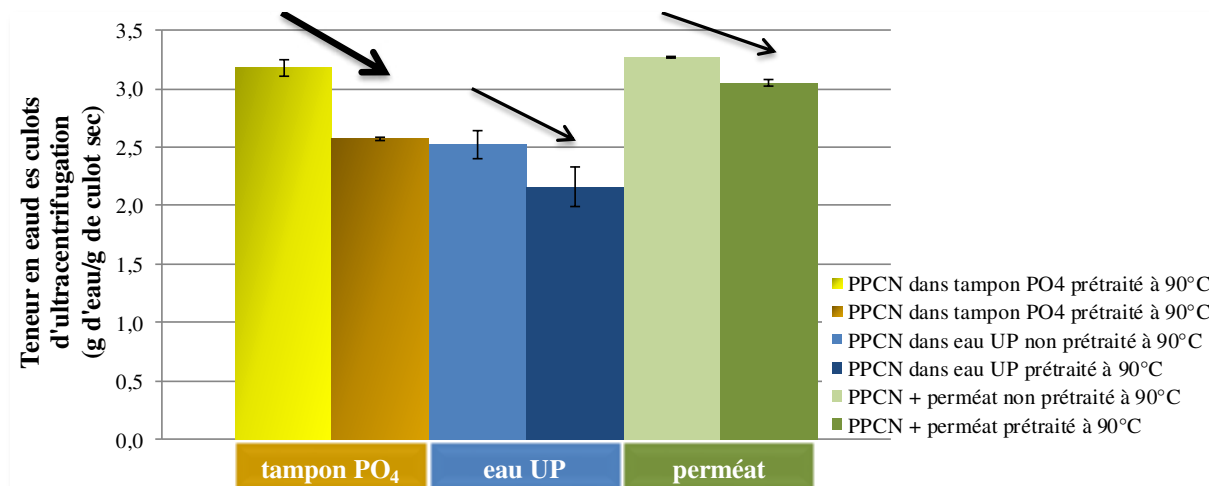


Figure 109 : Impact du prétraitement (90°C/60 min/pH 7,5) sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation d'une suspension de PPCN dans un tampon phosphate (PO<sub>4</sub>) 10 mmol.L<sup>-1</sup> et comparaison avec les formules PPCN dans eau ultra-pure (UP) et PPCN + perméat (moyennes sur 2 mesures)

Que les teneurs eau des culots d'ultracentrifugation soient similaires pour la formule avec perméat et celle avec tampon phosphate avant prétraitement pourrait indiquer un rôle essentiel du phosphate (*a priori* à la même concentration pour les deux formules). Néanmoins, comme la diminution n'était pas la même avec le prétraitement, d'autres mécanismes pourraient entrer en jeu : la présence de citrate et de cations supplémentaires modifierait les équilibres minéraux et le lactose apporterait de l'hydrophilie.

#### 2.4.6.2. Conclusion

La dispersion du PPCN dans **une solution de tampon phosphate** 10 mmol.L<sup>-1</sup> à pH 7,5 (au lieu d'eau ultra-pure additionnée de soude) **a amélioré la stabilité** des micelles de caséines acidifiées face au traitement UHT, et ce d'autant plus qu'un prétraitement

(90°C/60 min) était appliqué. Cette formulation n'a pas eu d'impact sur le pH après prétraitement ou le potentiel zêta micellaire. En revanche, la présence d'un tampon phosphate a eu des répercussions (comparaison avec la formule PPCN dans de l'eau ultra-pure) sur :

- La couleur : pas d'impact du prétraitement mais une valeur de  $b^*$  plus négative ;
- Sur la taille de particules : diamètre des micelles plus petit et diminution causée par le prétraitement thermique plus sensible ;
- Sur la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation : hydratation micellaire supérieure (de l'ordre de celle mesurée dans une formule PPCN + perméat) et « déshydratation » causée par le prétraitement plus intense.

Ainsi, le phosphate contribuerait significativement au mécanisme de stabilisation des micelles de caséines acidifiées face à un traitement thermique fort.

### 2.5. Conclusion de la phase 2

Le **prétraitement** consistant à maintenir une formule lactière à **90°C**, **pendant 60 minutes**, au **pH ajusté à 7,5** (par ajout d'une solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>) et contenant du **perméat** ou étant **riche en caséines**, **améliorait la stabilité thermique des protéines acidifiées**.

Des facteurs favorisant la réaction de lactosylation ont pu être mis en avant :

- **l'alcalinisation préalable** à pH 7,5 (obtenue par ajout d'une solution de NaOH concentrée) ;
- l'augmentation de la **concentration en lactose** ;
- la réduction de l'**activité chimique de l'eau**.

D'autre part,

- La substitution du lactose par du glucose et des micelles de caséines par du caséinate n'a pas permis d'améliorer significativement la lactosylation des résidus lysyls.
- Augmenter la teneur en lactose était déconseillé en raison de sa dégradation thermique acidifiante (voie L.A.).
- Ajouter de l'azote non protéique (urée) n'avait aucun effet, en particulier d'un point de vue stabilité thermique.
- Le pouvoir tampon, apporté par les minéraux (et notamment le phosphate) ainsi que par les protéines, avait un rôle clé dans les mécanismes de stabilisation face au traitement UHT.

Les mesures qui ont été réalisées pour pouvoir caractériser l'impact d'un prétraitement de 60 minutes à 90°C sur différentes formulations et en particulier les principales différences rapportées sont résumées dans le Tableau 23 ci contre.

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Phase 2 : Étude de différentes voies de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique ultra-haute température

Tableau 23 : Impact du prétraitement à 90°C pendant 60 minutes sur les mesures les plus discriminantes et selon la formulation (hydratation = teneur en eau des culots d'ultracentrifugation, KXX/XX = positionnement de la lysine/caséine support)

Formule (pH avant prétraitement)	pH minimum avant déstabilisation UHT	Variation de pH du au prétraitement	Potentiel $\zeta$ (sens de variation, valeur en mV)	Diamètre (sens de variation, valeur en nm)	Hydratation (g d'eau.g <sup>-1</sup> de culot sec)	Lactosylations (intensité, caséines lactosylées, lysines lactosylées/caséine)
PPCN*1 (pH 7,5)	6,9	-0,01	= -25	≈ 158	↓ 2,16	<b>Faible</b> Caséine $\beta$ variant A <sub>2</sub> (K191/ $\alpha_{s2}$ )
PPCN*1 + lactose*1 (pH 7,5)	6,7	-0,05	= -22	↓ 183	↓ 2,05	<b>Faible</b> Caséine $\alpha_{s1}$ et $\beta$ (K119, 132/ $\alpha_{s1}$ , K91/ $\alpha_{s2}$ )
PPCN*1 + lactose*1 (pH 7,0)	6,9	0,00	= -20	≈ 180	↓ 1,78	<b>Aucune</b>
PPCN*1 + glucose*1 (pH 7,0)	7,0	-0,0	= -20	≈ 176	↓ 1,83	<b>Faible</b> Caséine $\alpha_{s1}$ et $\beta$ (K91, 113/ $\alpha_{s2}$ )
PPCN*1 + lactose*3 (pH 7,5)	> 7,0	-0,11	= -17	↓ 225	↓ 1,77	<b>Moyenne</b> Caséine $\alpha_{s1}$ et $\beta$ (K7, 119/ $\alpha_{s1}$ , K113, 188, 191/ $\alpha_{s2}$ )
Lait cru (pH 7,5)	6,2	-0,07	= -17	≈ 147	↓ 3,83	<b>Non déterminées</b>
PPCN + perméat*1 (pH 7,5)	6,1	-0,10	= -16	↓ 140	↓ 3,05	<b>Moyenne</b> Caséine $\alpha_{s1}$ et $\beta$ (K7, 119, 132/ $\alpha_{s1}$ , K91, 113, 173/ $\alpha_{s2}$ )
PPCN + perméat*3 (pH 7,5)	< 5,8	0,00	≈ -9	↑ 309	↓ 1,99	<b>Moyenne</b> Caséine $\alpha_{s1}$ et $\beta$ (K7/ $\alpha_{s1}$ , K80, 91, 113, 173/ $\alpha_{s2}$ )
PPCN*2 (pH 7,5)	< 6,7	0,00	= -26	↓ 151	↓ 2,91	<b>Non déterminées</b>
PPCN*1 + urée (pH 7,5)	> 6,8	0,00	≈ -27	↓ 164	↓ 2,40	<b>Non déterminées</b>
PPCN*1 dans tampon PO <sub>4</sub> (pH 7,5)	6,3	0,00	≈ -25	↓ 123	↓ 2,57	<b>Non déterminées</b>

.....

Plusieurs remarques et hypothèses peuvent être émises au sujet de ces résultats :

1. La formule la plus résistante face au traitement UHT après acidification (PPCN\*1 + perméat\*3) était celle qui avait le potentiel zêta de valeur absolue la plus faible. Par conséquent les **répulsions électrostatiques seules n'expliqueraient pas** la stabilité des micelles de caséines acidifiées, en particulier face au traitement UHT.
2. De même, la **taille des particules ne serait pas un critère** primordial dans la stabilité face au traitement UHT. En effet, parmi les formules les plus « résistantes » étaient celles contenant les plus grosses (formule enrichie en perméat) ou les plus petites (PPCN suspendu dans un tampon phosphate) micelles de caséines.
3. Le prétraitement thermique 90°C/60 min diminuait la teneur en eau des culots d'ultracentrifugation. Une **hydratation micellaire inférieure** pourrait limiter les réactions menant à l'agrégation des micelles de caséines (moindres mobilité et interactions hydrogène).
4. Chauffer à pH 7,5, à 90°C et ajouter du lactose à une suspension de micelles de caséines a amélioré la stabilité thermique des protéines acidifiées par comparaison avec une formule ne contenant que du PPCN. Utiliser du perméat a augmenté encore plus l'indice de stabilité. Par conséquent la **lactosylation contribuerait mais ne serait pas la seule responsable** de la stabilisation des micelles de caséines acidifiées face au traitement UHT.
5. Le prétraitement (90°C/60 min) pourrait avoir un **rôle dans l'agencement des caséines et/ou des minéraux en plus d'un impact chimique vis-à-vis du lactose**. D'après Darewicz & Dziuba (2001), la glycosylation de la caséine  $\beta$  entraînait une modification de sa conformation. Le changement de structure secondaire (plus de structures a périodiques moins de structures organisées comme les hélices  $\alpha$ , les feuillets  $\beta$  ou les coudes) était aussi rapporté par Liu *et al.* (2012) et Liu & Zhong (2013). Par conséquent, même si le degré de lactosylation des

micelles de caséines était trop faible pour être détecté par nos mesures, cette légère modification pourrait entraîner une différence structurale significative avec des conséquences sur leur stabilité thermique. De même et de surcroît, lors du prétraitement thermique, des déplacements minéraux au sein de la micelle ou entre les phases soluble et colloïdale pourraient générer de légères modifications de l'organisation des caséines au sein de la suprastructure. Ces modifications dans les équilibres minéraux pourraient ne pas être détectées pour cause de réversibilité (ce qui n'empêcherait pas une réorganisation irréversible des caséines) ou parce qu'elles auraient lieu au sein de la micelle. Pour tester cette hypothèse, il faudrait faire appel à des techniques complémentaires à celles utilisées ici (dichroïsme circulaire dans les UV lointains, spectre infra-rouge à transformée de Fourier, hydrophobicité de surface ...).

6. Les niveaux de lactosylation observés dans la plupart des formules étudiées étaient peu élevés. Une des clés des mécanismes en jeu dans la lactosylation serait peut-être à chercher dans la composition minérale de la micelle de caséines. Comme expliqué par Akıllıoğlu & Gökmen (2014) et Visser *et al.* (1979), le **calcium ou le phosphate pourraient s'interposer entre les résidus lysyls et le sucre réducteur ce qui empêcherait la réaction de lactosylation** d'avoir lieu.
7. Les minéraux pourraient également être responsables de l'augmentation de la stabilité thermique en limitant les interactions entre caséines. La **diminution de réactivité des résidus des acides aminés** (comme suggéré face à la lactosylation) causerait une moindre agrégation entre caséines et limiterait donc la déstabilisation des micelles. Cette hypothèse pourrait aussi être appuyée par la théorie de Debye-Hückel qui assimile les protéines à des macro-ions entourés d'ions de petite taille et de charge opposée (contre-ions). Cette couche ionique constituerait une couche de protection diminuant l'intensité des interactions interprotéines. L'efficacité augmenterait avec la concentration en contre-ions dans la solution.

8. Même si les mesures de potentiel zêta n'ont pas mis en évidence un abaissement du  $pH_i$  suite au prétraitement (90°C/60 min) dans le cadre de cette étude (Tableau 23), l'impact positif de l'augmentation de la **force ionique** seule (*via* l'ajout de perméat par exemple) tendait à valider l'hypothèse d'une stabilisation des micelles de caséines acidifiées face au traitement UHT grâce à la diminution du  $pH_i$  des protéines. En effet, celui-ci diminue quand la force ionique augmente en raison de l'écrantage des charges (Figure 110) (Gaucheron 2004). Cette hypothèse est toutefois discutable car la force ionique du lait étant déjà élevée, l'enrichissement en minéraux, dû à une multiplication par trois de la teneur en perméat d'ultrafiltration de lait par exemple, pourrait n'entraîner qu'une faible variation du  $pH_i$  des caséines.

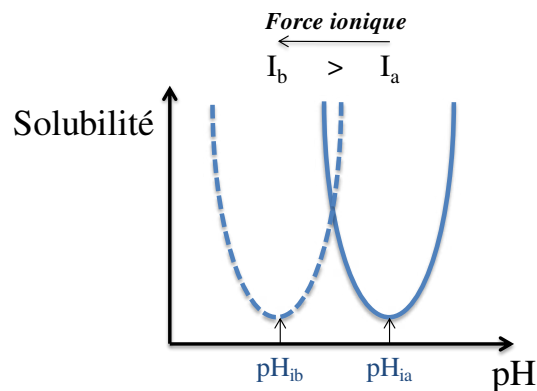


Figure 110 : Influence de la force ionique  $I$  sur le  $pH_i$  d'une protéine ( $I_a < I_b$ )

9. Une autre hypothèse pour expliquer la plus grande stabilité des caséines après prétraitement consisterait à considérer qu'une fraction de l'azote protéique, apparemment non significative dans les mesures réalisées, présenterait une **activité « chaperone »**. Cette fraction - qui serait comparable aux petites protéines de « choc thermique » présentes dans les cellules et désignées par l'acronyme sHsps (small Heat shock proteins, Haslbeck *et al.* 2005) - correspondrait aux nombreux fragments peptidiques écartés de l'analyse en spectrométrie de masse car qualifiés de non tryptiques. Ce rôle pourrait aussi être

directement affecté aux caséines dissociées lors du prétraitement. La capacité des protéines, et en particulier des caséines  $\kappa$ , à protéger contre la déstabilisation thermique a déjà été proposée dans la littérature (Holt *et al.* 2013). Ainsi, Kehoe et Foegeding (2014) ont rapporté que de nombreuses études avaient montré que les caséines  $\alpha_s$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  avaient un comportement similaire à celui des molécules chaperones. Eux-mêmes prouvaient qu'en présence de caséines  $\beta$ , la taille des agrégats de  $\beta$ -lactoglobuline thermo-induits était réduite. Même s'il n'est pas facile d'expliquer les mécanismes en jeu, les données accumulées par Kehoe et Foegeding (2014) les ont conduits à conclure que les caséines  $\beta$  interagissaient avec les premiers agrégats de  $\beta$ -lactoglobuline formés lors du traitement thermique, ce qui prévenait l'augmentation de taille de ces particules thermo-induites. Cela pourrait être dû à la modification des interactions électrostatiques car la charge des  $\beta$ -lactoglobulines était plus négative en présence de caséines  $\beta$  que seules (Kehoe & Foegeding 2014). Une diminution des attractions hydrophobes pourrait aussi être proposée.



# CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Ce projet de thèse avait pour objectif de mieux comprendre la stabilité des protéines laitières dans un contexte industriel. Cette question a été traitée face à deux types de **déstabilisation : acide et thermique**. Pour cela un test de stabilité a été mis en place. Le calcul de cet indice, s'appuyant sur le dosage d'azote contenu dans un aliquot prélevé après centrifugation de l'échantillon, a ensuite pu être utilisé tout au long de la thèse pour quantifier la stabilité des protéines laitières.

## *Phase 1 : Étude à l'échelle pilote de la stabilité des protéines laitières selon le pH, la température d'acidification, la teneur en protéines, la teneur en matière grasse et le mode d'acidification*

Dans un premier temps, il s'agissait de déterminer **la stabilité des protéines laitières en fonction du pH et du protocole d'acidification**. La combinaison de plusieurs facteurs (pH, teneurs en protéines et en matière grasse, température d'acidification et mode d'acidification), d'analyses physico-chimiques multi-échelles et de traitements statistiques ont permis de **hiérarchiser et d'appréhender les mécanismes** en jeu lors de la déstabilisation acide.

**Le facteur ayant le plus fort impact sur cette stabilité était le pH**. En acidifiant la suspension de pH 6,7 à pH 3,7, les protéines se protonaient ce qui **réduisait les répulsions électrostatiques** entre micelles de caséines (processus mis en évidence par les mesures de

## CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Phase 1 : Étude à l'échelle pilote de la stabilité des protéines laitières selon le pH, la température d'acidification, la teneur en protéines, la teneur en matière grasse et le mode d'acidification

potentiel zêta). De plus, cela entraînait une solubilisation des minéraux colloïdaux, ce qui fragilisait l'édifice micellaire.

**Le deuxième facteur ayant le plus d'effet était la température.** Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette agrégation des protéines favorisée à 42°C (*versus* 8°C). Elles mettaient en cause :

- l'**équilibre** entre les mécanismes promoteurs de stabilité et ceux qui au contraire fragilisaient le système :
  - solubilité des minéraux plus importante à froid,
  - organisation variable des caséines au sein de la micelle : solubilisation de la caséine  $\beta$  plus importante à froid, répartition des charges impactée par les équilibres minéraux thermo-sensibles,
  - **force des interactions** : attractions hydrophobes inférieures à froid,
- les **cinétiques plus rapides** à « chaud » (viscosité supérieure à 8°C, théorie d'Eyring-Polanyi (Polanyi 1987)).

**Le troisième facteur ayant la plus forte influence sur la stabilité protéique était la teneur en poudre de lait écrémé.** Les formules résistaient mieux à l'acidification lorsqu'elles étaient composées à 7 % de protéines plutôt que 3,2 %. Les caséines, de par leur **pouvoir tampon**, interviendraient dans les rééquilibrages acido-basiques dus à l'acidification. De plus, avec l'enrichissement en poudre de lait, une augmentation des teneurs en minéraux était mesurée. D'après nos calculs et pour un pH donné, les micelles de caséines étaient moins déminéralisées dans des formules contenant 7 % de protéines que 3,2 %. Si une plus grande déstabilisation pouvait être attendue dans la formule plus concentrée, il ne faut pas oublier que la teneur en protéines n'avait été multipliée « que » par deux et restait donc inférieure à 10 % de la composition massique totale.

Le mode d'acidification avait moins d'incidence sur les variables mesurées que les trois premiers facteurs. Toutefois, l'utilisation d'**acide citrique semblait favorable à la stabilité** grâce à ses propriétés chélatantes du calcium. La différence par rapport à l'acide lactique ajouté chimiquement était sensible sur la mesure du potentiel zêta (plus négatif avec

## CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Phase 1 : Étude à l'échelle pilote de la stabilité des protéines laitières selon le pH, la température d'acidification, la teneur en protéines, la teneur en matière grasse et le mode d'acidification

l'acide citrique). D'autre part, la diffusion plus progressive de l'acide lactique produit par les ferments permettait de conserver un aspect plus homogène de la formule.

### La teneur en matière grasse n'avait pas de conséquence sur l'indice de stabilité.

La quantité de matière apportée (12 %) et l'impact des globules gras sur les propriétés physico-chimiques des protéines étant faibles, les mécanismes de déstabilisation étaient peu touchés par ce facteur de formulation. Toutefois, le déphasage était moins visible du fait d'une émulsion physiquement plus stable.

Pour résumer, pour conserver un système le plus stable possible, il est préférable d'acidifier peu, à froid, avec de l'acide citrique, une formule à teneur en protéines élevée (7 %). L'ajout de matière grasse peut aussi aider à conserver un aspect plus homogène de l'émulsion. Au contraire, l'édifice micellaire est plus fragilisé par un pH bas (par exemple 3,7), une température élevée (par exemple 42°C), une faible teneur en protéines (par exemple 3,2 %) et l'utilisation d'acide lactique (Figure 111). Ce sont ces conditions qui ont été utilisées lors de la phase 2 de la thèse.

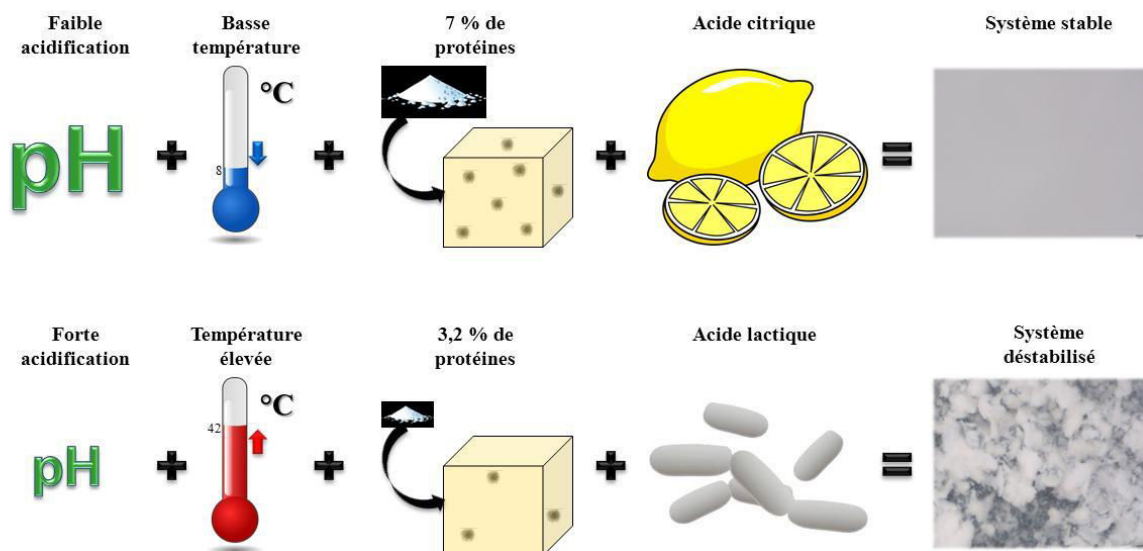


Figure 111 : Mémo des conclusions de la phase 1 issu du poster présenté à la 9<sup>th</sup> NIZO Dairy Conference (la matière grasse n'ayant pas d'impact significatif sur les variables observées)

Le traitement UHT à l'échelle pilote a déstabilisé toutes les formules acidifiées et ce dès pH 6,2 (point d'acidification le plus élevé de la gamme étudiée). Dans la phase 2,

l'acidification a donc été menée sur une gamme moins large de pH mais avec des points plus rapprochés pour pouvoir déterminer plus finement les pH de basculement stable/instable (pH-seuil).

Des **analyses complémentaires** pourraient être réalisées comme des mesures d'hydrophobicité, de viscosité ou des observations plus précises par exemple à l'aide de la microscopie à force atomique, afin d'approfondir les recherches. **Davantage de répétitions** pourraient également renforcer les tests statistiques. D'autre part, tester des **gammes** plus larges ou avec davantage de points pour les facteurs déjà étudiés pourrait également compléter les connaissances acquises en répondant à des questions comme : quelle est la concentration en protéines optimale pour avoir une formule la plus stable possible ? comment se comporte le système à pH très acide ou au contraire alcalin ? *etc.* La phase 2 de la thèse a aussi permis de préciser certains mécanismes entrant dans la stabilisation du système protéique. Enfin, l'acidification du lait par **injection de CO<sub>2</sub>** sous pression serait un moyen intéressant pour étudier l'**effet des cycles pH** sur les propriétés physicochimiques de la micelle de caséines. En effet, le pH du lait diminue puis retrouve son niveau initial après dépressurisation sans changement de force ionique ni dilution du lait (contrairement à ce qui est provoqué par l'ajout d'acide) (Guillaume *et al.* 2002 ; Klandar *et al.* 2009 ; Raouche *et al.* 2007 et 2008).

### *Phase 2 : Recherche de solutions de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique UHT*

Dans un second temps, l'objectif était de **proposer des solutions de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement UHT**, celles-ci étant nécessaires à l'innovation en industrie laitière. Plusieurs voies ont été envisagées et une partie a été testée. Les autres seront proposées en perspectives.

Les premières recherches sur la lactosylation des caséines ont permis de mettre en évidence plusieurs éléments :

1. Les micelles de caséines, contrairement aux protéines sériques, se **lactosylent difficilement**. Même sous forme de caséinates, peu de résidus lysyls semblent réagir.
2. La réaction de lactosylation s'opère plus facilement en voie « sèche » qu'en voie « humide » (**faible activité de l'eau préférable**).
3. Si le traitement thermique n'est pas trop long (pas plus de 60 min), la lactosylation peut se faire sans entraîner de **brunissement de l'échantillon** (apparition de mélanoidines dans les étapes avancées des réactions de Maillard).
4. La **substitution du lactose par du glucose**, sans alcalinisation avant prétraitement à 90°C, ne semble pas augmenter significativement le taux de glycosylation et n'améliore pas la stabilité thermique des micelles de caséines.
5. L'**enrichissement en lactose** augmente légèrement le taux de lactosylation mais diminue la stabilité thermique des protéines acidifiées, sans doute en se dégradant selon la voie de L.A.

L'approfondissement des recherches sur le prétraitement à 90°C a permis de compléter ces connaissances :

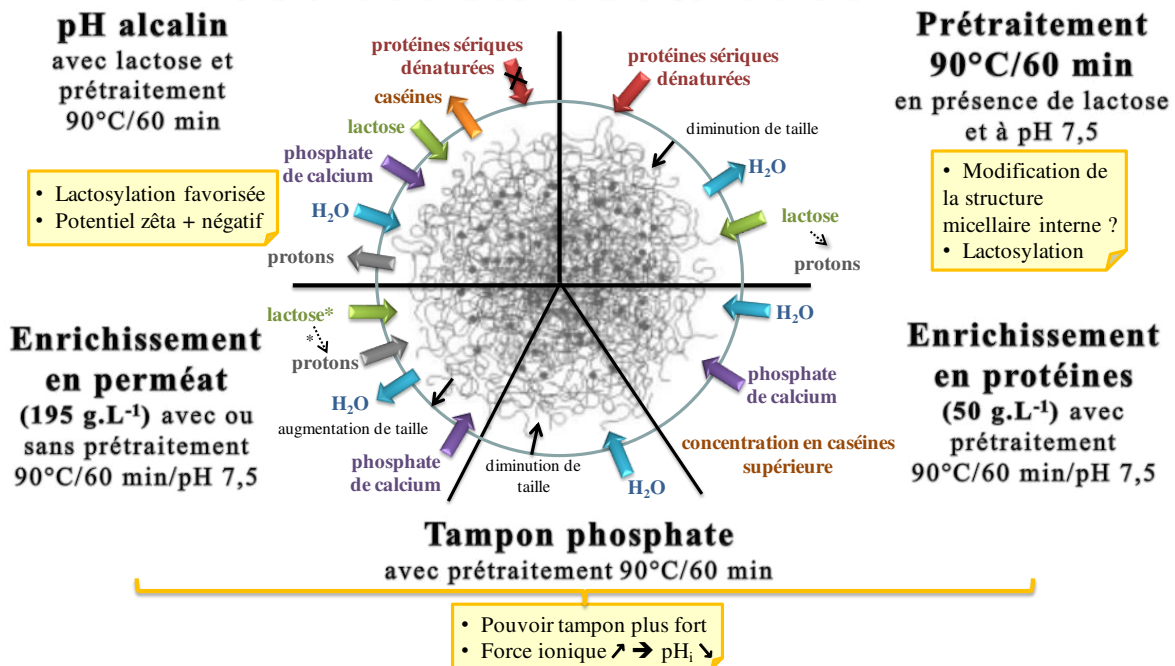
1. La stabilité thermique est plus grande quand le **pH** est **alcalin** avant prétraitement thermique (ajustement à pH 7,5 avec de l'hydroxyde de sodium concentré).
2. L'**enrichissement en perméat ou en micelles de caséines**, et donc l'augmentation de la teneur en minéraux qui implique un accroissement de la force ionique et du pouvoir tampon, améliore la stabilité thermique des protéines laitières acidifiées.

## CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

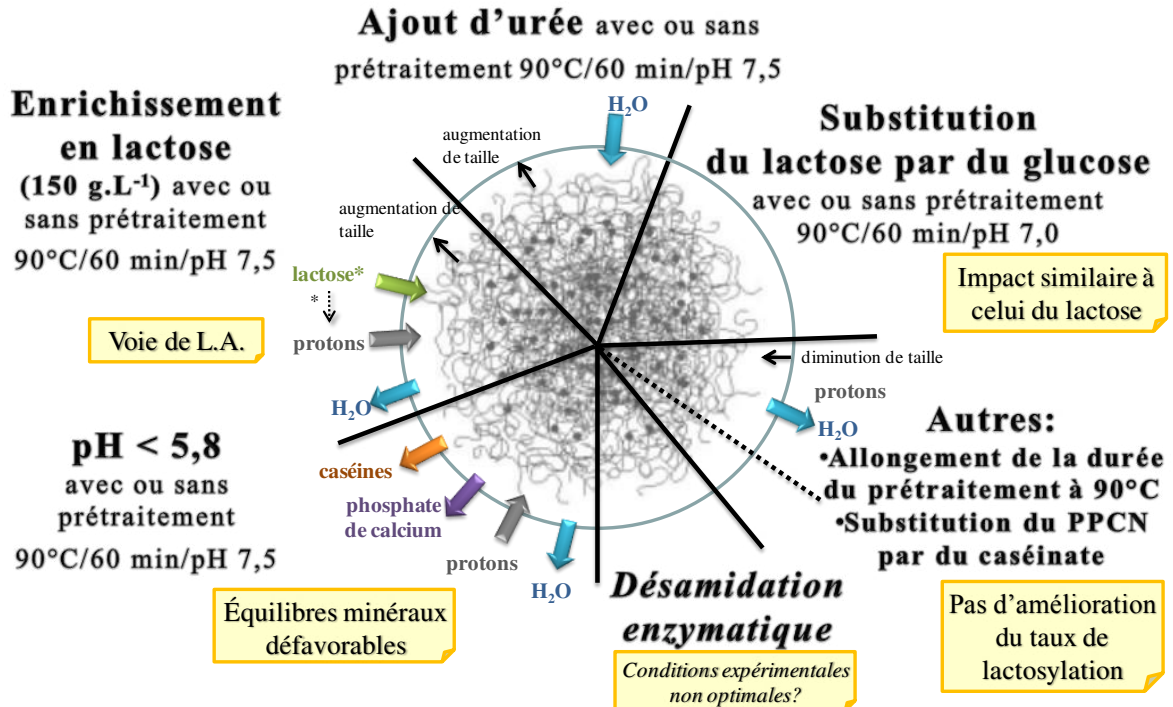
Phase 2 : Recherche de solutions de stabilisation des protéines lactières acidifiées face au traitement thermique UHT

3. Le prétraitement thermique induit généralement des diminutions d'hydratation et de taille micellaires. Il tend aussi à diminuer le pH et n'abaisse pas le potentiel zêta des micelles de caséines.
4. La formule qui permet d'atteindre le **pH le plus bas (pH 5,8)**, tout en restant stable face au traitement UHT en bain d'huile, est composée de **PPCN à 25 g.L<sup>-1</sup>** et de **perméat à 195 g.L<sup>-1</sup>** (soit trois fois la concentration d'un lait, teneur maximale testée).

## LES ESSAIS EFFICACES



## LES TESTS QUI ONT ÉCHOUÉ



## LES PISTES PROMETTEUSES

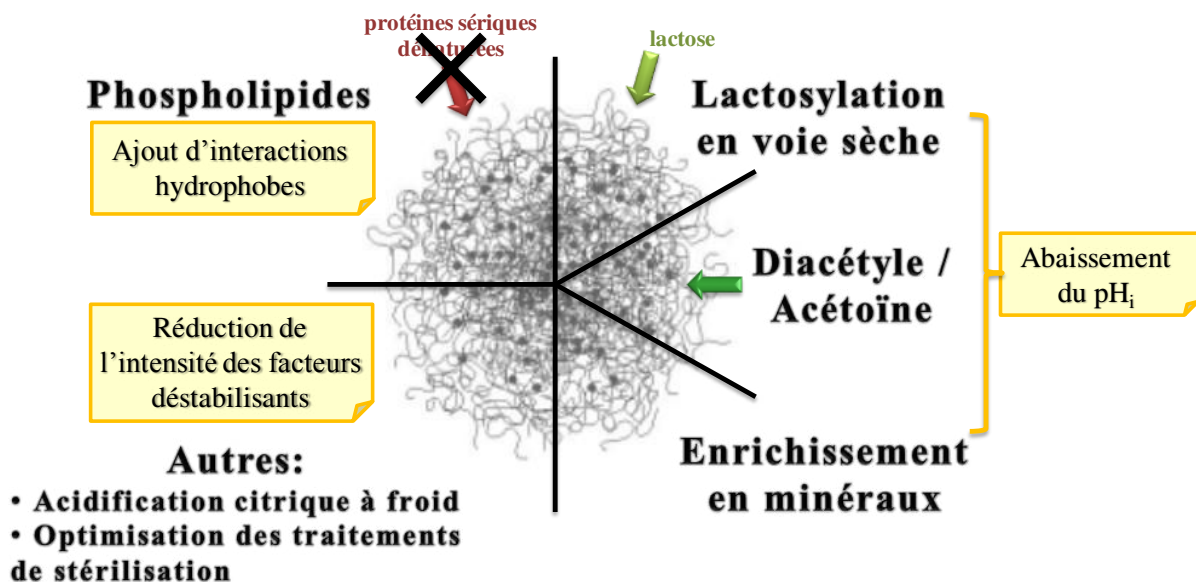


Figure 112 : Synthèse des travaux de la phase 2 et perspectives (les flèches bleues traduisent les variations de teneur en eau des culots d'ultracentrifugation, les flèches grises traduisent les variations de potentiel

## CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Phase 2 : Recherche de solutions de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique UHT

zêta, les flèches vertes et rouges traduisent la fixation de molécules sur les caséines, les flèches violette et orange traduisent des transferts, les flèches en pointillés traduisent l'acidification due à la dégradation thermique du lactose, \* signale un effet induit par le prétraitement)

La majeure partie des résultats obtenus dans la phase 2 est issue d'expérimentations réalisées sur des **milieux modèles** à base de PPCN. Cette stratégie a permis de mieux comprendre l'impact de chacun des facteurs de formulation (Figure 112) mais cette démarche s'est éloignée des conditions industrielles. De même, les essais UHT ont, pour la plupart, été réalisés en bain d'huile pour des raisons pratiques et économiques mais la représentativité de ces tests face à des traitements UHT en injection directe de vapeur est discutable. Certains essais mériteraient donc d'être répétés dans des conditions plus proches de la réalité industrielle.

De plus, il a été choisi de mener la phase 2 dans les conditions d'acidification les plus déstabilisatrices (à savoir une acidification à « chaud », avec de l'acide lactique, d'une formule ayant une teneur en protéines relativement faible). Les résultats d'amélioration de la stabilité par le prétraitement thermique, avec ajout de perméat ou de protéines, mériteraient d'être validés avec d'autres modes d'acidification (fermentation ou ajout d'acide citrique par exemple).

D'autre part, la stratégie mise en place ici consistait à **abaisser le plus possible le pH** avant déstabilisation par traitement UHT. Toutefois, une autre approche serait aussi possible et consisterait à partir d'échantillons très acides. En effet, ces systèmes à pH très bas sont également stables face au traitement UHT. La recherche de voies de stabilisation pour atteindre les pH intermédiaires sans entraîner de déstabilisation thermique aurait donc pu être réalisée en partant de pH 3,5 par exemple.

D'autres recherches et approfondissements sur les voies de stabilisation thermique pourraient également s'inspirer des résultats obtenus dans cette thèse (Figure 112) :

1. L'**enrichissement en minéraux** semble la piste la plus prometteuse et rapide à valider. Pour les prochains essais, il serait intéressant de tester l'ajout, à du lait frais écrémé, de perméat d'ultrafiltration de lait ou de sérum de fromagerie ou bien encore de mélanges commerciaux des minéraux du lait. Ensuite serait



appliqué le prétraitement thermique (90°C/60 min voire un barème optimisé) avant l'acidification à l'acide lactique puis la stérilisation UHT. Ces essais pourraient probablement être réalisés sans ajout d'hydroxyde de sodium concentré puisqu'il ne s'agit pas de favoriser la lactosylation.

2. Les analyses par spectrométrie de masse ont montré que la lactosylation était plus intense en conditions « sèches » (à savoir sur un mélange de protéines et lactose lyophilisé). D'un point de vue industriel, cette voie est probablement moins facile à mettre en œuvre car elle nécessiterait des étuves pour chauffer les poudres, à moins qu'un séchage à façon (par atomisation/sur rouleau) ne soit possible. Les prochains essais pourraient porter sur :
  - de la **poudre de lait écrémé** qui serait prétraitée à 90°C *versus* un témoin constitué de cette même poudre mais non prétraitée ;
  - le **type de poudre** de lait écrémé selon son mode de production : séchage à haute température *versus* un « témoin » obtenu par un séchage à basse température (poudres *low heat versus high heat*) ;
  - d'autres poudres de protéines, ayant des **rapports différents entre protéines et sucres** (lactose amorphe de préférence) d'une part et **protéines sériques et caséines** d'autre part, prétraitées à 90°C (ou non pour le témoin).

La **durée de prétraitement de ces poudres serait à réduire** puisque, les réactions de Maillard étant favorisées en « voie sèche », la formation de mélanoidines serait plus rapide. De même, la lactosylation étant favorisée par une faible activité de l'eau, l'étape d'**alcalinisation préalable pourrait être éliminée**.

3. La substitution du lactose par le glucose (sucre plus réducteur) s'est avérée peu concluante. Toutefois l'emploi de molécules plus réactives dans ces réactions de Maillard pourrait peut-être améliorer la glycation. Le **diacétyl**, par exemple, est une molécule aromatique très réactive vis-à-vis des acides aminés et plus électrophile que les sucres (Harden & Norris 1911 ; Riordan 1973 ; Gripon & Hofmann 1981 ; MacCarthy *et al.* 1986 ; Pripis-Nicolau *et al.* 2000 ; Marchand

*et al.* 2001 ; Liu *et al.* 2012). Il est naturellement présent dans les produits laitiers et est principalement issu de la fermentation (McCarthy *et al.* 1986). Des tests sur lait écrémé pourraient donc être envisagés. La **durée du prétraitement à 90°C devrait être réduite** (voire éliminée) afin d'éviter un brunissement du produit et **l'ajout d'hydroxyde de sodium pourrait être négligé** puisque la réaction devrait être beaucoup plus favorable. L'enrichissement en diacétyl pourrait être couplé à un ajout d'acétoïne, une molécule très proche et à la réactivité similaire (Pripis-Nicolau *et al.* 2000) afin d'augmenter la teneur en réactifs sans pour autant dépasser les limites réglementaires (soit 5 et 10 mg.kg<sup>-1</sup> respectivement dans une boisson et un aliment, pour le diacétyl ou l'acétoïne, d'après la circulaire conjointe n°001/97 relative aux additifs alimentaires publiée en 2009 par le ministère de l'agriculture et de la pêche maritime et le ministère de la santé).

4. Une modification enzymatique du pH<sub>i</sub> des caséines a également été testée. La réaction visée était une **désamidation**, conversion d'un groupement protéique amide en un groupement acide carboxyl avec libération d'un ion ammonium (Figure 113).

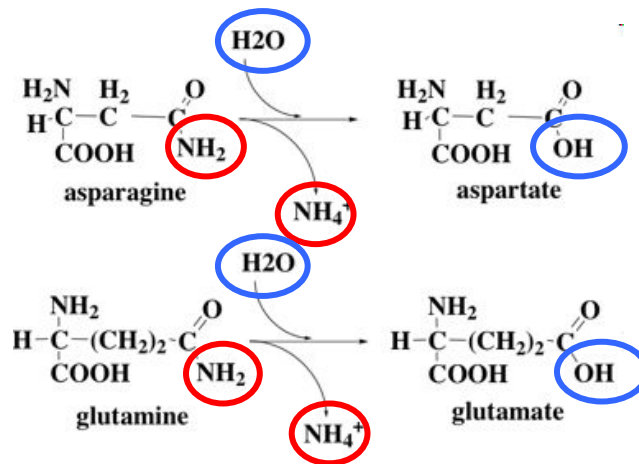


Figure 113 : Schéma réactionnel de la désamidation (rouge = charge positive et bleu = charge négative) (Jaspard 2001)

D'après De Jongh & Koppelman (2002) et Miwa *et al.* (2010), la désamidation peut diminuer le pH<sub>i</sub> des protéines mais aussi altérer leur structure secondaire ou

## CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Phase 2 : Recherche de solutions de stabilisation des protéines laitières acidifiées face au traitement thermique UHT

tertiaire, augmenter les répulsions électrostatiques et détruire les ponts salins. Elle a été étudiée sur des protéines issues de l'avoine, du blé, du soja ou du lait par exemple (Gu *et al.* 2001 ; Yong *et al.* 2004 et 2006 ; Miwa *et al.* 2010). Un brevet a même été publié sur le sujet (Timmer-Keetels *et al.* 2012). Les deux amydohydrolases choisies dans cette thèse (une glutaminase et une asparaginase) **n'ont toutefois pas amélioré la stabilité thermique** des protéines acidifiées.

Par ailleurs, plutôt que de vouloir modifier la chimie des caséines ou de leur environnement, une approche plus « physique » des interactions pourrait également donner des résultats probants face à la déstabilisation causée par des traitements thermiques UHT. Une stratégie possible consisterait à modifier les interactions entre les protéines elles-mêmes, ou entre les protéines et leur environnement. Ainsi, l'ajout de **phospholipides**, coproduits de la fabrication du beurre (Trung Le *et al.* 2011b ; Saffon *et al.* 2015), pourrait, en induisant des **interactions hydrophobes et répulsions stériques**, réduire l'agrégation des caséines et le dépliement des protéines sériques lors du traitement UHT (Crujisen 1996 ; Kasinos *et al.* 2014a et b ; Figure 114).

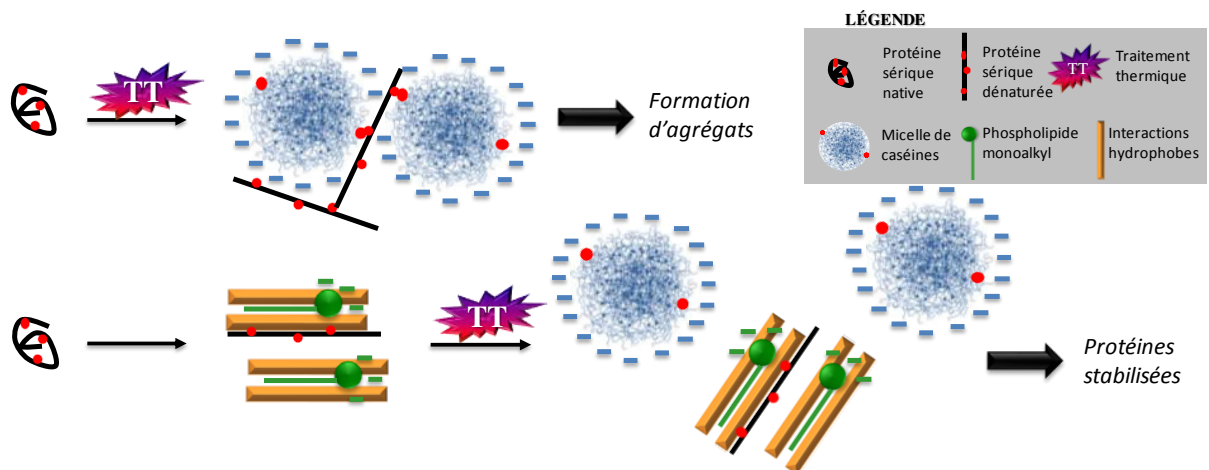


Figure 114 : Représentation schématique de l'effet du chauffage sur les micelles de caséines en présence de protéines sériques sans et avec ajout préalable de phospholipides (d'après Kasinos *et al.* 2014b)

En effet, d'après Corredig & Dalgleish (1999), ce sont les **agrégats de protéines sériques** qui agissent comme intermédiaires dans l'association thermo-induite des protéines sériques et caséines et donc dans la coagulation thermique du lait (Figure 114). À l'opposé, la formation d'un complexe entre phospholipides et protéines sériques pourrait empêcher cette coagulation (Saffon *et al.* 2015). Plusieurs études (Kasinos *et al.* 2013, 2014b ; Tran Le *et al.* 2007, 2011a) ont effectivement mis en évidence une amélioration de stabilité face au traitement thermique par ajout de phospholipides et en **absence de matière grasse** (autre que celle apportée avec lesdits phospholipides).

D'autre part, d'après Kasinos *et al.* (2013, 2014a, b et c) et McCrae & Muir (1992), la **teneur en phospholipides** et les **rapports entre les différents types de phospholipides** (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, sphingomyéline) ont un impact significatif sur l'augmentation de stabilité thermique. Des brevets ont déjà été publiés sur l'intérêt d'utiliser la lécithine laitière dans des formules soumises à un traitement thermique, par exemple dans des produits à vocation nutritionnelle (Braun 2014). Pour aller plus loin, l'emploi de **lyso-phospholipides** pourrait améliorer encore davantage la stabilisation face aux traitements thermiques étant donné leur pouvoir amphiphile supérieur à celui des dialkyl-phospholipides (Jiménez-Flores *et al.* 2005 ; Tran Le *et al.* 2007 et 2011b ; Kasinos *et al.* 2014b).

Avoir une approche plus « procédé », en travaillant sur le **couple temps - température du traitement UHT**, pourrait également constituer une piste intéressante. En effet, d'après les travaux de Corredig & Dalgleish (1996) et Anema & Li (2003), pour limiter l'agrégation protéique due aux protéines sériques dénaturées, il est préférable d'augmenter le plus rapidement possible la température. Enfin, le type d'équipement utilisé pour le traitement ultra-haute température pourrait aussi faire l'objet de recherches.

---

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

Ahmad S., Piot M., Rousseau F., Grongnet J.-F. & Gaucheron F. (2009). Physico-chemical changes in casein micelles from buffalo and cow's milk as a function of alkalisation. *Dairy Science and Technology*, **89**, 387-403.

Akillioğlu H. G. & Gökmen V. (2014). Effects of hydrophobic and ionic interactions on glycation of casein during Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**(46), 11289-11295.

Alexander M. & Dalgleish D. G. (2005). Interactions between denatured milk serum proteins and casein micelles studied by diffusing wave spectroscopy. *Langmuir*, **21**(24), 11380-11386.

Anema S. G. & Li Y. (2003). Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1640-1646

Arnold W. M., Gessner A. G. & Zimmermann U. (1993). Dielectric measurements on electro-manipulation media. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1157**(1), 32-44 May 7.

## B

Baptista J. A. & Carvalho R. C. (2004). Indirect determination of Amadori compounds in milk-based products by HPLC/ELSD/UV as an index of protein deterioration. *Food Research International*, **37**(8), 739-747.



## C

Cayot P., Courthaudon J. L. & Lorient D. (1991). Emulsifying properties of pure and mixed  $\alpha$ s1- and  $\beta$ -casein fractions: effects of chemical glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**(8), 1369-1373.

Chen Y., Liu X., Labuza T. P. & Zhou P. (2013). Effect of molecular size and charge state of reducing sugars on nonenzymatic glycation of  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Research International*, **54**(2), 1560-1568.

Chen Y., Chen X., Guo T. L. & Zhou P. (2015). Improving the thermostability of  $\beta$ -lactoglobulin via glycation: The effect of sugar structures. *Food Research International*, **69**, 106-113.

Chevalier F., Chobert J. M., Mollé D. & Haertlé T. (2001a). Maillard glycation of  $\beta$ -lactoglobulin with several sugars: comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Le Lait*, **81**(5), 651-666.

Chevalier F., Chobert J. M., Popineau Y., Nicolas M. G. & Haertlé T. (2001b). Improvement of functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*, **11**(3), 145-152.

Chobert J. M., Gaudin J. C., Dalgalarondo M. & Haertlé T. (2006). Impact of Maillard type glycation on properties of beta-lactoglobulin. *Biotechnology Advances*, **24**(6), 629-632.

Church F. C., Swaisgood H. E., Porter D. H. & Catignani G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, **66**(6), 1219-1227.

Ciron C. I. E., Gee V. L., Kelly A. L. & Auty M. A. (2012). Modifying the microstructure of low-fat yoghurt by microfluidisation of milk at different pressures to enhance rheological and sensory properties. *Food Chemistry*, **130**(3), 510-519.

Colas B., Gobin C. & Lorient D. (1988). Viscosity and voluminosity of caseins chemically modified by reductive alkylation with reducing sugars. *Journal of Dairy Research*, **55**, 539-546.

Cook E. J. & Lagace A. P. (1990). *U.S. Patent No. 4,908,154*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Corredig M. & Dalgleish D. G. (1996). Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International*, **29**(1), 49-55.

Corredig M. & Dalgleish D. G. (1999). The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *International Dairy Journal*, **9**(3), 233-236.

Corzo-Martínez M., Moreno F. J., Villamiel M. & Harte, F. M. (2010). Characterization and improvement of rheological properties of sodium caseinate glycated with galactose, lactose and dextran. *Food Hydrocolloids*, **24**(1), 88-97.

Courthaudon J.-L., Colas B. & Lorient D. (1989). Covalent binding of glycosyl residues to bovine casein: effects on solubility and viscosity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**(1), 32-36.

Coutouly A (2013). Impact couple du procédé de fabrication et de la composition en émulsifiants lipidiques et protéiques sur la structure et la texture d'un cream cheese. *Thèse*, Université de Nantes, Faculté des sciences et des techniques, France.

Creamer L.-K., Berry G.-P. & Mills O.-E. (1977). A study of the dissociation of  $\beta$ -casein from the bovine casein micelle at low temperature [milk and cream]. *New Zealand Journal of Dairy Sciences and Technology*, 58-66.

Crowley S. V., Megemont M., Gazi I., Kelly A. L., Huppertz T. & O'Mahony J. A. (2014). Heat stability of reconstituted milk protein concentrate powders. *International Dairy Journal*, **37**(2), 104-110.



.....

Crujisen J.-M. M. (1996). Physical stability of caseinate-stabilized emulsions during heating. *Thèse*. Landbouwniversiteit Wageningen, Pays-Bas.

**D**

Dalgleish D.-G. & Law A. J. R. (1988). pH-induced dissociation of bovine casein micelles : Analysis of liberated caseins. *Journal of Dairy Research*, **55**, 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**, 727-735

Dalgleish D.-G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter*, **7**(6), 2265-2272.

Dalgleish D.-G. & Corredig M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, **3**, 449-467.

Darewicz M. & Dziuba J. (2001). The effect of glycosylation on emulsifying and structural properties of bovine  $\beta$ -casein. *Food/Nahrung*, **45**(1), 15-20.

Darling D. F. & Dickson J. (1979). The determination of the zeta potential of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, **46**, 329-332.

Kastrup Dalsgaard T., Holm Nielsen J. & Bach Larsen L. (2007). Proteolysis of milk proteins lactosylated in model systems. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**(4), 404-414.

Davies D. T. & White J. C. D. (1960). The use of ultrafiltration and dialysis in isolating the aqueous phase of milk and in determining the partition of milk constituents between the aqueous and disperse phases. *Journal of Dairy Research*, **27**, 171-190.

De Jong G. A. H. & Koppelman S. J. (2002). Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *Journal of Food Science*, **67**(8), 2798-2806.

De Kort E., Minor M., Snoeren T., van Hooijdonk T. & van der Linden E. (2011). Effect of calcium chelators on physical changes in casein micelles in concentrated micellar casein solutions. *International Dairy Journal*, **21**, 907-913.

De Kruif C. G. (1997). Skim milk acidification. *Journal of Colloid and Interface Sciences*, **185**, 19-25.

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**, 36-52

De Kruif C. G. & Holt C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. Chapitre 5, (pp. 233-276). Dans *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, 3<sup>ème</sup> édition, Fox P. F., McSweeney P. L. H., ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Springer New York, États-Unis.

Dinnella C., Gargaro M. T., Rossano R. & Monteleone E. (2002). Spectrophotometric assay using o-phtaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein. *Food Chemistry*, **78**(3), 363-368.

Donato L., Alexander M. & Dalgleish D.-G (2007) Acid gelation in heated and unheated milks: interactions between serum protein complexes and the surfaces of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(10), 4160-4168.

Downey W. K. & Murphy R. F. (1970). The temperature-dependent dissociation of  $\beta$ -casein from bovine casein micelles and complexes. *Journal of Dairy Research*, **37**, 361-372.

Dumas J. B. A. (1831). Procédés de l'Analyse Organique. *Annales de Chimie et de Physique*, **247**, 198-213.

Dupont D., Johansson A., Marchin S., Rolet-Repecaud O., Marchesseau S. & Léonil J. (2011). Topography of the casein micelle surface by surface plasmon resonance (SPR) using a selection of specific monoclonal antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(15), 8375-8384.

.....

Dziuba J., Darewicz M. & Mioduszevska H. (1998). Physico-chemical characteristics of different genetic variants of bovine  $\beta$ -casein, modified covalently by glucose, galactose and lactose. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **7**(2), 166-171.

**E**

Evangelisti F., Calcagno C. & Zunin P. (1994). Relationship between blocked lysine and carbohydrate composition of infant formulas. *Journal of Food Science*, **59**, 335-337.

**F**

Famelart M.-H., Lepesant F., Gaucheron F., Le Graët Y. & Schuck, P. (1996). pH-Induced physicochemical modifications of native phosphocaseinate suspensions: Influence of aqueous phase. *Le Lait*, **76**(5), 445-460.

FAO 2013 : Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Chapitre 8 : Matière grasse. [en ligne] <http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F0i.htm> (consulté le 09 juillet 2015)

Farrell H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F. & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *Journal of Dairy Science*, **87**(6), 1641-1674.

Farrell Jr H. M., Malin E. L., Brown E. M. & Qi, P. X. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **11**(2), 135-147.

Fenaille F., Campos-Giménez E., Guy P. A., Schmitt C. & Morgan F. (2003). Monitoring of  $\beta$ -lactoglobulin dry-state glycation using various analytical techniques. *Analytical Biochemistry*, **320**(1), 144-148.

Fogliano V., Monti S. M., Visconti A., Randazzo G., Facchiano A. M., Colonna G. & Ritieni A. (1998). Identification of a  $\beta$ -lactoglobulin lactosylation site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1388**(2), 295-304.

G

Gastaldi E., Lagaude A. & Tarodo de la Fuente B. (1996). Micellar transition state in casein between pH 5.5 and 5.0. *Journal of Food Science*, **61**(1), 59-64.

Gastaldi E., Lagaude A. & Marchesseau S. (1997). Acid milk gel formation as affected by total solids content. *Journal of Food Science*, **62**(4), 671-687.

Gaucher I. (2007). Caractéristique de la micelle de caséine et stabilité des laits : de la collecte des laits crus au stockage des laits UHT. *Thèse*, Agrocampus Rennes, France.

Gaucher I., Mollé D., Gagnaire V. & Gaucheron F. (2008). Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids*, **22**(1), 130-143.

Gaucheron F., Le Graët Y., Piot M. & Boyaval E. (1996). Determination of anions of milk by ion chromatography. *Le Lait*, **76**(5), 433-443.

Gaucheron F., Mollé D. & Pannetier R. (2001). Influence of pH on the heat-induced proteolysis of casein molecules. *Journal of Dairy Research*, **68**(01), 71-80.

Gaucheron F. (2004). Minéraux et produits laitiers, *Éditions Tec & Doc*, Paris, France. 922 pp. ISBN : 2-7430-0641-2

Gripon J. C. & Hofmann T. (1981). Inactivation of aspartyl proteinases by butane-2, 3-dione. Modification of tryptophan and tyrosine residues and evidence against reaction of arginine residues. *Biochemistry Journal*, **193**, 55-65.

Gu Y. S., Matsumura Y., Yamaguchi S. & Mori T. (2001). Action of protein-glutaminase on  $\alpha$ -lactalbumin in the native and molten globule states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5999–6005.

Gu F. L., Kim J. M., Abbas S., Zhang X. M., Xia S. Q. & Chen Z. X. (2010). Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein–glucose. *Food Chemistry*, **120**(2), 505-511.

Guillaume C., Marchesseau S., Lagaude A. & Cuq J.-L. (2002). Effect of salt addition on the micellar composition of milk subjected to pH reversible CO<sub>2</sub> acidification. *Journal of Dairy Science*, **85**(9), 2098-2105.

## H

ter Haar R., Westphal Y., Wierenga P. A., Schols H. A. & Gruppen H. (2011). Cross-linking behavior and foaming properties of bovine  $\alpha$ -lactalbumin after glycation with various saccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(23), 12460-12466.

Hamada J. S. & Marshall W. E. (1989). Preparation and functional properties of enzymatically deamidated soy proteins. *Journal of Food Science*, **54**(3), 598-601.

Hamada J. S. (1994). Deamidation of food proteins to improve functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **34**, 283–292.

Harden A. & Norris D. (1911). The diacetyl reaction for proteins. *The Journal of Physiology*, **42**(4), 332-336.

Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurtner D. & Buchner J. (2005). Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, **12**(10), 842-846.

Haug I. J., Skar H. M., Vegarud G. E., Langsrud T. & Draget K. I. (2009). Electrostatic effects on  $\beta$ -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, **23**(8), 2287-2293.

Henle T., Walter H., & Klostermeyer H. (1991). Evaluation of the extent of the early Maillard-reaction in milk products by direct measurement of the Amadori-product lactuloselysine. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, **193**(2), 119-122.

Hodge J. E. (1953). Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1**(15), 928-943.

Holt C., Muir D. D. & Sweetsur A. W. (1978). Seasonal changes in the heat stability of milk from creamery silos in south-west Scotland. *Journal of Dairy Research*, **45**(02), 183-190.

Holt C., Dalgleish D.-G. & Jenness R. (1981). Calculation of the ion equilibria in milk diffusate and comparison with experiment. *Analytical Biochemistry*, **113**(1), 154-163.

Holt C. & Jenness R. (1984). Interrelationships of constituents and partition of salts in milk samples from eight species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **77**(2), 275-282.

Holt C. (1992). Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry*, **43**, 63-151.

Holt C. & Horne D. S. (1996). The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **50**(2), 85-111.

Holt C. & Timmins P. (1997). Modelling milk: the structure of calcium phosphate nanoclusters. *Rapport Annuel de l'Institut Laue-Langevin*

Holt C. (2004). An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. *European Biophysics Journal*, **33**(5), 421-434.

Horne D. S. (1986). Steric stabilization and casein micelle stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, **111**(1), 250-260.

Horne D. S. (2002). Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **7**(5), 456-461.

Huppertz T. & Fox P. F. (2006). Effect of NaCl on some physico-chemical properties of concentrated bovine milk. *International Dairy Journal*, **16**(10), 1142-1148.



I

Ichilczyk-Leone J., Amram Y., Scheind N. & Lenoir J. (1981). Le refroidissement du lait et son comportement en fromagerie. I. Incidences du refroidissement du lait sur ses caractères physico-chimiques et son comportement vis-à-vis de la présure. *Le Lait*, **401**, 7-18.

Ismail A. A., El Deeb S. A. & El Difrawi E. A. (1973). The buffering properties of cow and buffalo milks. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, **152**(1), 25-31.

J

Jean K., Renan M., Famelart M.-H. & Guyomarc'h F. (2006). Structure and surface properties of the serum heat-induced protein aggregates isolated from heated skim milk. *International Dairy Journal*, **16**, 303-315.

Jiménez-Flores R., Ye A. & Singh H. (2005). Interactions of whey proteins during heat treatment of oil-in-water emulsions formed with whey protein isolate and hydroxylated lecithin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(10), 4213-4219.

Jindal S. & Naeem A. (2013). Consequential secondary structure alterations and aggregation during prolonged casein glycation. *Journal of Fluorescence*, **23**(3), 367-374.

K

Kasinos M., Sabatino P., Vanloo B., Gevaert K., Martins J. C. & Van der Meeren P. (2013). Effect of phospholipid molecular structure on its interaction with whey proteins in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, **32**(2), 312-321.

Kasinos M., Le T. T. & Van der Meeren P. (2014a). Improved heat stability of recombined evaporated milk emulsions upon addition of phospholipid enriched dairy by-products. *Food Hydrocolloids*, **34**, 112-118.









formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose-binding site. *Journal of Dairy Science*, **80**(10), 2270-2281.

Liu D. Z., Weeks M. G., Dunstan D. E. & Martin G. J. O. (2013). Temperature-dependent dynamics of bovine casein micelles in the range 10-40°C. *Food Chemistry*, **141**, 4081-4086.

Liu J., Ru Q. & Ding Y. (2012). Glycation a promising method for food protein modification: physicochemical properties and structure, a review. *Food Research International*, **49**(1), 170-183.

Liu G. & Zhong Q. (2013). Thermal aggregation properties of whey protein glycated with various saccharides. *Food hydrocolloids*, **32**(1), 87-96.

Liu G. & Zhong Q. (2015). High temperature-short time glycation to improve heat stability of whey protein and reduce color formation. *Food Hydrocolloids*, **44**, 453-460.

Lopez C. (2005). Focus on the supramolecular structure of milk fat. *Reproduction Nutrition Development*, **45**, 497-511.

Lucey J.-A. & Singh H. (1998) Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, **30**(7), 529-542.

Lucey J.-A., Tamehana M., Singh H. & Munro P.-A. (1998). 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**(04), 555-567.

## M

Maillard L.-C. (1912). Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoïdines par voie méthodique. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, **154**, 66-68.

Marchand S., Almy J. & de Revel G. (2011). The cysteine reaction with diacetyl under wine-like conditions: proposed mechanisms for mixed origins of 2-methylthiazole, 2-methyl-

3-thiazoline, 2-methylthiazolidine, and 2, 4, 5-trimethyloxazole. *Journal of Food Science*, **76**(6), C861-C868.

Marchin S. (2007). Dynamique de la micelle de caséines : caractérisation structurale. *Thèse*, AgroCampus Rennes, France.

Marchin S., Putaux J.-L., Pignon F. & Léonil J. (2007). Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultrasmall-angle x-ray scattering. *The Journal of Chemical Physics*, **126**(4), 045101.

McCarthy P. K., Flynn A. & Fox P. F. (1986). Nutritional quality of diacetyl/urea treated caseinates. *Food Chemistry*, **21**(2), 103-114.

McCrae C. H. & Muir D. D. (1992). The influence of phospholipid classes of crude lecithin on the heat stability of recombined milk. *Milchwissenschaft*, **47**(12), 755-759.

McCrae C. H. (1999). Heat stability of milk emulsions: phospholipid–protein interactions. *International Dairy Journal*, **9**(3), 227-231.

McSweeney S. L. Healy R. & Mulvihill D. M. (2008). Effect of lecithin and monoglycerides on the heat stability of a model infant formula emulsion. *Food Hydrocolloids*, **22**(5), 888-898.

The Merck Index, 10<sup>th</sup> Ed. (1983). Edited By Martha Windholz. Merck & Co., P.O. Box 2000, Rahway, NJ 07065. pp 330-331

Metwalli A. A., Lammers W. L. & Van Boekel M. A. (1998). Formation of homocitrulline during heating of milk. *Journal of Dairy Research*, **65**(04), 579-589.

Mie G. (1976). “Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions”. Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions Transl. into ENGLISH from Ann. Phys.(Leipzig), v. 25, no. 3, 1908 p 377-445, 1, 377-445.



O

O'Brien J. & Morrissey P.-A. (1989a). The Maillard reaction in milk products. *Bulletin of the International Dairy Federation*, **238**, 53-61.

O'Brien J., Morrissey P.-A. & Ames J.-M. (1989b). Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **28**(3), 211-248.

O'Brien J. (1995). Heat-induced changes in lactose: isomerization, degradation, Maillard browning. In *Heat-induced changes in milk.*, 2<sup>nd</sup> Edition, IDF Special Issue n°9501, 134-170.

O'Brien J. (1997). Influence of pH and metal-ion concentration on the kinetics of nonenzymatic browning. *Abstract from the VI international symposium of the Maillard reaction.*

Odagiri S. & Nickerson T.-A. (1965a). Micellar changes in skim milk treated with alkali or acid. *Journal of Dairy Science*, **48**, 1157-1160.

Oliver C. M., Melton L. D. & Stanley R. A. (2006). Glycation of caseinate by fructose and fructooligosaccharides during controlled heat treatment in the 'dry' state. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**, 722-731.

Ono T. & Obata T. (1989). A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits. *Journal of Dairy Research*, **56**(03), 453-461.

Overbeek J. T. G. (1952). Electrochemistry of the double layer. *Colloid Science*, **1**, 115-193.

P

Parker T. G. & Dalgleish D.-G. (1981). Binding of calcium ions to bovine  $\beta$ -casein. *Journal of Dairy Research*, **48**(01), 71-76.

Philippe M., Le Graët Y. & Gaucheron F. (2005). The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles. *Food Chemistry*, **90**(4), 673-683.

Pierre A. & Brulé G. (1981). Mineral and protein equilibria between the colloidal and soluble phases of milk at low temperature. *Journal of Dairy Research*, **48**, 417-428.

Pierre A., Fauquant J., Le Graët Y., Piot M. & Maubois J.-L. (1992). Préparation de phosphocaséinate natif par microfiltration sur membrane. *Le Lait*, **72**, 461-474.

Pitkowski A., Nicolaï T. & Durand D. (2008). Scattering and turbidity study of the dissociation of casein by calcium chelation. *Biomacromolecules*, **9**, 369-375.

Polanyi J.C. (1987). Some concepts in reaction dynamics. *Science*, **4802**(236), 680-690.

Pripis-Nicolau L., De Revel G., Bertrand A. & Maujean A. (2000). Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(9), 3761-3766.

Pearce K. N. (1976). Moving boundary electrophoresis of native and rennet-treated casein micelles. *Journal of Dairy Research*, **43**, 27-36.

### R

Raouche S., Dobenesque M., Bot A., Lagaude A., Cuq J.-L. & Marchesseau S. (2007). Stability of casein micelle subjected to reversible CO<sub>2</sub> acidification: Impact of holding time and chilled storage. *International Dairy Journal*, **17**(8), 873-880.

Raouche S., Dobenesque M., Bot A., Cuq J.-L. & Marchesseau S. (2008). Stability of casein micelles subjected to CO<sub>2</sub> reversible acidification: Impact of carbonation temperature and chilled storage time. *International Dairy Journal*, **18**(3), 221-227.

Riordan J. F. (1973). Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione. *Biochemistry*, **12**(20), 3915-3923.







Sweetsur A. W. & Muir D. D. (1981). Role of cyanate ions in the urea-induced stabilization of the caseinate complex in skim-milk. *Journal of Dairy Research*, **48**(01), 163-166.

T

Ter Horst M. (1963). A new theory on the caseinate complex in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **17**(3), 185-192.

Thomsen M. K., Olsen K., Otte J., Sjøstrøm K., Werner B. B. & Skibsted L. H. (2012). Effect of water activity, temperature and pH on solid state lactosylation of  $\beta$ -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, **23**(1), 1-8.

Timmer-Keetels C. J. A. M., Nieuwenhuijse J. A. & Zijtveld-Van Der Wiel J. H. (2010). *U.S. Patent Application 13/395,759*.

Turner L. G., Swaisgood H. E. & Hansen A. P. (1978). Interaction of Lactose and Proteins of Skim Milk during Ultra-High-Temperature Processing 1, 2. *Journal of Dairy Science*, **61**(4), 384-392.

V

Vaia B., Smiddy M. A., Kelly A. L. & Huppertz T. (2006). Solvent-mediated disruption of bovine casein micelles at alkaline pH. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**, 8288-8293.

Van Boekel M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, **62**, 403-414.

Vanderghem C., Bodson P., Danthine S., Paquot M., Deroanne C. & Blecker C. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **14**(3), 485.

Van Dijk H. J. M. (1991). The properties of casein micelles. 4. The effects of the addition of NaCl, MgCl<sub>2</sub> or NaOH on the partition of Ca, Mg and PO<sub>4</sub> in cow's milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **45**, 241-251.

Van Dijk H. J. M. (1992). The properties of casein micelles. VI: Behaviour above pH 9, and implications for the micelle model. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **46**, 101-113

Van Hooydonk A. C. M., Hagedoorn H. G. & Boerrigter I. J. (1986). pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 1. Effect of acidification on physico-chemical properties. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **40**, 281-296.

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.

Visser J., Schaier R. W. & van Gorkom M. (1979). The role of calcium, phosphate and citrate ions in the stabilization of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, **46**, 333-335.

Visser J., Minihan A., Smits P., Tjan S. B. & Heertje I. (1986). Effects of pH and temperature on the milk salt system. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **40**, 351-368.



Walstra P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist ?. *International Dairy Journal*, **9**(3), 189-192.

Walstra P., Wouters J. T. M. & Geurts T. J. (2006). Milk: main characteristics. *Dairy Science and Technology* (2<sup>nd</sup> Ed.). Boca Raton, Taylor and Francis Group, Floride, États-Unis.

Walstra P. & Jenness R. (1984). Dairy chemistry & physics. *Dairy chemistry & physics*. John Wiley & Sons. New York, États-Unis. 467 pp. ISBN 0-471-09779-9

Wolfschoon-Pombo A. F. & Andlinger D. J. (2013). Micellar calcium in acid curd cheese with different pH values, fat and protein levels. *International Dairy Journal*, **32**(1), 20-25.

Y

Yamaguchi S. & Yokoe M. (2000). A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3337–3343.

Yamaguchi S., Jeenes D. J. & Archer D. B. (2001). Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminy residues in proteins. *European Journal of Biochemistry*, **268**(5), 1410-1421.

Yeboah F. K. & Yaylayan V. A. (2001). Analysis of glycated proteins by mass spectrometric techniques: qualitative and quantitative aspects. *Food/Nahrung*, **45**(3), 164-171.

Yong Y. H., Yamaguchi S., Gu Y. S., Mori T., Matsumura Y. (2004). Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of alpha-zein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7094–7100.

Yong Y. H., Yamaguchi S. & Matsumura Y. (2006). Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 6034–6040.

# VALORISATION DES RÉSULTATS

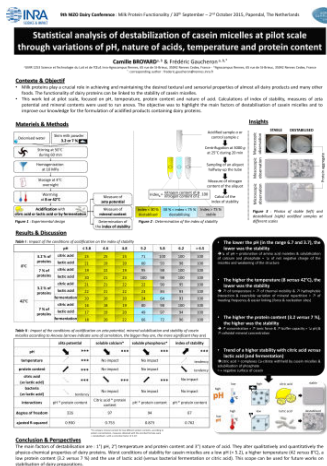
## 1. Publication



Broyard C. & Gaucheron F. (2015). Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. *Dairy Science & Technology*, **95**(6), pp 831-862

DOI : 10.1007/s13594-015-0220-y

## 2. Congrès



9<sup>th</sup> NIZO Dairy Conference – du 30 septembre au 2 octobre 2015, à Papendal (Pays-Bas) - présentation d'un poster : « Statistical analysis of destabilization of casein micelles at pilot scale through variations of pH, nature of acids, temperature and protein content » Broyard C. & Gaucheron F.

---

# FORMATIONS SUIVIES

## ***1. Première année***

1) Visite d'entreprise : découverte de la production industrielle chez Elvir. 2,5 jours (du 26 au 28 février 2013). À Condé-sur-Vire (50)

2) Management : encadrement d'équipe, communication et conduite de projet. 3 jours (du 23 au 25 avril 2013). À Rennes (35).

3) Technique : conduite des appareils à couvercle amovible (autoclave). 1 jour (02 septembre 2013). À la Boissière Ecole (78)

## ***2. Deuxième année***

1) Communication : Prise de parole en public : Optimisez vos chances à l'oral lors de vos soutenances et congrès...!, 13 heures (du 24 au 25 avril 2014). À Rennes (35).

2) Communication : Communication scientifique en anglais et français : rédaction d'articles, communications orales, 5 demi-journées (du 19 au 23 mai 2014). À Rennes (35).

3) Construction du projet professionnel : 24 H Chrono de l'Entreprenariat, 36 heures (du 5 au 6 septembre 2014). À Paris (75)

4) Statistiques : statistiques générales et utilisation de R, 1 jour (26 novembre 2014). À la Boissière École (78)

---

### **3. *Troisième année***

1) Construction du projet professionnel : Doctoriales<sup>®</sup> de Bretagne 2015, 5 jours (19 janvier 2015 puis du 16 au 19 février 2015). À Rennes (35)

2) Construction du projet professionnel : Rencontres Universités-Entreprise, 1 jour (19 mars 2015). À Paris (75)

3) Construction du projet professionnel : Visite d'un centre de recherche et d'innovation en cosmétique, 1 demi-journée (10 septembre 2015). À Chevilly-Larue (75)