



HAL
open science

Triacylglycérols de la matière grasse laitière enrichie en acides gras insaturés : structures cristallines et fonctionnalités

Simon Bugeat

► **To cite this version:**

Simon Bugeat. Triacylglycérols de la matière grasse laitière enrichie en acides gras insaturés : structures cristallines et fonctionnalités. Ingénierie des aliments. Université de Bretagne Occidentale; AGROCAMPUS OUEST, 2011. Français. NNT: . tel-02806635

HAL Id: tel-02806635

<https://hal.inrae.fr/tel-02806635v1>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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



N° ordre : 2001-12
N° Série : B-215

THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne
pour obtenir le diplôme de

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

Spécialité : Chimie Physique

Ecole Doctorale : Vie Agro Santé (VAS)

présentée par

Simon BUGEAT

Triacylglycérols de la matière grasse laitière enrichie en acides gras insaturés : structures cristallines et fonctionnalités

soutenue le 27 mai 2011 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

Docteur Marie-Caroline MICHALSKI (CR INRA)..... rapporteur
Docteur Patrice MARTIN (DR INRA)..... rapporteur
Professeur Romain JEANTET (Pr Agrocampus) membre
Docteur Jean-Blaise BRUBACH (SOLEIL) membre
Docteur Sylviane LESIEUR (DR CNRS)..... membre
Docteur Saïd BOUHALLAB (DR INRA) membre
Docteur Didier BRODIN (Elvir) membre
Monsieur Koenraad DUHEM (CNIEL) membre



REMERCIEMENTS

Cette thèse constitue un véritable travail d'équipe, dont les différents acteurs ont apporté leur brique « élémentaire » comme on dit habituellement, mais néanmoins nécessaire à l'accomplissement de ce projet. Les remerciements qui suivent sont donc pour moi l'occasion de rendre hommage à tous les gens qui, de façon ingrate, ne sont ensuite plus cités dans ce manuscrit, mais qui ont finalement tous participé à l'aboutissement de ce travail.

Je voudrais ainsi remercier en premier lieu mes directeurs de thèse, Sylviane Lesieur et Saïd Bouhallab pour leurs encouragements et leur soutien à tous les moments de ma thèse. *Merci à vous deux de m'avoir aidé à mener ce travail jusqu'au bout dans les meilleures conditions possibles.* Je tiens également à remercier Sylvie Lortal pour son accueil au STLO et pour les montagnes déplacées afin que la vie au sein du laboratoire soit des plus agréables. *Merci Sylvie pour ta gentillesse, ton sens humain et ta capacité d'écoute.*

Je remercie aussi mon encadrante Christelle Lopez pour l'entière confiance dont elle a fait preuve envers moi durant toute ma thèse et pour m'avoir fait partager sa culture lipide et son expérience de la matière grasse laitière et du synchrotron.

Je remercie bien sûr mes financeurs, l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) et le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) de m'avoir confié la responsabilité de mener ce travail, en particulier les personnes qui ont été mes interlocuteurs pendant ces trois ans : Jean-Pierre Guyonnet et Françoise Jean.

Un grand merci également aux membres du jury qui ont eu le courage et surtout la patience d'évaluer mon travail : Romain Jeantet, que je remercie d'avoir accepté d'être président du jury en période particulièrement chargée. *Merci également pour tes conseils en ce qui concerne mon projet professionnel à venir.* Merci à Marie-Caroline Michalski et Patrice Martin d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce long mémoire, dans des conditions de délais un peu justes... Merci à Didier Brodin et Koenraad Duhem pour leurs échanges fructueux en tant que représentants de l'industrie laitière, à la soutenance comme tout au long de cette thèse. Enfin, un grand merci à Jean-Blaise Brubach qui a su voir ce travail sous un angle différent et qui a décelé les apports d'une – peut-être – nouvelle méthode de lissage...

Remerciements

J'en viens ensuite à remercier mes collègues et amis du STLO, acteurs eux aussi de la réussite de ce travail : Valérie ma « grande sœur » qui a arrêté la patouille pour être à la masse (?!)... *Merci pour tout ton soutien dans les périodes les plus dures, je te dois énormément.* Marieke la reine incontestée du LatEx (*faut-il prononcer le X, redis-moi encore ?*), Claire –*la cantine instaurera-t-elle définitivement "poulpy day" pour ton anniversaire ?* – Olivia et sa bonne humeur permanente, Yohan le basque sale (*et non pas l'inverse, Grumph !*), Omar et les adeptes de la pause fruit, Fabio et ses grosses vaches et enfin François le clochard plus si clochard que ça.

Merci également à Florence pour les granulos mais également pour sa gentillesse et sa confiance. Un gros merci aussi à Marie-Hélène pour m'avoir enseigné le grand art de la rhéologie, car malgré tout ce qu'on peut penser, écraser du beurre est un art. Merci à Joelle pour ses conseils et sa relecture lors de la phase de rédaction. Merci à Stéphane et Thomas pour leurs commentaires et discussions constructives m'ayant permis de proposer les traitements de signaux de DRX novateurs. Merci à Claudie et Daniel de m'avoir enseigné le maniement de la ligne de DRX à Châtenay, ainsi que tous les réglages réalisés pour que ça marche pour le mieux. Et tant qu'on est dans les rayons X, merci aussi à Javier et toute son équipe au synchrotron SOLEIL pour les heures passées à faire les réglages si propres de leur faisceau. Enfin, un grand merci à Jessica pour l'organisation du pot de thèse et la décharge de ce stress à un moment où on en a franchement besoin.

Je n'oublie pas non plus les amis de longue date : Manu le champion du Pro Charriot 2004, Kevin qui restera le vainqueur de sa catégorie malgré tout, Ludo l'autiste qui a enfin trouvé sa voie, Seb le déchet et toute la confrérie de la Violence Humaine et de la Bâtardise (attention aux rotules). Je garde aussi une pensée de soutien pour Julien « le Président » en train de vivre la thèse à 100%, Matt'Hub (*j'espère que tu inculqueras l'esprit asymptotique à ta fille*), Bastien "Beemane" perdu dans le grand tourbillon du métro-boulot-dodo et "Poulot", *même si tu ne danses plus le mia. Merci à tous pour nos délires et votre amitié infaillible.*

Et enfin, cette thèse ne serait rien sans ma famille : "Ppu", "Mmu" et "Poupon" ; *merci d'avoir été avec moi tout du long malgré la distance.* Merci aussi à la nouvelle famille qui m'a accueilli si naturellement : Jean-Paul et Karine, Sylvie et Didier, Gwen et Aude, Tifenn la "student" et Gurvan le "teunage". Et bien sûr, je réserve l'énorme merci final à ma "bichette", Nolwenn qui aura vécu cette thèse au même titre que moi. *Je t'aime.*

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	I
TABLE DES MATIERES	I
LISTE DES ABBREVIATIONS	IX

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------------	---

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
--------------------------------	---

I. COMPOSITION DE LA PHASE AQUEUSE DU LAIT.....	9
A. <i>Les protéines</i>	9
1. Les protéines micellaires non solubles à pH 4,6	10
2. Les protéines du lactosérum	11
B. <i>Autres constituants de la phase aqueuse du lait</i>	12
II. COMPOSITION ET VARIABILITE DE LA MATIERE GRASSE LAITIERE.....	12
A. <i>Composition de la matière grasse laitière</i>	12
B. <i>Composition et structure des triacylglycérols du lait</i>	13
1. Composition en acides gras des triacylglycérols du lait	13
2. Structure chimique des triacylglycérols laitiers	16
C. <i>Synthèse et sécrétion des lipides du lait</i>	17
1. Synthèse de la matière grasse dans la cellule épithéliale mammaire	17
1.1. Synthèse <i>de novo</i> des acides gras à courtes et moyennes chaînes	17
1.2. Prélèvement des acides gras à longues chaînes dans le sang	18
1.3. Synthèse des triacylglycérols à partir du pool d'acides gras	19
2. Sécrétion des globules gras par la cellule épithéliale mammaire	20
D. <i>Composition et structure de la membrane des globules gras natifs</i>	22
1. Composition de la membrane des globules gras	22
2. Structure de la membrane des globules gras.....	23
E. <i>Qualité nutritionnelle de la matière grasse laitière</i>	24
F. <i>Variabilité et possibilités de modification de la composition de la matière grasse laitière</i>	26
III. STABILITE DES EMULSIONS.....	29
A. <i>Considérations générales sur l'instabilité des émulsions</i>	30
B. <i>La coalescence et la coalescence partielle</i>	30

Table des matières

IV.	PRINCIPES GENERAUX DE LA CRISTALLISATION	31
A.	<i>Surfusion</i>	31
B.	<i>Nucléation</i>	32
1.	Nucléation homogène primaire	33
2.	Nucléation hétérogène primaire.....	33
3.	Nucléation hétérogène secondaire.....	33
C.	<i>Croissance</i>	34
D.	<i>Mûrissement d'Ostwald</i>	34
E.	<i>Modélisation de la cristallisation</i>	35
F.	<i>Cristallisation en émulsion</i>	35
1.	Effets de la dispersion	35
2.	Effets de la taille des gouttelettes.....	36
3.	Effets de la composition de l'interface	37
V.	POLYMORPHISME ET STRUCTURES MOLECULAIRES DES TRIACYLGLYCEROLS	39
A.	<i>Organisation latérale</i>	40
1.	La forme polymorphique α	40
2.	Les formes polymorphiques β' et β	41
B.	<i>Organisation longitudinale</i>	42
C.	<i>Organisation à l'état liquide</i>	43
1.	Modèle smectique	44
2.	Modèle nématique	44
3.	Modèle discotique	45
D.	<i>Propriétés thermiques des triacylglycérols</i>	45
1.	Propriétés thermiques de acides gras.....	46
2.	Propriétés thermiques de triacylglycérols purs	47
3.	Propriétés thermiques de triacylglycérols en mélanges	48
VI.	POLYMORPHISME ET COMPORTEMENT THERMIQUE DES TRIACYLGLYCEROLS LAITIERS	49
A.	<i>Matière grasse laitière anhydre et ses fractions</i>	49
1.	Propriétés thermiques de la matière grasse laitière.....	49
2.	Le polymorphisme de la matière grasse laitière	52
3.	Taille et forme des cristaux à l'échelle microscopique	56
B.	<i>Propriétés de cristallisation de la matière grasse laitière sous forme de globules gras natifs ou d'émulsions</i>	60
1.	Polymorphisme et propriétés thermiques.....	60
2.	Propriétés des cristaux à l'échelle microscopique dans la phase dispersée d'une émulsion.....	62
C.	<i>Propriétés de cristallisation des triacylglycérols laitiers dans les matrices complexes</i>	63
VII.	LIEN ENTRE LE COMPORTEMENT DE CRISTALLISATION DE LA MATIERE GRASSE LAITIERE ET SES PROPRIETES DE TEXTURE...	65
A.	<i>Relation entre la texture et la rhéologie des matières grasses</i>	65
B.	<i>La rhéologie de la matière grasse laitière anhydre et dans les produits transformés</i>	67
C.	<i>Modification de la texture des produits laitiers par la composition de la matière grasse</i>	68

Table des matières

MATERIELS ET METHODES	71
I. MATERIELS	73
A. <i>Echantillons d'origine laitière.....</i>	<i>73</i>
1. Production des laits et des crèmes pour l'étude.....	73
2. Matières grasses extraites	74
3. Fractions de matière grasse anhydres	74
B. <i>Emulsions reconstituées.....</i>	<i>75</i>
1. Protéines utilisées pour la fabrication d'émulsions	75
2. Matières grasses utilisées pour la fabrication d'émulsions	75
C. <i>Produits transformés.....</i>	<i>76</i>
1. Beurres.....	76
2. Fromages de type raclette	77
II. METHODES.....	77
A. <i>Détermination du taux de matière grasse des crèmes et émulsions.....</i>	<i>77</i>
B. <i>Extractions de la matière grasse</i>	<i>77</i>
3. Protocole d'extraction par barattage – chauffage	77
4. Protocole d'extraction par solvant.....	78
C. <i>Fractionnement physique de la matière grasse dans l'acétone.....</i>	<i>78</i>
D. <i>Détermination de la composition en acides gras de matière grasse anhydre extraite par méthylation et analyse en chromatographie gazeuse.....</i>	<i>79</i>
E. <i>Préparation des émulsions.....</i>	<i>79</i>
F. <i>Mesure de taille des globules gras natifs et des gouttelettes d'émulsions reconstituées.....</i>	<i>80</i>
G. <i>Caractérisation du comportement thermique par microcalorimétrie différentielle</i>	<i>82</i>
1. A l'aide de la DSC Q1000.....	82
1.1. Etalonnage.....	82
1.2. Préparation des échantillons.....	82
2. A l'aide de Microcalix.....	82
2.1. Présentation de l'appareil	82
2.2. Etalonnage.....	83
2.3. Préparation des échantillons.....	83
H. <i>Caractérisation des cristaux à l'échelle moléculaire par diffraction des rayons X couplée à la microcalorimétrie différentielle</i>	<i>83</i>
1. Ligne de laboratoire du CNRS (Châtenay-Malabry, France).....	83
1.1. Présentation du montage de la ligne.....	83
1.2. Protocoles de cinétiques en température enregistrés sur les crèmes	84
1.3. Protocoles de cinétiques en température enregistrés sur les matières grasses laitières anhydres	85
2. Ligne synchrotron SWING (SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France)	86
2.1. Présentation du montage de la ligne.....	86
2.2. Protocole de cinétique en température utilisé sur les émulsions de matières grasses laitières	86

Table des matières

3.	Traitement des données de diffraction des rayons X, paramètres structuraux extraits.....	87
3.1.	Etalonnage des détecteurs en vecteur de diffusion q.....	87
3.2.	Paramètres extraits des enregistrements de diffraction des rayons X.....	87
3.3.	Lissage des données enregistrées sur la ligne de laboratoire du CNRS.....	88
I.	<i>Microscopie en lumière polarisée.....</i>	89
J.	<i>Rhéologie.....</i>	90
1.	Mesures du comportement viscoélastique des matières grasses laitières anhydres.....	90
2.	Mesure de force de compression des beurres.....	91
RESULTATS.....		93
CHAPITRE I : PROPRIETES DE CRISTALLISATION DES TRIACYLGLYCEROLS LAITIERS EN MILIEU ANHYDRE EN FONCTION DE LEUR COMPOSITION EN ACIDES GRAS.....		95
I.	INTRODUCTION.....	97
II.	ECHANTILLONS ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....	97
III.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	99
A.	<i>Composition en acides gras des différentes matières grasses étudiées.....</i>	<i>99</i>
B.	<i>Article rédigé en vue de sa soumission dans une revue scientifique à comité de lecture : approche multi-échelle des propriétés de cristallisation des triacylglycérols laitiers anhydres en fonction de leur composition en acides gras.....</i>	<i>101</i>
C.	<i>Propriétés thermiques des triacylglycérols laitiers anhydres et détermination du taux de matière grasse solide en fonction de la température.....</i>	<i>136</i>
1.	Détermination des variations d'enthalpies spécifiques des fractions de triacylglycérols laitiers.....	136
2.	Calcul du taux de matière grasse solide en fonction de la température.....	139
IV.	CONCLUSION.....	143
CHAPITRE II : PROPRIETES DE CRISTALLISATION DES TRIACYLGLYCEROLS EN EMULSION EN FONCTION DE LEUR COMPOSITION EN ACIDES GRAS.....		145
I.	INTRODUCTION.....	147
II.	ECHANTILLONS ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....	147
A.	<i>Echantillons de crèmes.....</i>	<i>148</i>
B.	<i>Emulsions reconstituées à taille de gouttelettes contrôlée.....</i>	<i>150</i>
III.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	150
C.	<i>Propriétés de cristallisation des triacylglycérols dans les globules gras natifs en fonction de leur composition en acides gras.....</i>	<i>150</i>

Table des matières

1.	Propriétés de cristallisation au cours d'un cycle de refroidissement-chauffage à 0,5°C/min.....	150
1.1.	Caractérisation des propriétés thermiques et identification des structures cristallines des triacylglycérols dans les crèmes au cours du refroidissement	150
1.2.	Lien entre la composition en acides gras et les structures cristallines identifiées à -7°C après le refroidissement	156
1.3.	Propriétés thermiques et identification des structures cristallines au cours du chauffage	163
2.	Variétés cristallines et comportement de fusion des triacylglycérols après stockage t>48h à 4°C.....	169
2.1.	Identification des structures cristallines à 4°C.....	169
2.2.	Propriétés thermiques au cours du chauffage	177
2.3.	identification des structures cristallines au cours du chauffage	181
3.	Propriétés de cristallisation à la suite d'une trempe à -7°C.....	183
4.	Conclusion.....	188
D.	<i>Article accepté pour publication dans Food Research International : L'enrichissement en acides gras insaturés et la taille des gouttelettes d'émulsion affectent le comportement de cristallisation des triacylglycérols laitiers après stockage à 4°C.....</i>	<i>189</i>
IV.	CONCLUSION.....	224

CHAPITRE III : PROPRIETES DE CRISTALLISATION DES FRACTIONS DE MATIERE GRASSE LAITIERE ANHYDRE

SEPAREES A 4°C EN RELATION AVEC LEUR COMPOSITION EN ACIDES GRAS..... 225

I.	INTRODUCTION.....	227
II.	ECHANTILLONS ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....	227
III.	RESULTATS ET DISCUSSION	229
A.	<i>Composition en acides gras des fractions séparées à 4°C.....</i>	<i>229</i>
B.	<i>Propriétés de cristallisation des triacylglycérols fractionnés à 4°C au cours d'un refroidissement à vitesse rapide.....</i>	<i>232</i>
1.	Propriétés thermiques étudiées au cours d'un refroidissement à 2°C/min.....	232
2.	Comportement structural des matières grasses anhydres B8 et B10 au cours d'un refroidissement à 3°C/min.....	238
3.	Comportement structural des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours d'un refroidissement à 3°C/min	240
4.	Comportement structural des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours d'un refroidissement à 3°C/min	245
5.	Discussion	251
C.	<i>Propriétés de fusion des triacylglycérols fractionnés à 4°C au cours d'un chauffage à vitesse rapide ..</i>	<i>257</i>
1.	Propriétés thermiques étudiées au cours d'un chauffage à 2°C/min	257
2.	Comportement structural des matières grasses anhydres B8 et B10 au cours d'un chauffage à 3°C/min ..	262
3.	Comportement structural des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours d'un chauffage à 3°C/min	265

Table des matières

4.	Comportement structural des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours d'un chauffage à 3°C/min	270	
5.	Discussion	276	
IV.	CONCLUSION.....	280	
CHAPITRE IV : PROPRIETES DE CRISTALLISATION DES TRIACYLGLYCEROLS DANS DES PRODUITS TRANSFORMES, RELATION AVEC LEURS PROPRIETES FONCTIONNELLES			283
I.	INTRODUCTION	285	
II.	ECHANTILLONS ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....	285	
III.	RESULTATS.....	286	
A.	<i>Approche multi-échelle des propriétés de cristallisation des triacylglycérols dans les beurres en lien avec leur dureté</i>	286	
1.	Composition en acides gras des beurres étudiés	286	
2.	Propriétés thermiques des beurres	290	
2.1.	Caractérisation thermique des beurres au cours du chauffage	290	
2.2.	Détermination du taux de matière grasse solide dans les beurres à 4°C et son évolution au cours du chauffage.....	295	
3.	Caractérisation cristallographique des beurres	299	
3.1.	Identification des structures cristallines formées par les triacylglycérols dans les beurres à 4°C après 54-62 jours de stockage à 4°C	300	
3.2.	Identification des structures cristallines formées par les triacylglycérols dans les beurres au cours du chauffage de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après 54-62 jours de stockage à 4°C.....	302	
4.	Caractérisation rhéologique des beurres étudiés	306	
B.	<i>Fromage type raclette</i>	309	
1.	Composition en acides gras des fromages étudiés	309	
2.	Propriétés thermiques des fromages.....	310	
2.1.	Caractérisation thermique des fromages au chauffage	310	
2.2.	Détermination du taux de matière grasse solide dans les fromages à 4°C et son évolution au cours du chauffage.....	313	
3.	Caractérisation cristallographique des fromages.....	316	
3.1.	Identification des structures cristallines formées par les triacylglycérols dans les fromages à 4°C après 14-21 jours de stockage à 4°C.....	316	
3.2.	Identification des structures cristallines formées par les triacylglycérols dans les fromages au cours du chauffage de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après 14 jours de stockage à 4°C.....	318	
IV.	DISCUSSION :	321	
V.	CONCLUSION :	325	
CONCLUSION GENERALE			327

Table des matières

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	335
ANNEXES.....	I
ANNEXE I : METHODES DE CARACTERISATION DU POLYMORPHISME DES TRIACYLGLYCEROLS.....	I
A. <i>Calorimétrie différentielle</i>	<i>i</i>
1. Principe général	<i>i</i>
2. Détermination du taux de matière grasse solide	<i>iii</i>
B. <i>Diffraction des rayons X</i>	<i>iv</i>
1. Principe général	<i>iv</i>
2. Signatures DRX des structures transversales adoptées par les triacylglycérols.....	<i>vi</i>
3. Signatures DRX des structures longitudinales adoptées par les triacylglycérols	<i>vii</i>
C. <i>Autres techniques</i>	<i>ix</i>
1. Diffraction de neutrons.....	<i>ix</i>
2. Spectroscopie infra-rouge.....	<i>ix</i>
3. Résonnance magnétique nucléaire.....	<i>ix</i>
ANNEXE II : COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES MATIERES GRASSES UTILISEES	XI
ANNEXE III : DIAGRAMMES DE DIFFRACTION DES RAYONS X ENREGISTRES AU REFROIDISSEMENT DES CREMES AUTRES QUE B8 ET B10	XIII
ANNEXE IV : DIAGRAMMES DE DIFFRACTION DES RAYONS X ENREGISTRES AU CHAUFFAGE DES CREMES AUTRES QUE B8 ET B10.	XVII
ANNEXE V : DIAGRAMMES DE DIFFRACTION DES RAYONS X ENREGISTRES AU CHAUFFAGE DEPUIS 4°C DES CREMES AUTRES QUE B8 ET B10	XX
ANNEXE VI : DIAGRAMMES DE DIFFRACTION DES RAYONS X ENREGISTRES AU COURS DES 20 MINUTES DE TREMPE A -7°C DES CREMES AUTRES QUE B8 ET B10	XXIV
ANNEXE VII : POSTERS DE PRESENTATION DE RESULTATS PRESENTES A DIVERS CONGRES	XXVIII
<i>Résumé de la thèse</i>	<i>xxxii</i>
<i>Absctract</i>	<i>xxxii</i>

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACP : analyse en composante principale

AGILAIT : programme de l'Agence Nationale pour la Recherche portant sur l'étude des structures, stabilités à l'oxydation, propriétés et bioaccessibilité de la matière grasse de laits riches en acides gras insaturés.

DRX : diffraction des rayons X

DRXT : diffraction des rayons X résolue en temps

LURE : laboratoire pour l'utilisation du rayonnement électromagnétique

MCD : microcalorimétrie différentielle

RMN : résonance magnétique nucléaire

SAXS : diffusion des rayons X aux petits angles (small angles X-ray scattering)

SOLEIL : source optimisée de lumière d'énergie intermédiaire du LURE

WAXS : diffusion des rayons X aux grands angles (wide angles X-ray scattering)

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Introduction générale

La santé représente une des problématiques majeures du 21^{ème} siècle. Après avoir connu des problèmes de production, la société actuelle rencontre des problèmes de qualité (INCA 2, Obépi-Roche, Agrimonde). En particulier dans le domaine agro-alimentaire, le nombre croissant d'études sur les effets positifs ou négatifs sur la santé d'ingrédients ou molécules alimentaires (protéines, vitamines, sucres ou matière grasse...) rend compte de cette tendance. Ceci provient directement de la demande des consommateurs en faveur d'une meilleure transparence sur la composition et la manière dont sont produits les aliments qu'ils consomment.

Apportant 39% des apports énergétiques totaux (France, INCA 2), les matières grasses tiennent une place particulière dans l'esprit des consommateurs. Souvent associées à la prise de poids dans les pays occidentaux et à l'augmentation du taux de cholestérol et donc du risque de maladies cardio-vasculaires, elles sont pourtant nécessaires à une alimentation équilibrée. Les acides gras saturés et les acides gras *trans*, en particulier, ont une mauvaise réputation auprès du grand public pour leurs nombreux effets néfastes plus ou moins avérés. A l'inverse, les bénéfiques pour la santé humaine des acides gras insaturés, et en particulier les acides gras omega 6, omega 3 et linoléiques conjugués (CLA) ont largement été diffusés et ont trouvé un impact positif auprès des consommateurs. La tendance actuelle va donc dans le sens d'une diminution de la consommation d'aliments riches en matières grasses dites saturées, remplacées par des matières grasses insaturés.

Les matières grasses animales sont riches en acides gras saturés, au contraire des matières grasses végétales. Elles ne jouissent donc pas d'une bonne image auprès des consommateurs, bien que le discours des nutritionnistes change et tend à montrer que certains acides gras saturés (C18:0 par exemple) seraient neutres voire même bénéfiques pour la santé humaine. En fait, c'est essentiellement l'excès de consommation des acides laurique (C12:0), myristique (C14:0) et palmitique (C16:0) qui serait athérogène (Legrand, 2010). Parmi les matières grasses animales, le lait et les produits laitiers représente une des sources majeures de lipides dans notre alimentation. Mais avec un taux en acides gras saturés souvent supérieur à 65%, la matière grasse laitière n'a pas toujours bonne presse auprès du grand public. Cependant, on tend à montrer aujourd'hui que l'effet délétère que peuvent avoir ces acides gras a plutôt une origine quantitative que qualitative (Legrand, 2010).

La composition de la matière grasse laitière lui confère des propriétés physiques uniques, notamment une large plage de température de fusion allant de -40°C à +40°C sur laquelle elle est en partie liquide et en partie cristallisée. Ces propriétés de cristallisation de la matière grasse laitière sont depuis longtemps utilisées pour fabriquer des produits tels que le

Introduction générale

beurre ou la crème chantilly, dont la texture est unique et découle directement de ces propriétés. La composition en acides gras de la matière grasse laitière peut cependant être modifiée pour répondre aux exigences des consommateurs à savoir réduire la teneur en acides gras saturés, au profit des acides gras insaturés. Cependant, la modification de la composition en acides gras insaturés pourrait modifier les propriétés physiques de cristallisation de cette matière grasse et changer les propriétés de texture des produits. C'est dans ce cadre que se positionne cette thèse, ayant pour objectif spécifique d'étudier les propriétés physiques à différents niveaux d'échelle et fonctionnalités notamment en tant qu'agent de texture des matières grasses laitières enrichies en acides gras insaturés. Ces propriétés physiques n'ont jamais été étudiées dans des matières grasses laitières aussi riches en acides gras insaturés. Cette thèse se positionne dans un projet de recherche plus global : le projet AGILAIT (ANR-06-PNRA-012). Ce projet soutenu par le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL), a pour objectif d'étudier les structures, la stabilité à l'oxydation et la bioaccessibilité de la matière grasse de laits riches enrichis en acides gras insaturés.

Dans ce manuscrit, j'ai choisi de présenter en premier lieu une synthèse bibliographique dressant un état des connaissances sur la composition et les propriétés de cristallisation de la matière grasse laitière. Ensuite, une partie décrivant les matériels et méthodes utilisés pendant cette thèse est proposée. Enfin, les résultats que nous avons obtenus sont détaillés sous la forme de quatre chapitres abordant la matière grasse laitière sous des formes de complexité croissante du modèle au réel : de sa forme anhydre à son état dispersé dans l'aliment. Le premier chapitre présente les résultats de caractérisation multi-échelles (moléculaire, microscopique et macroscopique) de matières grasses laitières anhydres de compositions en acides gras modifiées en termes de propriétés de cristallisation. Ce premier chapitre dresse également le bilan sur certains concepts et méthodes mis en place et utilisés dans cette thèse. Le deuxième chapitre s'intéresse aux propriétés de cristallisation de matières grasses laitières enrichies en acides gras insaturés dans un état émulsionné, c'est-à-dire sous forme de gouttelettes de matière grasse dans une phase aqueuse. En effet, dans le lait natif et dans de nombreux produits transformés, la matière grasse se trouve sous une forme émulsionnée, susceptible de modifier les propriétés de cristallisation de la matière grasse. Le troisième chapitre apporte des réponses complémentaires à des questions découlant des résultats obtenus dans le deuxième chapitre et qui concernent la structure moléculaire des matières grasses enrichies en acides gras insaturés étudiées. Enfin, le quatrième et dernier chapitre s'intéresse aux propriétés de cristallisation de la matière grasse laitière en fonction de

sa composition dans deux produits transformés : le beurre et le fromage de type raclette. Ce dernier chapitre aborde la problématique sous un angle plus appliqué que les autres chapitres.

La **Figure I-1** présente l'approche générale adoptée dans cette thèse et les différents aspects étudiés de la cristallisation des triacylglycérols laitiers dans leurs différents états : anhydre, en émulsion et dans des produits complexes.

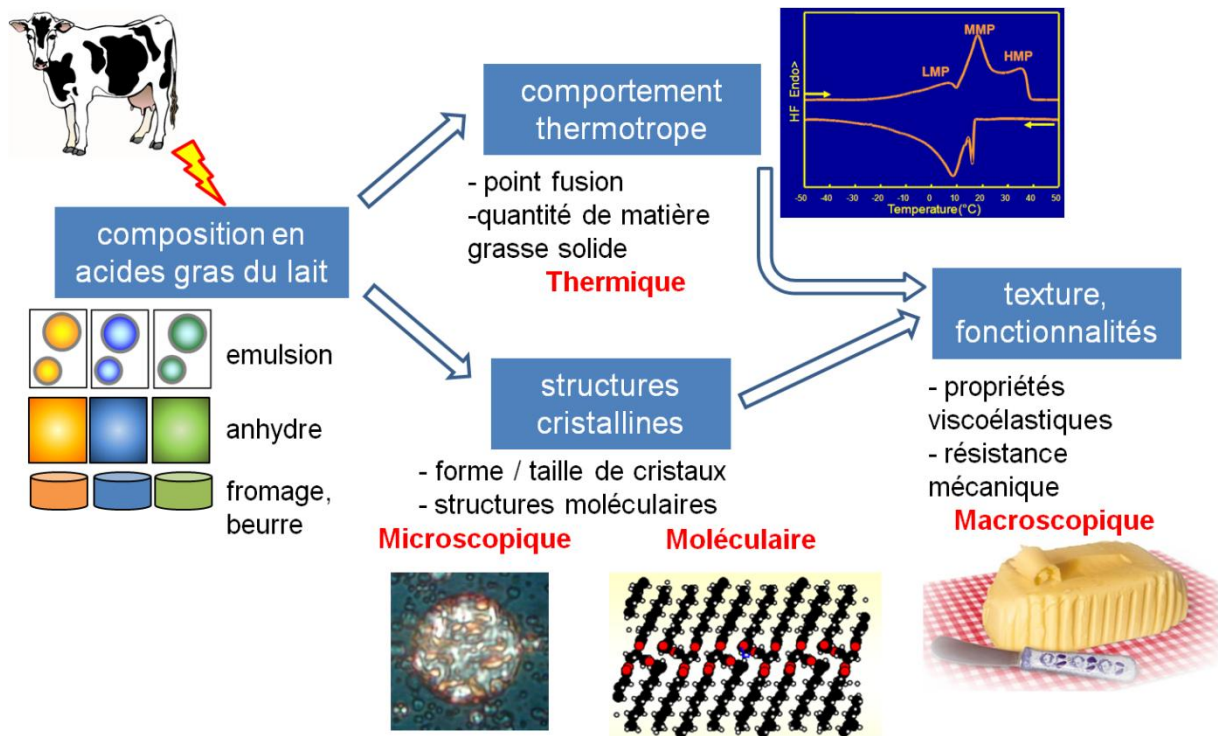


Figure I-1 : approche globale de la thèse. Etude des différents aspects de la cristallisation des triacylglycérols laitiers en fonction de leur composition en acides gras : de l'échelle moléculaire à macroscopique.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse bibliographique

Le lait est un fluide biologique sécrété par les femelles mammifères pour nourrir leur petit au début de sa vie pendant la période de lactation et avant le sevrage. Nous nous sommes intéressés au lait de vache, principale production au niveau mondial (85% du volume total, données CNIEL-AFIL), aussi, le mot lait sera employé dans la suite de ce manuscrit pour lait de vache. Le lait est une émulsion naturelle de type huile dans eau, comprenant une phase aqueuse et une phase grasse stabilisée par une interface. La phase aqueuse comprend un certain nombre de composés dissous (sels, lactose, protéines) et colloïdaux (micelles de caséines). La phase lipidique ou matière grasse laitière est dispersée sous forme de gouttelettes d'émulsion appelées globules gras. La composition globale du lait est relativement bien connue et a été résumée dans plusieurs ouvrages (Mulder et Walstra, 1974 ; Walstra et Jenness, 1984 ; Jensen et Newberg, 1995 ; Alais et Linden, 1997 ; Walstra *et al.*, 2006 ; McGibbon et Taylor, 2006). Le diagramme présenté en **Figure B-1** présente la composition globale du lait de vache. La structure et composition de la matière grasse seront détaillées dans leur paragraphe respectif de manière plus approfondie.

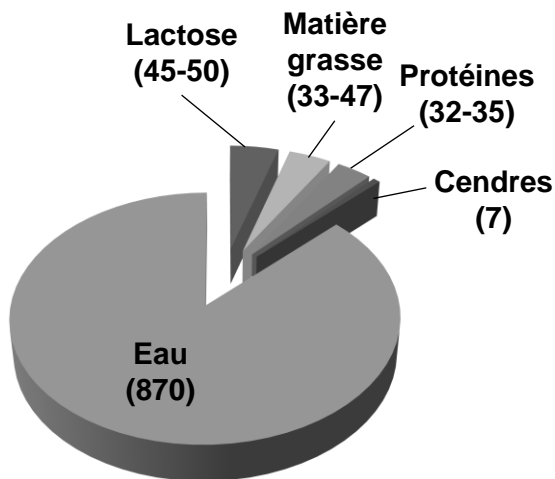


Figure B-1 : composition globale du lait de vache (en g/L de lait) (d'après Walstra et Jenness, 1984 ; Alais et Linden, 1997 ; Walstra *et al.*, 2006).

I. COMPOSITION DE LA PHASE AQUEUSE DU LAIT

A. Les protéines

Les protéines du lait se décomposent en deux familles : i) les protéines non solubles à pH 4,6 que sont les caséines, ii) les protéines sériques, aussi appelées protéines du lactosérum, qui à l'inverse, ne précipitent pas à pH à 4,6 (**Figure B-2**).

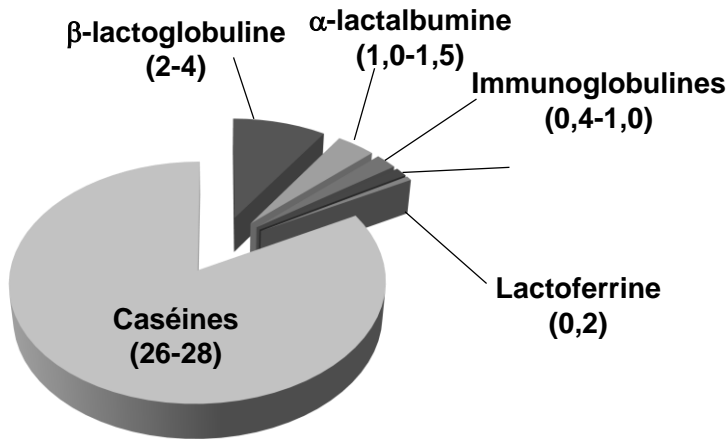


Figure B-2 : composition protéique du lait de vache (en g/L de lait) (d'après Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989 ; Cayot et Lorient, 1998).

1. Les protéines micellaires non solubles à pH 4,6

Les caséines, qui constituent 80% des protéines du lait, sont associées sous forme micellaire dans la phase aqueuse du lait. Elles sont au nombre de 4 types : α_{s1} , β , κ et α_{s2} par ordre de concentration respective d'approximativement : 10 g/L, 9,3 g/L, 3,3 g/L, 2,6 g/L (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989).

Dans le lait, ces 4 types de protéines sont les monomères qui s'associent naturellement à hauteur de 10^4 monomères pour former des micelles de diamètre 20-600 nm avec un diamètre moyen de 250 nm environ (Holt, 1992). La structure de ces micelles a été étudiée par plusieurs auteurs qui ont proposé 3 types de modèles structuraux : les modèles de cœur-enveloppe, les modèles de structure ouverte et les modèles de sub-micelles. Une analyse critique des modèles de micelles de caséines est détaillée dans la revue de Horne (2006). Les modèles sub-micellaire et de structure ouverte sont les plus en accord avec des résultats expérimentaux pour caractériser la structure de la micelle de caséines. La stabilité colloïdale des micelles de caséine est assurée essentiellement par la présence du phosphate de calcium, à raison de 8 g pour 100 g de caséines, qui assure le pontage des unités sous-micellaires.

Le modèle sub-micellaire présente la micelle de caséine comme un assemblage d'unités sous-micellaire de 10-20 nm constituées de caséines α_s et β , d'autres contenant en plus de la caséine κ . Ces sub-micelles plus riches en caséines κ seraient localisées à la surface des micelles. Cependant, Walstra (1999) remet ce modèle en question en présentant le calcium colloïdal comme partie intégrante des sub-micelles sous forme de granule, rendant moins évidente l'organisation en sous-unités bien distinctes (**Figure B-3-A**).

Le modèle de structure ouverte présente la micelle de caséine comme un réseau protéique ouvert. Le modèle spécifique de structure ouverte « dual-binding » proposé par Horne (1998), et qui semble le plus vraisemblable d'après les observations structurales actuelles, fait état d'un équilibre entre des interactions hydrophobes et électrostatiques gouvernant la croissance des micelles. Le phosphate de calcium colloïdal constituerait le point d'ancrage des différentes caséines, hormis la caséine κ qui agirait comme agent de terminaison de croissance et formerait ainsi une couche chevelue en périphérie des micelles (**Figure B-3-B**).

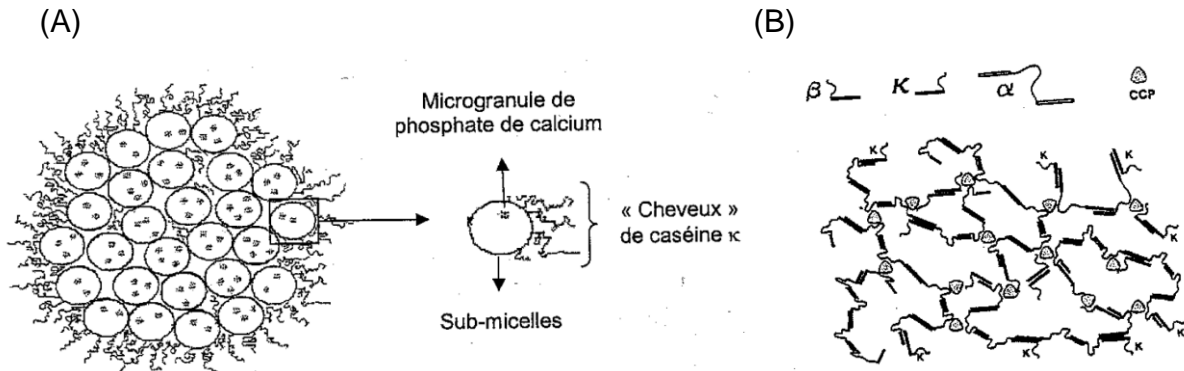


Figure B-3 : modèles schématiques principaux de micelle de caséine : modèle de sub-micelles (A, d'après Walstra, 1999) et modèle de structure ouverte « dual-binding », les segments représentent les domaines hydrophobes des caséines (B, d'après Horne, 1998).

Les caséinates industriels utilisés comme surfactant pour stabiliser des émulsions ou autres ne sont pas les caséines natives. Ces caséinates sont fabriqués à partir de micelles de caséines précipitées à pH 4,6, c'est-à-dire pour lesquelles le phosphate de calcium colloïdal est retiré, puis sont ressolubilisées à pH 7 à l'aide d'hydroxyde de calcium, de sodium ou encore de potassium. Dans cette thèse en particulier, nous avons utilisé des caséinates de sodium en particulier (voir plus loin).

2. Les protéines du lactosérum

Le groupe des protéines sériques, qui constituent 20% des protéines du lait, comporte plusieurs protéines, dont deux sont considérées comme majeures : la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine. Les protéines dites mineures du lactosérum sont les immunoglobulines, la sérum albumine bovine, la lactoferrine et une population de petites protéines sériques dérivées de l'hydrolyse de caséines, appelées caséines κ , et du sang (facteur de croissance). Nous ne détaillerons pas plus ici les différentes propriétés de ces protéines car elles n'ont pas été utilisées dans la thèse, contrairement aux caséines (Fox et McSweeney, 2003).

B. Autres constituants de la phase aqueuse du lait

Le sucre principal du lait est le lactose, un disaccharide composé d'un assemblage de D-glucose et D-galactose, liés par une liaison covalente β -1,4. Il est présent dans le lait à une concentration de 45-50 g/L environ (Walstra et Jenness, 1984 ; Alais et Linden, 1997 ; Walstra *et al.*, 2006).

La **Figure B-4** présente la composition des minéraux du lait, qui sont présents en globalité à hauteur de 7% environ. Une partie de ces minéraux est sous forme dissoute, alors qu'une partie du phosphate de calcium est sous forme colloïdale associée aux micelles de caséines (Walstra et Jenness, 1984 ; Alais et Linden, 1997 ; Walstra *et al.*, 2006).

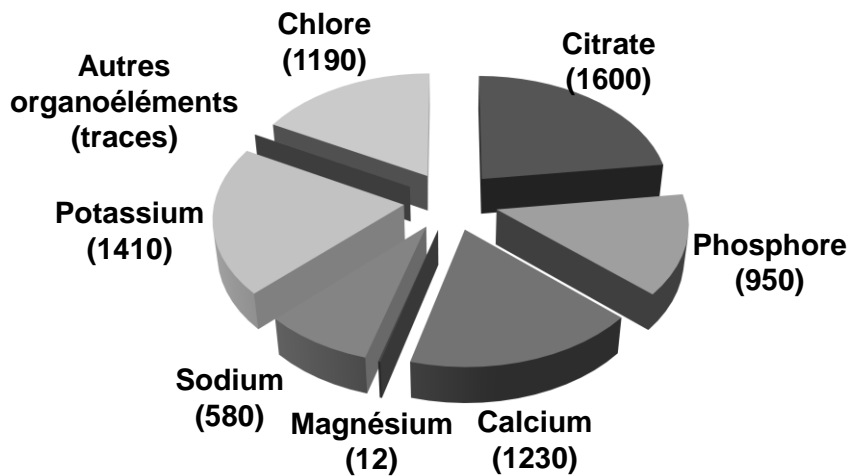


Figure B-4 : composition minérale du lait de vache (en mg/L de lait) (d'après Walstra et Jenness, 1984 ; Alais et Linden, 1997 ; Walstra *et al.*, 2006).

L'équilibre de dissociation du phosphate de calcium dans le lait est lié très étroitement avec la stabilité des micelles de caséines (Mekmene *et al.*, 2010).

II. COMPOSITION ET VARIABILITE DE LA MATIERE GRASSE LAITIERE

A. Composition de la matière grasse laitière

Les globules gras du lait de vache possèdent une taille allant de 0,02 à 20 μ m avec un diamètre moyen de 2-5 μ m (Mulder et Walstra, 1974 ; Michalski *et al.*, 2002 ; Huppertz et Kelly, 2006). Ces gouttelettes lipidiques sont constituées d'une membrane complexe constituée de phospholipides et sphingolipides (0,6%), diglycérides (0,36%), cholestérol (0,31%), d'acides gras (0,027%) et de monoglycérides (0,027%) (Christie, 1995) et d'un cœur

de triacylglycérols représentant 97-98% de la matière grasse laitière totale (**Figure B-5**, Mulder et Walstra, 1974 ; Jensen, 2002 ; McGibbon et Taylor, 2006).

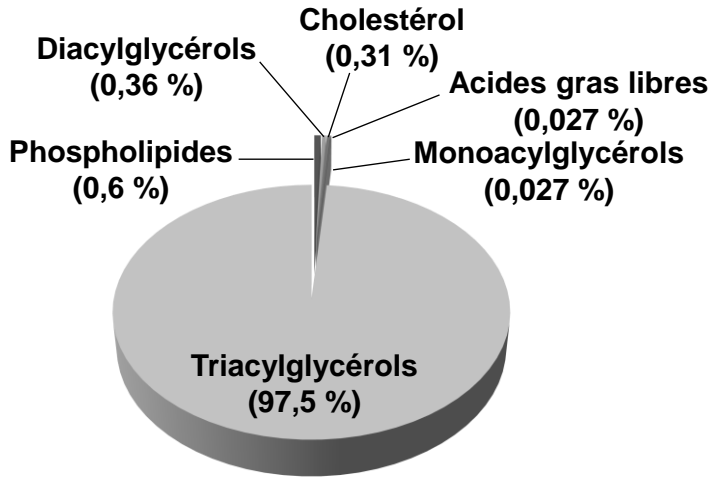


Figure B-5 : composition globale des lipides du lait (en p/p, d'après Christie, 1995 ; Jensen, 2002 ; McGibbon et Taylor, 2006).

Les triacylglycérols sont donc les constituants majeurs de la matière grasse laitière. Ils constituent une source alimentaire très énergétique (de l'ordre de 37 kJ/g, soit 8.9 kcal/g) pour le développement du veau (Walstra et Jenness, 1984 ; McGibbon et Taylor, 2006). Les triacylglycérols sont des triesters d'acides gras sur une molécule de glycérol qui présente au niveau du carbone central un site chiral (**Figure B-6**).

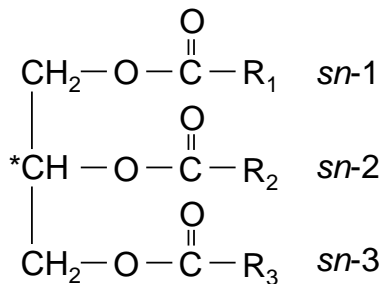


Figure B-6 : formule générale d'un triacylglycérol. R1, R2 et R3 représentent des chaînes aliphatiques d'acides gras. * : centre de chiralité.

B. Composition et structure des triacylglycérols du lait

1. Composition en acides gras des triacylglycérols du lait

La matière grasse du lait est une des matières grasses naturelles les plus complexes de par la grande diversité d'acides gras qui la composent, que ce soit en longueur de chaîne,

Synthèse bibliographique

ou en degré d'insaturation. Plus de 400 acides gras ont été identifiés dans la matière grasse laitière (**Tableau B-1**, Jensen, 2002 ; McGibbon et Taylor, 2006).

Tableau B-1 : composition en acides gras du lait de vache (*t = trans, c = cis, i = iso, ai = ante-iso*) (d'après Jensen, 2000).

Acides gras saturé linéaires		Acides gras monoinsaturés		Acides gras polyinsaturés		Acides gras ramifiés	
C4:0	3,82	C10:1	0,27	C18:2 <i>c9,t113</i> + C18:2 <i>t9,t12</i>	0,21	C13:0 <i>i</i>	0,14
C5:0	0,02	C12:1	0,09	C18:2 <i>t8,t13</i>	0,08	C13:0 <i>ai</i>	0,02
C6:0	2,24	C14:1	1,08	C18:2 <i>c9,t12</i>	0,08	C14:0 <i>i</i>	0,13
C7:0	0,03	C16:1	2,02	C18:2 <i>t9,c12</i>	0,05	C15:0 <i>i</i>	0,36
C8:0	1,29	C17:1	0,38	C18:2 <i>t11,c15</i>	0,36	C15:0 <i>ai</i>	0,62
C9:0	0,03	C18:1 <i>t4</i>	0,02	C18:2 <i>c9,t11</i>	1,11	C16:0 <i>i</i>	0,26
C10:0	2,74	C18:1 <i>t5</i>	0,02	C18:2 <i>c9,c12</i>	1,30	C17:0 <i>i</i>	0,60
C11:0	0,05	C18:1 <i>t6/7/8</i>	0,24	C18:2 <i>c9,c15</i>	0,03	C17:0 <i>ai</i>	0,54
C12:0	3,28	C18:1 <i>t9</i>	0,22	C18:3 <i>c9,c12,c15</i>	0,52	C18:0 <i>i</i>	0,07
C13:0	0,09	C18:1 <i>t10</i>	0,27	C20:4	0,09		
C14:0	10,43	C18:1 <i>t11</i>	2,47				
C15:0	1,26	C18:1 <i>t12</i>	0,30				
C16:0	26,88	C18:1 <i>t13/14</i>	0,29				
C17:0	0,68	C18:1 <i>t15</i>	0,45				
C18:0	10,00	C18:1 <i>t16</i>	0,23				
C19:0	0,07	C18:1 <i>c9</i>	18,36				
C20:0	0,16	C18:1 <i>c11</i>	0,54				
C22:0	0,07	C18:1 <i>c12</i>	0,12				
C24:0	0,04	C18:1 <i>c13</i>	0,07				
		C18:1 <i>c15</i>	0,03				
		C20:1	0,27				
		C22:1	0,03				

Cette composition est caractérisée par une teneur variable en acides gras saturés dans les systèmes d'élevages actuels et comprise entre 65 et 75%. De ce fait, les acides gras insaturés présentent une teneur comprise entre 25 et 35% (McGibbon et Taylor, 2006). La matière grasse laitière contient environ 15 acides gras dont la teneur est supérieure à 1% en masse (Kaylegian et Lindsay, 1995 ; Jensen, 2002 ; McGibbon et Taylor, 2006). La composition moyenne en acides gras majoritaires des triacylglycérols laitiers est donnée dans le **Tableau B-2**.

Tableau B-2 : composition moyenne en acides gras majoritaires des triacylglycérols du lait de vache (d'après Kaylegian et Lindsay, 1995 et Jensen et Newberg, 1995 ; McGibbon et Taylor, 2006).

Acide gras	Nom usuel	Abréviation	Teneur (% massique)		
C4:0	Butyrique	Bu	2-5		
C6:0	Caproïque	Co	1-5	Courts	
C8:0	Caprylique	Cy	1-3		
C10:0	Caprique	Ca	2-4		
C12:0	Laurique	La	2-5	Moyens	Saturés
C14:0	Myristique	My	8-14		
C15:0	Pentadécylrique	C15	1-2		
C16:0	Palmitique	P	25-30		
C17:0	Margarique	C17	0,5-1,5	Longs	
C18:0	Stéarique	S	10-13		
C16:1	Palmitoléique	Po	1-3		
C18:1 <i>c9</i>	Oléique	O	17-27		
C18:1 <i>t11</i>	Vaccénique	V	3		Insaturés
C18:2 <i>c9,c12</i>	Linoléique	Li	1-3		
C18:2 <i>c9,t11</i>	Linoléique conjugué	CLA	1,1		
C18:3 <i>c9,c12,c15</i>	α -Linoléique	Lo	0,5-2		

Les acides gras courts C4:0 et C6:0 sont présents en proportions relativement élevées (jusqu'à 5% chacun), ceci étant une des caractéristiques de la matière grasse de lait bovin. De la même façon, les acides gras C15:0 et C17:0 à nombre impair de carbone sont spécifiques de la matière grasse laitière de ruminant, ceux-ci étant synthétisés par la flore bactérienne du rumen (Jensen, 2002).

Les acides gras saturés sont essentiellement composés d'acides gras à longueur de chaînes de C4 à C18. Le C16:0 est le plus abondant des acides gras saturés (25 à 30%), C14:0 et C18:0 sont assez abondants (10 à 14%). Les acides gras courts et moyens ont la particularité d'être absorbés en tant qu'acides gras non estérifiés par l'organisme lors de la digestion (phase gastrique), ce qui leur permet d'être directement métabolisés dans le foie et ainsi contribuer rapidement au métabolisme (McGibbon et Taylor, 2006).

Parmi les acides gras insaturés, l'acide gras majoritaire est l'acide oléique C18:1 *c9* (17 à 27%). Les autres acides gras insaturés *cis* sont présents en quantités bien moindre : 0,5% pour le C18:1 *c11*, 1% pour le C14:1 *c9* et 1,5% pour le C16:1 *c9*. Le mode de synthèse des acides gras du lait dans l'organisme de la vache, notamment l'activité ruménique, implique une faible concentration en acides gras polyinsaturés *cis*. En tout état de cause, deux acides gras polyinsaturés *cis* sont en proportions non négligeables : le C18:2 *c9,c12* à hauteur de 1,2

à 1,7% et le C18:2 *c9,c12,c15* à hauteur de 0,7 à 1,2%. Parmi les isomères de l'acide linoléique, l'acide linoléique conjugué C18:2 *c9,t11* est le plus concentré dans le lait (Lock et Bauman, 2004). Les acides gras monoinsaturés *trans* représentent environ 3%, dont l'acide vaccénique C18:1 *t11* est le majoritaire (Precht *et al.*, 2001).

2. Structure chimique des triacylglycérols laitiers

En considérant une répartition homogène des acides gras sur les trois positions du glycérol, le nombre théorique de triacylglycérols possibles serait de 400^3 , soit 64 000 000. En fait, la répartition des acides gras sur le glycérol n'est pas aléatoire. Il existe une stéréospécificité de position des acides gras sur le glycérol, décrite dans le **Tableau B-3**. Les acides gras saturés les plus courts sont estérifiés préférentiellement sur la position *sn-3* du glycérol, alors que les plus longs sont plutôt sur la position *sn-1*. Les acides gras saturés à chaînes moyennes se trouvent soit en *sn-2*, soit en *sn-1*. Les acides gras insaturés sont estérifiés préférentiellement en position *sn-1*. Cette stéréospécificité provient du mécanisme de synthèse des triacylglycérols du lait de vache (Palmquist, 2006).

Tableau B-3 : stéréolocalisation des principaux acides gras du lait de vache sur les trois positions du glycérol (adapté de Parodi, 1982).

Acide gras	<i>sn-1</i> (% mol)	<i>sn-2</i> (% mol)	<i>sn-3</i> (% mol)
C4:0	0	1,3	98,7
C6:0	0	4,8	95,2
C8:0	3,7	43,8	52,5
C10:0	8,2	47,6	44,1
C12:0	20,0	54,3	25,7
C14:0	28,7	56,1	15,1
C16:0	47,6	42,3	10,1
C18:0	62,4	16,3	21,3
C18:1	43,6	18,6	37,8

Gresti *et al.* (1993) a identifié 223 triacylglycérols, représentant 80% des triacylglycérols totaux. Les principaux sont présentés dans le **Tableau B-4** sans prendre en compte la stéréospécificité des acides gras sur le glycérol. Le poids moléculaire des triacylglycérols du lait de vache montre une distribution large. Cela se traduit par un nombre d'atomes de carbone des triacylglycérols allant de 26 à 56. Cela est dû à la variété de composition et de longueurs de chaîne des acides gras laitiers (C4 à C18). Les triacylglycérols les plus abondants sont ceux comprenant 36 à 40 atomes de carbones (35% environ) et 46 à 52 (36% environ) (MacGibbon et Taylor, 2006).

Tableau B-4 : composition en principaux triacylglycérols de la matière grasse laitière (d'après Gresti *et al.*, 1993 ; Jensen, 2002).

Triacylglycérol	Teneur (% mol)	Triacylglycérol	Teneur (% mol)	Triacylglycérol	Teneur (% mol)
4:0 14:0 16:0	3,05	4:0 14:0 18:1	1,79	4:0 18:1 18:1	1,48
6:0 14:0 16:0	1,37	4:0 16:0 18:1	4,17	14:0 18:1 18:1	1,26
4:0 14:0 18:0	1,35	6:0 16:0 18:1	2,02	16:0 18:1 18:1	2,50
4:0 16:0 16:0	3,20	4:0 18:0 18:1	1,58	18:0 18:1 18:1	1,21
6:0 16:0 16:0	1,50	10:0 16:0 18:1	1,60	18:1 18:1 18:1	1,02
4:0 16:0 18:0	2,47	12:0 16:0 18:1	1,22		
6:0 16:0 18:0	1,12	14:0 16:0 18:1	2,82		
		14:0 18:0 18:1	1,45		
		16:0 16:0 18:1	2,34		
		16:0 18:0 18:1	2,16		
Trisaturés	14,1	Monoinsaturés	21,2	Polyinsaturés	7,47

C. Synthèse et sécrétion des lipides du lait

Dans le lait, les triacylglycérols sont synthétisés au sein de la cellule épithéliale mammaire puis sont sécrétés dans le lait sous forme de globules gras.

1. Synthèse de la matière grasse dans la cellule épithéliale mammaire

Chez les ruminants, deux sources biologiques d'acides gras sont à l'origine de la synthèse des triacylglycérols qui composent la matière grasse du lait : d'une part une synthèse *de novo* et d'autre part un prélèvement directement dans le sang (McGuire et Bauman, 2002 ; Palmquist, 2006).

1.1. Synthèse *de novo* des acides gras à courtes et moyennes chaînes

La synthèse *de novo* a lieu dans les cellules épithéliales mammaires pour les acides gras courts et moyens (C4:0 à C14:0, **Figure B-7**). Cette voie de biosynthèse bien connue et est détaillée dans Hillgartner *et al.* (1995), Barber *et al.* (1997) et Palmquist (2006). Elle requiert deux types de substrats : des chaînes courtes hydrocarbonées et des équivalents réducteurs (NADPH₂). Chez les ruminants, cette synthèse d'acides gras a lieu à partir d'acétate majoritairement, de β -hydroxybutyrate à hauteur de 10-15%, dérivé de l'activité ruménique, et de propionate (C3:0) très minoritairement (Palmquist, 2006).

La synthèse *de novo* des acides gras a lieu dans le réticulum endoplasmique lisse au niveau de sa membrane ou de sa lumière (Heid et Keenan, 2005). Elle se décompose en deux

Synthèse bibliographique

étapes. La première étape consiste en la carboxylation de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) issu de l'acétate par l'acétyl-CoA carboxylase donnant ainsi du malonyl-CoA (Palmquist, 2006). La deuxième étape consiste en l'élongation d'un acétyl-CoA à l'aide des résidus malonyl-CoA à l'aide d'un complexe enzymatique appelé acides gras synthase (Smith *et al.*, 2003 ; Palmquist, 2006). L'élongation se fait ainsi par incrémentation de 2 atomes de carbone. Le butyryl-CoA dérivant du β -hydroxybutyrate peut également servir de précurseur de cette réaction.

La longueur de chaîne des acides gras synthétisés *de novo* est régulée par différentes enzymes, notamment les thioestérases I et II qui stoppent la réaction d'élongation pour libérer des acides gras ayant entre 8 et 16 atomes de carbone (Chilliard *et al.*, 2001a ; Smith *et al.*, 2003 ; Palmquist, 2006).

1.2. Prélèvement des acides gras à longues chaînes dans le sang

Les acides gras à plus longues chaînes (C16:0 et > C18:0) sont prélevés par les cellules mammaires directement dans le sang à partir des lipoprotéines circulantes contenant des triacylglycérols issus de l'alimentation (**Figure B-7**, Palmquist, 2006). Le prélèvement est réalisé par hydrolyse des triacylglycérols à l'aide de la lipoprotéine lipase pour les acides gras positionnés préférentiellement en *sn*-3 (Palmquist, 2006 ; Clegg *et al.*, 2001). Les acides gras entrant dans la cellule épithéliale mammaire par cette voie sont principalement les acides palmitique, stéarique et oléique.

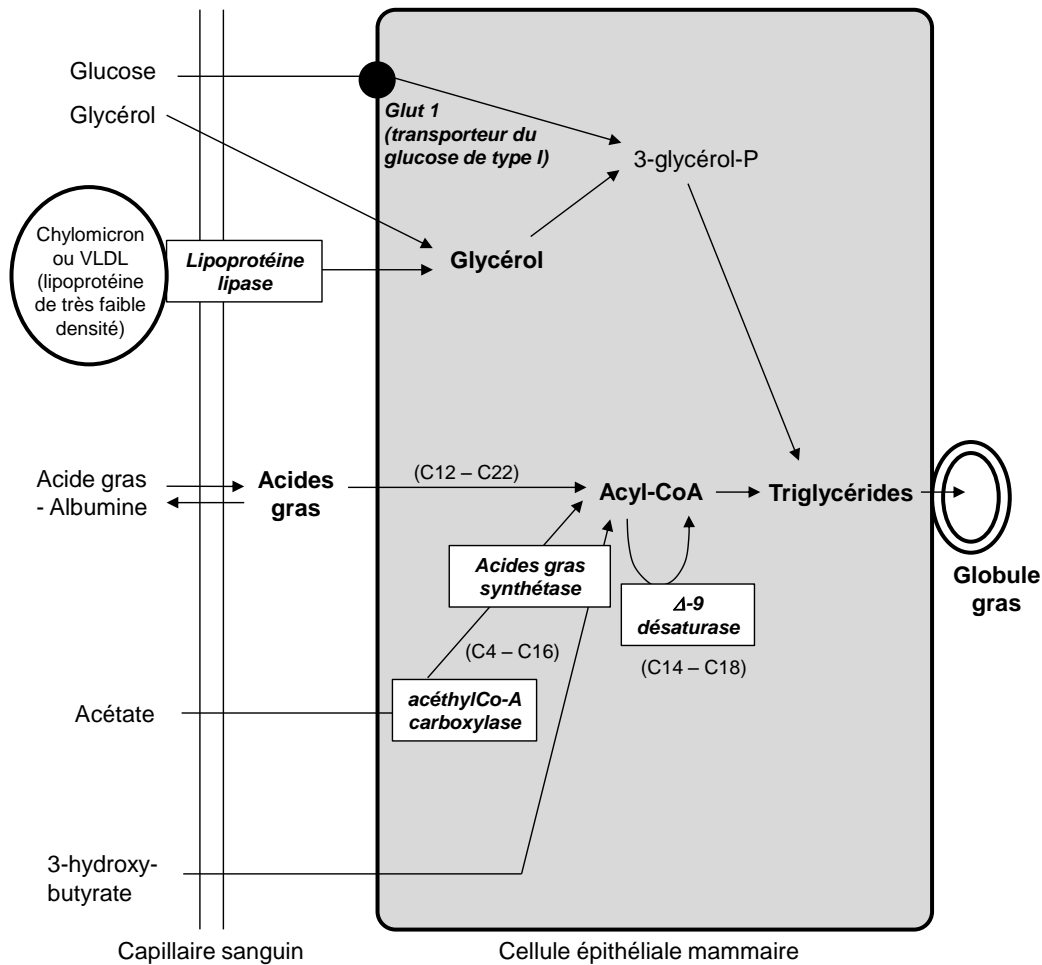


Figure B-7 : Les différentes voies métaboliques conduisant au pool d'acides gras dans la cellule épithéliale mammaire (d'après Chilliard *et al.*, 2001a).

1.3. Synthèse des triacylglycérols à partir du pool d'acides gras

Le glycérol-3-phosphate ou α -glycérophosphate à l'origine de la synthèse des triacylglycérols provient essentiellement de la glycolyse (Bickerstaffe et Annison, 1971 ; Palmquist, 2006). La voie de synthèse des triacylglycérols est détaillée dans la **Figure B-8**.

Les acides gras doivent être présents sous forme d'acyl-CoA dans la cellule pour être estérifiés sur le glycérol. Les acides gras issus de la synthèse *de novo* se trouvent sous cette forme, en revanche les acides gras issus du prélèvement sanguin sont convertis en acyl-CoA par l'intermédiaire de l'acyl-CoA synthase (Hawke et Taylor, 1995 ; Coleman et al, 2000 ; Palmquist, 2006). Le glycérol-3-phosphate est premièrement estérifié en position *sn*-1 avec un acide gras plutôt saturé à longue chaîne. Un deuxième acide gras est ensuite estérifié en position *sn*-2, lui aussi préférentiellement à longue chaîne ou chaîne moyenne (Hawke et Taylor, 1995). Le phosphatidate alors produit occupe un point central dans la biosynthèse des lipides (Palmquist, 2006) dans le sens où il peut se diriger vers la voie de biosynthèse des

glycérophospholipides ou être utilisé comme précurseur des triacylglycérols (Coleman Lee, 2004). L'estérification de la position *sn*-3 du glycérol est alors effectuée en deux étapes : la déphosphorylation puis l'estérification.

La cellule épithéliale de la glande mammaire des ruminants estérifie directement le butyryl-CoA et l'hexanoïl-CoA sur la position *sn*-3 du glycérol, ce qui explique la proportion d'acides gras C4:0 et C6:0 en quantités non négligeables dans le lait (Hawke et Taylor, 1995).

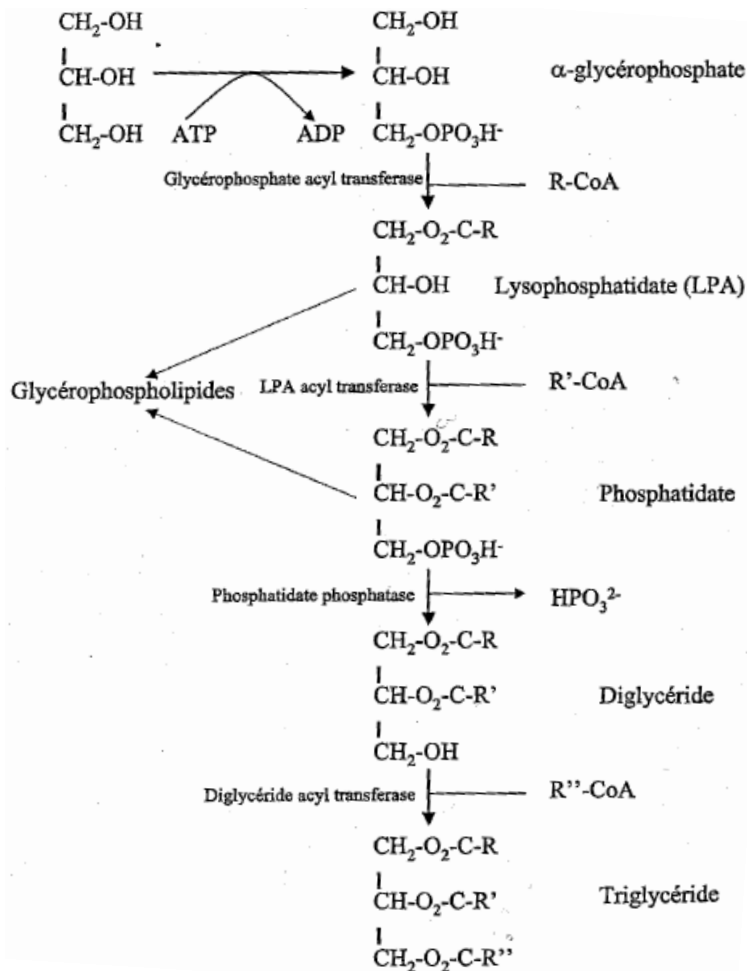


Figure B-8 : Synthèse des triacylglycérols du lait – voie de l' α -glycérophosphate (Hawke et Taylor, 1995).

2. Sécrétion des globules gras par la cellule épithéliale mammaire

Les triacylglycérols synthétisés dans le réticulum endoplasmique lisse de la cellule transigent sous forme de micro-gouttelettes qui coalescent avant d'être excrétées au niveau de l'apex de la cellule (**Figure B-9**, Keenan et Mather, 2006). Ces micro-gouttelettes lipidiques (MLD) sont les précurseurs intra-cellulaires des globules gras. Elles proviennent exclusivement du réticulum endoplasmique de la partie basale de la cellule épithéliale mammaire (Heid et Keenan, 2005). Les triacylglycérols s'accumulent entre les deux couches

de la membrane du réticulum endoplasmique où ils sont synthétisés (Zazcek et Keenan, 1990) puis sont ainsi expulsés dans le cytosol sous forme de micro-gouttelettes lipidiques appelées gouttelettes lipidiques cytoplasmiques recouvertes de la face externe du réticulum endoplasmique (Mather et Keenan, 1998). Ces microgouttelettes ne dépassent pas la taille de 0.5 μm à la sortie du réticulum endoplasmique (Heid et Keenan, 2005).

Une fois expulsées dans le cytosol, les microgouttelettes transitent vers l'apex cellulaire et grossissent par action de plusieurs phénomènes, dont la fusion ou le transfert à l'aide de protéines cytoplasmiques sont généralement avancés (Patton, 1973, Valivullah *et al.*, 1986 ; Heid et Keenan, 2005 ; Ollivier-Bousquet, 2002).

A l'approche de l'apex de la cellule, un processus d'enveloppement des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques dans la membrane plasmique de la cellule intervient jusqu'à dissociation complète des globules gras nouvellement formés (Keenan et Mather, 2006). Lors de ce processus d'enveloppement, une partie du cytoplasme peut être entraînée dans le globule gras formé (Heid et Keenan, 2005).

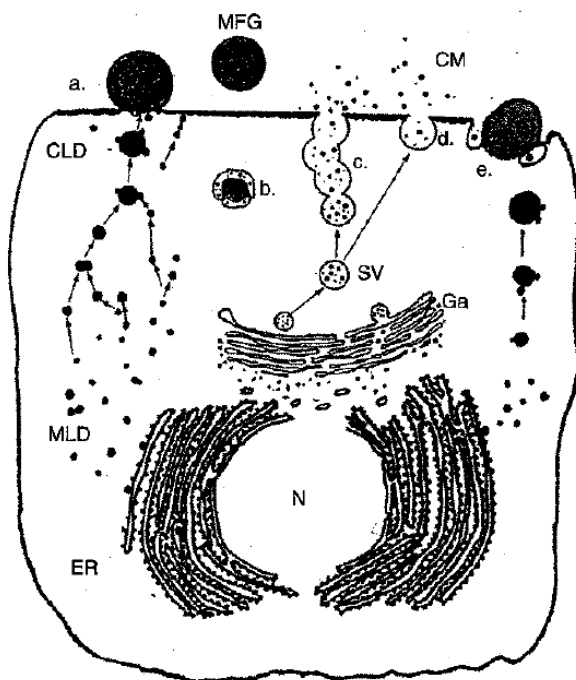


Figure B-9 : schéma représentant l'origine intracellulaire des globules gras du lait, depuis la croissance à la sécrétion des gouttelettes (d'après Keenan et Mather, 2006). CLD = gouttelette lipidique cytoplasmique, CM = micelle de caséine, ER = réticulum endoplasmique, Ga = appareil de Golgi, MLD = gouttelette microlipidique, MFG = globule gras du lait, N = noyau, SV = vésicule sécrétrice.

Les globules gras sont concentrés dans le lait de vache à raison de $\sim 15 \cdot 10^9$ unités par gramme de lait. Les globules gras d'un diamètre inférieur à 1 μm représentent 80% de

l'ensemble des globules gras, mais moins de 10% du volume total de matière grasse. Les globules gras d'un diamètre compris entre 1 et 8 µm constituent 90% du volume de matière grasse. Les globules gras d'un diamètre supérieur à 8 µm représentent 1 à 3% du volume de matière grasse (Mulder et Walstra, 1974 ; Couvreur et Hurtaud, 2007).

Enfin, Timmen et Patton (1988) ont émis l'hypothèse que la taille des globules gras serait conditionnée par leur composition tryglycéridique. Cette hypothèse a été reprise par Fauquant *et al.* (2005) qui ont observé des teneurs plus fortes en acides gras longs et insaturés dans les globules gras de petite taille isolés par filtration par rapport à l'ensemble des globules gras du même lait.

D. Composition et structure de la membrane des globules gras natifs

La membrane des globules gras natifs représente 2 à 6% de la masse totale des lipides du lait (Keenan et Dylewski, 1995 ; McGibbon et Taylor, 2006). Elle joue un rôle de protection et de stabilisation physique et biochimique des globules gras.

1. Composition de la membrane des globules gras

La membrane des globules gras est un assemblage complexe d'eau (12% contre moins de 1% au cœur du globule gras), de protéines, de lipides divers et de composés mineurs (Danthine *et al.*, 2000). La composition de cette membrane varie comme celle des triacylglycérols suivant la race, l'âge de l'animal, le stade de lactation ou encore l'alimentation (Couvreur et Hurtaud, 2007 ; Lopez *et al.*, 2008a).

La teneur en protéines de la membrane des globules gras varie de 25 à 60% du poids sec (Patton, 1982 ; Keenan *et al.*, 1983 ; Kanno et Kim, 1990 ; Kim et Nawar, 1992 ; Deeth, 1997 ; Couvreur et Hurtaud, 2007 ; Fong *et al.*, 2007). Ces variations peuvent s'expliquer d'une part par la variabilité biologique des GG mais aussi par les difficultés d'isolement sans contamination de la membrane des GG (Danthine *et al.*, 2000). Ces protéines sont constituées principalement de polypeptides et glycoprotéines (Danthine *et al.*, 2000), mais des enzymes ont aussi été identifiées en quantités minoritaires (McPherson et Kitchen, 1983).

Les lipides polaires sont les constituants majoritaires de la membrane des globules gras. Ils sont constitués de sphingolipides et phospholipides, ces derniers contribuant fortement au rôle émulsifiant de la membrane. Le **Tableau B-5** récapitule les teneurs relatives en différents lipides polaires de la membrane des globules gras.

Synthèse bibliographique

Tableau B-5 : structure chimique et composition relative des lipides polaires de la membrane des globules gras. R, R₁ et R₂ représentent des groupements acyls (d'après Deeth, 1997 ; Rombaut et Dewettinck, 2006).

Lipide de la membrane	Structure chimique	Concentration (% masse)
Phosphatidylcholine		19,2-37,3
Phosphatidyléthanolamine		19,8-42,0
Spingomyéline		18,0-34,1
Phosphatidylinositol		0,6-11,8
Phosphatidylsérine		1,9-10,5

2. Structure de la membrane des globules gras

La structure de la membrane des globules gras reflète son passé sécrétoire (Keenan et Mather, 2006). Elle est constituée d'un multicouche complexe composée d'une couche interne de protéines et lipides originaires des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques formées par le réticulum endoplasmique et d'une bicouche externe dérivée de la membrane plasmique de la cellule sécrétrice de la glande mammaire. L'épaisseur de cette membrane est de 10 nm en moyenne (Mulder et Walstra, 1974). Différentes schématisations de l'organisation de cette membrane, typique d'une membrane cellulaire, ont été proposées (**Figure B-10**, McPherson et Kitchen, 1983 ; Danthine *et al.*, 2000 ; Michalski *et al.*, 2001 ; Lopez *et al.*, 2010).

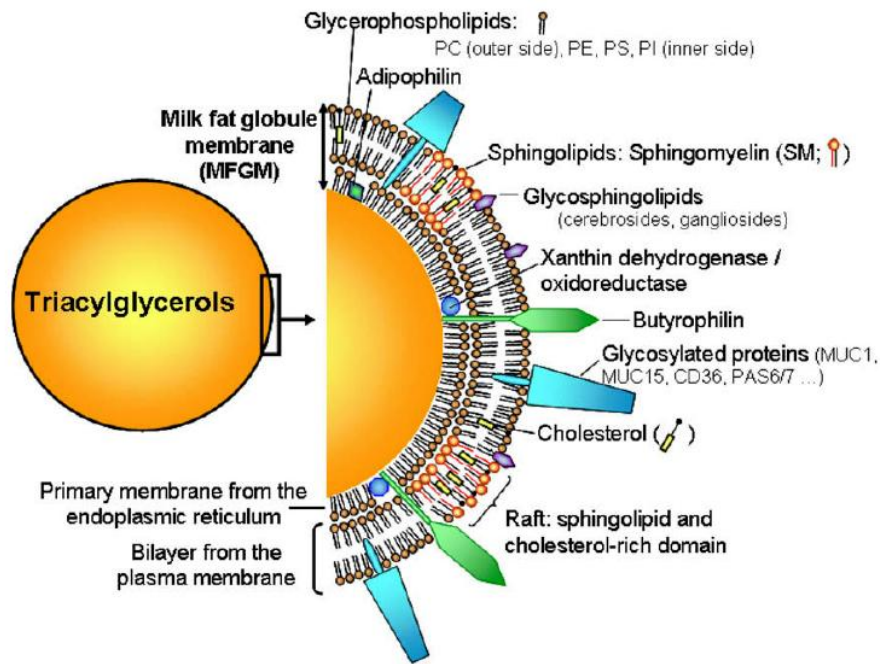


Figure B-10 : schématisation de la structure de la membrane des globules gras (d'après Lopez *et al.*, 2010).

E. Qualité nutritionnelle de la matière grasse laitière

La matière grasse laitière est une source remarquable d'énergie (German et Dillard, 2006 ; Parodi, 2006). Elle contient une teneur importante en acides gras saturés (65-75%), issue en grande partie de la biohydrogénation microbienne qui a lieu dans le rumen. Les acides gras saturés à chaînes moyennes (C12:0, C14:0, C16:0), qui représentent une grande part des acides gras saturés du lait, ont été suspectés d'augmenter le taux de cholestérol total et les lipoprotéines de faible densité (LDL) dans le sang, alors que les acides gras plus courts C4:0 à C10:0 et l'acide stéarique n'auraient pas d'effet probant (Williams, 2000 ; Steijns, 2008). L'augmentation du taux de cholestérol total et des LDL dans le sang est connue pour avoir comme conséquence un risque accru d'athérosclérose dans les artères coronaires (Steijns, 2008), induisant un risque de maladie cardiovasculaire accru (Mensink *et al.*, 2003). Cependant, des tests de consommation de matière grasse laitière riche en acides gras C12:0, C14:0 et C16:0 ont montré que ces acides gras contribuaient également à augmenter la teneur en lipoprotéine à haute densité (HDL) dans le sang, connue pour diminuer le risque d'athérosclérose (Hu et Willett, 2000). Ainsi, il n'a pu être montré clairement l'effet de ces acides gras saturés sur le risque de maladies cardiovasculaires.

L'acide stéarique C18:0 en particulier est généralement considéré comme neutre vis-à-vis du cholestérol, puisqu'il est majoritairement désaturé sous forme de C18:1 *c9* et a donc

Synthèse bibliographique

une effet métabolique comparable à ce dernier c'est-à-dire qu'il diminue le taux de LDL dans le sang (Steijns, 2008). De même, l'acide myristique pour son rôle spécifique dans l'acylation des protéines est maintenant considéré comme particulièrement utile à la vie cellulaire (Legrand, 2008).

En ce qui concerne les acides gras polyinsaturés, ils sont considérés d'une manière générale, comme bénéfiques vis-à-vis de la santé humaine. Outre les acides gras essentiels pour l'homme $\omega 3$ et $\omega 6$, c'est-à-dire devant être apportés par l'alimentation car ne pouvant être synthétisés, et qui sont présents dans le lait sous forme de C18:2 n-3 et C18:3 n-6, certains isomères de l'acide linoléique ont des propriétés bénéfiques reconnues. L'acide linoléique conjugué C18:2 *c9,t11* (CLA), qui est l'isomère majoritaire dans le lait de vache, retarde le développement de l'athérosclérose (Kritchevsky, 2003 ; Toomey *et al.*, 2003 ; Parodi, 2006), sans pour autant diminuer les teneur en LDL ni en cholestérol total et sans augmenter la teneur en HDL dans le sang. Le CLA est également connu pour avoir des propriétés anti-inflammatoires (Yu *et al.*, 2002), ainsi que des propriétés anti-carcinogéniques (Corl *et al.*, 2003 ; Lock *et al.*, 2004 ; Belury, 2002) et anti-mutagènes prévenant le développement du cancer du sein (Ip *et al.*, 1999).

Les autres acides gras insaturés *trans* ont des propriétés controversées vis-à-vis de la santé humaine. D'un côté, les acides gras C18:1 *t9* et C18:1 *t10* sont suspectés d'avoir un effet négatif sur la santé humaine, notamment en augmentant la teneur en LDL (Willett *et al.*, 1993), ce qui aurait pour conséquence d'augmenter le facteur de risque des maladies cardiovasculaires et du diabète (Ascheiro *et al.*, 1999 ; Salmeron *et al.*, 2001). En fait, en ce qui concerne le risque d'attaque cardiaque, ce sont les acides gras *trans* comportant au moins deux insaturations *trans* qui seraient incriminés particulièrement (Lemaitre *et al.*, 2002). D'un autre côté, l'acide vaccénique C18:1 *t11* joue le rôle de précurseur dans la synthèse endogène d'acide linoléique conjugué chez l'homme par action de la $\Delta 9$ -désaturase (Lock *et al.*, 2005). En fait, une confusion entre les effets sur la santé des acides gras *trans* d'origine industrielle, résultant de l'hydrogénation des huiles végétales souvent trouvés dans les margarines, et les acides gras *trans* d'origine animale présent notamment dans le lait, est à l'origine du débat sur ces acides gras *trans* (Parodi, 2006). De nombreuses études ont montré qu'il est nécessaire de différencier l'origine des acides gras *trans* alimentaires afin de déterminer leur impact sur la santé et le risque de maladies cardiovasculaires en particulier (Willett *et al.*, 1993 ; Ascheiro *et al.*, 1994 ; Bolton-Smith *et al.*, 1996 ; Pietinen *et al.*, 1997).

Enfin, les sphingolipides et l'acide butyrique C4:0 sont reconnus pour leurs propriétés inhibitrices dans le développement du cancer du colon (Duan, 1998 ; Vesper *et al.*, 1999 ; Parodi, 2004).

Ainsi, il est nécessaire d'établir un profil d'acide gras complet pour déterminer l'effet biologique et santé global de la composition de la matière grasse laitière (Lock et Bauman, 2004), notamment vis-à-vis des acides gras *trans* dont les effets sont controversés et peuvent être très différents suivant leur nature.

F. Variabilité et possibilités de modification de la composition de la matière grasse laitière

La composition en acides gras des triacylglycérols laitiers est soumise à des variations pouvant provenir de deux grandes origines : technologique et environnementale.

Les moyens technologiques utilisés pour modifier la composition en acides gras de la matière grasse laitière peuvent être i) de nature physique comme le fractionnement (Kaylegian et Lindsay, 1995 ; Augustin et Versteeg, 2006), le mélange avec d'autres matières grasses comme les matières grasses végétales (Rousseau *et al.*, 1996a) ou des lipides mineurs (Wright et Marangoni, 2002) ii) de nature chimique telles que l'hydrogénation catalytique, l'interestérisation chimique (Rousseau et Marangoni, 2002) qui permet de modifier la distribution des acides gras sur le glycérol ou iii) de nature enzymatique telles que l'interestérisation enzymatique (Rousseau et Marangoni, 2002) ou l'hydrolyse enzymatique (Marangoni, 1994). Nous ne détaillerons pas ici ces aspects car aucun de ces moyens n'a été choisi pour modifier la composition en acides gras de la matière grasse laitière dans le cadre de cette thèse.

Les moyens environnementaux pouvant être utilisés pour modifier la composition en acides gras de la matière grasse laitière sont les moyens qui se rapportent à la conduite de l'élevage et à l'animal : la race (DePeters *et al.*, 1995) et l'alimentation (Palmquist *et al.*, 1993 ; Ashes *et al.*, 1997) des vaches, la période de lactation (Auldist *et al.*, 1998), la saison (Wolff *et al.*, 1995) et les facteurs géographiques. Brodin (1989) a mis en évidence la variabilité de composition de beurres suivant la saison, l'alimentation, le stade de lactation et les facteurs géographiques. Bornaz *et al.* (1992) ont déterminé les triacylglycérols majeurs responsables des variations de fermeté des beurres sur la base de compositions saisonnières et régionales de la matière grasse laitière. Ils ont ainsi mis en évidence quatre fractions de triacylglycérols : deux fractions dominées par les triacylglycérols POO + MyO (cf **Tableau**

B-2 pour les codes des différents acides gras), respectivement et corrélées négativement à la fermeté des beurres à 15°C, et deux fractions dominées par l'ensemble CaLaO + CyMyO + CoPO + BuSO et par l'ensemble BuPO + CoMyO + CoPL (cf **Tableau B-2** pour les codes des différents acides gras), respectivement et corrélées positivement à la fermeté des beurres à 15°C. L'alimentation des animaux reste le principal facteur animal permettant de modifier le plus la composition de la matière grasse laitière (Jensen, 2002), c'est pourquoi il a été choisi comme moyen dans le cadre de cette thèse.

De nombreux articles ont été publiés les dernières années quant à la modification de composition dont l'objectif était d'augmenter la teneur en certains acides gras particuliers, notamment l'acide oléique, l'acide linoléique conjugué et l'acide vaccénique, ou d'en diminuer d'autres, tels les acides gras saturés ou certains acides gras *trans* (Loor *et al.*, 2004 ; Dewhurst *et al.*, 2006) pour améliorer la valeur nutritionnelle de la matière grasse laitière (Noakes *et al.*, 1996). L'utilisation de fourrages riches en acides gras insaturés (**Tableau B-6**, Dhiman *et al.*, 1999 ; Elgersma *et al.*, 2006), d'huiles végétales et d'autres sources végétales d'acides gras insaturés comme des graines (**Tableau B-7**, Lawless *et al.*, 1998 ; Ryhänen *et al.*, 2005 ; Palmquist et Griinari, 2006 ; Glasser *et al.*, 2008), d'huiles de poisson (Shingfield *et al.*, 2005 ; Palmquist et Griinari, 2006) ont été mis en avant pour augmenter les teneurs en acides gras insaturés dans le lait.

Tableau B-6 : composition en acides gras du lait de vaches nourries avec différents fourrages (d'après Chilliard *et al.*, 2001b).

	Pâturage (plaine)	Pâturage (montagne)	Ensilage d'herbe	Ensilage d'herbe et concentrés	Ensilage de maïs et concentrés
Fourrage, %MS	100	100	100	63	68
Acides gras (g/100g MG)					
C4:0	3,5	4,8	-	3,2	3,4
C6:0 + C8:0	3,2	3,1		3,2	4,1
C10:0 + C12:0	5,8	4,5	18,6	7,3	8,2
C14:0	9,9	9,6		12,5	12,4
C16:0	25,8	24,9	27,8	35,6	32,7
C16:1	1,7	1,8	-	1,6	2,2
C18:0	11,4	10,8	10,3	9,9	8,1
C18:1	27,9	28,3	30,8	10,9	19,5
C18:2	2,6	4,5	-	1,5	2,2
C18:3	1,4	1,5	-	0,5	0,3
Total saturés	59,6	57,7		71,7	68,9
Total insaturés	40,4	42,3		28,3	31,1

Synthèse bibliographique

D'une manière générale, la matière grasse de laits produits à partir d'ensilage de maïs semble plus riche en acides gras à courtes chaînes et en acide linoléique comparé à celle des laits produits à partir d'ensilage d'herbe. En revanche, les ensilages favoriseraient la production d'acides myristique (C14:0) et palmitique (C16:0) aux dépens des acides mono et polyinsaturés comparé aux laits produits à partir de fourrages frais (Chilliard *et al.*, 2001b).

Tableau B-7 : effet de suppléments en huiles ou graines végétales sur la composition en acides gras du lait de vaches (d'après Glasser *et al.*, 2008).

Supplément Forme	-	Lin		Colza		Soja		Tournesol	
	-	graine	huile	graine	huile	graine	huile	graine	huile
Supplément lipidique (% MS)	-	3,6	3,2	3,9	2,9	3,2	2,9	3,8	3,7
Acides gras (g/100 g MG)									
C4:0	3,3	2,6	2,9	2,9	4,0	3,8	3,2	2,5	1,8
C6:0	2,3	2,0	1,6	2,0	2,5	2,3	1,9	1,6	1,2
C8:0	1,4	1,2	1,1	1,2	1,3	1,3	1,0	0,9	0,9
C10:0	3,4	2,5	2,1	2,7	3,0	2,7	2,2	2,3	1,8
C12:0	4,1	3,1	2,4	3,2	3,1	3,1	2,6	2,9	2,2
C14:0	12,3	9,9	9,4	10,4	10,5	9,8	9,3	9,8	9,4
C16:0	31,3	24,1	21,9	25,0	25,1	23,7	26,0	24,3	22,4
C18:0	9,7	14,4	11,9	13,1	13,6	12,9	13,6	14,0	12,2
C16:1	2,1	1,4	1,5	1,8	1,6	1,2	1,2	1,3	-
C18:1 <i>c9</i>	19,0	25,7	20,3	25,4	25,1	22,0	24,8	25,4	23,1
C18:1 <i>t11</i>	1,7	1,4	3,8	-	-	3,1	-	-	3,7
C18:2 <i>c9,c12</i>	2,4	2,2	2,1	2,0	2,1	4,0	3,2	3,2	2,9
C18:2 <i>c9,t11</i>	0,6	0,8	1,8	0,7	0,7	0,9	1,0	1,1	1,7
C18:3 <i>c9,c12,c15</i>	0,6	1,1	0,9	0,6	0,6	0,7	0,4	0,5	0,5
Total saturés	67,8	59,8	53,3	60,5	63,1	59,6	59,8	58,3	51,9
Total insaturés	32,2	40,2	46,7	39,5	36,9	40,4	40,2	41,7	48,1

L'ajout de suppléments lipidiques d'origine végétale au régime de base des vaches laitières augmente la teneur en acides gras insaturés, notamment les monoinsaturés, au détriment des acides gras saturés jusqu'à C16:0. Le taux de C18:0 augmente également avec l'ajout de suppléments lipidiques d'origine végétale dû à la réaction de biohydrogénation par les bactéries ruméniques. Les taux de C4:0 à C8:0 sont peu affectés par l'ajout de ces suppléments lipidiques. En ce qui concerne les acides gras C18, l'origine du supplément lipidique semble avoir un effet sur les teneurs en acides gras polyinsaturés : le lin et le colza semblent augmenter les teneurs en C18:2 *c9,c12* dans une moindre mesure en comparaison avec le soja et le tournesol, mais augmenteraient au contraire plus le C18:3 *c9,c12,c15*. Dans tous les cas, les acides gras *trans* sont fortement augmentés lors de l'ajout de suppléments

lipidiques d'origine végétale, ceci est dû encore une fois à la biohydrogénation ruménique. La forme du supplément lipidique a, elle aussi, une influence sur les teneurs en acides gras de la matière grasse laitière : une forme protégée comme la graine diminue moins les teneurs en C6:0 à C16:0, du à la moindre production de C18:1 *t11* qui inhibent la synthèse *de novo* des acides gras (Bauman et Grinari, 2001 ; Shingfield et Grinari, 2007).

Enfin, Timmen et Patton (1988) ont montré qu'il existe une régulation *in vivo* de la composition en acides gras de la matière grasse laitière de sorte que même si la composition en acides gras de la matière grasse laitière peut être modifiée, la structure générale des triacylglycérols qui la composent en majorité est assez peu modifiée.

III. STABILITE DES EMULSIONS

Par définition, une émulsion est un système instable thermodynamiquement, et qui est donc amené à évoluer au cours du temps (Dickinson, 1987 ; Walstra, 1995). Les gouttelettes dispersées dans l'émulsion sont en mouvement continu induisant des collisions entre gouttelettes. Ceci est dû aux mouvements browniens, aux forces de sédimentations ou à l'agitation mécanique. A la suite d'une collision, les gouttelettes peuvent se séparer, rester associées (floculation ou agrégation), ou perdre leur individualité et fusionner pour former des gouttelettes de plus grande taille (coalescence).

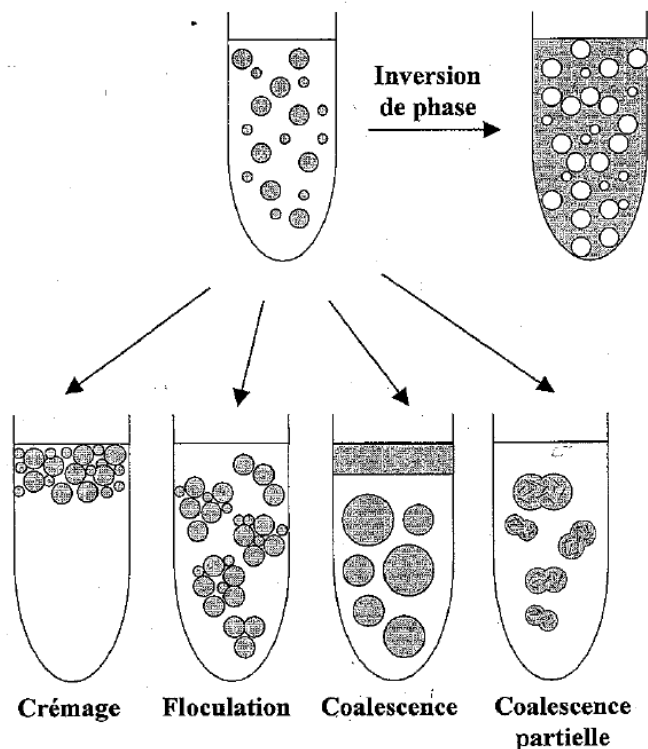


Figure B-11 : principaux phénomènes d'instabilité des émulsions.

A. Considérations générales sur l'instabilité des émulsions

Plusieurs phénomènes de déstabilisation peuvent donc intervenir pour une émulsion huile / eau comme le lait et sont schématisés sur la **Figure B-11** :

- le crémage : il s'agit de la séparation gravitationnelle des gouttelettes par rapport à la phase continue. Dans le lait où les globules gras ont une densité plus faible que la phase aqueuse, ceux-ci remontent ainsi naturellement selon la loi de Stokes :

$$v = - \frac{(2gr^2(\rho_2 - \rho_1))}{9\eta_1} \quad \text{Équation 1}$$

où v est la vitesse de crémage ($m.s^{-1}$), r est le rayon de la particule (m), g est l'accélération due à la gravité ($m.s^{-2}$), ρ_2 et ρ_1 sont les densités des phases continue et dispersée respectivement ($kg.m^{-3}$) et η_1 est la viscosité.

Le crémage est un phénomène réversible, les gouttelettes peuvent être redispersées par simple agitation.

- La floculation ou agrégation : il s'agit du phénomène de rapprochement des gouttelettes d'émulsion les unes aux autres du aux forces d'attraction. Elle est contrôlée par la fréquence des collisions entre gouttelettes et l'efficacité de ces collisions (McClements, 1999).
- L'inversion de phase : il s'agit d'une transformation d'une émulsion de A dans B pour donner une émulsion de B dans A.
- La coalescence : il s'agit de la fusion de plusieurs gouttelettes d'émulsion pour donner des gouttelettes de plus grande taille. C'est un phénomène irréversible où le film interfacial entourant les gouttelettes est rompu pour diminuer la surface de contact entre les deux phases et ainsi diminuer l'énergie libre du système (McClements, 1999 ; Das et Kinsella, 1990). Dans le cas d'une émulsion où la phase dispersée est partiellement cristallisée, la fusion totale des gouttelettes n'est pas possible et il y a alors coalescence partielle. La coalescence et la coalescence partielle sont des instabilités fréquemment rencontrées dans les produits laitiers.

La stabilité d'une émulsion est généralement évaluée par la mesure de la distribution de taille des gouttelettes (Fredrick *et al.*, 2010).

B. La coalescence et la coalescence partielle

La coalescence implique la rupture du film interfacial entourant les gouttelettes ; les propriétés de ce film ont donc une importance capitale vis-à-vis de la stabilité d'une émulsion à la coalescence. Pour augmenter la stabilité des émulsions, notamment vis-à-vis de la coalescence, l'industrie agroalimentaire utilise deux types de composés : les surfactants et les

stabilisants. Les surfactants sont des molécules à propriétés amphiphiles, pouvant migrer à la surface entre une interface huile / eau et former une couche protectrice autour des gouttelettes d'émulsion. Les stabilisants sont généralement des hydrocolloïdes permettant d'augmenter la viscosité de la phase continue et diminuer ainsi la fréquence des collisions entre gouttelettes. Les protéines peuvent agir à la fois comme surfactants et stabilisants (Dickinson et McClements, 1995).

La coalescence partielle d'une émulsion huile / eau est influencée par de nombreux paramètres discutés par Fredrick *et al.* (2010) : i) le taux de matière grasse cristallisée (Krog et Larsson, 1992 ; Boode et Walstra, 1993 ; Davies *et al.*, 2001), ii) la taille, la forme et l'orientation des cristaux à l'interface (Dickinson, 1997 ; Rousseau, 2000 ; Davies *et al.*, 2001 ; Coupland, 2002), iii) la nature et concentration des composés à l'interface (Goff et Jordan, 1989 ; Palanuwech et Coupland, 2003), iv) la vitesse de cisaillement (Boode et Walstra, 1993 ; Rousseau, 2000) et v) la taille des gouttelettes (Boode et Walstra, 1993).

La coalescence partielle implique la présence de cristaux dans la phase dispersée. Lorsque la température augmente au point que ces cristaux fondent, la coalescence devient totale et les gouttelettes fusionnent alors complètement (Vanapalli et Coupland, 2001 ; Granger *et al.*, 2005).

IV. PRINCIPES GENERAUX DE LA CRISTALLISATION

Lorsqu'un liquide est refroidi en dessous de sa température de fusion, l'état solide est le plus stable thermodynamiquement, c'est-à-dire que l'énergie libre de l'état solide est plus faible que celle de l'état liquide. Il en résulte le processus de cristallisation, c'est-à-dire passage de l'état liquide à l'état solide cristallin. A pression constant, l'équation d'état thermodynamique donnant la variation d'enthalpie libre du système est :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Équation 2}$$

où ΔG est la variation d'enthalpie libre du système, ΔH est la variation d'enthalpie, T est la température et ΔS est la variation d'entropie du système.

Le processus de cristallisation peut être divisé en trois étapes : la surfusion, la nucléation et la croissance des cristaux (Boistelle, 1988).

A. Surfusion

La surfusion est l'état d'une matière qui demeure en phase liquide alors que sa température est plus basse que son point de solidification. C'est un état dit métastable, c'est-à-

dire qu'une petite perturbation peut suffire pour déclencher abruptement le changement vers la phase solide. Dans un liquide libre d'impuretés, les *nuclei* en formation sont instables car ils sont refondus par l'agitation thermique. Le processus de cristallisation ne peut donc intervenir que lorsque le liquide est refroidi en-dessous de sa température de fusion. En fait, même si en dessous de la température de fusion d'un corps pur, l'état solide est le plus stable thermodynamiquement, il existe une barrière énergétique ΔG^* à dépasser afin de permettre la cristallisation (Dickinson et McClements, 1996). L'existence de cette barrière énergétique est schématisée **Figure B-12**. L'importance de cette barrière énergétique dépend de la capacité d'un *nucleus* stable à se former dans le liquide pour une température donnée (Rousset, 1998).

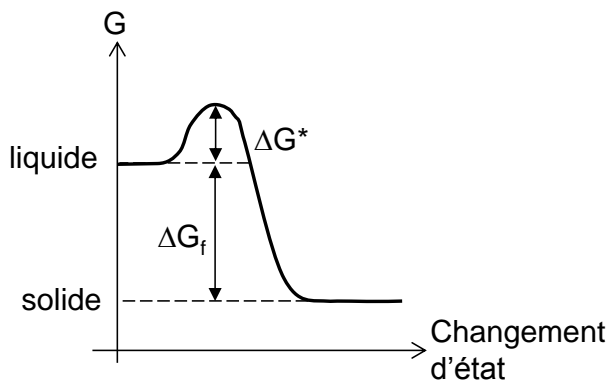


Figure B-12 : représentation schématique de la barrière énergétique ΔG^* à franchir pour cristalliser un corps pur expliquant le phénomène de surfusion. ΔG_f est l'enthalpie libre de fusion de ce corps pur (d'après Rousset, 1998).

Le degré de surfusion est défini comme la différence entre la température du corps étudié refroidi en dessous de sa température de fusion et sa température de fusion :

$$\Delta T = T - T_f \quad \text{Équation 3}$$

où ΔT est la surfusion, T est la température du corps étudié et T_f sa température de fusion.

Le degré de surfusion auquel se produit le phénomène de cristallisation dépend de la composition chimique du matériel étudié, de la présence de matériel étranger (impuretés catalytiques), de la vitesse de refroidissement ou l'application de forces externes (cisaillement par exemple).

B. Nucléation

La nucléation est la formation d'un premier germe de cristal à partir de l'agrégation de plusieurs molécules du liquide. Ce processus dépend largement des conditions de température et de la présence d'impuretés. Au dessus du point de fusion, aucun *nucleus* ne

peut se former car les molécules qui se regroupent pour initier un germe cristallin se dissocient trop rapidement. Il y a apparition de germes cristallins lorsque la température diminue ; ces germes peuvent donner naissance à des cristaux uniquement dans le cas de solutions sursaturées. La taille minimale d'un *nucleus* stable dépend de l'énergie libre du système donnée par l'équation de Gibbs Thompson :

$$\Delta G^r = \frac{16\pi\delta^3(V_m^s)^2T_f^2}{3(\Delta H_f\Delta T)^2} \quad \text{Équation 4}$$

où ΔG^r est l'énergie libre nécessaire pour former un nucléus stable de rayon r , δ est l'énergie libre de surface solide-liquide, V_m^s est le volume molaire du solide, ΔH_f est l'enthalpie de fusion, T_f et ΔT sont les température de fusion et degré de surfusion, respectivement.

Ainsi, plus la surfusion est importante, plus le nombre de *nuclei* stables de rayon r est grand. Plusieurs processus de nucléation existent.

1. Nucléation homogène primaire

Il s'agit de la formation d'un premier germe de cristal à partir des molécules du liquide sans catalyse par contact avec des interfaces ou des corps extérieurs. Cependant, ce type de nucléation est rare car il y a toujours présence de surfaces susceptibles d'induire une orientation préférentielle et un ordre.

2. Nucléation hétérogène primaire

La formation de cristaux est initiée à partir de matériaux étrangers, c'est-à-dire ayant une structure chimique différente de celle du liquide qui cristallise. La surface du contenant ou encore des impuretés présentes dans le liquide étudié sont souvent à l'origine de la nucléation hétérogène.

3. Nucléation hétérogène secondaire

La formation de cristaux est initiée à partir de cristaux déjà formés qui constituent des impuretés. Dans ce cas, le degré de surfusion des cristaux qui se forment par nucléation hétérogène secondaire est moins important que dans le cas de la nucléation homogène. Skoda et Van Den Tempel (1963) ont montré que les monoacylglycérols et diacylglycérols peuvent agir comme impureté catalytique pour la nucléation des triacylglycérols. Wright *et al.* (2000) ; Mazzanti *et al.* (2008, 2009) ont montré que les composés mineurs de la matière grasse laitière anhydre, les phospholipides notamment, retarderaient la nucléation et la croissance des cristaux.

Les différents processus de nucléation sont représentés dans la **Figure B-13**.

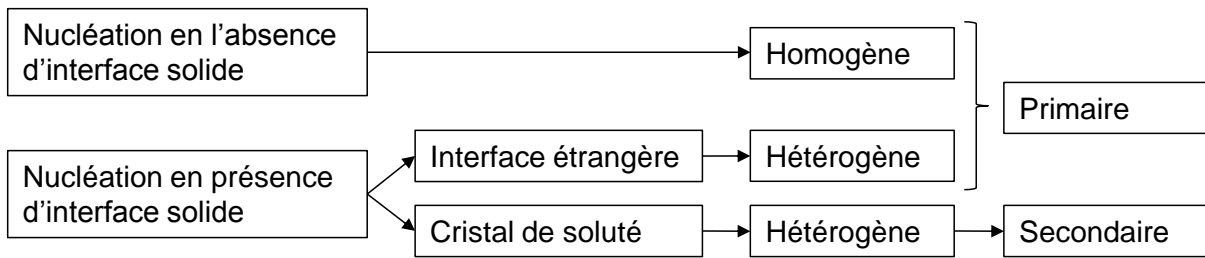


Figure B-13 : classification des différents processus de nucléation.

C. Croissance

La croissance est le résultat de l'intégration de molécules de l'état liquide dans des cristaux déjà formés à l'état solide. La vitesse de croissance des cristaux dépend de la vitesse de diffusion des molécules dans le milieu et donc de la température, puisque la viscosité du milieu dépend de la température, mais également de la nature des cristaux formés.

Pour les triacylglycérols, la vitesse de croissance des cristaux serait similaire à la vitesse de nucléation, provoquant une compétition entre les deux phénomènes (Ozilgen *et al.*, 1993). Un refroidissement rapide donne lieu à des cristaux de plus petite taille et organisés de manière moins compacte qu'à la suite de refroidissements lents (Dickinson et McClements, 1996). De plus, la vitesse de croissance des cristaux augmente lorsque la longueur de chaîne diminue. Ainsi, pour un même degré de surfusion, les cristaux de triacylglycérols de petite longueur de chaîne seraient de plus grande taille que les cristaux de triacylglycérols de grande longueur de chaîne (Himawan *et al.*, 2006).

D. Mûrissement d'Ostwald

Il s'agit de l'augmentation de la taille des cristaux formés par les processus de dissolution et fusion-recristallisation, c'est-à-dire la formation de cristaux plus grands à partir des cristaux initialement formés dans le milieu. Ce phénomène de mûrissement permet au système de se rapprocher de l'équilibre thermodynamique en homogénéisant la taille des cristaux qui le composent. Ce processus obéit à une loi de puissance en fonction du temps du type : $L(t) \propto t^n$ **Équation 5** (d'après Donhowe et Hartel, 1996).

où L est la taille d'un cristal, t est le temps et n est le nombre de cristaux.

E. Modélisation de la cristallisation

D'une manière générale, la cinétique de cristallisation isotherme des matières grasses est décrite en utilisant le modèle d'Avrami (Avrami, 1941) permettant de relier le taux de solide au temps. Il prend en compte la compétition qu'il peut exister entre les phénomènes de nucléation et croissance des cristaux. Pour les matières grasses, ce modèle est de la forme :

$$\frac{SFC(t)}{SFC(\infty)} = 1 - e^{-kt^n} \quad \text{Équation 6}$$

où $SFC(t)$ est le taux de solide au temps t , $SFC(\infty)$ est la limite du taux de solide à l'infini, k est la constante d'Avrami représentant le taux de cristallisation et n est l'exposant d'Avrami dépendant du mécanisme de croissance des cristaux

Ce modèle peut être modifié pour améliorer la description des données expérimentales et prendre en compte la dérive par rapport aux hypothèses du modèle de départ, notamment due à la complexité des matières grasses étudiées (Narine *et al.*, 2006). Une comparaison de différents modèles basés sur le modèle d'Avrami pour modéliser la cinétique de cristallisation des matières grasses est présentée par Foubert *et al.* (2003).

Un certain nombre de facteurs internes et externes influencent la nature, la taille, la morphologie et la vitesse de cristallisation des cristaux de matière grasse. Les facteurs internes sont liés à l'organisation moléculaire et aux forces intermoléculaires (Janssen-van Rosmalen *et al.*, 1975). Les facteurs externes sont liés à la température (Breitschuh et Windhab, 1998 ; Campbell *et al.*, 2002), à la présence d'impuretés (Boistelle et Astier, 1988 ; Wright *et al.*, 2000 ; Vanhoutte *et al.*, 2002), au cisaillement (Mazzanti, 2004) ou encore la vitesse de refroidissement (Lopez *et al.*, 2002a).

F. Cristallisation en émulsion

La cinétique de cristallisation en émulsion est différente de celle rencontrée en milieu anhydre (Walstra et Van Beresteyn, 1975 ; Ozilgen *et al.*, 1993).

1. Effets de la dispersion

Un degré de surfusion plus important est nécessaire pour cristalliser une matière grasse dispersée sous forme de gouttelettes d'émulsion (Coupland, 2002 ; Lopez et Ollivon, 2009a). En effet, lorsque la matière grasse est dispersée sous forme de gouttelettes fines, le nombre de gouttelettes peut surpasser le nombre d'impuretés contenues dans la matière grasse anhydre. Cela conduit à des gouttelettes « libres d'impuretés », ayant une propension à

crystalliser préférentiellement suivant un mécanisme apparent de nucléation homogène (Skoda et Van Ten Tempel, 1963 ; Walstra et Van Beresteyn, 1975). Kaneko *et al.* (1999) ont notamment mis en évidence une vitesse de nucléation accrue lors de l'ajout d'un polyester de sucrose dans des gouttelettes d'émulsion de *n*-hexadécane qu'ils ont attribué à un processus de nucléation hétérogène.

La vitesse de cristallisation est plus rapide dans les gouttelettes d'émulsion que dans la matière grasse anhydre du fait que le transfert de chaleur est plus rapide dans l'eau que dans l'huile (Dickinson et McClements, 1996). En effet, la croissance des cristaux dépend de l'évacuation de la chaleur de la surface du cristal croissant, la transition liquide → solide étant exothermique. Plus la chaleur est évacuée rapidement, plus la vitesse de cristallisation peut être rapide. Cependant, la cristallisation intervient à plus basse température en émulsion (Campbell *et al.*, 2002 ; Lopez et Ollivon, 2009a).

Le taux de matière grasse solide est également diminué en émulsion, probablement à cause d'un mécanisme de cristallisation homogène résultant de la ségrégation des impuretés dans les gouttelettes (Campbell *et al.*, 2002).

La dispersion d'alkanes et de triglycérides sous forme d'émulsion aurait enfin un effet sur les types de cristaux formés (Montenegro *et al.*, 2003 ; Bunjes *et al.*, 2000) comparé à ces matières grasses cristallisées en système anhydre pur. Lopez et Ollivon (2009a) ont montré la cocrystallisation d'un mélange miglyol - beurre de cacao en anhydre, alors qu'il y avait ségrégation des triacylglycérols issus de ces deux matières grasses en émulsion. De plus, les cristaux formés en émulsion seraient moins bien organisés qu'en système anhydre ou de plus petite taille (Lopez et Ollivon, 2009a), probablement en relation avec les contraintes résultantes de la courbure de l'interface des gouttelettes.

2. Effets de la taille des gouttelettes

La taille des gouttelettes d'émulsion a un effet notable sur la cristallisation des matières grasses, mais moindre sur le comportement de fusion de celles-ci (McClements *et al.*, 1993a). Il semble exister une taille seuil aux alentours de 1 µm en dessous de laquelle les gouttelettes d'émulsion cristalliseraient à partir d'un processus de nucléation homogène uniquement (**Figure B-14**, McClements *et al.*, 1993a ; Walstra et van Beresteyn, 1975 ; Palanuwech et Coupland, 2003). En effet, des émulsions de *n*-hexadécane avec un diamètre de 3 µm environ cristalliseraient ~5°C au dessus des mêmes émulsions de *n*-hexadécane avec un diamètre d'environ 1 µm. En-dessous de ce seuil de 1 µm, un effet de diminution de la

taille des gouttelettes a encore été reporté, bien que moins marqué, il diminuerait encore la température de début de cristallisation (McClements *et al.*, 1993a).

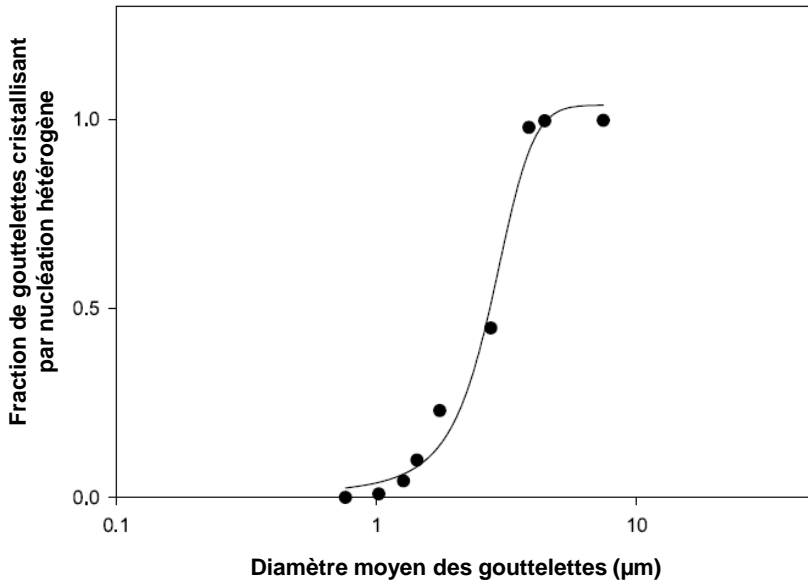


Figure B-14 : proportion de gouttelettes d'émulsion qui cristallisent par nucléation hétérogène en fonction du diamètre des gouttelettes (d'après Palanuwech et Coupland, 2003).

L'effet de la taille sur la température de fusion est controversé mais serait très faible comparé à l'effet sur la température de cristallisation (McClements *et al.*, 1993a ; Dickinson *et al.*, 1991 ; Palanuwech et Coupland, 2003 ; Bunjes *et al.*, 2000). La surfusion nécessaire pour cristalliser des gouttelettes d'émulsion serait donc augmentée lorsque la taille diminue (Montenegro *et al.*, 2003). De plus, l'enthalpie de fusion diminue avec la taille des gouttelettes (Bunjes *et al.*, 2000).

En ce qui concerne la vitesse de nucléation, elle diminue avec la taille des gouttelettes. Cela serait encore dû à la théorie de la nucléation selon laquelle les gouttelettes de plus petite taille prendraient plus de temps à cristalliser à cause de la probabilité plus faible de former un *nucleus*. Cette probabilité plus faible vient notamment de la moindre occurrence d'impuretés catalysant la nucléation dans les gouttelettes (Dickinson *et al.*, 1991).

3. Effets de la composition de l'interface

Comme pour l'effet de la taille des gouttelettes, la nature des molécules de l'interface stabilisant les gouttelettes d'émulsion a une forte influence sur la cristallisation des matières grasses, mais bien plus faible sur la fusion. La diminution de la tension interfaciale dépend du type d'émulsifiants. Cette diminution a pour conséquence de jouer sur la distance où les

cristaux peuvent saillir de l'interface huile / eau, et ainsi induire la cristallisation dans des gouttelettes entrant en collision (McClements *et al.*, 1993b). L'épaisseur de la surface d'émulsion, dépendant de la nature de l'émulsifiant, apparaît donc comme un paramètre déterminant dans l'évaluation de la stabilité physique de l'émulsion (Palanuwech et Coupland, 2003). Plus l'épaisseur de l'interface est petite et plus l'émulsion est susceptible de coalescer partiellement.

La nature de l'interface pourrait également avoir une influence sur la stabilité des matières grasses émulsionnées au refroidissement et au chauffage. Au refroidissement, une interface hydrophobe (Tween 20 par exemple) peut interagir avec les lipides du cœur des gouttelettes d'émulsion de *n*-hexadécane pour accélérer la nucléation hétérogène qui se produit à l'interface (**Figure B-15**, Kaneko *et al.*, 1999). La longueur et le degré d'insaturation des chaînes d'acides gras dans des émulsifiants hydrophobes jouent également sur la température de cristallisation : dans des fractions d'huile de palme, les acides gras les plus courts ($C < 14$) retardent la cristallisation alors que les plus longs et saturés la promeuvent (Sonoda *et al.*, 2006 ; Lopez et Ollivon, 2009a). Au chauffage, les lipides les plus proches de l'interface des gouttelettes seraient mélangés aux terminaisons des surfactants de l'interface, conduisant à une fusion à plus basse température que pour les lipides de cœur des gouttelettes d'émulsion (Gülseren et Coupland, 2007a). Cet effet de mélange n'a été observé qu'avec des alcanes purs stabilisés par du Tween 20, mais non par du caséinate de sodium. Cela proviendrait de la structure du caséinate très différente de celle des lipides de cœur ne permettant pas cet effet de mélange.

Les émulsifiants hydrophobe ont également eu un effet sur les types de cristaux formés en émulsions de *n*-hexadécane (Awad *et al.*, 2001a ; Ueno *et al.*, 2003) et des fractions d'huile de palme (Awad et Sato, 2001b ; Awad et Sato, 2002). Cet effet a été expliqué par des processus de nucléation hétérogène dans la phase lipidique des émulsions (**Figure B-15**).

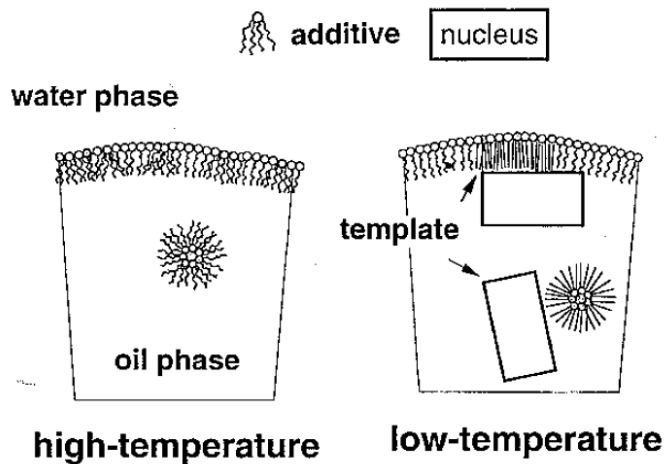


Figure B-15 : modèle de nucléation hétérogène en émulsions huile / eau avec additifs hydrophobes (d'après Awad et Sato, 2002).

V. POLYMORPHISME ET STRUCTURES MOLECULAIRES DES TRIACYLGLYCEROLS

Le polymorphisme d'une molécule est défini par la faculté de cette molécule à pouvoir cristalliser sous plusieurs formes cristallines correspondant à des arrangements moléculaires différents. Dans le cas des triacylglycérols, le polymorphisme résulte de l'organisation spatiale des chaînes aliphatiques d'acides gras et de l'empilement des strates de triacylglycérols (Timms, 1984 ; Small, 1986). Le polymorphisme des triacylglycérols a été détaillé dans de nombreux articles de revue et ouvrages scientifiques ; on citera notamment Timms, 1984 ; Small, 1986 ; Garti et Sato, 1988 ; Ollivon, 1992 ; Sato, 1996 ; Garti et Sato, 2001 ; Ghotra *et al.*, 2002 ; Himawan, 2006.

Le polymorphisme des triacylglycérols est de type monotropique, ce qui signifie que les transitions cristallines sont irréversibles et vont des formes cristallines les moins stables vers les formes cristallines les plus stables thermodynamiquement à condition de laisser suffisamment de temps au système pour évoluer. En conséquence, toutes les variétés polymorphiques peuvent être obtenues à partir du liquide. Les transitions entre les états solides sont considérées comme extrêmement lentes (Ollivon, 1992).

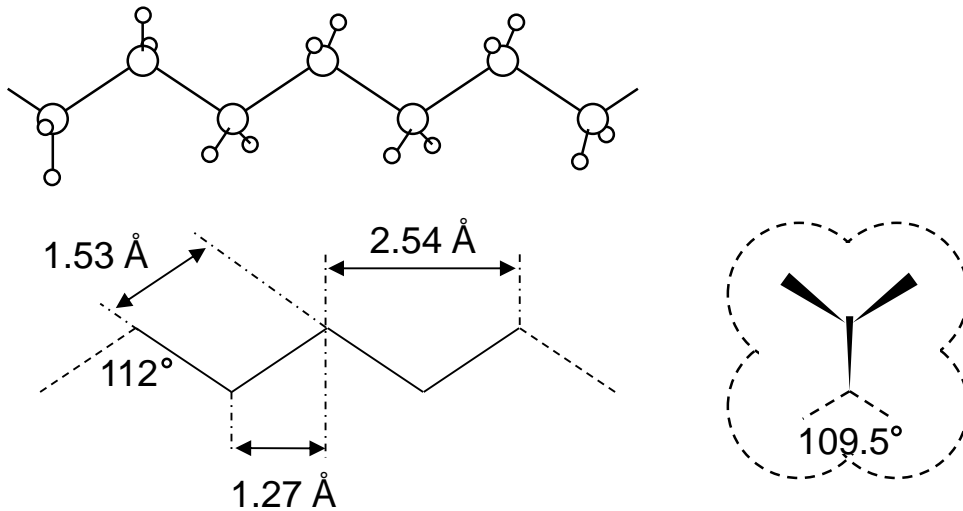


Figure B-16 : représentation schématique de la configuration de plus basse énergie des zig-zag plans des chaînes hydrocarbonées aliphatiques (conformation *trans*) (d'après Small, 1986).

A l'état solide, les chaînes aliphatiques d'acides gras se présentent sous la forme d'un zig-zag plan où les groupements méthyles sont en position *trans* (**Figure B-16**). Les interactions entre chaînes hydrocarbonées se font par l'intermédiaire de forces de Van der Waals – London agissant à de faibles distances entre molécules (Ghotra *et al.*, 2002). L'assemblage des chaînes aliphatiques dans un cristal est conditionné par ce type d'interactions, conduisant à la formation d'assemblages parallèles entre les chaînes, ainsi qu'à la formation de strates. Ainsi, deux états d'organisation interviennent dans la caractérisation d'un cristal de triacylglycerols à l'échelle moléculaire : l'organisation latérale et longitudinale qui sont à l'origine du polymorphisme.

A. Organisation latérale

Ce sont les différentes sous-cellules cristallines que peuvent adopter les chaînes aliphatiques des triacylgcérols.

1. La forme polymorphique α

Il s'agit d'une sous-cellule de type hexagonale (H), relativement peu compacte (25-26 Å³ par CH₂, Ollivon et Perron, 1992 ; Lopez *et al.*, 2002b), formée à la suite de refroidissements rapides. Les chaînes aliphatiques des acides gras n'ont pas d'orientation particulière et tournent librement les unes par rapport aux autres (Ollivon et Perron, 1992).

C'est la sous-cellule cristalline la moins stable, ses chaînes aliphatiques d'acides gras étant perpendiculaires au plan formé par les groupes méthyles terminaux. Il existe également une forme similaire appelée sub- α qui se forme à des températures plus faibles.

2. Les formes polymorphiques β' et β

Il s'agit de sous-cellules plus compactes que la forme α ($23,4-23,6 \text{ \AA}^3$ par CH_2 , Ollivon et Perron, 1992 ; Lopez *et al.*, 2002b). Elles sont respectivement de type orthorhombique perpendiculaire ($\text{O}\perp$) et triclinique parallèle ($\text{T}\parallel$). Les chaînes aliphatiques des acides gras sont inclinées par rapport au plan formé par les groupes méthyles terminaux d'un angle allant de 50° à 70° . Pour les triacylglycérols saturés purs, la variété cristalline la plus stable est généralement la forme β , mais la forme β' peut être la plus stable dans le cas de mélanges de triacylglycérols où la variété β ne peut pas se former.

La **Figure B-17** montre les représentations schématisées des 3 principales variétés polymorphiques adoptées par les triacylglycérols.

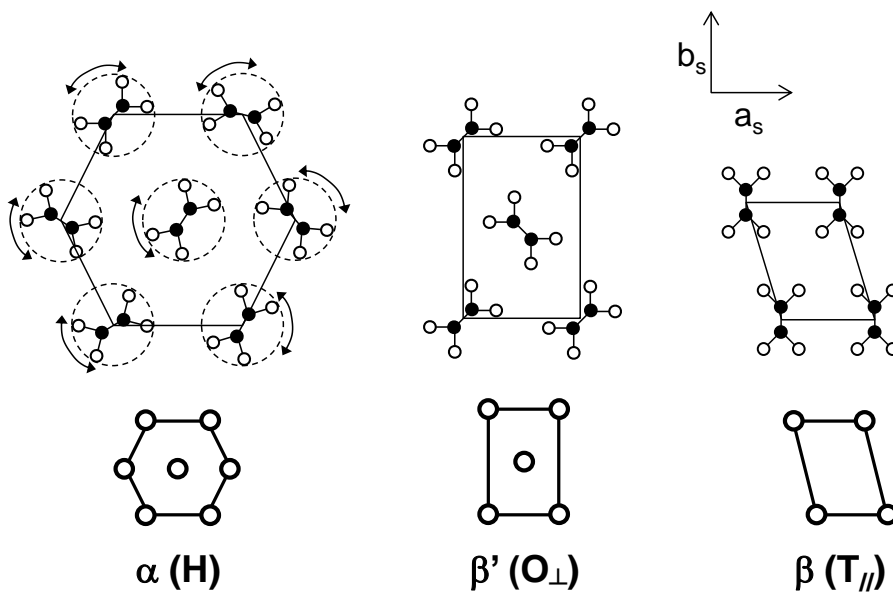


Figure B-17 : principales sous-cellules cristallines adoptées par les chaînes aliphatiques des triacylglycérols (projection sur le plan $a_s b_s$, a_s et b_s définissant la base de la sous-cellule) (schématisé à partir de Small, 1986 dans Ollivon et Perron, 1992).

Le diagramme énergie libre-température montre la stabilité des différentes formes polymorphiques en fonction de la température (**Figure B-18**). Les transitions polymorphiques sont déterminées par l'évolution de l'énergie libre vers les valeurs plus basses. A partir de cette **Figure B-18**, nous voyons que bien que la variété polymorphique β soit la plus stable en

dessous de $T_{f\beta}$, les variétés α et β' peuvent être formées grâce à l'existence du phénomène de surfusion ajouté à des vitesses de refroidissement rapides (Ollivon, 1992).

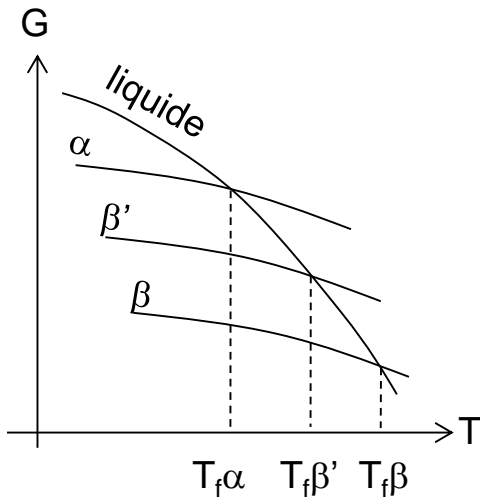


Figure B-18 : Variation de l'enthalpie libre en fonction de la température pour les trois variétés polymorphiques principales α , β' et β , ainsi que le liquide d'un triacylglycérol type. $T_{f\alpha}$, $T_{f\beta'}$, $T_{f\beta}$ sont les températures de fusion respectives des trois polymorphes. (d'après Ollivon, 1992 ; Sato et Ueno, 2001).

Les transitions polymorphiques possibles peuvent être résumées sous forme schématique comme dans la **Figure B-19**. Cette figure tient compte de l'état cristal-liquide (Sato et Ueno, 2001).

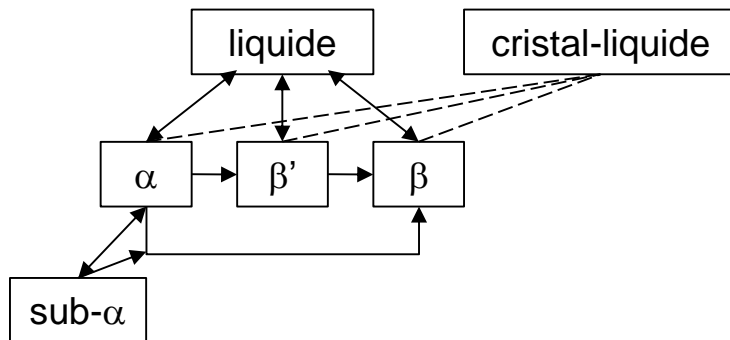


Figure B-19 : transformations polymorphiques possibles pour les triacylglycérols (d'après Hernqvist, 1988 ; Ollivon, 1992 ; Sato et Ueno, 2001).

B. Organisation longitudinale

Il s'agit de l'empilement des triacylglycérols sous forme de strates. L'épaisseur des strates est proportionnelle à la longueur des chaînes aliphatiques (L), elle-même proportionnelle au nombre d'atomes de carbones qui les composent (n) : $L = 1,27*n + b$ (où la valeur 1,27 correspond à la distance carbone-carbone pour la configuration de plus basse

énergie formée par les zig-zag plans des chaînes aliphatiques et b dépend de la nature des groupements polaires terminaux des empilements) (**Figure B-20**, Ollivon, 1992).

Dans les strates, les triacylglycérols seraient en configuration « chaise », avec une chaîne d'acide gras orientée dans la direction opposée aux deux autres. De cette manière, les organisations longitudinales des triacylglycérols seraient à 2 longueurs de chaînes ou 3 longueurs de chaînes majoritairement, plus rarement 4L ou 6L (Small, 1986). L'épaisseur des strates reflète alors le nombre de chaînes aliphatiques superposées dans la strate.

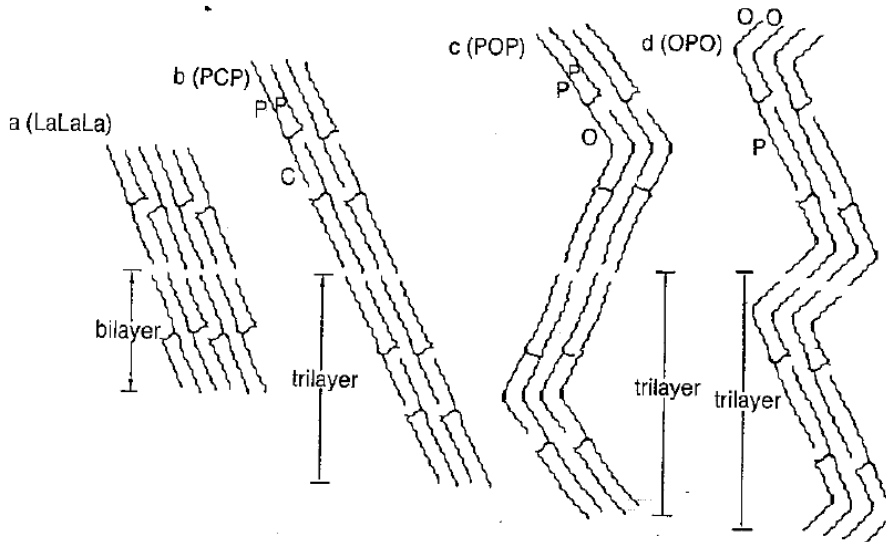


Figure B-20 : organisation longitudinales possibles des triacylglycérols : 2L (a), 3L (b, c) et 6L (d) (d'après Ollivon, 1992).

Les organisations longitudinales des chaînes d'acides gras dépendent de la symétrie du triacylglycérol considéré. Les triacylglycérols présentant un défaut d'empilement (insaturation ou acides gras de différente longueur) ont tendance à former des strates de type 3L, avec ségrégation de la chaîne présentant le défaut. Les triacylglycérols possédant des acides gras similaires en longueur de chaînes et en insaturations donnent des strates de type 2L (Larsson, 1994). Cette organisation est susceptible d'être convertie de 2L en 3L ou inversement au cours de transitions polymorphiques (Sato, 1996).

C. Organisation à l'état liquide

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'organisation des triacylglycérols à l'état liquide. En particulier, trois modèles sont généralement cités.

1. Modèle smectique

C'est le modèle proposé par Larsson (1972), étayé par le même auteur en 1992 et basé sur des mesures de diffraction des rayons X (DRX), qui suggère que les triacylglycérols à l'état fondu s'organisent sous forme de lamelles cristal-liquide. En effet, un pic de diffraction large (signal large de diffusion du liquide) est observé aux petits et aux grands angles par diffraction des rayons X lorsque les triacylglycérols sont fondus. Ce modèle est soutenu par les mesures de spectroscopie Raman et DRX réalisées par Hernqvist (1984). Les chaînes de triacylglycérols fondues lâches seraient organisées en bicouches mobiles peu organisées.

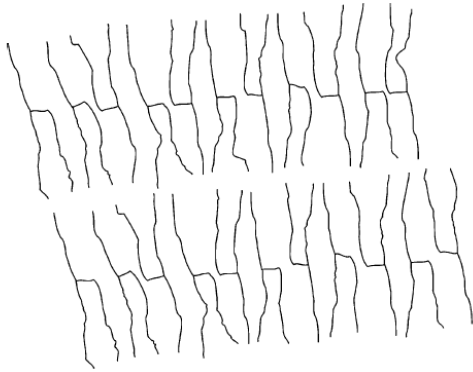


Figure B-21 : représentation du modèle smectique de l'état liquide des triacylglycérols (d'après Larsson, 1972).

2. Modèle nématique

C'est le modèle proposé par Cebula *et al.* (1992) à partir d'observations de diffraction des neutrons aux grands angles sur la trilaurine fondue. Ce modèle se base uniquement sur des observations réalisées aux grands angles de diffraction. Cependant, ces auteurs n'ont pas interprété les signaux larges de diffusion apparaissant aux petits angles de diffraction des rayons X en tant que structuration particulière.

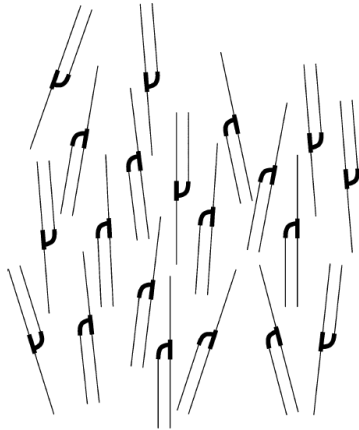


Figure B-22 : représentation du modèle nématique de l'état liquide des triacylglycérols (d'après Cebula *et al.*, 1992).

3. Modèle discotique

C'est le modèle proposé par Corkery *et al.* (2007) (**Figure B-23**) sur la base d'observations réalisées sur des molécules adoptant des structures de cristaux liquides et sur la base de simulations informatiques. Ce modèle a été appuyé par une étude par spectroscopie Raman, montrant qu'il était au moins plausible (Da Silva et Rousseau, 2008). Ce modèle permettrait d'expliquer les résultats différents obtenus par Larsson (1972) et Cebula *et al.* (1992).

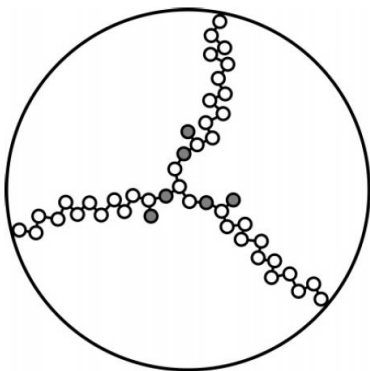


Figure B-23 : représentation du modèle discotique de l'état liquide des triacylglycérols (d'après Corkery *et al.*, 2007). Les atomes de carbones sont représentés en blanc sur la figure, les atomes d'oxygène sont en gris. Le glycérol est au centre du cercle représentant l'encombrement du triacylglycérol à l'état fondu.

D. Propriétés thermiques des triacylglycérols

Toutes les variétés polymorphiques observées (sub- α , α , β') exceptée la plus stable (β' ou β selon les triacylglycérols ou la matière grasse) sont hors d'équilibre

thermodynamique et tendent à évoluer vers des variétés plus stables. Ces variétés métastables sont accessibles à partir de traitements thermiques adaptés, notamment suite à des refroidissements rapides (Ollivon, 1992). Cependant, la vitesse de refroidissement joue un rôle très important sur les phénomènes de nucléation et croissance cristalline de ces molécules en lien avec le phénomène de surfusion notamment (Boistelle, 1988), alors que la fusion ne présente pas de retard, ce qui explique qu'elle soit généralement utilisée pour étudier les propriétés thermiques des triacylglycérols. Les caractéristiques thermiques des principaux triacylglycérols sont rassemblées dans différents ouvrages (Hagemann, 1988 ; Wesdorp, 1990 ; Ollivon, 1992). Les propriétés thermiques des triacylglycérols dépendent directement de la nature des acides gras qui les composent, notamment en termes de longueur de chaîne et d'insaturation.

1. Propriétés thermiques de acides gras

Le **Tableau B-8** présente les points de fusion des principaux acides gras présents dans la matière grasse laitière.

Tableau B-8 : températures de fusion des principaux acides gras du lait de vache (d'après Knothe et Dunn, 2009 ; Uehara *et al.*, 2008).

Acide gras	Température de fusion (°C)
C4:0	-7,9
C6:0	-3,4
C8:0	15,4
C10:0	30,8
C12:0	43,3
C14:0	53,5
C15:0	52,2
C16:0	62,2
C17:0	60,9
C18:0	69,3
C16:1	1,2
C18:1 <i>c9</i>	16,3
C18:1 <i>t11</i>	43,4
C18:2 <i>c9,c12</i>	-7,2
C18:2 <i>c9,t11</i>	14,9
C18:3 <i>c9,c12,c15</i>	-11,6

La température de fusion des acides gras augmente avec la longueur de chaîne pour les séries paires et impaires. Il existe une alternance des températures de fusion entre les acides gras à longueur de chaîne paire et impaire lorsque la longueur de chaîne augmente. En revanche, à longueur de chaîne égale, la température de fusion des acides gras diminue

lorsque l'insaturation augmente : C18:3 < C18:2 < C18:1 < C18:0 pour des insaturations *cis*. Enfin, un acide gras avec une insaturation *trans* a une température de fusion intermédiaire entre celle de l'acide gras saturé de même longueur de chaîne et celle d'un acide gras insaturé *cis* de même longueur de chaîne : C18:1 *c9* < C18:1 *t11* < C18:0. Cela provient de la structure plus linéaire des acides gras à chaînes *trans* par rapport à *cis*. Cette linéarité rapproche un acide gras *trans* de son homologue saturé en terme de structure et donc de propriétés physiques résultantes.

2. Propriétés thermiques de triacylglycérols purs

Le **Tableau B-9** présente les températures et enthalpies de fusion des différentes formes polymorphiques de quelques triacylglycérols suivant leur longueur de chaîne et insaturation.

Tableau B-9 : Températures et enthalpies de fusion des variétés polymorphiques de différents triacylglycérols suivant leur longueur de chaîne et degré d'insaturation (d'après Sato et Garti, 1988 ; Wesdorp, 1990 ; Ollivon, 1992 ; Knothe et Dunn, 2009).

Triacylglycérol	Température (°C) et enthalpie de fusion (kJ/mol)			
	α	β'_2	β'_1	β
CaCaCa	[-10 ; -7] 56,5	18	26	[30,4 ; 33] [92,1 ; 93,4]
LaLaLa	[14 ; 15,2] [60,3 ; 72,0]	34	40	[46 ; 46,5] [114,3 ; 116,4]
MyMyMy	[31 ; 32,8] [78,7 ; 85,0]	45	51	[56 ; 58,5] [135,2 ; 136,9]
PPP	[46 ; 44,7] [93,4 ; 103,0]	53	57	[66 ; 66,4] [163,3 ; 165,8]
SSS	[55 ; 54,7] [109,3 ; 112,2]	61 126,7	64	[73 ; 73,5] [188,4 ; 191,8]
SOS	[22,3 ; 29,5] 73		[33 ; 37] 111	[42 ; 44] [151,9 ; 192,9]
SSO	[26,7 ; 30,6] 71		[30,3 ; 43,5] [125,5 ; 171,3]	[38,5 ; 42,5]
SES	46,0		58	61 161,1
SOO	[-1,5 ; 2,7]		8,6 109,6	[22,5 ; 23,5] 94,2
OOO	[-37 ; -32] 37	-8	-5 79	[4,0 ; 5] [95,6 ; 113,1]

La température de fusion des variétés polymorphiques des triacylglycérols suivent les mêmes règles que pour les acides gras constitutifs : elle diminue avec la longueur de

chaîne des acides gras (CaCaCa < LaLaLa < MyMyMy < PPP < SSS), ainsi que lorsque le degré d'insaturation augmente pour des acides gras de même longueur de chaîne (OOO < SOO < SOS < SSS). Une insaturation *cis* diminue plus la température de fusion qu'une insaturation *trans* par rapport au triacylglycérol à même longueur de chaîne trisaturé (SOS < SES < SSS). La position d'une insaturation en termes de stéréospécificité des acides gras sur le glycérol joue également sur les paramètres thermiques.

3. Propriétés thermiques de triacylglycérols en mélanges

L'étude des propriétés thermiques des triacylglycérols en mélanges permet une meilleure compréhension du comportement physique des matières grasses naturelles complexes. Des mélanges binaires voire ternaires ont notamment été utilisés pour simplifier ces systèmes complexes et établir des diagrammes de phase. Ces diagrammes de phase mettent en évidence la compatibilité des triacylglycérols entre eux, c'est-à-dire leur capacité à former des cristaux mixtes. Plus les triacylglycérols se ressemblent en structure et plus il leur est possible de former ces cristaux mixtes. A titre d'exemple, la **Figure B-24** montre les diagrammes de phase de triacylglycérols saturés monoacides en fonction de leur longueur de chaîne (Wesdorp, 1990).

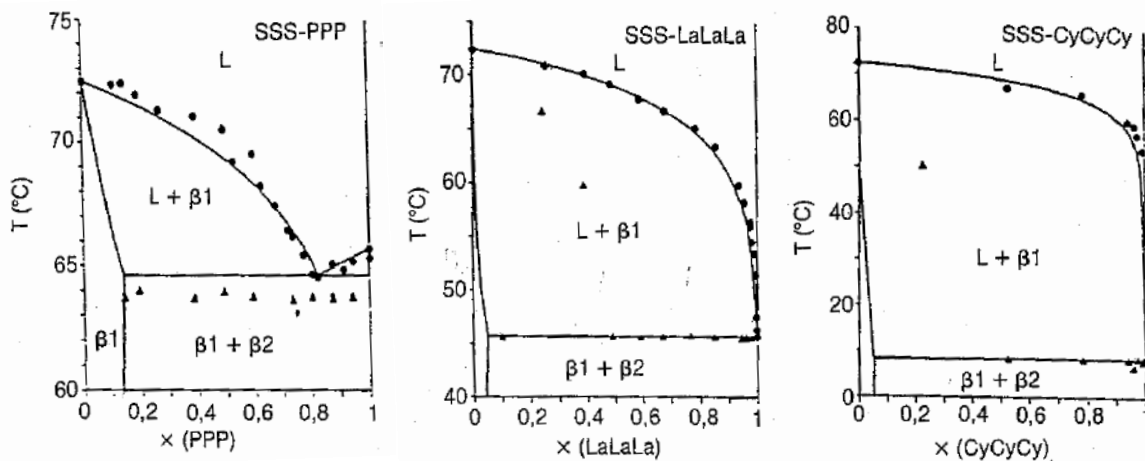


Figure B-24 : Diagrammes de phase de triacylglycérols saturés monoacides, SSS-PPP, SSS-LaLaLa, SSS-CyCyCy, ayant des acides gras différent de 2, 6 et 10 atomes de carbone, respectivement (d'après Wesdorp, 1990).

Plus les triacylglycérols sont différents au niveau moléculaire et plus les domaines d'existence des solutions solides (cristaux mixtes) sont restreints. Ces différences s'expliquent par des différences de longueurs de chaînes, d'organisation des plans méthyles terminaux, de

la présence d'insaturations, leur nombre, leur place sur la chaîne, leur type *cis* ou *trans* et tout paramètre qui risque de perturber l'empilement compact des chaînes (Ollivon, 1992).

Une partie répertoriant les différentes méthodes pour caractériser le polymorphisme des triacylglycérols est reportée en **Annexe I**. Pour plus d'information à ce sujet, se reporter à cette annexe.

VI. POLYMORPHISME ET COMPORTEMENT THERMIQUE DES TRIACYLGLYCEROLS LAITIERS

A. Matière grasse laitière anhydre et ses fractions

1. Propriétés thermiques de la matière grasse laitière

La matière grasse laitière est formée de plusieurs groupes de triacylglycérols qui cristallisent et fondent séparément et se comportent comme des solutions solides indépendantes (Timms, 1980). Les propriétés thermiques de la matière grasse laitière sont généralement étudiées par des méthodes calorimétriques.

Timms (1979) présente un profil de fusion de la matière grasse laitière enregistré par MCD en chauffage à 10°C/min de -43°C à 67°C après un refroidissement depuis 67°C à 5°C/min (**Figure B-25**). Le profil montre l'existence de 3 plages de fusion déjà observées par Sherbon (1974).

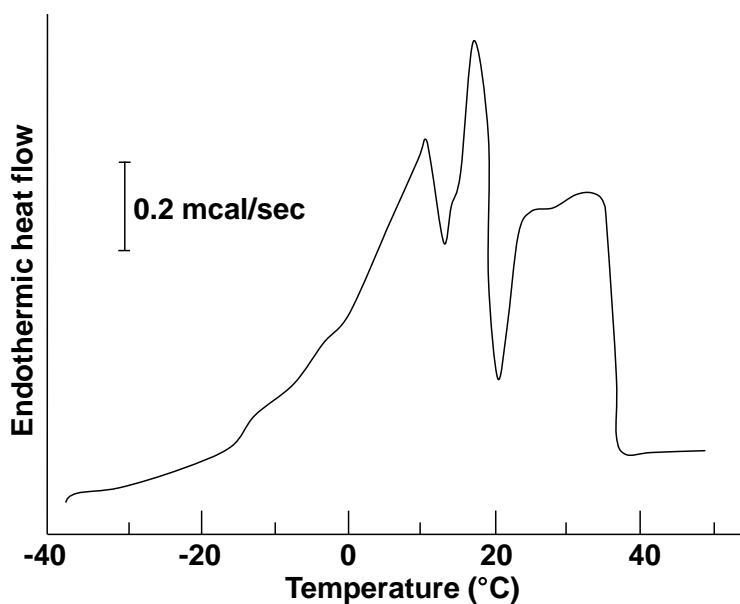


Figure B-25 : Thermogramme de fusion de la matière grasse laitière anhydre enregistré au cours d'un chauffage à 10°C/min après refroidissement de 67°C à -43°C à 5°C/min et stabilisation pendant 5 min à -43°C (d'après Timms, 1979).

Les différents pics de fusion de la matière grasse traduisent la disparition d'édifices cristallins de différents types. Les enthalpies et positions des pics varient avec l'histoire thermique des échantillons (Timms, 1980).

Timms (1980) sépare la matière grasse laitière en 3 fractions sur la base d'observations faites par calorimétrie. Ces fractions appelées à bas point de fusion (BPF), moyen point de fusion (MPF) et haut point de fusion (HPF) représentent selon lui 70%, 24% et 6% de la matière grasse laitière totale, respectivement. En recombinaison des fractions à BPF et HPF, Timms (1980) montre que la fraction à MPF est une fraction indépendante et non une solution solide de fractions à BPF et HPF. Les températures de fusion de ces 3 fractions ont été évaluées par Timms (1980) à $< 15^{\circ}\text{C}$ pour la fraction à BPF, comprise entre 35 et 50°C pour la fraction à MPF et $> 50^{\circ}\text{C}$ pour la fraction à HPF.

Lavigne (1995) étudie en détail le polymorphisme des fractions de la matière grasse laitière obtenues par fractionnement physique sur un pilote industriel, ainsi que leur composition (**Figure B-26**). Il conforte les hypothèses de Timms (1980) selon lesquelles i) la fraction à BPF est composée de triacylglycérols comprenant $1/3$ d'acides gras saturés à longue chaîne et $2/3$ d'acides gras insaturés ou à courtes chaînes type POO ou BuPO ; ii) la fraction à MPF est composée de triacylglycérols comprenant $2/3$ d'acides gras saturés à longue chaîne et $1/3$ d'acides gras insaturés ou à courtes chaînes type PPO ou BuPP ; et iii) la fraction à HPF est composée de triacylglycérols comprenant des acides gras saturés à longue chaîne type PPP et des triacylglycérols avec un acide gras insaturé à longue chaîne de type PPO (Lavigne *et al.*, 1997).

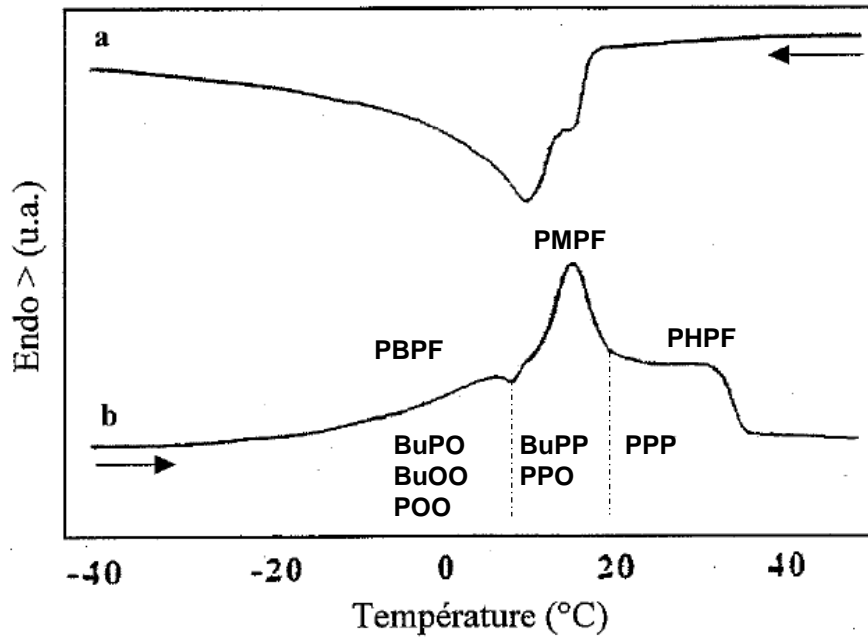


Figure B-26 : **a.** Thermogramme de cristallisation de la matière grasse laitière anhydre enregistré au cours d'un refroidissement à 5°C/min. **b.** Thermogramme de fusion de la matière grasse laitière anhydre avec les principaux triacylglycérols correspondant aux pics à bas point de fusion (PBPF), à moyen point de fusion (PMPF) et à haut point de fusion (PHPF) enregistré au cours d'un chauffage à 5°C/min (d'après Lavigne, 1995).

Marangoni et Lencki (1998) construisent les diagrammes de phases ternaires sur la base des mesures de quantité de phase solide en recombinaison les 3 fractions majeures de la matière grasse laitière. Ils montrent alors qu'il existe un degré de complémentarité important entre les fractions à MPF et HPF, les rendant totalement miscibles à l'état solide. La fraction à BPF recombinaison avec la fraction à MPF ou HPF formerait des solutions solides partielles, suggérant que des triacylglycérols de la fraction à BPF seraient incorporés dans les fractions à MPF et HPF.

Mazzanti *et al.* (2008, 2009) ont utilisé le couplage entre la diffraction des rayons X et la rhéologie pour montrer que la matière grasse laitière sous cisaillement cristallise en deux étapes, incluant une transition de phase $\alpha \rightarrow \beta'$. Ils ont montré qu'en isotherme, une vitesse de cisaillement plus grande réduisait la température de transition de phase de α en β' , sans avoir d'effet marqué sur la cinétique de croissance de chacune des phases. Cela serait dû à la ségrégation de petites cristallites produites par le cisaillement, donnant lieu à des sites de nucléation plus nombreux pour la transition de phase en β' , et des changements de composition des cristaux α et du liquide induits par le cisaillement. La comparaison entre la cristallisation de la matière grasse laitière anhydre contenant les triacylglycérols et tous ses

composés mineurs (phospholipides...) avec celle des triacylglycérols laitiers purs a permis de conforter les résultats de Wright *et al.* (2000) selon lesquels les composés mineurs retarderaient la nucléation et la croissance de la phase β' .

2. Le polymorphisme de la matière grasse laitière

La première référence quant à l'existence d'un polymorphisme dans la matière grasse laitière date de l'étude de Mulder (1953) dans laquelle il montre par dilatométrie que la matière grasse laitière possède un double point de fusion après avoir été refroidie rapidement. Cet auteur suggère également la formation de cristaux mixtes contenant plusieurs types de triacylglycérols.

DeMan (1961) a montré par diffraction des rayons X qu'un refroidissement rapide conduisait à la formation de cristaux caractérisés par deux pics de diffraction à 3,8 Å 4,2 Å indicateurs d'une sous-cellule β' . A la suite d'un refroidissement lent, il a observé la présence de pics de diffraction à 3,8, 4,2 et 4,6 Å, indicateurs de sous-cellules β' et β . Aux petits angles de diffraction, les empilements des chaînes d'acides gras montrent une distance de répétition de 41,2-41,8 Å (**Figure B-27**).

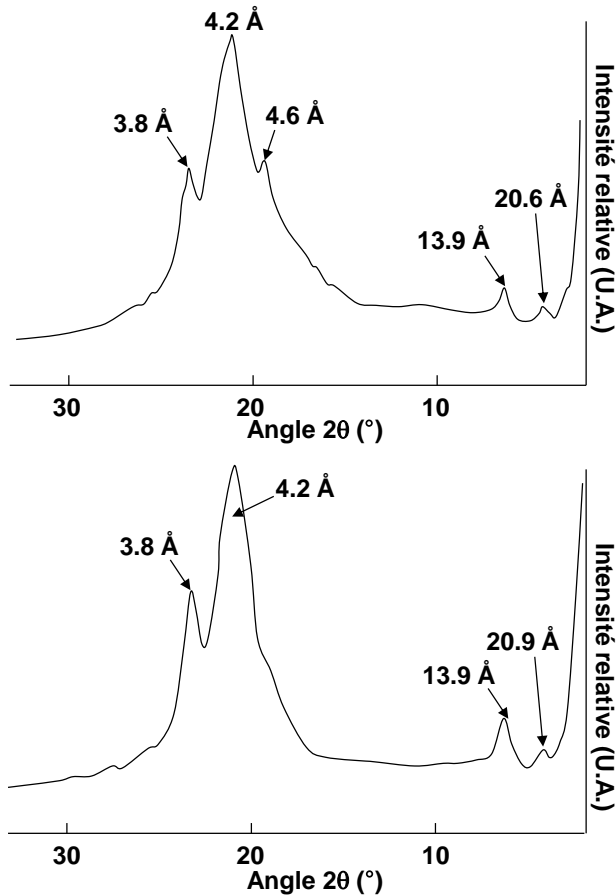


Figure B-27 : diagrammes de diffraction des rayons X enregistrés après un refroidissement lent (haut) et rapide (bas) de la matière grasse laitière anhydre (d'après DeMan, 1961).

Woodrow et DeMan (1968) montrent dans leur étude sur le comportement polymorphique de la matière grasse laitière par spectroscopie infrarouge et diffraction des rayons X qu'un refroidissement rapide à 5°C conduit à la formation de variété polymorphique α , se transformant au cours du temps en β' puis β' et β .

Van Beresteyn (1972) étaye les conclusions déjà obtenues par Woodrow et DeMan (1968) sur la formation d'une variété polymorphique α à basse température (11°C ici) qui se réorganise à température constante en β' , et lors d'un chauffage suivant le schéma : $\alpha \rightarrow \beta' \rightarrow \beta$. Les points de fusion des formes polymorphiques ont été déterminés à 22°C, 30°C et 36°C respectivement. Les transitions polymorphiques de α en β' et de β' en β seraient favorisées par des quantités importantes d'huile dans la matière grasse (Timms, 1979 ; DeMan, 1992 ; Cisneros *et al.*, 2006). Wright *et al.* (2005) ont démontré la formation de cristaux β lorsque la matière grasse laitière est diluée dans de l'huile de colza à raison de 1:8. La cristallisation en β a été attribuée à la diminution de la viscosité due à la grande quantité de

phase liquide, permettant la diffusion des triacylglycérols dans le milieu liquide et la formation de cristaux plus stables.

Plus récemment, Ten Grotenhuis *et al.* (1999) utilise le rayonnement synchrotron pour mettre en évidence les formes polymorphiques adoptées par la matière grasse laitière en fonction de la température et des vitesses de refroidissement de 0,5 à 20°C/min. Ils ont identifié 3 formes polymorphiques : sub- α , α et β' , par ordre de stabilité croissante. Aucune forme polymorphique β n'a été identifiée, expliqué par les auteurs par la complexité de composition de la matière grasse laitière.

Lopez *et al.* ont publié une série d'études (2001c, 2001d, 2005a) sur le comportement de cristallisation de la matière grasse laitière anhydre en fonction de la vitesse de refroidissement de 0.1 à 1000°C/min afin de mettre en évidence le polymorphisme des triacylglycérols laitiers. Ils ont mis en évidence des coexistences de cristaux de types 2L (40,5 à 47 Å d'épaisseur) et 3L (62 à 72 Å d'épaisseur) associés à des formes polymorphiques de types sub- α , α , β' et β suivant le passé thermique de l'échantillon (**Figure B-28**). Des réorganisations polymorphiques ont également été mises en évidence en conditions isotherme à la suite d'un refroidissement brutal (Lopez *et al.*, 2001c).

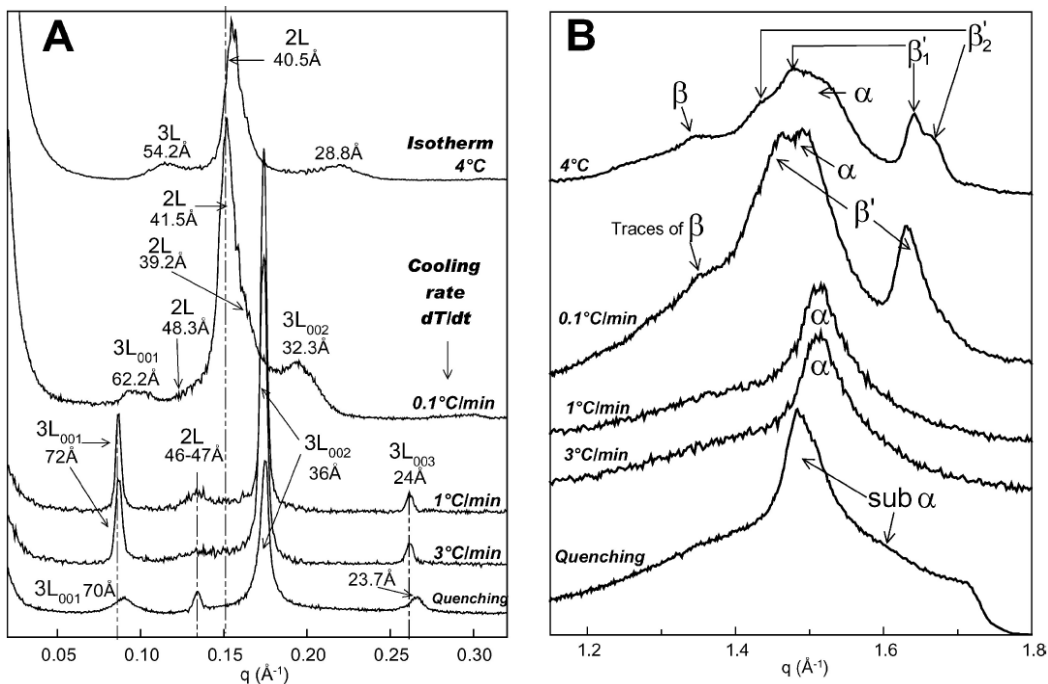


Figure B-28 : structures cristallines formées par les triacylglycérols laitiers anhydres à -8°C après refroidissement à différentes vitesses (indiquée sur la figure). **A.** Organisation longitudinale des triacylglycérols, caractérisée par diffraction des rayons X aux petits angles ; **B.** Organisation latérale des chaînes d'acides gras des triacylglycérols, caractérisée par diffraction des rayons X aux grands angles (d'après Lopez *et al.*, 2005a).

Afin de comprendre et caractériser la stabilité des structures cristallines formées lors des refroidissements mis en place dans les études de Lopez *et al.* (2001c, 2001d, 2002b, 2005a), Karray *et al.* (2004 et 2005) et Ben-Amara Dali *et al.* (2005 et 2007), la matière grasse étudiée a été systématiquement chauffée. Au cours de ces chauffages, le comportement de fusion de la matière grasse laitière a montré l'existence de réarrangements cristallins ou transitions polymorphiques comme montré en **Figure B-29**.

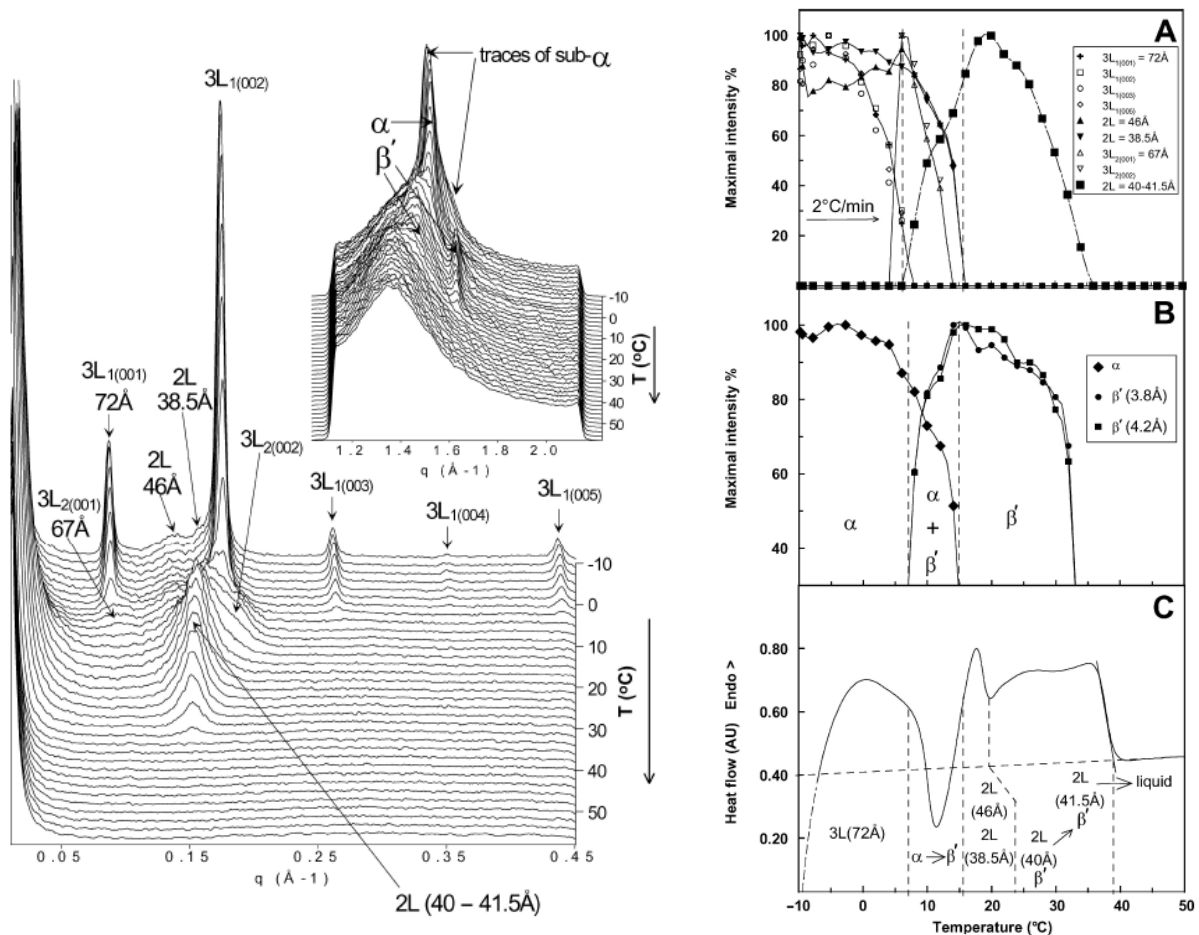


Figure B-29 : gauche : diagrammes de diffraction des rayons X (DRX) enregistrés en fonction de la température au cours du chauffage de matière grasse laitière anhydre à 2°C/min après refroidissement de 60°C à -10°C à 3°C/min (figure principale = petits angles ; insert = grands angles). **Droite :** évolution des intensités des pics de DRX (A = petits angles ; B = grands angles) en fonction de la température et analyse du thermogramme de fusion (C) pour le même échantillon (d'après Lopez *et al.*, 2005a)

La fusion ou réorganisation à différentes températures des cristaux formés suite au refroidissement (**Figure B-29**) dénote bien la ségrégation des triacylglycérols dans des structures différentes, ainsi que leur polymorphisme.

Lopez *et al.* (2006b) et Lopez et Ollivon (2009b) ont étudié plus particulièrement le polymorphisme de fractions oléiques et stéariques de la matière grasse laitière. Ces fractions

sont communément utilisées en industrie laitière pour la fabrication d'ingrédients et de beurre. Un diagramme de phase solide-liquide et une modélisation moléculaire de la phase liquide ont été proposés par Lopez et Ollivon (2009b) pour mieux comprendre la stabilité des différentes phases cristallines en fonction de la température (**Figure B-30**).

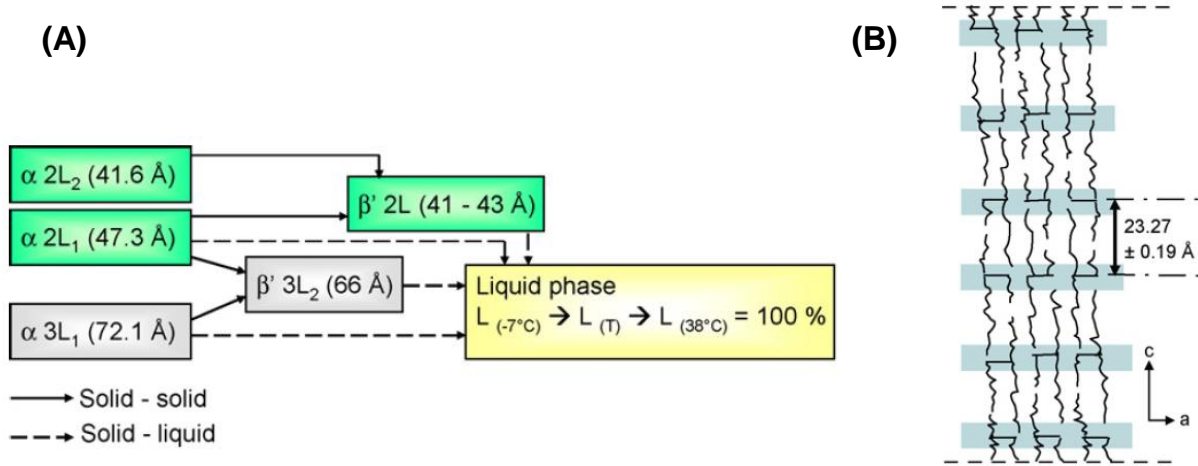


Figure B-30 : (A) modélisation des transitions de phases au cours du chauffage de la matière grasse laitière anhydre et (B) de l'organisation des triacylglycérols de la matière grasse laitière à l'état liquide (d'après Lopez et Ollivon, 2009b).

3. Taille et forme des cristaux à l'échelle microscopique

L'organisation à l'échelle microscopique des cristaux de triacylglycérols, qui s'applique aux TAG laitiers, peut être décrite comme un réseau de nature fractale, avec des structures de base de dimensions 1-140 μm (Narine et Marangoni, 1999b). Tang et Marangoni (2007) proposent un schéma représentant la structure de la matière grasse cristallisée à différentes échelles :

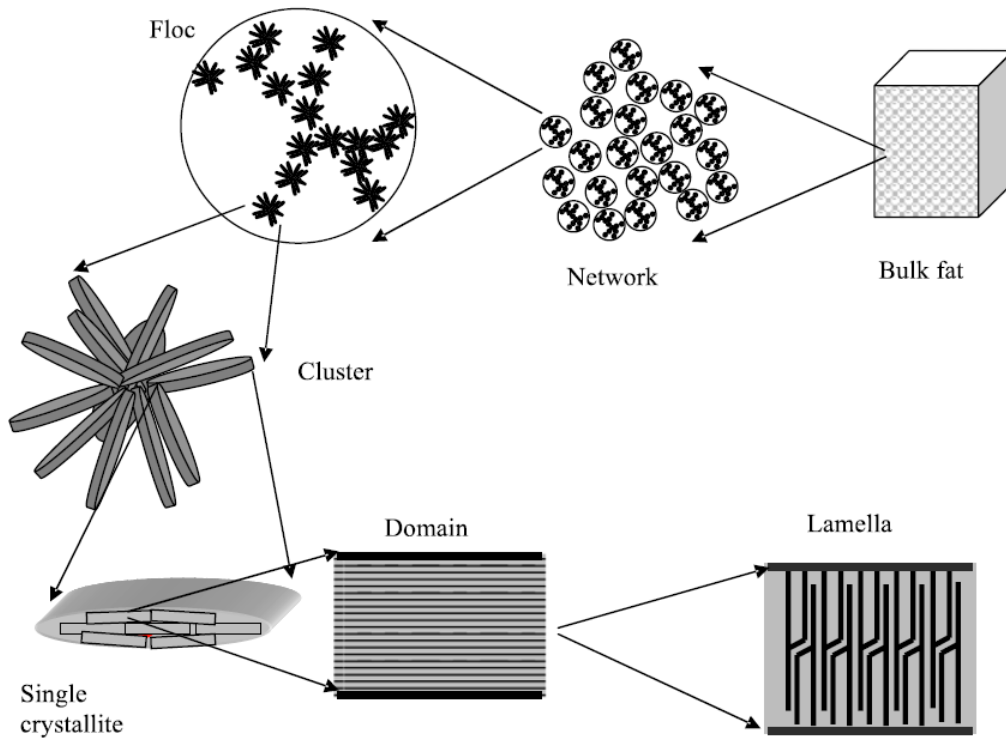


Figure B-31 : représentation du réseau cristallin de matière grasse à différentes échelles (d'après Tang et Marangoni, 2007).

Un modèle qui permet d'expliquer la microstructure des réseaux cristallins de matière grasse a été proposé par le groupe de Marangoni (Narine et Marangoni, 1999b ; Marangoni, 2002 ; Tang et Marangoni, 2008). Ce modèle basé sur les résultats issus de mesures rhéologiques et microscopiques relie la nature fractale du réseau cristallin à ses propriétés mécaniques. Le dernier modèle en date (Marangoni et Tang, 2008) relie le module de conservation viscoélastique G' à différents paramètres permettant de décrire la structure du réseau responsable de cette rigidité :

$$G' \sim \frac{A}{2\pi a \varepsilon l_0^2} (1 - e^{-k\Phi^b})^{1/(3-D)} \quad \text{Équation 7}$$

où A est la constante d'Hamacker, l_0 est la distance à l'équilibre entre les flocs, a est le diamètre des particules dans un floc, D est la dimension fractale des arrangements de particules dans le réseau, ε est la contrainte de compression, soit $\Delta L/L$ avec ΔL la déformation et L la taille du réseau, Φ est le taux de matière grasse solide (SFC), k et b sont des constantes.

En représentant les valeurs de G' obtenues pour des mesures rhéologiques à différentes valeurs de SFC pour une matière grasse, par exemple en faisant varier la température de surfusion, il est alors possible de déterminer les paramètres l_0 , a et D liés à la microstructure du réseau de matière grasse. Le paramètre D est ensuite comparé au même

paramètre obtenu par observations microscopiques et déterminé par analyse d'image. Ce modèle prend en compte les effets sur la rigidité dus à la microstructure du réseau, c'est-à-dire le nombre et la nature des connections entre clusters, ainsi que les effets de la distribution hétérogène du stress appliqué dans le réseau dépendant de la connectivité du réseau (Marangoni et Tang, 2008). Ce modèle permet également d'expliquer les dérives observées lors de l'analyse sur de larges gammes de SFC (**Figure B-32**, Tang et Marangoni, 2008).

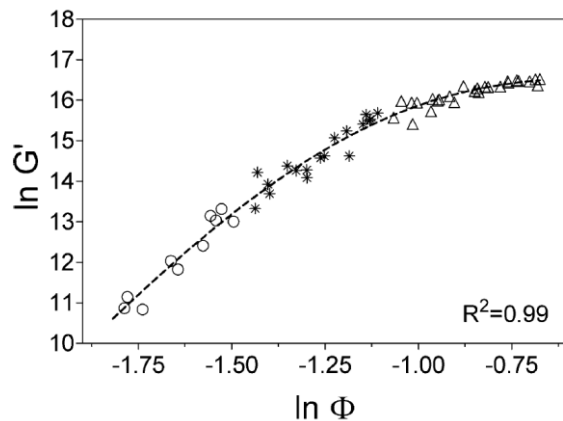


Figure B-32 : application du modèle fractal reliant le module de conservation viscoélastique G' au taux de matière grasse solide (SFC) pour des mélanges matière grasse laitière – huile de colza en différentes proportions (d'après Marangoni et Tang, 2008). ○ : matières grasses à faibles SFC, * : matières grasses à SFC intermédiaires, △ : matières grasses à SFC élevés.

Ce modèle a été utilisé pour décrire la microstructure du réseau cristallin formé par les triacylglycérols de la fraction à haut point de fusion de la matière grasse laitière stockée 24 h à 20-22°C (Tang et Marangoni, 2008). Pour cela, des mélanges de cette fraction avec la fraction à bas point de fusion et avec l'huile de colza en différentes proportions ont été utilisés afin d'obtenir des matières grasses de SFC allant de 74% à 94% environ à 20-22°C (**Figure B-33**). Un très bon ajustement a été obtenu entre les résultats rhéologiques et microscopiques, décrivant le réseau fractal formé par les triacylglycérols de la fraction à haut point de fusion par une dimension fractale de 2,7 environ dans son état stable (Tang et Marangoni, 2008 ; Marangoni et Narine, 2002 ; Wright *et al.*, 2001).

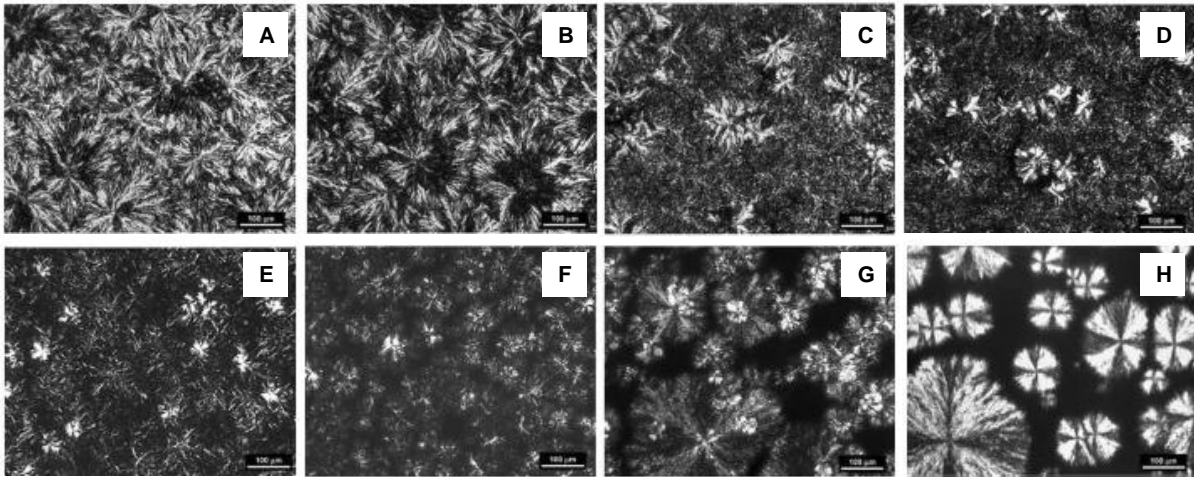


Figure B-33 : clichés de mélanges de triacylglycérols des fractions de matière grasse laitière à haut (HMF) et moyen point de fusion en microscopie en lumière polarisée à 22°C après 24 h de stockage. (A) 100% HMF ; (B) 90% HMF ; (C) 60-70% HMF ; (D) 50% HMF ; (E) 40% HMF ; (F) 30% HMF ; (G) 20% HMF ; (H) 10% HMF.

Marangoni et Narine (2002) montrent que la dimension fractale doit être fortement influencée par le polymorphisme de la phase solide et par voie de conséquence la vitesse de refroidissement. Un refroidissement rapide (5°C/min) à 5°C conduit à la formation d'aiguilles de petite taille, donnant lieu à une microstructure granulaire, alors qu'un refroidissement lent (0,1°C/min) à la même température conduit plutôt à la formation de cristallites sphérulitiques moins nombreux et de plus grande taille (**Figure B-34-A et B**, Wright *et al.*, 2001 ; Campos *et al.*, 2002). Cela se traduit par une diminution de la dimension fractale du réseau de 2,5 à 2,0 environ (**Figure B-34-C et D**, Wright *et al.*, 2001) d'où l'augmentation du désordre spatial suite à un refroidissement plus rapide. Le terme pré-exponentiel faisant intervenir les paramètres a et l_0 augmente avec la vitesse de refroidissement, dénotant bien des particules de petite taille et rapprochées, rapprochement du au plus grand nombre de sites de nucléation comparé à la matière grasse est cristallisée à vitesse plus faible (Wright *et al.*, 2001).

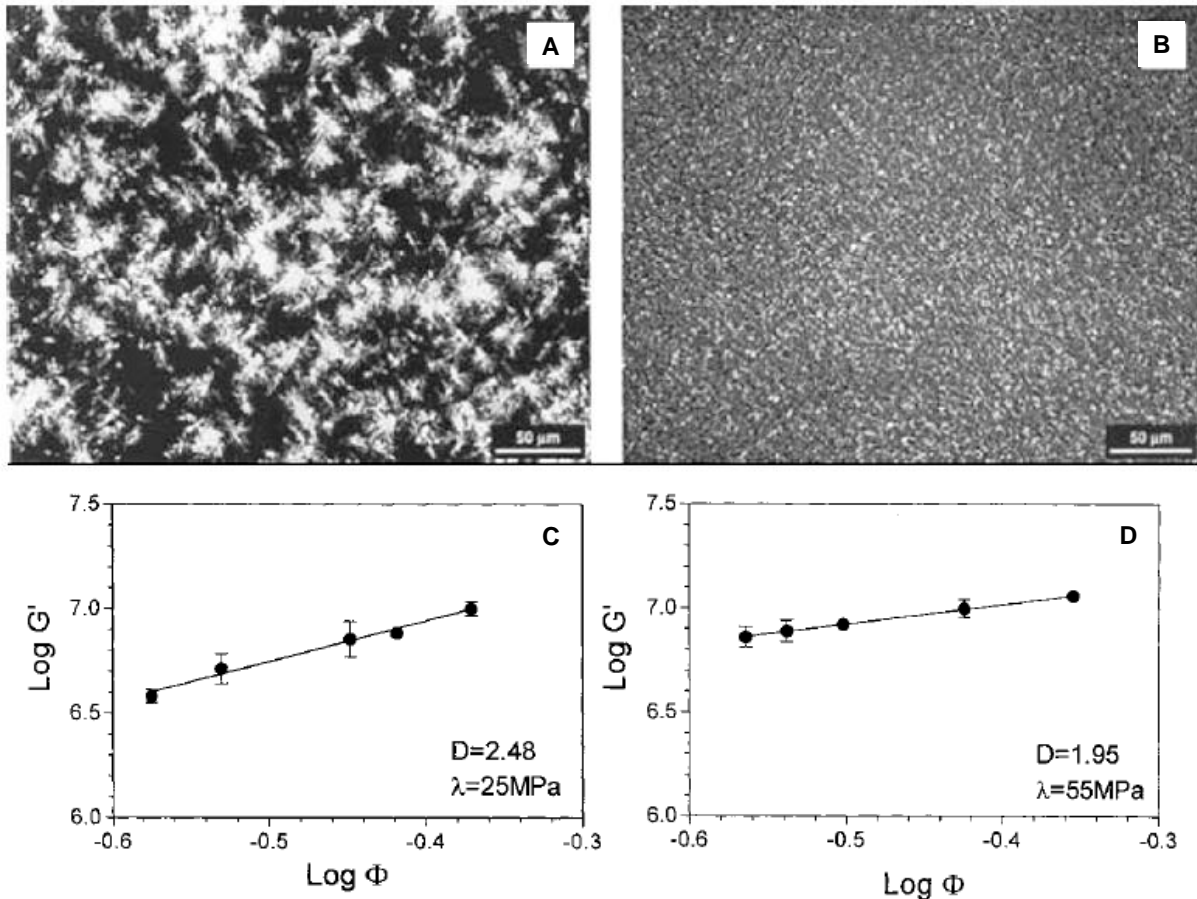


Figure B-34 : clichés en microscopie en lumière polarisée (A et B) et détermination rhéologique de la dimension fractale D (C et D) de matière grasse laitière refroidie à 5°C depuis l'état fondu à 0,1°C/min (A et C) et 5°C/min (B et D).

B. Propriétés de cristallisation de la matière grasse laitière sous forme de globules gras natifs ou d'émulsions

1. Polymorphisme et propriétés thermiques

Relativement peu d'études se sont intéressées au comportement de cristallisation de la matière grasse laitière sous forme de globules gras natifs ou sous forme d'émulsions reconstituées. Walstra et Van Beresteyn (1975) ont été les premiers à mettre en évidence le polymorphisme des triacylglycérols laitiers dispersés sous forme de globules gras. L'effet ou phénomène majeur mis en évidence par ces auteurs est la surfusion plus importante nécessaire à la cristallisation des triacylglycérols en état émulsionné par rapport aux mêmes molécules anhydre. En effet, un *nucleus* au moins doit se former par gouttelette pour que la matière grasse dispersée cristallise. Les variétés cristallines sont également affectées par l'état de dispersion des triacylglycérols (Walstra et Van Beresteyn, 1975 ; Söderberg *et al.*, 1989).

Lopez *et al.* (2000, 2001b, 2002a, 2002b, 2005b) et Ben Amara-Dali *et al.* (2008) ont étudié les propriétés de cristallisation des triacylglycérols laitiers dans les globules gras bovins et caprins, respectivement, en fonction des cinétiques thermiques appliquées à l'aide du couplage entre la calorimétrie et la diffraction des rayons X. Lopez *et al.* (2000, 2001b, 2002a, 2002b) ont comparé les propriétés de cristallisation des triacylglycérols laitiers dispersés dans les globules gras avec celles des triacylglycérols laitiers sous forme anhydre dans les mêmes conditions de passé thermique (Lopez *et al.*, 2001c, 2001d, 2002b, 2005a). Les diagrammes de DRX enregistrés après différents refroidissements des triacylglycérols dispersés dans les globules gras natifs du lait sont présentés **Figure B-35**.

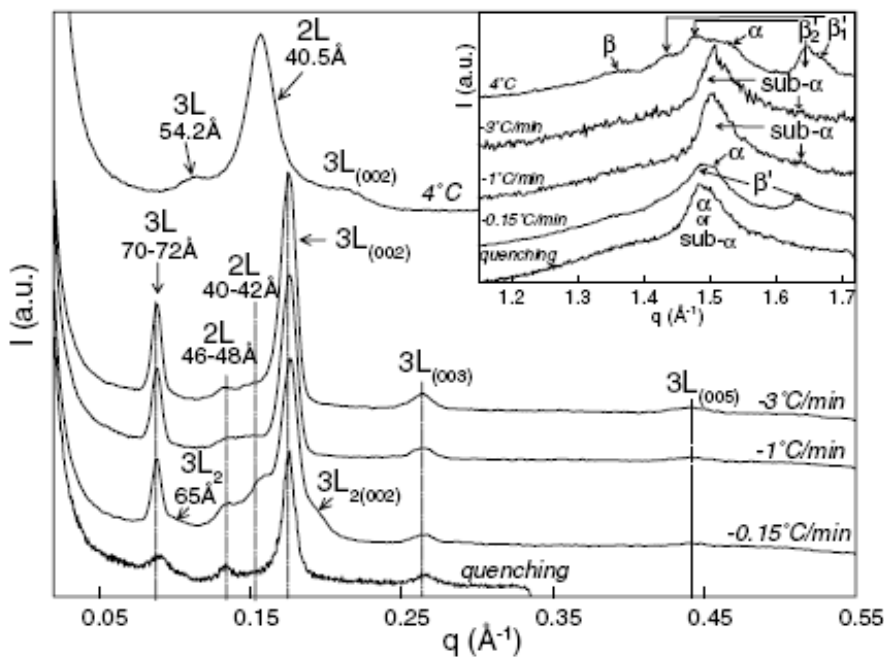


Figure B-35 : structures cristallines formées par les triacylglycérols laitiers dans les globules gras natifs à -8°C après des refroidissements à différentes vitesses indiquées sur la figure. L'organisation longitudinale des triacylglycérols est caractérisée par DRX aux petits angles ; l'organisation latérale (insert) est caractérisée par DRX aux grands angles (d'après Lopez et al, 2002a).

Un refroidissement rapide favorise la présence de cristaux instables de type α 3L avec des grandes distances entre 70-72 Å, alors que des refroidissements lents favorisent la présence de cristaux plus stables de type β et β' 2L avec des grandes distances de 40-42 Å à 4°C (**Figure B-35**). Dans tous les cas de passés thermiques étudiés, la complexité de composition de la matière grasse laitière a donné lieu à la cristallisation de cristaux mixtes.

Des globules gras natifs de plus petite taille (1-3 μm) diminuent la température de début de cristallisation des triacylglycérols et modifient les structures cristallines formées

(Michalski *et al.*, 2004 ; Lopez *et al.*, 2007b ; **Figure B-36**). De la même façon, une réduction de taille d'émulsion de triacylglycérols laitiers stabilisés par des protéines laitières de 1-2 μm à 0,2 μm conduit à une diminution de la température de début de cristallisation (Lopez *et al.*, 2002a). D'après Lopez *et al.*, 2002a, les cristaux de triacylglycérols formés dans des émulsions seraient moins bien organisés ou possèderaient plus de défauts qu'en anhydre, et ce d'autant plus que la taille des gouttelettes est petite (**Figure B-36**).

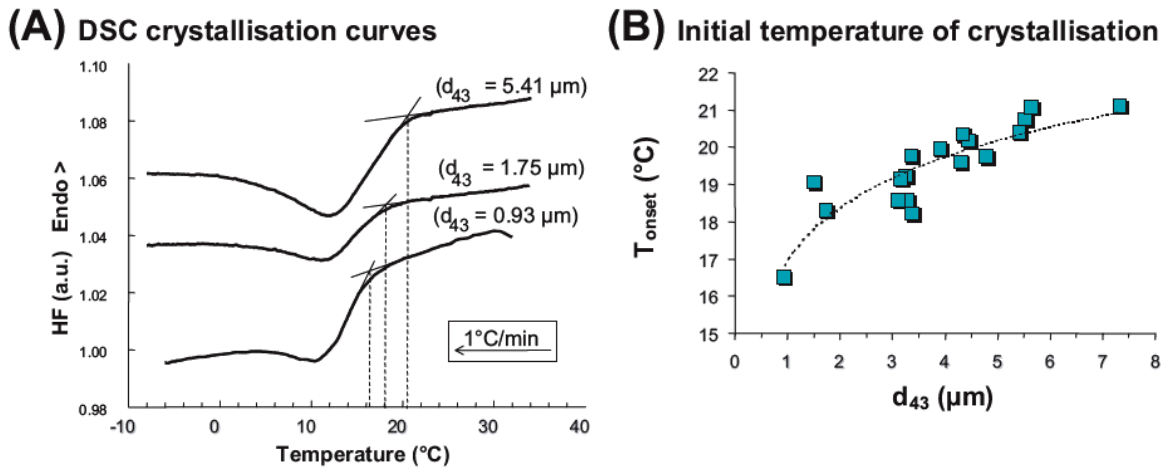


Figure B-36 : effet de la taille des globules gras natif du lait sur leur température de début de cristallisation (d'après Michalski *et al.*, 2004).

2. Propriétés des cristaux à l'échelle microscopique dans la phase dispersée d'une émulsion

Walstra (1967) définit une classification de taille, forme et localisation des cristaux sur la base d'observations en microscopie en lumière polarisée. Quatre types principaux sont alors définis (**Figure B-37**) :

- type O : globules caractérisés par une absence de biréfringence, soit une absence de matière cristallisée ou des cristaux trop petits pour être détectés par microscopie optique.
- type N1 ou N2 (Needle) : globules caractérisés par la présence de cristaux en forme d'aiguilles dispersées au cœur des globules. Aucun critère de taille ni de nombre n'a été avancé.
- type L (Layer) : globules caractérisés par la présence de cristaux situés à leur périphérie.
- type M (Mixed) : globules caractérisés par la présence de cristaux à la fois de types L et N.

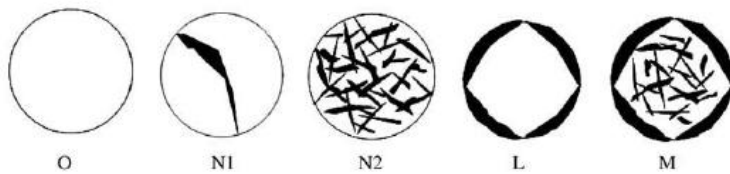


Figure B-37 : représentation schématique des types de globules gras semi-cristallins vus par microscopie en lumière polarisée (d'après Walstra, 1967).

Ces 4 types de globules gras correspondent aux 4 types définis par Buchheim et Precht (1979) et identifiés par microscopie électronique. Les facteurs qui influencent de manière préférentielle les types de cristaux à l'échelle microscopique sont la température de surfusion (Xu *et al.*, 2005), la composition de la matière grasse (Boode *et al.*, 1993) et l'histoire thermique (Lopez *et al.*, 2002a). Lopez *et al.* (2002a) a étudié les types de cristaux se formant dans les globules gras natifs du lait à l'échelle microscopique en fonction de la vitesse de refroidissement et la taille des globules gras. Comme en milieu anhydre, un refroidissement rapide induit des cristaux de plus petite taille (type N). En revanche, un refroidissement lent favorise la formation de cristaux de type L, notamment dans les plus petits globules, qui semblent moins cristalliser suite à un refroidissement rapide. Les différents types de globules en terme d'état cristallin n'auraient également pas les mêmes propriétés mécaniques, en particulier de résistance au barattage (Buchheim et Precht, 1979 ; Precht et Peters, 1981). Cela pourrait être relié à la déformation de la membrane des globules gras que peuvent induire les cristaux de type N par exemple (Lopez *et al.*, 2002a).

C. Propriétés de cristallisation des triacylglycérols laitiers dans les matrices complexes

Outre les recherches menées sur la cristallisation des triacylglycérols sous forme d'émulsion (native ou modèle) et sous forme anhydre, relativement peu d'études se sont intéressées aux propriétés de cristallisation des triacylglycérols dans les produits transformés tels les beurres, fromages, crèmes glacées.

Lopez *et al.* (2006a) étudient les propriétés thermiques des triacylglycérols dans l'emmental afin de déterminer le taux de matière grasse solide dans ce type de fromage en fonction de la température sur la base d'une méthode calorimétrique. Les structures supramoléculaires des cristaux formés par les triacylglycérols ont ensuite été caractérisées dans ces fromages à 4°C (Lopez *et al.*, 2008b). Ces auteurs ont identifié une coexistence de

cristaux 2L (40,5 Å) et 3L (54,6 Å) associés à des formes polymorphiques de 4 types : α , β'_1 , β'_2 et β . Les cristaux de triacylglycérols formés à 4°C semblent donc de même types que ceux déjà caractérisés dans les globules gras natifs et la matière grasse laitière anhydre (Lopez *et al.*, 2002b). Gliguem *et al.* (2009) ont caractérisé les propriétés de cristallisation et de fusion des triacylglycérols laitiers dans des fromages fondus au cours de cinétiques en température. Ils ont mis en évidence la cristallisation des triacylglycérols en α 3L (72 Å) lors d'un refroidissement à 2°C/min tout à fait identique à celle déjà caractérisée par Lopez *et al.* (2002a) dans des globules gras de petite taille. Au cours d'un chauffage subséquent, cette structure se réorganise en structure transitoire de type 2L (36,7 Å) puis β' 2L (40,6 Å) avant de fondre complètement. Ce comportement est en accord avec ce qui a déjà été observé dans des globules gras natifs de taille comparable à celle des gouttelettes de matière grasse des fromages fondus dispersées dans la matrice protéique Lopez *et al.* (2002a).

La matière grasse laitière joue également un rôle fondamental dans la structuration de la crème glacée grâce à ses propriétés de cristallisation uniques (Goff, 2002). Brièvement, la crème glacée est un système colloïdal complexe constitué de bulles d'air, de globules gras partiellement coalescés et agrégés, de cristaux de glace, le tout dans une matrice composée d'eau, de sucres, de protéines, de sels et de polysaccharides (Goff, 2002). La matière grasse utilisée pour la fabrication de crème glacée peut être de nature laitière (Amérique du nord, Australie, Nouvelle-Zélande et une grande partie de l'Europe) ou végétale (Goff, 2006). Sa teneur dans les crèmes glacées varie de 10 à 18% suivant la législation (Goff, 2006). Nous ne nous intéresserons qu'aux propriétés de cristallisation des matières grasses d'origine laitière dans les crèmes glacées. La structure de réseau formée par les globules gras partiellement coalescés permet la stabilisation des bulles d'air dans le produit. Cette structure donne également à la crème glacée ses propriétés de rétention de l'eau lors de l'extrusion, de texture onctueuse et de conservation de sa forme à la chaleur (Goff, 1997). Cette structure s'établit tout au long du procédé de fabrication des crèmes glacées. Plusieurs paramètres du procédé de fabrication ayant une influence sur la stabilité du produit fini ont été étudiés par de nombreux auteurs, notamment la composition de la matière grasse (Bazmi *et al.*, 2007 ; Bazmi *et al.*, 2008 ; Smet *et al.*, 2010), l'homogénéisation du pré-mix (Koxholt *et al.*, 2001 ; Smet *et al.*, 2010), l'interaction entre les protéines et les surfactants à l'interface avec la phase grasse (Bolliger *et al.*, 2000 ; Davies *et al.*, 2001 ; Sourdet *et al.*, 2002), la formation de la structure de la matière grasse au cours de la congélation (Goff *et al.*, 1999) ou encore la structure de la matière grasse (Koxholt *et al.*, 2001). La composition de la matière grasse a montré des

propriétés rhéologiques déterminantes pour l'obtention de texture des crèmes glacées (Bazmi *et al.*, 2008), le mélange de matière grasse laitière avec sa fraction à haut point de fusion qui donne un taux de matière grasse solide élevé étant plus sensible au cisaillement que la matière grasse laitière seule ou en mélange avec sa fraction à bas point de fusion (Bazmi *et al.*, 2008). Ce taux de matière grasse solide élevé, ainsi qu'une pression d'homogénéisation faible ont également montré une forte corrélation avec une fermeté plus élevée de la crème glacée, ainsi qu'une meilleure conservation de sa forme à la chaleur (Smet *et al.*, 2010). En revanche, l'enrichissement de la matière grasse laitière avec sa fraction à bas point de fusion conduit à la formation d'une structure avec des bulles d'air plus homogènes en taille et avec une incorporation d'air plus importante (Bazmi *et al.*, 2007).

VII. LIEN ENTRE LE COMPORTEMENT DE CRISTALLISATION DE LA MATIERE GRASSE LAITIERE ET SES PROPRIETES DE TEXTURE

A. Relation entre la texture et la rhéologie des matières grasses

Des méthodes empiriques basées sur l'extrusion, la pénétrométrie ou la résistance à la coupure ont été largement utilisées pour qualifier et quantifier certaines propriétés sensorielles (Prentice, 1972). Ces méthodes induisent des grandes déformations qui cassent la structure du matériaux (Wright *et al.*, 2001). Ces tests empiriques ont prouvé une bonne corrélation avec les résultats de tests sensoriels effectués sur des panels de consommateurs (Rousseau et Maragoni, 1999), ainsi qu'avec certaines propriétés de cristallisation de la matière grasse comme le taux de matière grasse solide (**Figure B-38**, Wright *et al.*, 2001). Cependant, ces tests empiriques sont critiquables pour la difficulté à corréler les paramètres mesurés aux propriétés fondamentales du matériau (Shellhammer *et al.*, 1997). De plus, la destruction de la structure du matériau et les conditions spécifiques inhérentes à chaque test difficilement transposables font que l'information rhéologique ne peut pas être obtenue (Shukla *et al.*, 1994).

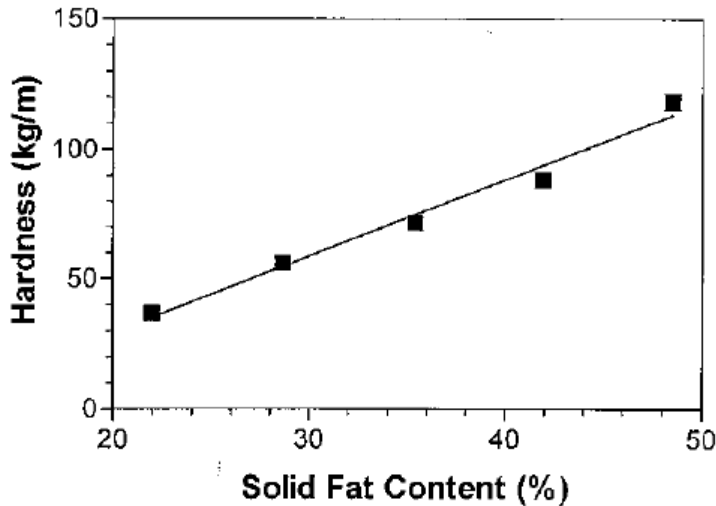


Figure B-38 : relation entre la dureté de la matière grasse laitière déterminée par pénétrométrie avec un cône et taux de matière grasse solide (SFC) déterminé par résonance magnétique nucléaire (d'après Wright *et al.*, 2001).

Le réseau cristallin formé par les matières grasses en général, et par les triacylglycérols laitiers en particulier peut être décrit comme une structure fractale (van den Tempel, 1979 ; Tang et Marangoni, 2007). Les propriétés rhéologiques de la matière grasse sont le résultat des effets combinés du taux de matière grasse solide (SFC), de la microstructure du réseau cristallin, incluant la taille, la forme et la distribution spatiale des cristaux de matière grasse, et de la structure moléculaire de la matière grasse (Marangoni et Tang, 2008). En première approximation, ces propriétés de dureté peuvent être évaluée par la mesure du taux de matière grasse cristallisée, donnant une corrélation très forte avec la dureté de la matière grasse (**Figure B-38**, Wright *et al.*, 2001). Néanmoins, une relation directe a été mise en évidence entre les propriétés viscoélastiques des matières grasses à très faibles déformations et leur dureté mesurée notamment par pénétrométrie (Rousseau *et al.*, 1996b). A très faibles déformations, Narine et Marangoni (1999a) ont relié le taux de matière grasse solide (SFC) de plusieurs matières grasses au module de conservation viscoélastique G' mesuré par des méthodes rhéologiques et à la dimension fractale D du réseau par la relation $G' \sim SFC^{1/(3-D)}$ (**Équation 8**). Ce modèle a ensuite été modifié pour prendre en compte des changements de microstructure et donc de dimension fractale lorsque le SFC varie beaucoup (Tang et Marangoni, 2008), donnant lieu au modèle $G' \sim (1 - e^{-k SFC^b})^{1/(3-D)}$ abordé plus haut. Des paramètres rhéologiques sont donc reliés par ce modèle au SFC ainsi qu'à des paramètres de structure du réseau cristallin.

Toro-Vazquez *et al.*, (2002, 2004) montrent que le polymorphisme de matières grasses végétales et de beurre de cacao peut être mis en évidence par des techniques rhéométriques en conditions statiques ou dynamiques. Les différentes phases de nucléation et croissance des cristaux peuvent également être identifiées et différenciées par cette technique. Il est également possible de mettre en évidence des phénomènes de maturation ou mûrissement d'Ostwald par la rhéologie impossibles à mettre en évidence par des techniques d'analyse thermique classiques comme la calorimétrie différentielle (De Graef *et al.*, 2006).

B. La rhéologie de la matière grasse laitière anhydre et dans les produits transformés

Les travaux de Shukla et Rizvi (1995) ont été les premiers à utiliser la viscoélasticité et à définir les conditions d'étude de la rhéologie des beurres et de la matière grasse laitière. Ils montrent que la zone d'étude viscoélastique linéaire dépend largement des conditions de température et de la fréquence d'oscillation. Sur l'ensemble de la plage de fusion de la matière grasse laitière, celle-ci se comporte comme un matériau viscoélastique, comportant des composantes liquide et solide (Wright *et al.*, 2001).

Wiking *et al.* (2009) met en évidence une relation entre les propriétés de cristallisation de la matière grasse laitière anhydre et ses propriétés rhéologiques. Ils reprennent la technique utilisée par Toro-Vazquez (2002) et De Graef *et al.* (2006) en complément d'analyses thermique et cristallographique pour montrer l'influence de la vitesse de refroidissement sur les propriétés de cristallisation de la matière grasse laitière en condition isotherme. Un refroidissement rapide conduisant à une cristallisation en deux étapes favoriserait la formation de cristaux α d'abord, associés à une première augmentation de l'angle de phase enregistrée en rhéologie, puis à une transition $\alpha \rightarrow \beta'$ associé à une nouvelle augmentation de l'angle de phase. Un refroidissement rapide conduirait de plus à la formation d'un réseau cristallin plus ferme qu'à la suite d'un refroidissement lent, due à des cristaux de plus petite taille, mais des pontages plus nombreux entre les cristaux (Campos *et al.*, 2002).

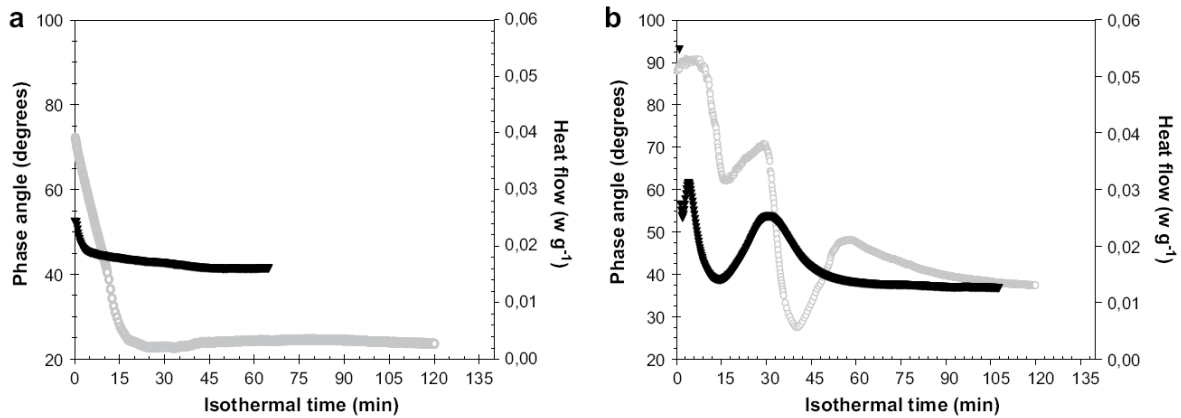


Figure B-39 : Suivi de l'angle de phase (○) et du signal de calorimétrie différentielle (▲) en fonction du temps après un refroidissement lent (**a**, 0.1°C/min) et rapide (**b**, 10°C/min) à 20°C depuis 65°C de matière grasse laitière (d'après Wiking *et al.*, 2009).

Gliguem *et al.* (2009) publient une étude sur les propriétés de cristallisation de la matière grasse laitière dans des fromages fondus. Ils utilisent alors une approche multi-échelle incluant la caractérisation des propriétés viscoélastiques des fromages, l'identification des types de cristaux à l'échelle moléculaire et l'analyse thermique afin de comprendre le comportement physique de la matière grasse laitière en cinétique en température dans la gamme 3-60°C.

Dans les margarines, à l'échelle moléculaire, le polymorphisme de la matière grasse laitière est lié à la rhéologie du réseau cristallin. La forme β' est généralement caractérisée par des cristaux de petite taille, de l'ordre de 3-5 μm , donnant à la margarine et aux produits une texture crémeuse douce, alors que les cristaux β ont tendance à être plus grand, de l'ordre de 50 μm , conférant une texture granuleuse (D'Souza, 1990 ; DeMan, 1992). La forme β' est donc préférée en termes de fonctionnalités pour la confection de produits alimentaires contenant des matières grasses (Hagemann, 1988 ; Ghotra *et al.*, 2002).

C. Modification de la texture des produits laitiers par la composition de la matière grasse

La composition de la matière grasse laitière peut altérer la consistance du beurre (Bornaz, 1993). Le fractionnement physique de la matière grasse laitière peut être utilisé pour produire des beurres plus tendres en recombinaison des fractions à bas point de fusion, contenant des triacylglycérols insaturés et courts (Kaylegian et Lindsay, 1992). La fraction à haut point

de fusion fournit des propriétés fonctionnelles clés pour la fabrication de beurres tartinables (Kaylegian et Lindsay, 1992 ; Shukla *et al.*, 1994).

Lin *et al.* (1996) montrent que la production de laits enrichis en acide oléique par le biais de l'alimentation animale donne lieu à des beurres plus tendres, avec des SFC plus faibles. Cependant, l'additif utilisé à base d'huile de tournesol oléique n'est pas utilisable facilement à grande échelle. Bobe *et al.* (2003, 2006) sélectionnent le lait de vaches sur la base de leur composition en matière grasse afin de produire des beurres plus tendres et montrent ainsi que la composition en acides gras est directement responsable de la dureté des beurres. En fait, la composition en acide gras de la matière grasse laitière peut affecter les propriétés de texture en diminuant la dureté de nombreux produits, tels le beurre et le fromage (Jones *et al.*, 2004) mais aussi la crème glacée, ou le yaourt (Chen *et al.*, 2004). A titre d'exemple, la fermeté à 8°C de fromages à teneur en acides gras insaturés d'environ 45% chute jusqu'à près de la moitié par rapport à des fromages à composition classique en acides gras (38% d'acides gras insaturés, Jones *et al.*, 2004). La flaveur de ces produits semble peu affectée par la composition en acides gras dans la plage de variation étudiée, leur assurant une acceptabilité de ce point de vue auprès des consommateurs (Jones *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2004 ; Ramaswamy *et al.*, 2001).

Couvreur *et al.* (2006) puis Hurtaud *et al.* (2010) ont relié la composition de la matière grasse laitière avec les propriétés de dureté des beurres mesurées par pénétrométrie. Pour cela, ils ont réalisé des tests de pénétrométrie sur des beurres de composition variées, notamment obtenus par ajout de graine de lin extrudée dans l'alimentation des vaches (Hurtaud *et al.*, 2010), et par l'utilisation de différents fourrages de base (Couvreur *et al.*, 2006). Il semblerait que le rapport C16:0/C18:1 soit un bon indicateur de la dureté des beurres à 4°C. La dureté des beurres mesurée dans l'étude de Couvreur *et al.* (2006) a par ailleurs été bien reliée avec la perception de fermeté en bouche sur un panel de consommateurs.

MATERIELS ET METHODES

Matériels et méthodes

I. MATERIELS

A. Echantillons d'origine laitière

1. Production des laits et des crèmes pour l'étude

Plusieurs régimes expérimentaux ont été utilisés dans le cadre de cette thèse afin de produire des laits de composition en acides gras différents. Pour cela, 5 phases de productions ont été mises en place, avec pour chaque phase, un régime témoin et un ou deux régimes enrichis en acides gras insaturés par le biais de l'alimentation animale et notamment l'ajout de suppléments lipidiques d'origine végétale. Le **Tableau M-1** détaille les régimes alimentaires des vaches utilisés pour produire les laits utilisés lors de cette thèse. Des laits expérimentaux ont été produits par des groupes de six vaches laitières au moins, de race Holstein. Les laits correspondant à un cumul de traite sur 24 heures pour chaque régime ont été réceptionnés à raison de une à quatre fois, chaque réception étant espacée de trois à quatre jours de la suivante afin d'évaluer la variabilité de composition intra régime par rapport à la variabilité inter régime. Les dates de réception des laits sont détaillées dans le **Tableau M-2**.

Tableau M-1 : régimes alimentaires utilisés pour produire les laits témoins et enrichis en acides gras insaturés. EM = ensilage de maïs ; EH = ensilage d'herbe ; Luz = bouchons de luzerne déshydratés.

Phase de production	Code	Base d'alimentation	Additif
1 (février 2008)	B1	EM + EH + Luz	- (<i>témoin</i>)
	B2	EM + EH + Luz	5% huile de tournesol
	B3	EM + EH + Luz	5% huile de lin
2 (avril 2008)	B5	EM	- (<i>témoin</i>)
	B6	EM	5% huile de colza
	B7	EM	5% huile de lin
3 (mars 2008)	B8	EH	- (<i>témoin</i>)
	B9	EH	5% huile de colza
	B10	EH	5% huile de lin
4 (décembre 2009)	Indus	Lait de grand mélange Bretagne	- (<i>témoin</i>)
	Blé	EM + EH	Blé
	Colza	EM + EH	Graines de colza aplaties
5 (mai 2010)	Herbe-Blé	Herbe pâturée	Blé
	Herbe-Colza	Herbe pâturée	Graines de colza aplaties

Pour améliorer le rapport signal sur bruit des analyses physiques effectuées sur les globules gras natifs, des crèmes ont été fabriquées à partir des laits expérimentaux par simple écrémage du lait, contrairement au procédé classique qui prévoit traitement thermique –

homogénéisation - maturation biologique. Les concentrations en matière grasse de ces crèmes sont données dans le **Tableau M-2**.

Tableau M-2 : dates d'arrivées des laits et concentrations en matière grasse des crèmes étudiées (Indus = industriel).

Code crème	Date 1	Date 2	Date 3	Date 4	Concentrations en matière grasse date1 / date2 / date3 / date4 (g/kg)
B1	04/02/08	07/02/08	14/02/08	18/02/08	500 / 620 / 590 / 500
B2	04/02/08	07/02/08	14/02/08	18/02/08	575 / 500 / 540 / 415
B3	04/02/08	07/02/08	14/02/08	18/02/08	550 / 600 / 525 / 465
B5	07/04/08	11/04/08	14/04/08		580 / 540 / 615
B6	07/04/08	11/04/08	14/04/08		590 / 555 / 670
B7	07/04/08	11/04/08	14/04/08		530 / 590 / 595
B8	27/03/08	01/04/08	03/04/08		510 / 555 / 515
B9	27/03/08	01/04/08	03/04/08		430 / 515 / 615
B10	27/03/08	01/04/08	03/04/08		480 / 595 / 540
Indus	30/11/09	02/12/09	07/12/09		400 / 553 / 520
Blé	30/11/09	02/12/09	07/12/09		575 / 528 / 580
Colza	30/11/09	02/12/09	07/12/09		538 / 600 / 603
Herbe-Blé	06/05/10				345
Herbe-Colza	06/05/10				340

2. Matières grasses extraites

La matière grasse de chaque crème étudiée a été extraite par barattage-chauffage ou par extraction par solvant suivant le volume nécessaire pour les expérimentations : extraction par solvant dans la majeure partie des cas, excepté la fabrication d'émulsions.

3. Fractions de matière grasse anhydres

Plusieurs fractions de matières grasses issues des laits utilisés lors de la thèse ont été produites à différentes températures par fractionnement dans l'acétone (ratio 1:4 v/v, acétone pour analyses, Carlo-Erba, Val de Reuil, France). Le détail du schéma technologique adopté pour recueillir les différentes fractions est donné dans la **Figure M-1**. La composition en acides gras de ces fractions est détaillée dans la partie résultats.

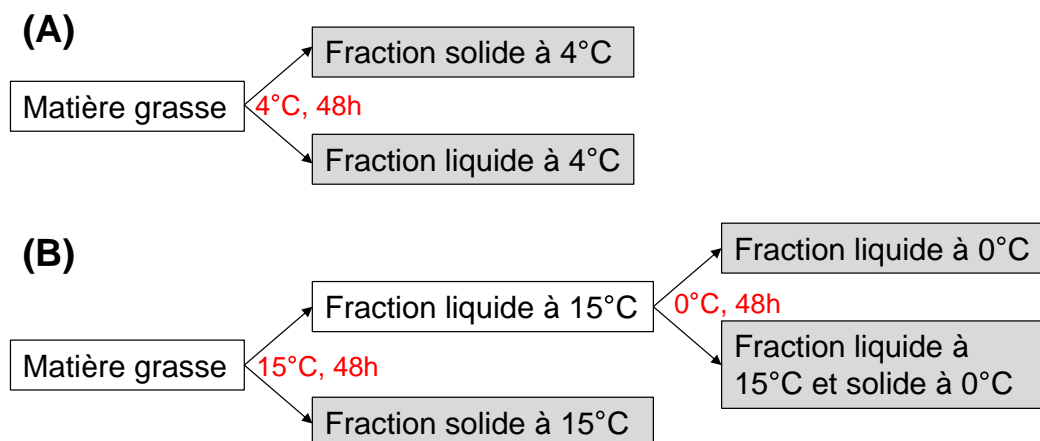


Figure M-1 : schéma des fractionnements physiques de la matière grasse dans l'acétone. (A) fractionnement à 4°C. (B) fractionnement à 15°C puis 0°C. Les fractions physiques récupérées sont indiquées dans les cases grisées.

B. Emulsions reconstituées

Des émulsions des matières grasses ont été fabriquées à partir des matières grasses extraites des crèmes étudiées dans le cadre cette thèse.

1. Protéines utilisées pour la fabrication d'émulsions

Une poudre de caséinate de sodium a été utilisée comme émulsifiant protéique afin de stabiliser les gouttelettes d'émulsion lipidique formées lors de la fabrication d'émulsions. La poudre de caséinate de sodium utilisée a été fournie par la société Armor Protéines S.A.S. (Saint Brice en Coglès, France). La composition de cette poudre est donnée dans le **Tableau M-3**.

Tableau M-3 : caractéristiques physico-chimiques de la poudre de caséinate de sodium utilisée pour la fabrication des émulsions.

Matière sèche (MS, %)	Protéines (% de la MS)	Matière grasse (% de la MS)	Lactose (% de la MS)	Sodium (% de la MS)
94	96	6	0,5	1,3

2. Matières grasses utilisées pour la fabrication d'émulsions

Les matières grasses B8 et B10 issues des laits correspondant ont été utilisées pour fabriquer des émulsions de matière grasse laitière avec des distributions de tailles contrôlées (duplicats).

C. Produits transformés

1. Beurres

Des beurres de baratte fabriqués par la société Elvir (Condé sur Vire, France) à partir des échantillons de laits issus des régimes « Indus-Elvir », « Colza », « Blé », « Herbe-Colza » et « Herbe-Blé » ont été utilisés lors de cette thèse. Le diagramme technologique utilisé lors de la fabrication des beurres est donné dans la **Figure M-2** à titre indicatif.

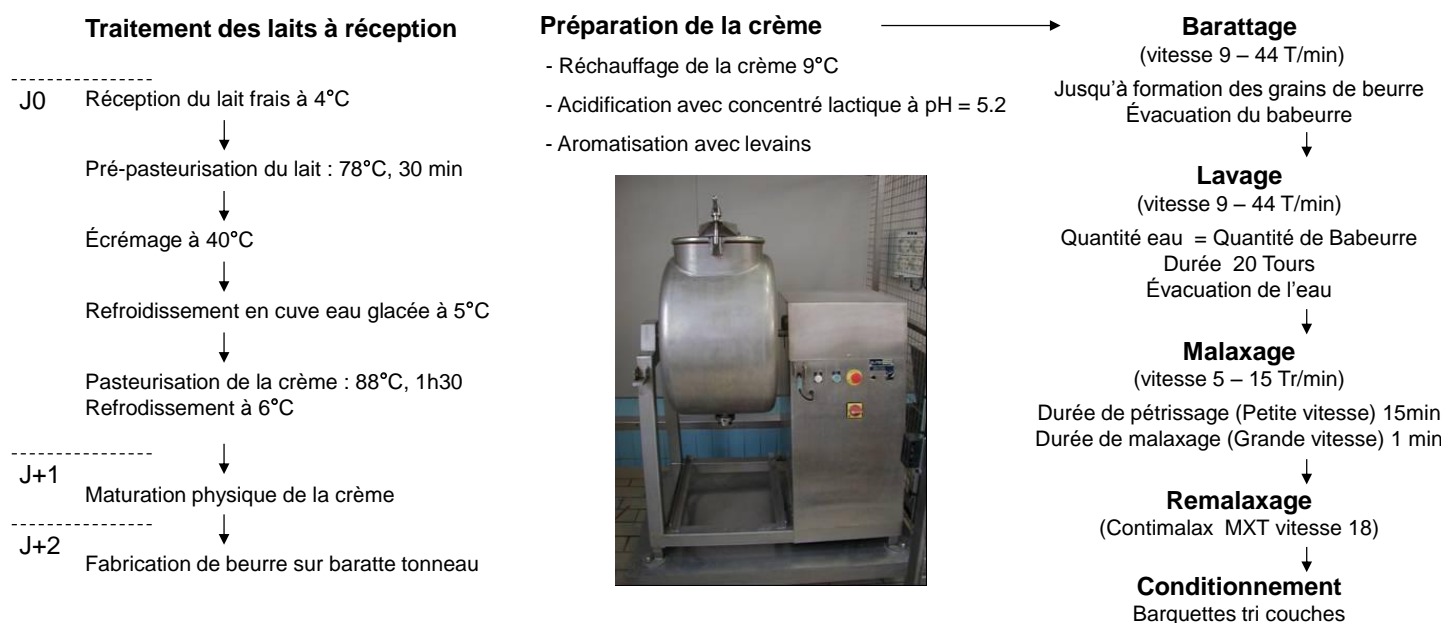


Figure M-2 : diagramme technologique utilisé par la société Elvir pour la fabrication des beurres caractérisés dans le cadre de la thèse. La photo centrale montre la baratte utilisée.

Plusieurs fabrications de beurres (N = 2-3) issus du même régime ont été réalisées afin d'estimer la reproductibilité des différents résultats obtenus sur ces échantillons. La composition physico-chimique des beurres est donnée dans le **Tableau M-4**.

Tableau M-4 : composition physico-chimiques de base des beurres utilisés au cours de la thèse.

Code du beurre	Date de fabrication	% non-gras ¹ (% m tot)	% humidité ² (% m tot)	% matière grasse : 100- ¹⁻² (% m tot)
Indus-Elvir	18/12/2009	1,06	9,78	89,2
Blé	03/12/2009	1,07	11,03	87,9
Colza	03/12/2009	1,31	11,73	87,0
Blé	08/12/2009	1,03	11,42	87,6
Colza	08/12/2009	1,13	11,58	87,3
Herbe-Blé	29/04/2010	1,70	14,45	83,9
Herbe-Colza	29/04/2010	1,17	11,87	87,0
Herbe-Blé	06/05/2010	0,89	11,33	87,8
Herbe-Colza	06/05/2010	1,04	11,65	87,3

2. Fromages de type raclette

Des fromages de type raclette (pâte pressée non cuite) fabriqués par l'institut technique Actilait (Rennes, France) à partir des échantillons de laits issus des régimes « B5 », « B6 » et « B7 » ont été utilisés lors de cette thèse. La raclette a été choisie comme fromage représentatif des pâtes pressées non cuites puisqu'elle représente environ 22% de la production française de fromages à pâtes pressées non cuites, elle-même représentant environ 22% de la valorisation des fromages français en 2008 (L'économie Laitière en Chiffres, CNIEL 2010) La composition en acide gras des fromages de type raclette est la même que celle déterminée pour les matières grasses correspondantes.

II. METHODES

A. Détermination du taux de matière grasse des crèmes et émulsions

Le taux de matière grasse des crèmes et émulsions étudiées a été déterminé par méthode butyrométrique. 5 g de crème ou d'émulsion $\pm 0,005$ g sont ajoutés à 10 mL d'acide sulfurique (96%, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et 1 mL de methyl-3-butan-1-ol (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) dans un butyromètre à crème Roeder. 5-6 mL d'eau sont ajoutés pour compléter le volume du butyromètre. Le butyromètre est placé au bain-marie pendant 15 min environ, puis centrifugé à 1100 rpm pendant 10 min à 55°C. Le taux de matière grasse est lu directement sur les graduations du butyromètre.

B. Extractions de la matière grasse

Deux protocoles d'extraction de la matière grasse à partir des crèmes ont été utilisés suivant les besoins en quantités de matière grasse.

3. Protocole d'extraction par barattage – chauffage

Ce protocole a été utilisé pour extraire des quantités relativement importantes de matière grasse (> 5 g) pour les besoins de la fabrication d'émulsions en quantité suffisante notamment.

Après obtention de la crème des laits étudiés à l'aide d'une écrémeuse à assiettes (Elecrem, Vanves, France) à 45°C à hauteur d'environ 500 g/kg de matière grasse, la crème est congelée à -20°C pendant plusieurs jours. La crème est ensuite placée à 4°C pendant 1 nuit. La matière grasse est obtenue par barattage de la crème à environ 10°C jusqu'à obtention

de beurre. La matière grasse est ensuite séparée de la phase aqueuse lors d'un chauffage à 70°C pendant 10 min, puis une centrifugation à 1500 g à 55°C pendant 10 min. La matière grasse extraite est enfin congelée à -20°C avant de subir ses différentes analyses.

4. Protocole d'extraction par solvant

Ce protocole a été utilisé pour extraire en systématique chaque matière grasse issue des crèmes correspondant aux laits individuels et des fromages étudiés dans le cadre de cette thèse. Ce protocole est adapté de Folch *et al.* (1957) et détaillé dans Lopez *et al.* (2008).

Brièvement pour la matière grasse issue des laits, 2 g de crème sont homogénéisés en présence d'un mélange chloroforme (HPLC grade, Carlo-Erba, Val de Reuil, France) - méthanol (HPLC grade, Carlo-Erba, Val de Reuil, France) (2:1, vol/vol) à l'aide d'un mixer (IKA, Fisher Bioblock). Le mélange est agité et laissé à équilibrer avec 1:4, vol/vol d'une solution saline de NaCl 0,73% p/p (Sigma-Alrich, Saint Quentin Fallavier, France). La phase supérieure est lavée 3 fois avec 40 mL de la solution de chloroforme-méthanol (2:1, vol/vol) et 10 mL de solution de NaCl (0,58%, p/p). La phase contenant les lipides totaux est filtrée (Whatman, 2,5 µm, Grosseron France) avec une pincée de sulfate de sodium anhydre (Sigma-Alrich, Saint Quentin Fallavier, France), puis évaporée à vide. Les lipides totaux extraits sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à analyse.

Pour la matière grasse issue des fromages, le protocole est le même à la différence qu'il intègre une étape supplémentaire de mixage de morceaux de fromage en présence de sable (sable de Fontainebleau, Grosseron, France) et de sulfate de sodium anhydre (Merck, Nogent-sur-Marne, France) en début d'extraction (Briard-Bion *et al.*, 2008).

C. Fractionnement physique de la matière grasse dans l'acétone

La production de fractions de matière grasse est réalisée dans l'acétone (Pour Analyses, Carlo-Erba, Val de Reuil, France) à partir d'une méthode adaptée de Kaylegian et Lindsay (1994) afin de diminuer la viscosité de la matière grasse aux faibles températures de fractionnement et faciliter la séparation des phases liquide et solide.

2 procédures de fractionnement ont été utilisées et sont détaillées dans la **Figure M-1**. Brièvement, la matière grasse à fractionner est fondue à 60°C, puis placée avec 1:4 vol/vol d'acétone (PA, Carlo Erba Réactifs, Val De Reuil, France) dans un flacon hermétique. Le mélange est stocké dans une chambre thermostatée à la température de fractionnement pendant 48 h. La fraction solide est alors séparée de la phase liquide par filtration par gravité

dans la chambre de fractionnement sur filtre Whatman n°40 (Whatman International Ltd, Maidstone, England). L'acétone résiduelle est évaporée dans chaque fraction sous flux d'azote pendant 2 h à 60°C.

D. Détermination de la composition en acides gras de matière grasse anhydre extraite par méthylation et analyse en chromatographie gazeuse

La composition en acides gras des matières grasses extraites a été déterminée selon la procédure détaillée dans Lopez *et al.* (2008) à partir d'une méthode adaptée de Park et Goins (1994).

Brièvement, 10 mg de matière grasse sont placés dans des tubes à méthylation, auxquels sont ajoutés 200 µL de chlorure de méthylène (Carlo-Erba, Val de Reuil, France) et 1 mL de méthoxide de sodium à 0,5 M (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Après une purge à l'azote, les tubes sont fermés puis placés dans un bain d'eau à 90°C pendant 10 min. Les tubes sont ensuite refroidis, et 1 mL de BF₃-méthanol à 10% sont ajoutés (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Après une purge à l'azote, les tubes sont fermés puis à nouveau placés dans un bain d'eau à 90°C pendant 10 min. Les tubes sont ensuite refroidis, 1 mL d'eau milliQ et 2 mL d'hexane sont ajoutés (Carlo-Erba, Val de Reuil, France). La phase supérieure est ensuite collectée après mélange.

L'analyse des méthyl ester d'acides gras est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CG, Agilent 7890 GC system, Agilent Technologies France, Massy, France) équipé avec un détecteur à ionisation de flamme, un injecteur programmé en température et 2 colonnes capillaires (50 m par 0,32 mm; épaisseur de film de 0,25 µm chacune) de 70% Cyanopropyl polysilphenylenesiloxane (BPX-70, SGE, Ringwood, Vic., Australia) montées en série.

E. Préparation des émulsions

Des émulsions de matière grasse ont été fabriquées par procédé d'homogénéisation haute pression. La phase aqueuse est constituée d'une solution de poudre de caséinate de sodium (Protéines, Saint Brice en Coglès, France) à 4% p/v dissoute dans de l'eau milliQ. La phase aqueuse est chauffée à 60°C pendant 1 h sous agitation magnétique, puis laissée à agiter pendant 1 nuit à température ambiante pour assurer la dissolution complète de la poudre de caséinate.

Un mélange pour émulsion est préparé en mélangeant la matière grasse anhydre à émulsionner préalablement fondue à 60°C pendant 20 minutes avec la phase aqueuse également chauffée à 60°C à hauteur de 400-450 mL/L d'émulsion. Les taux de matière grasse de ces émulsions sont donnés dans le **Tableau M-5**. Les distributions granulométriques des émulsions sont détaillées dans les chapitres de résultats.

Tableau M-5 : pression d'homogénéisation utilisées et taux de matière grasse des émulsions fabriquées dans le cadre de la thèse.

Matière grasse émulsionnée	Date de fabrication	Pressions d'homogénéisation (Pa)	Taux de matière grasse (g/kg)
B8	16/10/2008	50.10 ⁵ , 200.10 ⁵ , 500.10 ⁵	400
B10	16/10/2008	40.10 ⁵ , 200.10 ⁵ , 500.10 ⁵	420
B8	26/10/2009	30.10 ⁵ , 200.10 ⁵ , 500.10 ⁵	400
B10	26/10/2009	30.10 ⁵ , 200.10 ⁵ , 500.10 ⁵	400

Une pré-émulsion est réalisée sur ce mélange à l'aide d'un Polytron PT 3100 (Kinematica, Littau-Lucerne, Switzerland) équipé avec une tête de 30 mm PT-DA 3030/2EC head (Kinematica, Littau-Lucerne, Switzerland) et fonctionnant à 4000 rpm pendant 3 min. L'émulsion est ensuite réalisée à 60°C à l'aide d'un homogénéisateur à valves haute pression (Stansted, Harlow, Essex, UK), en recirculant la pré-émulsion 10 fois à pression contrôlée avant collecte. La chambre d'homogénéisation est préalablement chauffée par injection d'eau distillée à 60°C afin d'éviter la cristallisation de matière grasse dans le circuit d'homogénéisation. 0,02% vol/vol d'azide de sodium (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) est ajouté à chaque émulsion pour éviter la croissance bactérienne.

Les pressions d'homogénéisation utilisées dans la thèse pour obtenir des émulsions de tailles variables allaient de 30.10⁵ à 500.10⁵ Pa. Le pH final des émulsions a été systématiquement contrôlé pour être à 6,7, soit le pH standard du lait par addition éventuelle d'acide chlorhydrique 1% ou de solution d'hydroxyde de sodium 1%.

F. Mesure de taille des globules gras natifs et des gouttelettes d'émulsions reconstituées

La distribution de taille des gouttelettes (émulsion ou globules gras) est réalisée par mesure de diffusion de la lumière selon les théories de Fraunhofer et Mie. La théorie de Fraunhofer postule que :

- les particules sont opaques, sphériques et leur diamètre est supérieur à la longueur d'onde utilisée

- les particules diffractent la lumière avec la même efficacité
- lorsque les rayons lasers frappent une particule, ils sont diffractés

La théorie de Mie est une extension de la théorie de Fraunhofer. La lumière laser est traitée comme une onde et les perturbations causées par la présence d'une particule d'indice de réfraction différent de celui du milieu de propagation (solvant) sont évaluées de façon exacte. Dans le cas des émulsions, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable à la mesure afin d'éviter la multidiffusion, la théorie de Mie étant basée sur le fait que la lumière est diffusée par une seule particule.

Les mesures de caractérisations granulométriques de la thèse ont été réalisées à l'aide d'un Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK) équipé d'un laser He/Ne d'une longueur d'onde de 633 nm, et d'une diode électroluminescente à 466 nm. Cet appareil permet la mesure de taille de particules d'un diamètre allant de 0,02 à 2000 μm . Les indices de réfractifs choisis pour faire les mesures sont 1,330 pour le milieu dispersant (eau), et 1,458 et 1,460 pour la matière grasse laitière à 633 et 466 nm, respectivement. Le choix de ces indices est détaillé dans Michalski *et al.* (2001). Deux protocoles de préparation d'échantillon ont été adoptés :

- dilution des échantillons (crème ou émulsion) à 10% vol dans de l'eau milliQ
- dilution des échantillons (crème ou émulsion) à 10% vol dans une solution de sodium dodécylsulfate (SDS) à 1%

La dilution dans le SDS permet la dissociation éventuelle des gouttelettes agrégées sans modifier leur taille grâce à l'action tensio-active anionique du SDS. Quelques gouttes de l'échantillon dilué sont dispersées dans environ 100 mL d'eau milliQ jusqu'à obtenir 10% d'obscurité. La mesure est ensuite effectuée. Outre la distribution de tailles, différents paramètres sont extraits par le logiciel d'acquisition : le diamètre modal correspondant à la population de gouttelettes le plus présent dans la distribution de tailles, le diamètre moyen pondéré en surface (d_{32} exprimé en μm), le diamètre moyen pondéré en volume (d_{43} exprimé en μm) et la surface spécifique (SSp exprimée en m^2/g).

$$d_{32} = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2} \text{ Équation 9}$$

$$d_{43} = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3} \text{ Équation 10}$$

$$SSp = 6(\sum_i \frac{V_i}{d_i} / \sum_i V_i) = 6/d_{32} \text{ Équation 11}$$

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

G. Caractérisation du comportement thermique par microcalorimétrie différentielle

Deux appareils ont été utilisés pour les mesures d'analyse thermique : le DSC Q1000 (TA Instruments, Newcastle, DE) et un calorimètre développé dans le laboratoire de l'UMR CNRS 8612 appelé Microcalix® (Ollivon *et al.*, 2006). Ce dernier appareil permet le couplage avec la diffraction des rayons X.

1. A l'aide de la DSC Q1000

1.1. Etalonnage

L'étalonnage du calorimètre Q1000 en température et enthalpie est réalisé à l'aide d'indium (température de fusion : 156,66°C, variation d'enthalpie de fusion : 28,41 J/g) automatiquement par le logiciel d'acquisition de l'appareil (Universal Analysis 2000 v 4.1 D software, TA Instruments, Newcastle, DE).

1.2. Préparation des échantillons

Les échantillons analysés avec le calorimètre Q1000 sont introduits dans des capsules en aluminium d'une contenance de 14 µL (capsule : 900793.901, couvercle : 900794.901, TA Instruments, Newcastle, DE). Les capsules sont ensuite scellées hermétiquement pour être introduites dans la tête de mesure du calorimètre. Une capsule vide est utilisée comme référence.

2. A l'aide de Microcalix

2.1. Présentation de l'appareil

Le calorimètre Microcalix® (**Figure M-3**) se compose de la cellule calorimétrique, d'une alimentation Hewlett Packard HP E3632A pour les effets Peltier de régulation, d'un microvoltmètre HP 34401A, d'un régulateur de température double boucle Eurotherm HP 900 directement relié aux deux thermocouples de la cellule, d'un bain thermostaté RC6 Lauda contenant de l'eau glycolée à 40% et d'un ordinateur pour piloter les commandes et les données au travers de deux bus (IEEE 488 et RS 232).

2.2. Etalonnage

L'étalonnage du calorimètre Microcalix® en température est réalisé à l'aide de l'acide laurique (température de fusion : 43,7°C) selon le protocole décrit par Grabielle-Madelmont et Perron (1983).

2.3. Préparation des échantillons

Les échantillons analysés avec le calorimètre Microcalix sont introduits dans des capillaires en quartz (Glas Müller, Berlin, Allemagne) de 1,5 mm de diamètre avec une épaisseur de paroi de 0,01 mm. Environ 20 µL d'échantillon sont déposés au fond des tubes capillaires à l'aide d'une seringue et d'un embout en téflon, permettant ainsi d'éviter de polluer les parois du tube.

H. Caractérisation des cristaux à l'échelle moléculaire par diffraction des rayons X couplée à la microcalorimétrie différentielle

1. Ligne de laboratoire du CNRS (Châtenay-Malabry, France)

1.1. Présentation du montage de la ligne

Les échantillons analysés par diffraction des rayons X sur la ligne de diffraction des rayons X du CNRS (Châtenay-Malabry, France) sont placés dans le faisceau de rayons X, réglé à la longueur d'onde $K\alpha$ du cuivre, soit $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$. En bref, environ 20 µL de chaque échantillon sont placés dans un capillaire en quartz de 1.5 mm de diamètre externe, avec des parois de 0,1 mm pour être insérés dans la cellule de mesure du calorimètre Microcalix®, elle-même située sur la ligne de diffraction des rayons X. Les données d'intensité de rayons X diffractés sont enregistrées par deux détecteurs linéaires à gaz placés aux petits et grands angles de diffraction, permettant l'acquisition simultanée des intensités de rayons X diffractés sur des gammes de vecteurs de diffusion allant de 0,09 à 0,55 \AA^{-1} et de 1,1 \AA^{-1} à 1,9 \AA^{-1} , respectivement (**Figure M-3**).

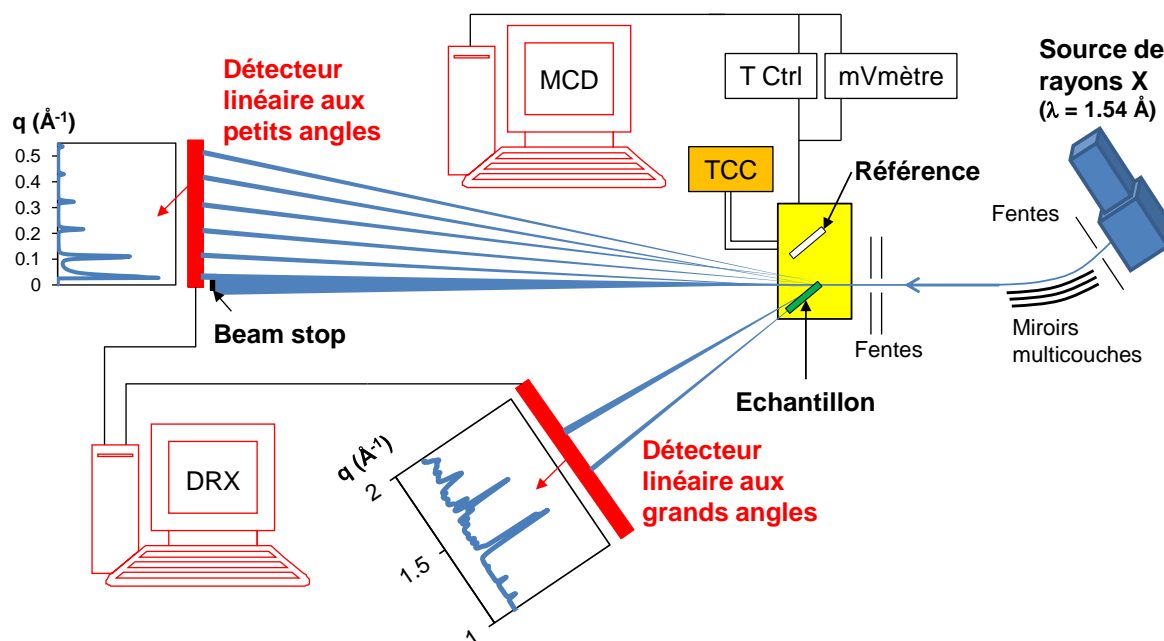


Figure M-3 : montage expérimental du couplage entre le calorimètre Microcalix® et la ligne de diffraction des rayons X du laboratoire du CNRS de Châtenay-Malabry.

1.2. Protocoles de cinétiques en température enregistrés sur les crèmes

Pour les expérimentations réalisées sur la ligne de DRX de laboratoire du CNRS de Châtenay-Malabry, un compromis entre les vitesses des étapes de refroidissement et de chauffage, liées au temps d'expérimentation, et le rapport signal sur bruit a dû être pris en compte. Chaque étape de cinétique en température a ainsi été réalisée à une vitesse de $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ ou $1^\circ\text{C}/\text{min}$. De la même manière, les étapes de statique en température ont été fixées à 20 min. Pour tous ces protocoles, l'enregistrement des diagrammes de diffraction des rayons X a été réalisé pendant un temps de 120 s, correspondant à un temps d'enregistrement effectif des SAXS et des WAXS de 59 s chacun, et un temps de repos de 2 s. De cette manière, un total de 10 enregistrements a été défini pour les étapes de statiques en température. Pour les étapes de cinétiques en température, un enregistrement correspondait ainsi à une amplitude de 1°C dans le cas des vitesses de $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$, et une amplitude de 2°C dans le cas des vitesses de $1^\circ\text{C}/\text{min}$.

3 protocoles de suivi du comportement de cristallisation – fusion des triglycérides dans les globules gras natifs ont été choisis, afin d'étudier le polymorphisme de ces triglycérides dans leur structure native. Ces protocoles présentés dans la **Figure M-4** ont pour but de nous permettre d'identifier les types de cristaux dans certaines conditions de passés thermiques particuliers.

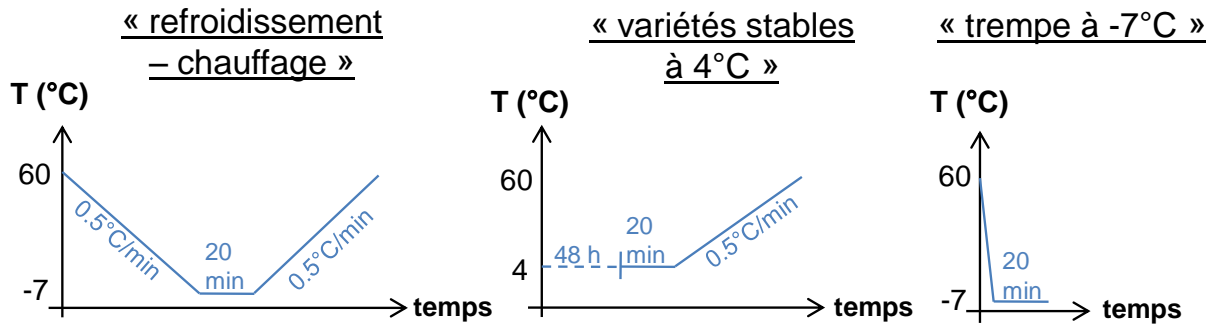


Figure M-4 : schémas des protocoles de cinétiques en température enregistrés sur les crèmes.

- Le protocole de cycle de refroidissement puis chauffage à 0,5°C/min à partir de la matière grasse fondue à 60°C permet d'identifier les types de cristaux de triglycérides se formant au cours d'un refroidissement à vitesse relativement rapide.
- Le deuxième protocole permet d'identifier les variétés de cristaux stables à la température de stockage et conservation des produits laitiers, après un stockage considéré comme suffisamment long pour développer les variétés les plus stables.
- Le protocole de trempe à -7°C permet d'identifier les types de cristaux de triglycérides se formant au cours de refroidissements très brutaux. La température de -7°C a été choisie comme limite inférieure afin de ne pas cristalliser l'eau constituant la phase continue des crèmes.

Les 3 protocoles ont été réalisés pour les crèmes de 2008. Ensuite, pour les crèmes de 2009 et 2010, seul le protocole 3 a été retenu car semblait le plus discriminant sur la base des résultats obtenus en 2008.

1.3. Protocoles de cinétiques en température enregistrés sur les matières grasses laitières anhydres

Un seul protocole a été utilisé pour caractériser le comportement de cristallisation – fusion des triglycérides laitiers sous forme anhydre. Ce protocole fait intervenir une stabilisation pendant 1 min à 60°C, puis un refroidissement de 60°C à -20°C à 0,5°C/min, puis une étape de statique pendant 15 min à -20°C, et enfin une étape de chauffage de -20°C à 45°C à 0,5°C/min.

2. Ligne synchrotron SWING (SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France)

2.1. Présentation du montage de la ligne

Les échantillons analysés par diffraction des rayons X sur la soumise ligne SWING du synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France) sont placés dans le faisceau de rayons X du synchrotron, réglé à une longueur d'onde de $\lambda = 0,828 \text{ \AA}$ (15 keV). En bref, environ 20 μL de chaque échantillon sont placés dans un capillaire en quartz de 1,5 mm de diamètre externe, avec des parois de 0,1 mm pour être insérés dans la cellule de mesure du calorimètre Microcalix®, elle-même située sur la ligne de diffraction des rayons X. Les données d'intensité de rayons X diffractés sont enregistrées par un détecteur charge-coupled device (CCD) à 2 dimensions placé à une longueur de 554 mm des échantillons, permettant l'acquisition sur une gamme de vecteurs de diffusion allant de $0,08 \text{ \AA}^{-1}$ à $1,8 \text{ \AA}^{-1}$ (**Figure M-5**). Cette gamme de vecteurs de diffusion permet donc l'enregistrement simultané des petites et grandes distances des cristaux de triacylglycérols. Chaque enregistrement de diffraction des rayons X présente donc des cercles de diffraction concentriques, qui sont intégrés de manière radiale afin de produire un signal d'intensité diffractée en fonction du vecteur de diffusion q .

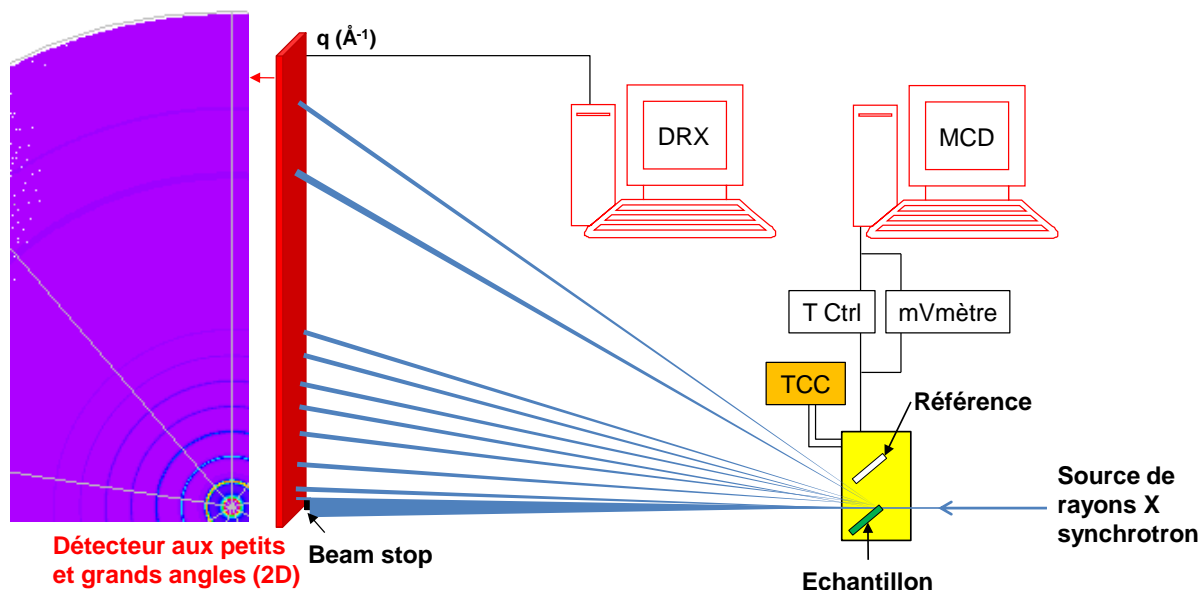


Figure M-5 : montage expérimental du couplage entre le calorimètre Microcalix® et la ligne de diffraction des rayons X SWING du synchrotron SOLEIL.

2.2. Protocole de cinétique en température utilisé sur les émulsions de matières grasses laitières

Les propriétés de cristallisation des émulsions de matières grasses laitières ont été étudiées à l'aide du couplage de la diffraction des rayons X avec la microcalorimétrie

différentielle. Pour cela, elles ont été stockées pendant $t > 48$ h à 4°C avant d'être insérées dans le calorimètre lui-même réglé à 4°C . A cette température, un enregistrement a été effectué en DRX, avant que les émulsions soient chauffées à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à 60°C . Pendant ce chauffage, le signal calorimétrique a été enregistré en même temps que l'intensité de rayons X diffractée afin d'étudier les propriétés de fusion des triacylglycérols cristallisés pendant $t > 48$ h à 4°C .

3. Traitement des données de diffraction des rayons X, paramètres structuraux extraits

3.1. Etalonnage des détecteurs en vecteur de diffusion q

L'étalonnage des détecteurs en vecteur de diffusion est réalisé à l'aide de deux molécules :

- le bécénate d'argent caractérisé par des pics de diffraction intenses, fins, et bien caractérisés avec un vecteur de diffusion correspondant au premier ordre de diffraction $q_{001} = 0,10763 \text{ \AA}^{-1}$ soit $d = 58,38 \text{ \AA}$ de distance de répétition. Le bécénate d'argent est utilisé pour étalonner le détecteur des petits angles de la ligne de DRX du CNRS et le détecteur 2D de la ligne SWING du synchrotron SOLEIL.
- la tristéarine synthétisée et purifiée à l'UMR du CNRS 8612 caractérisée aux petits angles par un pic au vecteur de diffusion du premier ordre $q_{001} = 0,13916 \text{ \AA}^{-1}$, soit une distance de répétition $d = 45,15 \text{ \AA}$. La tristéarine est également caractérisée par des pics aux vecteurs de diffusion $q = 1,363, 1,636$ et $1,698 \text{ \AA}^{-1}$, correspondant à des distances de répétition $d = 4,61, 3,84$ et $3,70 \text{ \AA}$. La tristéarine est utilisée pour étalonner le détecteur des grands angles de la ligne de DRX du CNRS et le détecteur 2D de la ligne SWING du synchrotron SOLEIL.

3.2. Paramètres extraits des enregistrements de diffraction des rayons X

Les données de DRX ont été traitées à l'aide du logiciel PeakFit (Jandel Scientific, Allemagne) afin d'extraire des paramètres de forme et position des pics. Chaque pic a été ajusté à l'aide d'une fonction pseudo-Voigt, prenant en compte des paramètres gaussiens et lorentziens (Lopez, 2001) :

$$y = a_0 \left(\frac{\frac{a_3 \sqrt{\ln 2}}{a_2 \sqrt{\pi}} \exp\left(-4 \ln 2 \left(\frac{x-a_1}{a_2}\right)^2\right) + \frac{1-a_3}{\pi a_2 \left(1+4\left(\frac{x-a_1}{a_2}\right)^2\right)}}{\frac{a_3 \sqrt{\ln 2}}{a_2 \sqrt{\pi}} + \frac{1-a_3}{\pi a_2}} \right) \quad \text{Équation 12}$$

où $a_0 =$ amplitude ; $a_1 =$ centre, $a_2 =$ largeur et $a_3 =$ forme.

Cette équation permet de déterminer la position en q des pics (q_{\max}), la largeur à mi-hauteur (FWHM), l'intensité maximale des pics (I_{\max}) et l'aire sous chaque pic.

Parallèlement, les données ont été traitées en bloc par cinétique à l'aide du logiciel R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), selon une procédure informatique écrite spécifiquement dans le cadre de cette thèse pour tracer les données dans des graphs en 2D ou 3D, et caractériser la position des pics q_{\max} et leur intensité relative exprimé en % du pic le plus intense $I_{\%}$.

3.3. Lissage des données enregistrées sur la ligne de laboratoire du CNRS

Les données de DRX enregistrées sur la ligne de laboratoire du CNRS Châtenay-Malabry ont montré un niveau de bruit relativement important et gênant les traitements de données décrit plus haut. Pour améliorer le rapport signal sur bruit des données acquises sur cette ligne de DRX de laboratoire, nous avons proposé une procédure de lissage basée sur une approche statistique.

Pour un groupe de données homogènes, c'est-à-dire l'ensemble des enregistrements de DRX réalisés sur les crèmes et l'ensemble des enregistrements de DRX réalisés sur les matières grasses extraites, nous avons procédé comme suit :

- définition d'un même vecteur de diffusion étalon pour l'ensemble des données afin de permettre la correspondance en un unique vecteur de diffusion q et un numéro de canal de chacun des 2 détecteurs (SAXS et WAXS).
- normalisation des données en intensité pour chacun des 2 détecteurs utilisés. Une zone de 50 canaux adjacents où le signal pour chaque enregistrement est le plus faible est choisie. Cette zone correspond ainsi à un signal diffusé le plus faible possible, et donc indépendant
- réalisation d'une ACP pour chaque détecteur (SAXS et WAXS) prenant en compte l'ensemble des données normalisées avec comme individus les enregistrements et comme variables les numéros de canal des détecteurs, correspondant alors à un vecteur de diffusion unique.
- choix du nombre de premières composantes principales contenant de l'information sur la base du graphique d'effondrement de la variance (**Figure M-6**).
- lissage faible de ces premières composantes principales choisies à l'aide d'une procédure Loess (paramètre de filtre : 0,01).
- recombinaison des données lissées à partir des composantes principales choisies lissées et des coordonnées des individus dans la nouvelle base définie par l'ACP.

Cette procédure de lissage semble permettre la réduction importante du bruit de fond sans pour autant réduire les informations sur le signal propre de DRX. Cette procédure utilise la propriété de redondance de l'information utile due à la prise en compte d'un grand nombre de données de même type, par rapport au caractère aléatoire du bruit de fond.

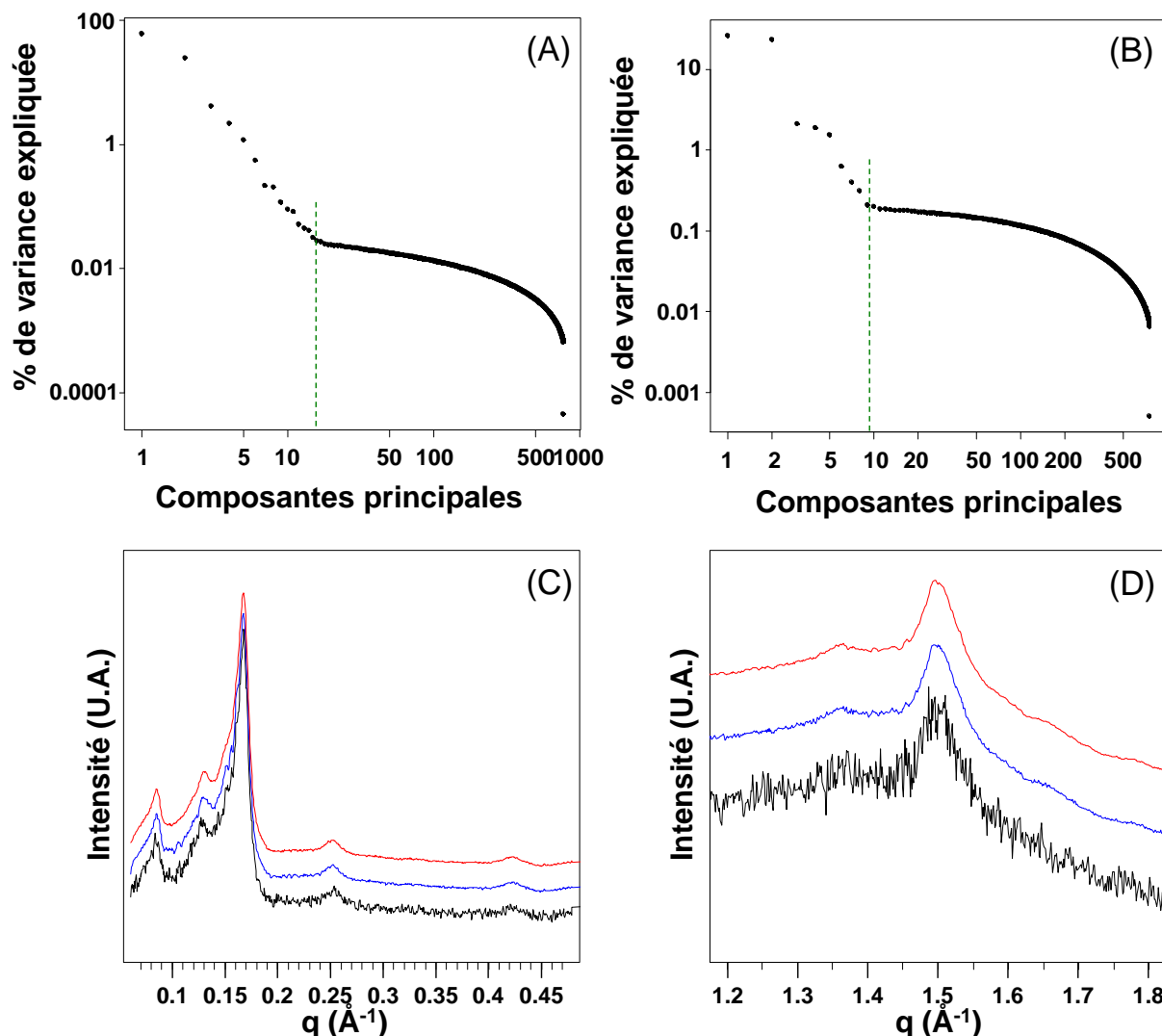


Figure M-6 : diagrammes d'éboulement du pourcentage de variance représentée par chaque composante principale issue de l'ACP sur les données de DRX aux petits angles (A) et grands angles de diffraction (B). Le trait vertical en pointillé montre le nombre de composantes principales choisies pour reconstruire les diagrammes de DRX lissés. Exemple de lissage par ACP sur un enregistrement de DRX aux petits angles (C) et aux grands angles de diffraction (D). Le diagramme en noir est le diagramme brut, le diagramme en bleu est lissé par reconstruction à partir des premières composantes principales brutes et le diagramme en rouge est lissé par reconstruction à partir des premières composantes principales lissées.

I. Microscopie en lumière polarisée

Le montage utilisé pour les expérimentations de microscopie en lumière polarisée est le même que celui utilisé par Lopez *et al.* (2002). Brièvement, une goutte de chaque

échantillon à analyser en microscopie en lumière polarisée (laits ou matières grasses laitières anhydres) est placée entre deux lamelles circulaires en verre. Les échantillons ainsi préparés sont chauffés à 60°C pendant 1 minute avant d'être placés sur la platine d'observation du microscope.

A l'issue de ce chauffage, les échantillons entre lamelles sont placés sur une platine entre polariseurs croisés et sous lumière blanche d'un microscope Nikon E600 Eclipse (Champigny sur Marne, France) équipé d'un objectif long focus (LWD 40x 0,55 ; 0-2 mm). Un appareil photo Nikon Coolpix 950 est utilisé pour enregistrer les images observées dans l'objectif du microscope avec une résolution de 1600 x 1200 pixels.

Sur cette platine, les échantillons sont placés une cavité régulée par effets Peltier dont la température est ainsi contrôlée à $\pm 0,2^\circ\text{C}$. Plusieurs clichés sont pris immédiatement après un refroidissement de la platine de 60°C jusqu'à 6°C à une vitesse de 0,5°C/min pour matières grasses laitières anhydres ou 3°C/min pour les crèmes.

J. Rhéologie

Des échantillons d'origine laitière (beurres et matières grasses laitières anhydres) ont été analysés par différentes méthodes rhéologiques afin de déterminer certaines propriétés de texture de ces échantillons. En ce qui concerne les matières grasses laitières anhydres, des mesures de viscoélasticité ont été réalisées dans la région viscoélastique linéaire des échantillons. En ce qui concerne les beurres, des mesures de tests de compression ont été réalisées afin d'évaluer la dureté des beurres produits dans le cadre du projet AGILAIT.

1. Mesures du comportement viscoélastique des matières grasses laitières anhydres

Le module de conservation viscoélastique G' des matières grasses laitières anhydres produites dans le cadre du projet AGILAIT a été évalué en fonction de la température lors d'une stimulation à contrainte et fréquence constante afin d'étudier les propriétés de texture de ces matières grasses. Un échantillon de chaque matière grasse a ainsi été placé dans un rhéomètre Physica MCR 301 (Anton Paar GmbH, Graz, Autriche) monté en géométrie plan – plan de 25 mm de diamètre. soumis à une légère oscillation. Le plan supérieur de mesure était un plan strié PP25-P2 (Anton Paar GmbH, Graz, Autriche), la plan inférieur était contrôlé en température par effet Peltier à l'aide d'un dispositif P-PTD 200 (Anton Parr GmbH, Graz, Autriche) et une enceinte thermostatée H-PTD 200 (Anton Parr GmbH, Graz, Autriche)

assurait également l'isolation en température du système de mesure. La **Figure M-7** présente le montage expérimental.

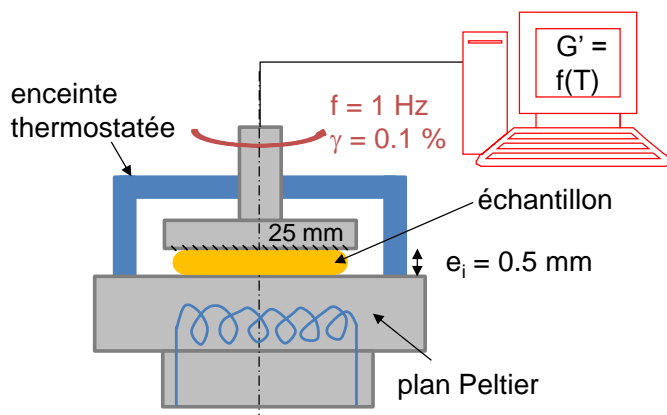


Figure M-7 : montage expérimental pour les mesures de module de conservation viscoélastique des matières grasses laitières anhydres en fonction de la température à fréquence et contrainte constantes.

Pour les mesures à proprement parler, environ 300 μL de chaque échantillon préalablement fondu pendant 2 minutes à 60°C a été placé sur le plan inférieur lui-même réglé à une température de 50°C. Le plan supérieur a ensuite été positionné pour les mesures avec un entrefer de 0,5 mm. Chaque échantillon a ensuite été maintenu à 50°C pendant 5 minutes avant d'être soumis à un refroidissement de 50°C à -20°C à 0,5°C/min à déformation et fréquence constantes (0,1% et 1 Hz, respectivement). Ces conditions de mesures ont été vérifiées comme étant dans la région viscoélastique linéaire de chaque échantillon, déterminée par mesures du module de conservation G' à 5°C, 15°C, 25°C et 30°C en appliquant un balayage en contrainte à une fréquence constante de 1 Hz. Ensuite, chaque échantillon a été conservé pendant 15 minutes à -20°C avant d'être réchauffé à 0,5°C/min jusqu'à 60°C alors qu'il subissait à nouveau une stimulation en oscillation à 0,1% et 1 Hz. Le module de conservation G' a été enregistré en triplicat pour chaque matière grasse lors de ce protocole en température. Durant toute la procédure de mesure, l'entrefer a été ajusté en maintenant la force normale au plan à 0 N afin de compenser toute éventuelle dilatation ou contraction de l'échantillon.

2. Mesure de force de compression des beurres

La résistance à l'enfoncement de cubes de beurres, reflétant leur dureté et leur tartinabilité a été caractérisée par pénétrométrie. Pour cela, le travail nécessaire pour écraser les cubes de beurre de 2 cm d'arête stockés à 4°C pendant 45-60 jours sur 10 mm a été

Matériels et méthodes

déterminé au cours de 10 mesures par beurre à l'aide d'un Instron Universal Testing Machine (Instron, Canton, Massachusetts) équipé d'un capteur de force de 1 kN.

Pratiquement, les cubes de beurres ont été prédécoupés à 4°C à l'aide d'un calibre muni de fils à couper le beurre pour réaliser des cubes calibrés de 2 cm d'arrête, puis placés en réfrigérateur pendant 48 h à 4°C. Les cubes ont ensuite été disposés sur le plan de mesure de l'Instron Universal Testing Machine dans une pièce thermostatée à 18°C. La mesure est lancée immédiatement après placement d'un cube de beurre sur le plan de mesure et ajustement de la hauteur du capteur de force afin qu'il affleure la face supérieure du cube ainsi placé.

RESULTATS

CHAPITRE I :
PROPRIETES DE CRISTALLISATION DES TRIACYLGLYCEROLS
LAIERS EN MILIEU ANHYDRE EN FONCTION DE LEUR
COMPOSITION EN ACIDES GRAS

Chapitre I

I. INTRODUCTION

Ce chapitre a pour vocation de fournir les premiers éléments de comparaison des propriétés physiques de matières grasses laitières anhydres de composition classique en acides gras et enrichis en acides gras insaturés par le biais de l'alimentation animale. Pour cela, nous avons étudié les propriétés de cristallisation des triacylglycérols extraits de laits produits à partir de régimes témoins et riches en acides gras insaturés. Les méthodes de caractérisation utilisées dans cette parties sont la diffraction des rayons X, la microcalorimétrie différentielle, la microscopie et la rhéologie. Elle nous ont permis de relier les propriétés de cristallisation des triacylglycérols à différentes échelles (moléculaire, microscopique et macroscopique) et de conclure sur des mécanismes de cristallisation différents entre les triacylglycérols témoins et ceux enrichis en acides gras insaturés.

Dans un premier temps, nous présenterons dans ce chapitre la composition en acides gras des matières grasses anhydres utilisées dans cette thèse, en mettant en avant ce qui les différencie. En deuxième partie, un article rédigé en vue de sa publication dans une revue scientifique à comité de lecture présente les résultats obtenus sur les propriétés de cristallisation des triacylglycérols anhydres à l'aide d'une approche multi-échelle mettant en avant les techniques classiques de diffraction des rayons X, microcalorimétrie différentielle et microscopie à lumière polarisée avec une technique rhéologique. Enfin, la dernière partie de ce chapitre présente une méthode de détermination de la quantité de matière grasse solide en fonction de la température à partir d'une méthode calorimétrique, compte tenu de l'importance de ce paramètre vis-à-vis des propriétés de texture et de fonctionnalités des matières grasses.

II. ECHANTILLONS ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Plusieurs échantillons de matières grasses ont été utilisés afin d'étudier les propriétés de cristallisation des triacylglycérols en fonction de leur composition en acides gras à l'état anhydre. Pour rappel, jusqu'à 14 échantillons de matières grasses provenant de régimes différents offerts aux vaches ont été utilisés dans cette partie. Ces échantillons sont détaillés dans la partie **Matériels et méthodes**. Nous rappelons toutefois les codes utilisés dans le **Tableau CI-1**. Afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats, les matières grasses extraites des crèmes ont été reçues de 3 à 4 fois sur des périodes de 2 semaines, exceptée pour les crèmes « Herbe-blé » et « Herbe-colza » reçues uniquement 1 fois. Chaque réception correspondait à une traite du soir et du matin combinée pour un cumul de 6 vaches au moins.

Tableau CI-1 : régimes alimentaires utilisés pour produire les matières grasses témoins et enrichis en acides gras insaturés. EM = ensilage de maïs ; EH = ensilage d’herbe ; Luz = bouchons de luzerne déshydratés.

Code	Base d'alimentation	Additif
B1	EM + EH + Luz	- (<i>témoin</i>)
B2	EM + EH + Luz	5% huile de tournesol
B3	EM + EH + Luz	5% huile de lin
B5	EM	- (<i>témoin</i>)
B6	EM	5% huile de colza
B7	EM	5% huile de lin
B8	EH	- (<i>témoin</i>)
B9	EH	5% huile de colza
B10	EH	5% huile de lin
Indus	Lait de grand mélange Bretagne	- (<i>témoin</i>)
Blé	EM + EH	Blé
Colza	EM + EH	Graines de colza aplaties
Herbe-Blé	Herbe pâturée	Blé
Herbe-Colza	Herbe pâturée	Graines de colza aplaties

Des fractions des matières grasses B8 et B10 ont été utilisées pour déterminer les variations d’enthalpies de fusion relatives aux triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion tels que décrits par Marangoni et Lencki (1998), afin de nous permettre d’estimer au mieux le taux de matière grasse solide en fonction de la température à partir de données calorimétriques. Deux températures de fractionnement ont été choisies d’après les données de Timms (1980), Marangoni et Lencki (1998) et Kaylegian et Lindsay (1992) pour séparer les triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion des matières grasses laitières : 0°C et 15°C. Ces fractions ont été fabriquées selon la procédure décrite dans la partie **Matériels et méthodes**. Les codes utilisés pour ces fractions sont donnés dans le **Tableau CI-2**.

Tableau CI-2 : codes des fractions de matières grasses B8 et B10 utilisées pour déterminer les variations d’enthalpie de fusion des triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion.

Code de la matière grasse d'origine	B8	B10
Régime utilisé	EH	EH + 5% huile lin
Fraction solide à 15°C	B8 sol15	B10 sol15
Fraction liquide à 15°C et solide à 0°C	B8 liq15-sol0	B10 liq15-sol0
Fraction liquide à 0°C	B8 liq0	B10 liq0

III. RESULTATS ET DISCUSSION

A. Composition en acides gras des différentes matières grasses étudiées

La composition en acides gras des matières grasses étudiées dans cette thèse est au cœur du problème. Plusieurs échantillons de matière grasse ont été utilisés tout au long de cette thèse, issus de laits provenant de régimes alimentaires différents offerts aux vaches. L'objectif de cette partie est de montrer en quoi les matières grasses étudiées sont différentes en composition. Pour cela, la composition en acides gras de l'ensemble des matières grasses étudiées et répertoriées dans la partie **Echantillons et protocoles expérimentaux** de ce chapitre a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse tel que décrit dans la partie **Matériels et méthodes**. Nous ne détaillerons pas ici les compositions en acides gras de l'ensemble des régimes, mais elles seront consignées en **Annexe II**. En revanche, une analyse en composante principale (ACP, Jolliffe, 1986) permet d'identifier rapidement les groupes de matières grasses dont la composition est proche ainsi que les acides gras dont la concentration permet d'expliquer l'existence de ces groupes de matières grasses. Pour cela, l'ensemble des compositions individuelles en acides gras dont la teneur est supérieure à 0,5% a été pris en compte. La composition moyenne en acides gras est donnée dans la **Figure CI-1**, la **Figure CI-2** montre les coordonnées des individus dans la nouvelle base de représentation définie à partir des anciennes variables d'acides gras.

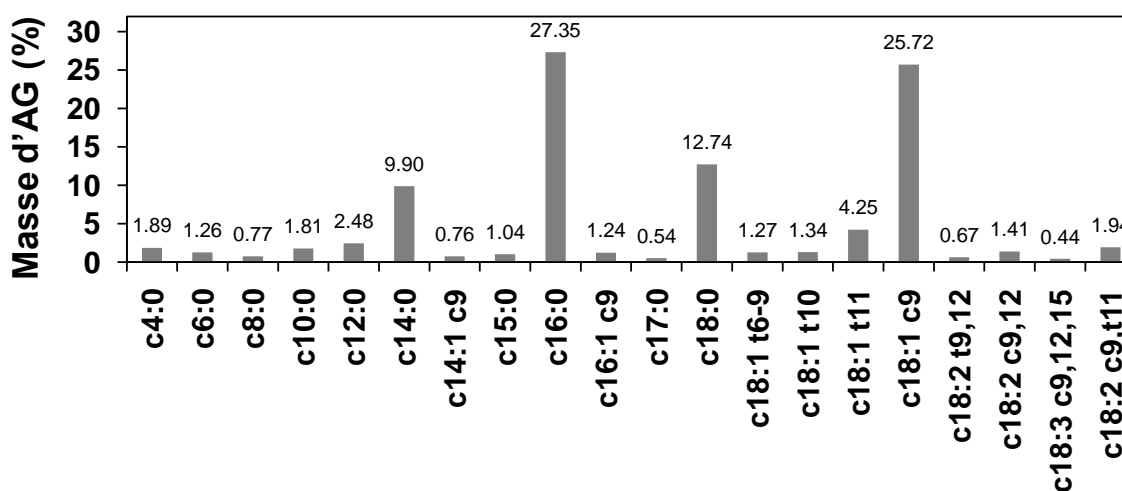


Figure CI-1 : composition moyenne en acides gras de l'ensemble des matières grasses utilisées dans la thèse. Seuls les acides gras dont la teneur dépasse 0,5% sont représentés.

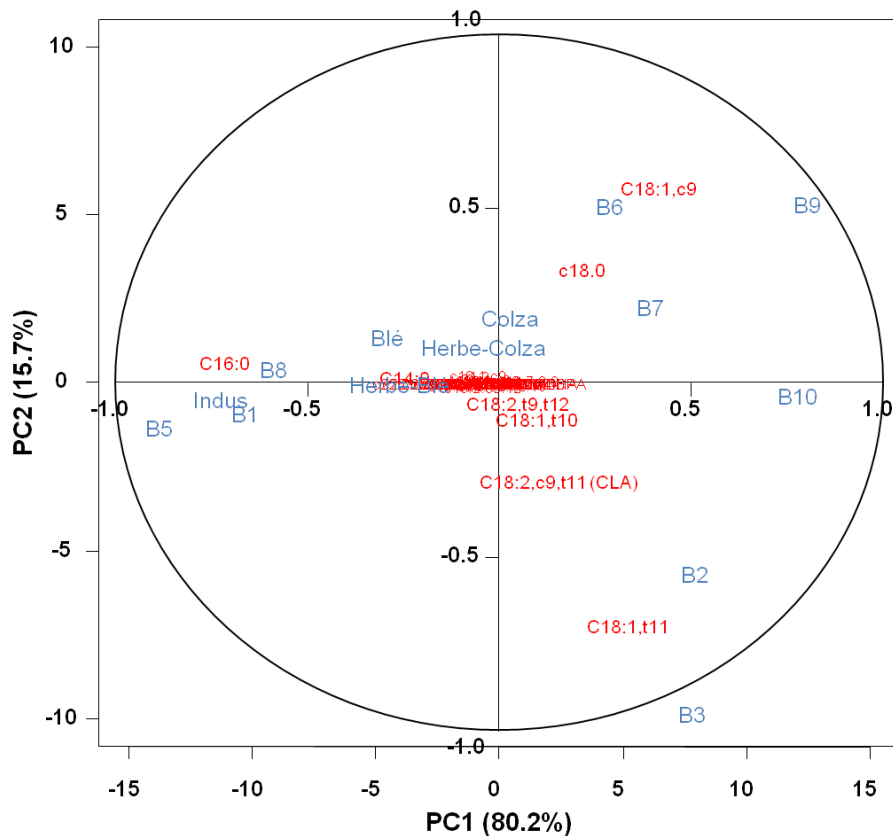


Figure CI-2 : représentation des compositions en acides gras des matières grasses issues des régimes étudiés sur les deux premiers axes de l'analyse en composantes principale. Les régimes sont en bleu (repère extérieur), les acides gras sont en rouge (repère central).

Le premier axe de l'analyse en composante principale sur la **Figure CI-2** représente 80,2% de la variabilité totale. Il est défini majoritairement par l'acide gras C16:0, ainsi que par les acides gras C18:1,c9, C18:1,t11 et dans une moindre mesure les C18:0 et C18:2, c9,t11 et C14:0. Ce premier axe sépare les échantillons de matière grasse en 3 pôles plus ou moins distincts : les échantillons témoins B1, B5, B8, Industriel d'une part, les échantillons issus des régimes riches en acides gras insaturés de la phase de validation Blé, Colza, Herbe-blé et Herbe-colza, puis les échantillons issus des régimes riches en acides gras insaturés B2, B3, B6, B7, B9 et B10 d'autre part. Les matières grasses les plus à gauche de la carte des individus sont les plus riches en C16:0, compte tenu de leur positionnement par rapport aux cercle des variables en **Figure CI-2**. Au contraire, les matières grasses sur la droite de la carte des individus sont les plus riches en acides gras insaturés tels que le C18:1,c9 et C18:1,t11. Le premier axe pourrait donc être appelé axe de saturation, en excluant l'acide gras C18:0 qui ne suit pas cette tendance à cause des mécanismes de biohydrogénation se déroulant dans le rumen bovin (Chilliard *et al.*, 2001b).

Chapitre I

Le deuxième axe, qui compte pour 15,7% de la variabilité, est défini par quatre acides gras essentiellement : C18:0 et C18:1,*c9* d'une part et C18:1,*t11* et C18:2,*c9,t11* d'autre part. Cet axe montre une séparation des matières grasses les plus riches en acides gras insaturés avec B6, B7 et B9 d'une part, et B2 et B3 d'autre part. La matière grasse B10 se place en intermédiaire. Selon cette ACP, les acides gras C18:0, C18:1,*c9* d'un côté et C18:1,*t11*, C18:2,*c9,t11* de l'autre côté seraient antagonistes : une concentration importante en C18:0 et C18:1,*c9* serait synonyme de concentration plus faible en C18:1,*t11* et C18:2,*c9,t11*. Cela semble logique compte tenu du métabolisme des vaches laitières et de la flore ruménique (Chilliard *et al.*, 2001b). Nous observons ici simplement un effet de la biohydrogénation. Malgré tout, la variabilité des échantillons selon ce 2^{ème} axe reste toutefois mineure par rapport à l'axe 1.

En tout état de cause, les matières grasses étudiées peuvent être réduites en terme de composition en acides gras à 3 groupes : les matières grasses riches en acides gras saturés mais pauvres en C18:0, les matières grasses intermédiaires moyennes et les matières grasses riches en acides gras insaturés et en C18:0. Pour simplifier certaines parties de cette thèse, nous n'étudierons dans certains cas que des matières grasses extrêmes. La matière grasse B10 étant la plus moyenne des matières grasses du pôle des matières grasses riches en acides gras insaturés sur la **Figure CI-2**, nous avons choisi d'étudier cette matière grasse plus particulièrement, avec son homologue témoin B8.

B. Article rédigé en vue de sa soumission dans une revue scientifique à comité de lecture : approche multi-échelle des propriétés de cristallisation des triacylglycérols laitiers anhydres en fonction de leur composition en acides gras

Comparative analysis of the crystallization properties of milk triacylglycerols as a function of their unsaturated fatty acid content: a multi-scale approach

Simon Bugeat^{a,b,c,d}, Marie-Hélène Famelart^{b,c}, Valérie Briard-Bion^{b,c}, Philippe Pradel^e, Bruno Martin^f, Sylviane Lesieur^d, Claudie Bourgaux^d, Christelle Lopez^{b,c,*}

^a CNIEL, 42 rue de Châteaudun, F-75314 Paris, France

^b INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

^c AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

^d CNRS, UMR8612 Université Paris-Sud XI, 5 rue J.-B. Clément, F-92296 Châtenay-Malabry, France

^e INRA Domaine expérimental de Marcenat, F-15190 Marcenat, France

^f INRA, URH1213 Unité de Recherches sur les Herbivores, F-63122 Saint-Genes-Champanelle, France

* corresponding author.

E-mail address: Christelle.Lopez@rennes.inra.fr

Phone number: +33 2 23 48 56 17

Fax number: +33 2 23 48 53 50

ABSTRACT

Increasing the unsaturated fatty acid (UFA) content in milk fat is of primary importance to face nutritional recommendations. However, such changes can affect the crystallization properties of milk triacylglycerols (TAG) and their functional properties. The objectives of this study were to investigate the crystallization properties of milk fat as a function of its fatty acid (FA) composition upon cooling and heating conditions and relate them to macroscopic observations about their rheological properties. UFA-enriched TAG were obtained using cow diet supplemented with linseed oil and compared to control TAG. The crystallization properties of TAG were studied using time resolved X-ray diffraction coupled to differential scanning calorimetry. The rheological properties of TAG were also studied using oscillatory viscoelasticity in similar temperature conditions. We characterized the coexistence of several solid fat phases with a liquid phase, the characteristics of which depended on the temperature and FA composition. The enrichment in UFA from 29 to 52 wt% led to i) a decrease in the crystallization enthalpy variation at -20°C from 80 to 63 J/g, presumably linked to a decrease in the solid fat content, ii) a decrease in the storage modulus of about 50% at -20°C, and iii) the formation of 2 chain length (2L, 48.9-39.0 Å) at 16°C and 3 chain length (3L, 71.8 Å) crystalline structures at 11°C with $\alpha + \beta'$ polymorphic forms in the control TAG while 2L (49.4 Å) at 15°C and 3L (69.3-74.6 Å) at 8°C with $\alpha + \beta'$ polymorphic forms were formed with UFA-enriched TAG on cooling. On heating, the reorganization of the crystalline structures proved to be different between control and UFA-enriched TAG, especially in the medium melting range where β' 3L (66.8 Å) crystals were evidenced in the control TAG but not in the UFA-enriched TAG. Such experiments increased the knowledge about the

Chapitre I

crystallization properties of complex TAG and will be useful for industrial applications and the development of UFA-enriched dairy products with improved nutritional properties.

Keywords: Milk fat crystallization, unsaturated fatty acids, coupled techniques, polymorphism, rheology, calorimetry, X-ray diffraction, polarized light microscopy

1. Introduction

Fat crystals are essential in the manufacture of dairy products (butter, whipped cream) and highly condition the physical properties of high-fat content food products (Goff, 1997; Wright et al., 2001). They can also alter the quality of food products (Narine & Marangoni &, 1999). Moreover, information about the crystallization and functional properties of milk fat enriched in unsaturated fatty acids to improve its nutritional properties is scarce (Smet et al., 2009; Smet et al., 2010). Hence, it is interesting for physico-chemists and food industrials to improve the knowledge about milk fat crystallization behavior, particularly as a function of its fatty acid composition.

Population studies have long established relationships between saturated fatty acids (SFA) in the diet and the incidence of coronary heart diseases (Williams, 2000), which is a leading cause of death in most industrialized countries. Thus, the decrease in the consumption of food products rich in SFA in favor of unsaturated dietary fats is highly recommended by nutritionists to prevent cardiovascular disease risks (Joint FAO/WHO Expert Consultation, 2003). Whole milk and some dairy products have been listed as one of the risk factors in coronary heart disease due to their high content of SFA (Noakes et al., 1996). Milk fat mainly contains triacylglycerols (TAG; 98% of milk lipids) (Christie, 1995) in which more than 400 fatty acids of various chain length and degree of unsaturation have been identified (Jensen, 2002). Bovine milk fat contains high amounts of SFA, i.e. 65 to 70% of total fatty acids (Jensen, 2002). Improving the fatty acid composition of milk by reducing the the saturation degree is therefore of considerable interest for food industry, in agreement with healthy nutrition.

A number of ways exist to increase the unsaturated fatty acids (UFA) content of milk fat, such as (i) technology, mainly with dry fractionation of fat, (ii) chemical methods such as enzymatic interesterification, (iii) mixing of milk fat with UFA-rich vegetable oil or fish oil, (iv) selection of cows and (v) dietary manipulation by means of feeding dairy animals (Palmquist et al., 1993; Smet et al., 2009; Smet et al., 2010; Lopez et al., 2008). Numerous studies have been published on the use of cow dietary supplements to increase UFA in milk fat since it is among the most natural and efficient ways known to alter the milk fatty acid composition. A recent review focused on the influence of the addition of vegetable seeds and oils, namely linseed, rapeseed, soybeans and sunflower to the cow diet on milk FA composition (Glasser et al. 2008).

The increase in the UFA content of TAG will undoubtedly change the physicochemical properties of the resulting milk fat and dairy products, especially their thermal properties and crystallization behavior (Ollivon, 1992; Smet et al., 2010). This may affect the functional properties and texture of dairy products as well as the consumer acceptability (Marangoni & Rousseau, 1996; Bobe et al., 2003; Chen et al., 2004). In this context, investigating both crystallization process, resulting structural organization of UFA-enriched milk TAG and rheological properties is of primary importance. From a general point of view, the difficulty of studying milk fat crystallization lies in the large distribution of the FA residues among the TAG (more than 200 TAG species according to Gresti et al., 1993), which therefore partition into liquid and crystalline solid states over a wide range of temperatures spanning from -40°C to 40°C (Timms, 1980; Lopez & Ollivon, 2009). Furthermore, TAG molecules individually exhibit a monotropic polymorphism which notably complicates the thermal

behavior of their mixes and consequently the control of the structure of the milk fat in its solid state as a function of the temperature applied during processing and conditioning treatments (Ollivon & Perron, 1992). Under such thermal conditions, milk fat is partially crystallized (Lopez & Ollivon, 2009). The knowledge of the polymorphic behavior of the TAG constituting the solid fraction of the fat appears then essential to anticipate the texture and functional properties of dairy products (Wright et al., 2001).

A number of works has been focusing on milk fat thermodynamics by using differential scanning calorimetry (DSC) to give an insight into TAG phase behavior (Timms, 1980; Marangoni and Lencki, 1998; Lopez & Ollivon, 2009). The authors have accordingly described complex crystallization and melting processes characterized by the existence of three distinct non-isothermal solid-to-liquid phase transitions referred to as high- medium- and low-melting point fractions and corresponding to partial segregation of the mix constituting TAG species (Timms, 1980; Lavigne & Ollivon, 1997; Marangoni & Lencki, 1998; Lopez et al., 2006; Lopez & Ollivon, 2009). Structural characterization of the solid phases formed in milk TAG emulsions has been also undertaken by the group of Michel Ollivon using the coupling synchrotron X-ray diffraction and DSC (ten Grotenhuis et al., 1999; Lopez et al., 2001a, 2001b, 2002, 2005). The crystalline arrangement of TAG in anhydrous milk fat was especially investigated (Lopez et al., 2001a, 2002). In summary, the longitudinal organizations of milk TAG in bulk correspond to double-chain length (2L in the 40.5-47 Å range) or triple-chain length (3L in the 62-72 Å range) lamellar arrangements (Lopez & Briard-Bion, 2007) while the polymorphic forms corresponding to the lateral packing of the TAG hydrocarbon chains already identified in milk fat emulsions are sub- α , α , β' and β forms (Lopez et al., 2001a, 2001b, 2002, 2005). Recently, Smet et al. (2010) investigated the crystallization behavior of UFA-milk fat in bulk using DSC and X-ray diffraction. However, none of these previous studies has been addressed to emulsions of UFA-enriched TAG.

The objective of this work was to investigate the effect of increased UFA content on the crystallization properties of milk TAG in bulk during cooling and heating at a medium rate (0.5°C/min) from a molecular, thermal and rheological point of view. Experiments using DSC and time-resolved X-ray diffraction as a function of temperature were implemented to compare phase behaviors and structural organizations of either control TAG or UFA-enriched milk TAG. The viscoelastic properties of such milk fats were also investigated on comparable temperature treatments in order to link molecular and macroscopic observations.

2. Materials and methods

2.1. Experimental milk samples and anhydrous milk fats

Milk samples containing control TAG or UFA-enriched TAG were obtained from six distinct groups of six Holstein cows each at the same lactation stage and producing close amounts of milk with similar compositions. Three pairs of groups were created, noted A, B and C, comprising one control and one UFA-enriched group in each pair. During four consecutive weeks, the cows from the control groups received daily 1.7 kg dry matter (DM) of corn grass silage *ad libitum* and 3.1 kg DM of cereals (control A), 1.7 kg DM of corn silage *ad libitum* and 3.1 kg DM of cereals (control B) and 1.7 kg DM of grass silage *ad libitum* and 3.1 kg DM of cereals (control C). The cows from the UFA-enriched groups received daily the same quantity of silage *ad libitum* plus 0.6 kg DM of soybean meal (70%

Chapitre I

barley and 30% maize) and 0.7 kg of oil from linseed (UFA-enriched groups). Linseed oil was dispersed on the silage and the quantities of oil were adjusted individually to bring an oil level of 5% dry matter for each cow. For each group of cows, the milk productions recovered twice a day from milkings in the morning and evening were mixed and refrigerated at 4°C.

Milk fat globules were concentrated from milk by centrifugation at 45°C to about 50% wt/wt fat content with a plate-separator (Elecrem, Vanves, France) and stored at -20°C. Then, the concentrated milk fat globules were stored for 1 night at 4°C. TAG samples were prepared by churning milk fat globules at 10°C, heating at 70°C for 10 min to melt TAG and separation of TAG from the aqueous phase by centrifugation at 1500 g at 55°C for 10 min. The supernatant composed of the TAG and referred to as bulk TAG in the following was taken and stored at -20°C until further experiments.

2.2. Fatty acid composition determination

Overall fatty acid compositions of total and fractioned TAG were determined according to the method adapted from [Park & Goins \(1994\)](#). This consists in the conversion of initial TAG into fatty acid (FA) methyl esters which were then analyzed by gas chromatography (GC). This was performed by using an Agilent 7890 GC system (Agilent, Santa Clara, USA) with instrument parameters already reported by [Lopez et al. \(2008\)](#). Retention times were determined by injection of commercial mixes of FA methyl esters standards (FAME Mix C4-C24 and FAME Mix C14-C22) and trans FAs all purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The analyses were performed in triplicate from two independent samples.

2.3. Rheological experiments

The rheological properties of the samples were investigated with a Physica MCR 301 rheometer (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) fitted with a serrated upper parallel plate (25 mm diameter, Anton Paar GmbH, Graz, Austria). Cooling and heating ramps were performed through the lower plate thanks to a Peltier temperature control device including a temperature control hood, both from Anton Paar (Anton Paar GmbH, Graz, Austria).

Each TAG sample was pre-heated at 60°C for 2 min in a hot water bath to ensure complete melting of existing TAG crystals. About 300 µL of each melted TAG sample were loaded on the lower plate previously heated at 50°C. Then the upper plate was lowered to the measuring position with a gap of 0.5 mm, and the normal force was imposed 0 N. The sample was kept for 5 min at 50°C. The samples were characterized by rheological measurements performed in the linear viscoelastic region (determined by preliminary experiments at 5, 15, 25 and 30°C) by applying a constant strain of 0.1% and a constant frequency of 1 Hz. The storage modulus (G' , Pa) was recorded in triplicate experiments during the following temperature protocol: i) the samples were cooled from 50°C to -20°C at 0.5°C/min, ii) then the samples were kept at -20°C for 15 minutes, iii) finally, the samples were heated from -20°C to 60°C at 0.5°C/min. All along this protocol, the gap between the plates was adjusted to maintain the normal force at 0 N.

2.4. Differential scanning calorimetry (DSC) experiments

Chapitre I

DSC measurements were performed with a DSC Q1000 (TA Instruments, Newcastle, DE) on the bulk TAG. Apparatus calibration was made with indium standard (156.66°C and 28.41 J/g melting temperature and enthalpy variation, respectively). Total sample masses, typically ranging from 9 to 16 mg, were introduced in 20 μ L aluminum pans (pans: 900793.901, lids: 900794.901, TA Instruments, Newcastle, DE) which were hermetically sealed after sample introduction. An empty pan was used as reference. The TAG sample pan was placed for 5 min at 60°C in the calorimeter to ensure the complete melting of existing TAG crystals. The pan was subjected to the previous temperature sweeps (2-3). Standard parameters were calculated by Universal Analysis 2000 v 4.1 D software (TA Instruments, Newcastle, DE). For the cooling step, the onset temperatures associated to the two principle exothermic events ($T_{\text{onset 1}}$ and $T_{\text{onset 2}}$), the minimal heat flow determined on the whole temperature range (Heat flow min), and the partial crystallization enthalpy variation calculated by integration of the heat flow from 23 to -19.5°C after subtraction of the baseline (ΔH_{cryst}). For the heating step, the final melting temperatures associated to the low and high melting peaks (LMP and HMP, respectively) ($T_{\text{offset LMP}}$, $T_{\text{offset HMP}}$), the maximal heat flow (Heat flow max), the heat flow measured at 25°C (Heat flow_{25°C}) and the partial fusion enthalpy variation calculated by direct integration of the heat flow from -17.5°C to 38°C (ΔH_{fus}).

The estimated solid fat content of the anhydrous TAG at -20°C was determined with a method adapted from Lopez et al. (2006) as follows. The TAG samples were introduced in the aluminum pans, stored at 4°C for $t = 48$ h, and introduced in the calorimeter previously cooled at 4°C. The TAG were then cooled to -50°C at 0.1°C/min in order to crystallize all the TAG in their most stable form. The melting profile of TAG was recorded on subsequent heating at 0.5°C/min from -50°C to 60°C to determine the total melting enthalpy variation ΔH_{total} , calculated between -40 and 45°C. The estimated SFC (%) was calculated according to the following equation: $\text{SFC at } -20^\circ\text{C} (\%) = [\Delta H_{\text{fus}} (\text{J/g TAG}) / \Delta H_{\text{total}} (\text{J/g TAG})] * 100$, in the approximation of averaging the mean latent heat of fusion for all TAG whatever their crystalline form and FA composition of TAG. All the thermal measurements were performed in triplicate. Since the results were obtained with good reproducibility, only one differential scanning calorimetry recording is shown per sample.

2.5. Polarized light microscopy experiments

Control A and UFA-enriched A TAG samples were examined by polarized light microscopy. The set up was the same as in Lopez et al. (2002). Briefly, both samples were heated for 1 minute at 60°C to erase all thermal history; then they were placed between two circular lamellae. The lamellae were placed in a cavity of a Peltier cooled stage, the temperature of which was controlled at $\pm 0.2^\circ\text{C}$. Both samples were cooled on the microscope stage at 0.5°C/min to 6°C, while photos were taken every 2 minutes, corresponding to a difference of 1°C.

2.6. X-Ray Diffraction coupled to Differential Scanning Calorimetry experiments (XRD / DSC)

X-ray diffraction (XRD) coupled to DSC experiments were performed on the laboratory beam line at CNRS Châtenay-Malabry, operating at a wave length of 1.54 Å. The set-up consisted in the insertion of a calorimeter (Microcalix®, Ollivon et al., 2006) on the laboratory X-Ray beam line. Two

Chapitre I

linear detectors (1024 channels each) allowed the recording of small ($0.06\text{-}0.48\text{ \AA}^{-1}$) and wide angles ($1.0\text{-}2.0\text{ \AA}^{-1}$) XRD, respectively. The diffracted intensity was reported as a function of the scattering vector $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$ where 2θ is the scattering angle and λ the wavelength of the incident beam. The channel to scattering vector q calibration of the XRD detectors was made with high purity tristearin (Lavigne et al., 1993) for wide angles and silver behenate (Blanton et al., 2000) for small angles. Calibration of the calorimeter for temperatures was made by melting pure lauric acid (melting temperature = 43.7°C) as described in Grabielle-Madelmont & Perron (1983).

Small volumes (around $20\text{ }\mu\text{L}$) of each TAG sample preheated at 60°C were loaded in thin quartz capillaries (GLAS W. Muller, Berlin, Germany) especially designed for XRD. The capillaries were introduced in the calorimeter at 60°C . Then the TAG samples were characterized by coupled XRD as a function of temperature (XRDT) at both small and wide angles and high sensitivity differential scanning calorimetry (DSC) thanks to the same temperature protocol used for the rheological experiments. During this temperature protocol, XRD patterns were recorded every 120 s with 118 s life time and 2 s dead time.

R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) was used to display the XRD patterns and determine the positions of the Bragg reflections. PeakFit software (Gendel Scientific, Germany) was used to determine the peak maximum intensities, thanks to fit with a Gaussian-Lorentzian sum (amplitude) equation as in Lopez et al. (2001c).

2.7. *Statistical analysis*

Analyses of variance have been carried out using Statgraphics Plus version 5 (Statistical Graphics Corp., Englewood Cliffs, NJ) on the rheological and the thermal parameters extracted taking the composition of fat (control vs UFA-enriched) as a qualitative factor of the ANOVA model. Bonferroni multiple sample comparison test with a 95% threshold was used to rank the samples.

3. Results

As similar physical properties were observed for all control TAG and for all UFA-enriched TAG, the figures show only results for control A and UFA-enriched A TAG samples. The physical properties of the other samples are summed up as extracted parameters from the data recorded and compiled in Tables.

3.1. *Fatty acid composition*

Table 1 shows the FA composition of the 6 TAG samples and the average FA composition of control vs UFA-enriched TAG, determined by gas chromatography.

Chapitre I

Table 1: Fatty acid composition (% weight mean values \pm standard deviation; 9 individual values) of the control and unsaturated fatty acid (UFA) enriched triacylglycerols

Fatty acids (FA)	Control A	UFA-enriched A	Control B	UFA-enriched B	Control C	UFA-enriched C	Control all	UFA-enriched all
C4:0	1.77 \pm 0.17 ^e	1.45 \pm 0.18 ^{bc}	1.50 \pm 0.11 ^c	1.29 \pm 0.09 ^{ab}	1.60 \pm 0.17 ^{cd}	1.11 \pm 0.10 ^a	1.63 \pm 0.19 ^x	1.28 \pm 0.19 ^y
C6:0	1.45 \pm 0.14 ^d	0.92 \pm 0.11 ^b	1.33 \pm 0.04 ^c	0.89 \pm 0.04 ^b	1.25 \pm 0.06 ^c	0.72 \pm 0.05 ^a	1.34 \pm 0.12 ^x	0.84 \pm 0.11 ^y
C8:0	1.01 \pm 0.08 ^d	0.56 \pm 0.06 ^b	1.03 \pm 0.02 ^d	0.61 \pm 0.02 ^b	0.89 \pm 0.02 ^c	0.43 \pm 0.03 ^a	0.98 \pm 0.08 ^x	0.53 \pm 0.09 ^y
C10:0	2.42 \pm 0.17 ^e	1.22 \pm 0.10 ^b	2.76 \pm 0.04 ^f	1.42 \pm 0.06 ^c	2.18 \pm 0.03 ^d	0.91 \pm 0.08 ^a	2.45 \pm 0.26 ^x	1.18 \pm 0.23 ^y
C12:0	3.20 \pm 0.19 ^e	1.67 \pm 0.10 ^b	3.91 \pm 0.12 ^f	1.99 \pm 0.10 ^c	3.00 \pm 0.03 ^d	1.22 \pm 0.10 ^a	3.37 \pm 0.42 ^x	1.63 \pm 0.34 ^y
C14:0	12.37 \pm 0.22 ^e	7.88 \pm 0.30 ^b	14.00 \pm 0.26 ^f	9.05 \pm 0.28 ^c	11.85 \pm 0.26 ^d	6.20 \pm 0.52 ^a	12.74 \pm 0.96 ^x	7.71 \pm 1.25 ^y
C14:1 <i>c9</i>	0.74 \pm 0.03 ^d	0.40 \pm 0.02 ^b	0.99 \pm 0.08 ^f	0.64 \pm 0.04 ^c	0.83 \pm 0.01 ^e	0.31 \pm 0.03 ^a	0.85 \pm 0.12 ^x	0.45 \pm 0.14 ^y
C15:0	1.04 \pm 0.02 ^c	0.94 \pm 0.01 ^b	1.20 \pm 0.10 ^d	0.81 \pm 0.02 ^a	1.14 \pm 0.04 ^d	0.96 \pm 0.06 ^b	1.13 \pm 0.09 ^x	0.90 \pm 0.07 ^y
C15:1 <i>c10</i>	0.32 \pm 0.03 ^b	0.05 \pm 0.05 ^a	0.40 \pm 0.02 ^c	0.32 \pm 0.01 ^b	0.07 \pm 0.08 ^a	0.06 \pm 0.01 ^a	0.26 \pm 0.15 ^x	0.14 \pm 0.13 ^y
C16:0	35.03 \pm 0.26 ^d	20.69 \pm 0.32 ^b	37.51 \pm 1.60 ^e	23.24 \pm 0.63 ^c	34.83 \pm 1.05 ^d	19.21 \pm 0.08 ^a	35.79 \pm 1.64 ^x	21.05 \pm 1.74 ^y
C16:1 <i>c9</i>	1.17 \pm 0.01 ^c	0.65 \pm 0.02 ^a	1.33 \pm 0.14 ^c	0.93 \pm 0.34 ^b	1.29 \pm 0.01 ^c	0.77 \pm 0.10 ^{ab}	1.26 \pm 0.10 ^x	0.78 \pm 0.23 ^y
C17:0	0.57 \pm 0.03 ^c	0.49 \pm 0.02 ^b	0.51 \pm 0.03 ^b	0.44 \pm 0.01 ^a	0.60 \pm 0.04 ^c	0.52 \pm 0.04 ^b	0.56 \pm 0.05 ^x	0.49 \pm 0.04 ^y
C17:1 <i>c10</i>	0.18 \pm 0.07 ^{ab}	0.14 \pm 0.01 ^a	0.20 \pm 0.01 ^{ab}	0.19 \pm 0.02 ^{ab}	0.22 \pm 0.06 ^b	0.18 \pm 0.03 ^{ab}	0.20 \pm 0.05 ^x	0.17 \pm 0.03 ^x
C18:0	11.21 \pm 0.20 ^b	11.84 \pm 0.61 ^b	9.52 \pm 1.03 ^a	14.86 \pm 0.44 ^c	11.89 \pm 0.50 ^b	17.33 \pm 0.54 ^d	10.87 \pm 1.20 ^y	14.68 \pm 2.34 ^x
C18:1 <i>t9</i>	0.68 \pm 0.03 ^b	1.81 \pm 0.22 ^d	0.54 \pm 0.06 ^{ab}	1.24 \pm 0.10 ^c	0.38 \pm 0.02 ^a	1.34 \pm 0.15 ^c	0.53 \pm 0.13 ^y	1.46 \pm 0.30 ^x
C18:1 <i>t10</i>	0.44 \pm 0.08 ^a	2.88 \pm 0.45 ^d	0.31 \pm 0.05 ^a	1.51 \pm 0.29 ^b	0.37 \pm 0.07 ^a	2.07 \pm 0.12 ^c	0.37 \pm 0.09 ^y	2.15 \pm 0.65 ^x
C18:1 <i>t11</i>	1.77 \pm 0.14 ^a	13.52 \pm 0.77 ^d	1.07 \pm 0.18 ^a	5.08 \pm 0.19 ^b	1.58 \pm 0.08 ^a	9.20 \pm 1.34 ^c	1.47 \pm 0.33 ^y	9.27 \pm 3.62 ^x
C18:1 <i>c9</i>	20.47 \pm 0.55 ^a	23.39 \pm 0.87 ^b	19.31 \pm 0.49 ^a	30.42 \pm 0.69 ^c	22.14 \pm 1.18 ^b	30.56 \pm 1.86 ^c	20.64 \pm 1.42 ^y	28.12 \pm 3.62 ^x
C18:2 <i>t9,12</i>	0.46 \pm 0.02 ^b	1.61 \pm 0.08 ^e	0.22 \pm 0.04 ^a	0.92 \pm 0.03 ^c	0.45 \pm 0.02 ^b	1.49 \pm 0.05 ^d	0.38 \pm 0.12 ^y	1.34 \pm 0.31 ^x
C18:2 <i>c9,12</i> (n-6)	1.50 \pm 0.05 ^d	1.19 \pm 0.06 ^b	1.26 \pm 0.04 ^{bc}	1.17 \pm 0.07 ^b	1.34 \pm 0.04 ^c	1.07 \pm 0.09 ^a	1.37 \pm 0.11 ^x	1.14 \pm 0.09 ^y
C18:3 <i>c9,12,15</i> (n-3)	0.55 \pm 0.02 ^d	0.43 \pm 0.03 ^c	0.17 \pm 0.01 ^a	0.31 \pm 0.03 ^b	0.76 \pm 0.07 ^e	0.52 \pm 0.01 ^d	0.50 \pm 0.25 ^x	0.42 \pm 0.09 ^x
C18:2 <i>c9,t11</i>	0.77 \pm 0.07 ^a	5.54 \pm 0.28 ^d	0.50 \pm 0.14 ^a	2.32 \pm 0.27 ^b	0.77 \pm 0.06 ^a	3.34 \pm 0.42 ^c	0.68 \pm 0.16 ^y	3.74 \pm 1.40 ^x
Saturated FA (SFA)	70.48 \pm 0.87 ^c	47.95 \pm 0.55 ^a	73.50 \pm 0.81 ^d	54.75 \pm 0.53 ^b	69.49 \pm 1.10 ^c	48.77 \pm 0.60 ^a	71.16 \pm 1.96 ^x	50.49 \pm 3.14 ^y
Unsaturated FA (UFA)	29.52 \pm 0.87 ^b	52.05 \pm 0.55 ^d	26.50 \pm 0.81 ^a	45.25 \pm 0.53 ^c	30.51 \pm 1.10 ^b	51.23 \pm 0.60 ^d	28.84 \pm 1.96 ^y	49.51 \pm 3.14 ^x
Monounsaturated FA	25.89 \pm 0.77 ^b	43.03 \pm 0.45 ^e	24.18 \pm 0.56 ^a	40.42 \pm 0.49 ^d	26.96 \pm 1.23 ^c	44.67 \pm 0.52 ^f	25.68 \pm 1.45 ^y	42.7 \pm 1.84 ^x
Polyunsaturated FA	3.63 \pm 0.15 ^b	9.02 \pm 0.29 ^e	2.32 \pm 0.31 ^a	4.83 \pm 0.47 ^c	3.55 \pm 0.13 ^b	6.56 \pm 0.37 ^d	3.17 \pm 0.65 ^y	6.81 \pm 1.79 ^x
Total <i>trans</i> FA	4.12 \pm 0.27 ^b	25.36 \pm 0.94 ^e	2.63 \pm 0.38 ^a	11.08 \pm 0.42 ^c	3.56 \pm 0.06 ^{ab}	17.44 \pm 1.84 ^d	3.44 \pm 0.68 ^y	17.96 \pm 6.07 ^x
Total C18:1 <i>trans</i>	2.89 \pm 0.18 ^b	18.21 \pm 0.73 ^e	1.92 \pm 0.23 ^a	7.83 \pm 0.15 ^c	2.34 \pm 0.03 ^{ab}	12.61 \pm 1.42 ^d	2.38 \pm 0.44 ^y	12.89 \pm 4.41 ^x
C18:2 / C18:3 = ω 6/ ω 3	2.72 \pm 0.14 ^c	2.75 \pm 0.06 ^c	7.34 \pm 0.12 ^e	3.75 \pm 0.14 ^d	1.77 \pm 0.14 ^a	2.03 \pm 0.15 ^b	3.94 \pm 2.48 ^x	2.85 \pm 0.73 ^x

^{a, b, c, d, x, y, :} Results displaying different letters by rows are significantly different to Bonferroni multiple sample comparison tests (95% threshold).

As expected, the addition of linseed oil to cow diet led to changes in the FA composition of TAG with a significant ($P < 0.001$) increase in the UFA content from 26.5-30.5% to 45.3-52.1% (about 1.7-fold; **Table 1**) depending on the base diet. Regarding the monounsaturated FA, the C18:1 *c9* rate was significantly higher (1.4-fold in average; $P < 0.001$) in the UFA-enriched TAG. The isomers of C18:1 *trans* FA were strongly increased ($P < 0.001$) in the UFA-enriched TAG: 6.3-fold for samples A, 4.1-fold for samples B and 5.6-fold for samples C. The vaccenic acid (C18:1 *t11*), which is the main C18:1 *trans* FA of milk fat was increased from 1.47 ± 0.33 % up to 9.27 ± 3.62 % in average ($P < 0.001$), the higher increase being for UFA-sample A (7.6-fold; $P < 0.001$), then for UFA-sample C (5.8-fold; $P < 0.001$) and then for UFA-sample B (3.0-fold; $P < 0.001$). Among the polyunsaturated FA, the amounts of C18:2 *c9,c12* and C18:3 *c9,c12,c15* were significantly smaller ($P < 0.001$) in the UFA-enriched TAG compared to the corresponding control TAG while the content in C18:2 *c9,t11* which is the main conjugated linoleic acid (CLA) of milk fat, was greatly increased in the UFA-enriched TAG (from 4.3-fold for UFA-enriched C to 7.2-fold for UFA-enriched A; $P < 0.001$) (**Table 1**).

The UFA-enriched TAG contained significantly smaller amounts of short-chain (C4:0 and C6:0) and medium-chain (C8:0 to C14:0) saturated FA than the control TAG (from 1.2-fold to 2.5-fold, $P < 0.001$). (**Table 1**). With respect to the long-chain saturated FA, the C16:0 decreased in the UFA-enriched TAG with ratios between UFA-enriched TAG and corresponding control TAG of 0.6. The C18:0 showed different behavior: it increased in the UFA-enriched B and C TAG with ratios between UFA-enriched TAG and corresponding control TAG of 1.5-1.6. In the samples A, no difference could be evidenced between control and UFA-enriched TAG.

To sum up, all the UFA-enriched TAG showed a decrease in the shorter and medium length FA by about half the rates of control TAG. The C16:0 was also decreased in the same proportion. The C18:0 was kept at the same rate or increased by half the rate of control TAG. The mono-UFA were increased by 70%, with huge increases in *trans* FA (increase of at least 370%). The poly-UFA showed either a decrease or a similar rate between UFA-enriched and control TAG, except for the CLA which was increased largely.

3.2. *Physical properties of control and UFA-enriched triacylglycerols on cooling*

3.2.1. Rheological properties

The viscoelastic behavior of the control and UFA-enriched TAG were investigated with temperature using oscillatory rheology. **Figure 1 A** shows the recording of the storage modulus as a function of temperature during the cooling of the control A and UFA-enriched A TAG. Multiple phases were evidenced for both samples, delimited by sudden changes in the recordings of G' as a function of temperature.

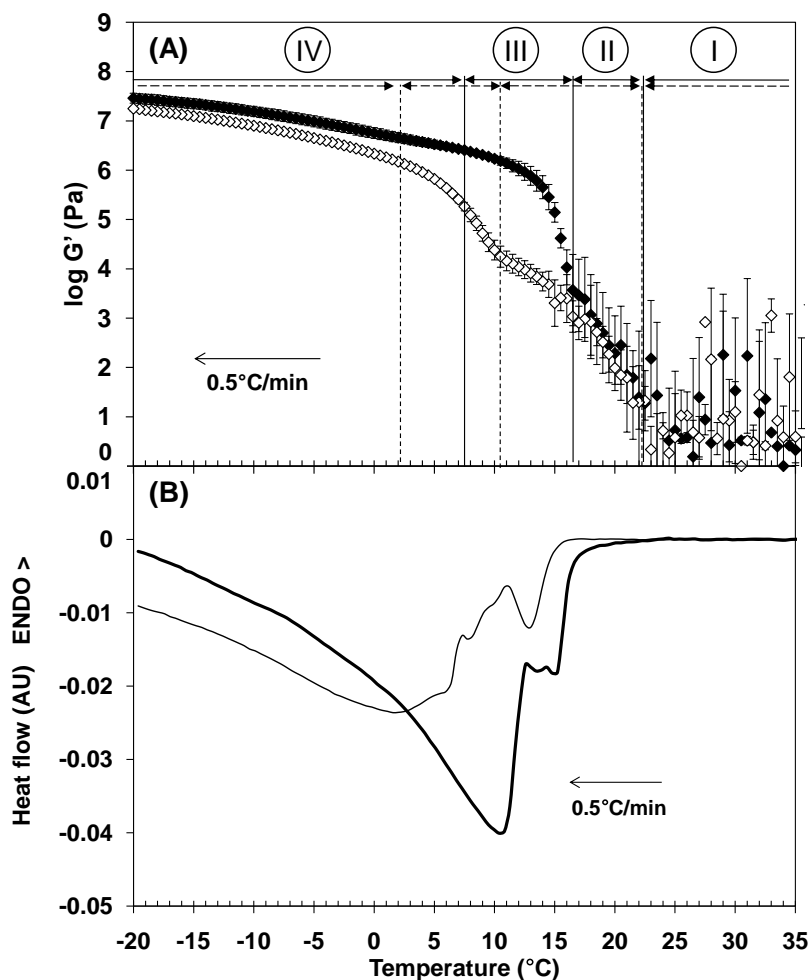


Figure 1: Temperature dependant behavior of the control A and UFA-enriched A triacylglycerols investigated using the combination of rheology and differential scanning calorimetry (DSC) on cooling. **(A)** Storage modulus recorded as a function of temperature using oscillatory rheology (control A = full symbols, UFA-enriched A = empty symbols). The profiles presented result from 3 independent measurements (mean \pm standard deviation). The vertical lines delimit the IV phases of changes of G' (control A = full lines, UFA-enriched A = broken lines). **(B)** Thermograms recorded using DSC (control A = thick line, UFA-enriched = thin line).

From 60°C to 22°C, the storage modulus showed a similar basic level in both samples (phase I). Along this phase, the G' was hardly measured by the rheological apparatus, since it was nearly null. Below 22°C, a first linear $\log G'$ increase was observed leading to a value higher than 10^3 Pa in both samples assessed at 16.5°C in the control A and 10.5°C in the UFA-enriched A sample (phase II). This first increase was related to the beginning of the crystallization of the TAG. A second $\log G'$ increase, characterized by a sudden new increase in the slope of the $\log G'$, was measured at about 10.5°C vs 16.5°C in the UFA-enriched A and control A samples, respectively (phase III). This second $\log G'$ increased could be due to a change in the crystallization of the TAG. For temperatures lower than 2°C, the $\log G'$ displayed a quasi linear change until the end of the cooling (phase IV). The transition between phase III and IV was not very clear, however, the linear increase of $\log G'$ in phase IV was assessed at a lower temperature in the UFA-enriched A sample than in the control A sample (approximately 2°C vs 7°C, respectively). From 16.5°C to -20°C, the storage modulus of the UFA-enriched A sample was 2 to 100 times lower than that of the control A sample (**Figure 1**).

Chapitre I

Table 2 compiles some parameters extracted from the recordings of the storage modulus as a function of temperature during the cooling of each of the 6 TAG samples studied: i) the temperatures of first and ii) second log G' increase happening at the beginning of phases II and III (T_{II} and T_{III} resp.), iii) the slope of the second log G' increase at phase III ($Slope_{III}$), and iv) the G' value at -20°C ($G'_{-20^{\circ}\text{C}}$).

Table 2: Rheological and thermal parameters of the control and unsaturated fatty acid (UFA) enriched triacylglycerols determined using rheology and differential scanning calorimetry (DSC) resp. on cooling from 60°C to -20°C at 0.5°C/min (mean values ± standard deviation; 3 individual values).

Fat source	Rheological parameters				Thermal parameters			
	T _{II} (°C)	T _{III} (°C)	Slope _{III} (log Pa/°C)	G' _{-20°C} (10 ⁷ Pa)	T _{onset 1} (°C)	T _{onset 2} (°C)	Heat Flow min (AU)	ΔH _{cryst} (J/g fat)
Control A	21.7 ± 1.4 ^a	16.4 ± 0.5 ^d	-0.884 ± 0.473 ^a	2.96 ± 0.70 ^{bc}	16.5 ± 0.1 ^b	13.4 ± 0.2 ^c	-37.4 ± 3.3 ^a	75.1 ± 5.5 ^{ab}
UFA-enriched A	21.0 ± 0.8 ^a	10.3 ± 0.4 ^a	-0.366 ± 0.071 ^a	1.77 ± 0.19 ^a	15.0 ± 0.2 ^a	8.3 ± 0.4 ^a	-21.6 ± 2.4 ^b	61.3 ± 9.5 ^a
Control B	23.1 ± 0.9 ^a	16.5 ± 0.2 ^d	-1.105 ± 0.680 ^a	4.60 ± 0.65 ^d	16.4 ± 0.4 ^b	13.8 ± 0.2 ^c	-37.5 ± 2.8 ^a	85.4 ± 7.7 ^b
UFA-enriched B	23.0 ± 1.4 ^a	13.4 ± 0.5 ^c	-0.553 ± 0.269 ^a	1.87 ± 0.66 ^{ab}	16.5 ± 0.1 ^b	10.5 ± 0.1 ^b	-22.3 ± 1.0 ^b	64.2 ± 4.5 ^a
Control C	23.4 ± 0.6 ^a	16.5 ± 1.3 ^d	-0.967 ± 0.483 ^a	3.07 ± 0.62 ^c	16.6 ± 0.1 ^{bc}	13.6 ± 0.2 ^c	-36.5 ± 1.1 ^a	79.6 ± 2.0 ^{ab}
UFA-enriched C	20.3 ± 2.4 ^a	12.2 ± 0.5 ^b	-0.232 ± 0.031 ^a	1.56 ± 0.07 ^a	17.5 ± 0.5 ^c	10.4 ± 0.1 ^b	-20.5 ± 1.5 ^b	62.5 ± 6.2 ^a
Control all	22.7 ± 1.3 ^a	16.6 ± 0.5 ^a	-0.983 ± 0.530 ^a	3.50 ± 0.97 ^a	16.5 ± 0.2 ^a	13.6 ± 0.2 ^a	-37.1 ± 2.3 ^a	80.0 ± 6.6 ^a
UFA-enriched all	21.4 ± 1.9 ^a	12.5 ± 1.9 ^b	-0.404 ± 0.199 ^b	1.73 ± 0.39 ^b	16.3 ± 1.1 ^a	9.7 ± 1.1 ^b	-21.4 ± 1.7 ^b	62.7 ± 6.2 ^b

T_{II} = temperature at the 1st increase of G', T_{III} = temperature at the change of G' slope on 2nd increase, Slope_{III} = log G' slope at 2nd increase, G'_{-20°C} = G' value at -20°C, T_{onset 1} = onset temperature of the 1st exotherm, T_{onset 2} = onset temperature of the 2nd exotherm, Heat Flow min = minimum heat flow on the whole temperature range, ΔH_{cryst} = crystallization enthalpy variation calculated between 23°C and -19.5°C.

^{a, b, c}: Results displaying different letters by columns are significantly different to Bonferroni multiple sample comparison tests (95% threshold).

T_{II} did not show any significant difference between control and UFA-enriched samples, individually or in average, while T_{III} was significantly lower ($P < 0.001$) in the UFA-enriched samples than in the control samples: 4.1°C in average. $G'_{-20^{\circ}\text{C}}$ of the UFA-enriched TAG samples were about 50% in average of the control TAG samples, meaning the crystal network formed by the UFA-enriched TAG upon cooling was less hard. The maximum slope of the second log G' increase (Slope_{III}) did not proved to be significantly different between UFA-enriched TAG and corresponding control TAG samples due to rather high standard deviations. Nevertheless a higher average value was always measured in the control TAG samples. In addition, Slope_{III} was significantly ($P < 0.001$) lower in absolute value in the UFA-enriched TAG samples than in the control TAG samples, all base diet taken together. This could mean the kinetics associated to this second log G' increase were lower in the UFA-enriched TAG than in the control TAG.

To sum up, the solid-like response recorded as a function of temperature during cooling of the control and UFA-enriched TAG increased in two steps. The second G' increase intervenes at lower temperature for UFA-enriched TAG than for control TAG, and probably with lower kinetics, due to different crystallization phenomena. Besides, the solid-like response of UFA-enriched TAG was always lower than that of control TAG.

3.2.2. Thermal properties

The thermal properties of the control and UFA-enriched TAG were investigated on cooling from 60°C to -20°C at $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ using DSC. **Figure 1 B** shows the thermograms recorded by DSC during the cooling of the control A and UFA-enriched A samples. **Table 2** shows some parameters extracted from the thermograms recorded on the 6 TAG samples studied on cooling.

Two main exotherms were observed in the control A and UFA-enriched A TAG samples (**Figure 1**), identified by a sharp decrease of the heat flow. The onset temperature of the first main exotherm was $16.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ in the control A sample and $15.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ in the UFA-enriched A sample. This first exotherm was associated to the beginning of the crystallization of the TAG in both samples. The onset temperature of the second exotherm was $13.4 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ in the control A sample and at $8.3 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ in the UFA-enriched A sample. In both samples, the second exotherm was the more energetic of the two.

Concerning the parameters extracted from the thermograms recorded on the 6 samples studied, the $T_{\text{onset } 1}$ proved to be lower in the UFA-enriched TAG sample A compared to the control TAG sample A. For the other couples of samples, no significant difference could be evidenced. All base diets taken together, the control and UFA-enriched TAG samples had similar $T_{\text{onset } 1}$. The $T_{\text{onset } 2}$ was always lower in the UFA-enriched TAG samples than in the corresponding control TAG samples, with an average difference between the two of 3.9°C . The $T_{\text{onset } 2}$ was not significantly different between the control TAG samples, whereas the UFA-enriched A TAG sample showed a smaller $T_{\text{onset } 2}$ than the other two UFA-enriched TAG samples. The control TAG samples had lower values of Heat flow min assessed during the 2nd exotherm than the UFA-enriched TAG samples. No significant differences in Heat flow min were measured among the control or among the UFA-enriched TAG

samples. The ΔH_{cryst} was significantly lower in the UFA-enriched TAG samples than in the control TAG samples, all base diets taken together.

The crystallization process occurred in two steps in all the TAG mixes, with first crystallization event occurring at comparable temperatures in UFA-enriched and control TAG. However the second crystallization event was recorded at lower temperature for UFA-enriched TAG than for control TAG. The UFA-enriched TAG had also significantly lower crystallization enthalpy variation on the temperature range [60, -20°C].

3.2.3. Microscopic observations

The crystals' morphology and size were observed during the cooling by polarized light microscopy. **Figure 2** shows the crystals formed by TAG at 15°C and 6°C in the control A and UFA-enriched A samples, respectively. These temperatures were chosen after the DSC measurements, so that the microscopic observations should correspond to what happened during the first and second exotherms in both samples.

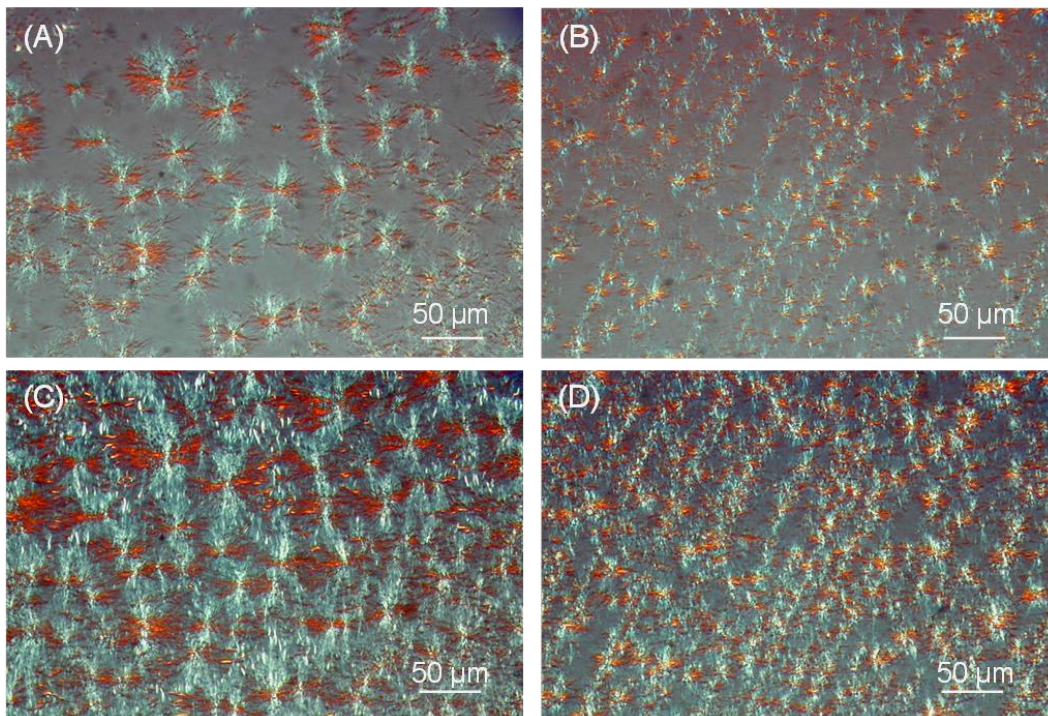


Figure 2: Polarized light microscopy photos taken at 15°C (**A** and **B**) and 6°C (**C** and **D**) after cooling of control A (A and C) and UFA-enriched A (B and D) triacylglycerols.

At 20°C, both samples already contained several small TAG crystals (not shown), although the DSC recordings on cooling showed the beginning of crystallization at this temperature. The nucleation of the crystallization could have been enhanced by the contact of the samples with the lamellae, thus increasing the temperature of beginning of crystallization, which could explain the great number of crystallites already present in the samples. At 15°C, both samples exhibited spherulitic particles, but crystallites in the UFA-enriched A sample appeared 2 to 3 times smaller than in the control A sample.

At 6°C, the crystals already formed at 15°C have grown up, and other several crystals have formed, but the UFA-enriched A sample still displayed smaller spherulites than the control A sample.

3.2.4. Structural properties

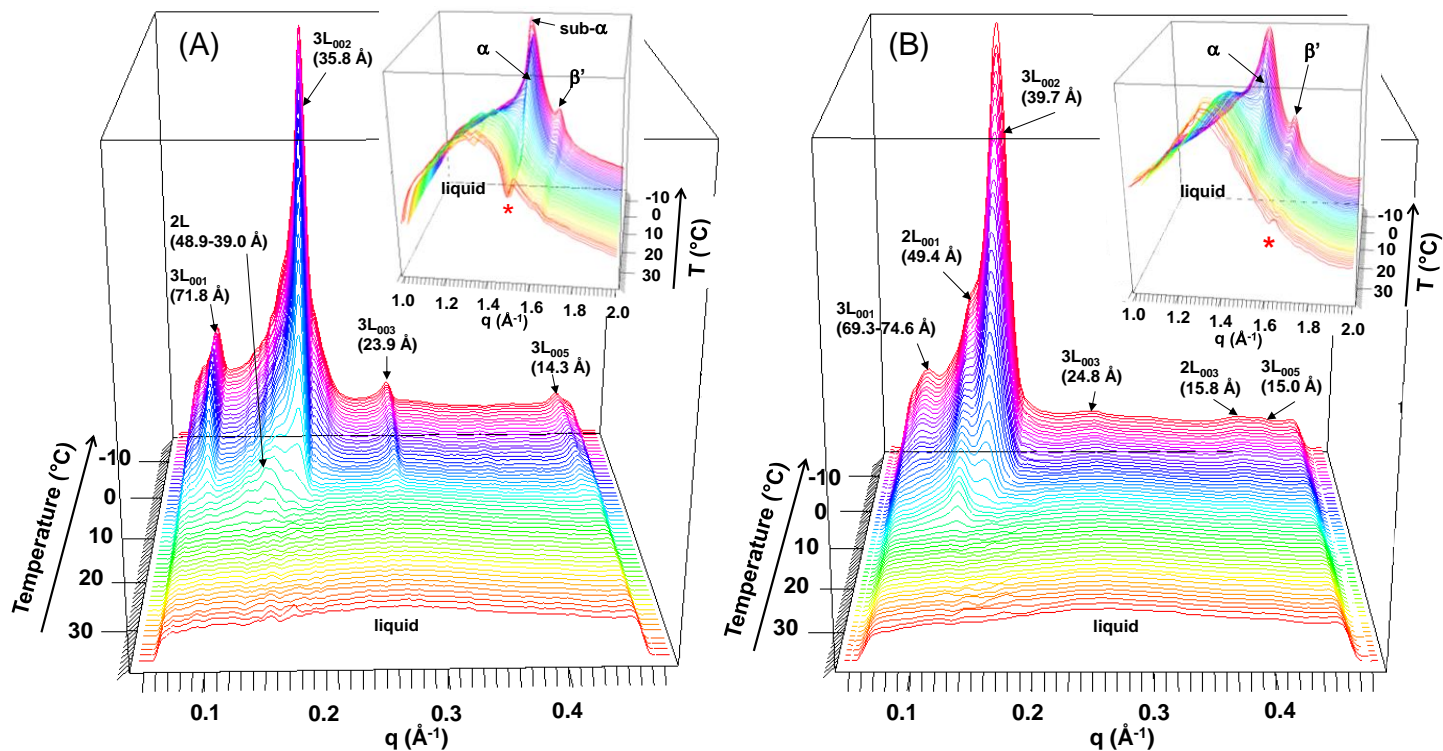


Figure 3: X-ray diffraction patterns recorded at small angles (main Figures) and wide angles (insets) on cooling of control A (A) and unsaturated fatty acid enriched A (B) triacylglycerols.
* noise due to detector defaults

The solid fat phase formed in the control A and UFA-enriched A TAG samples was characterized during cooling from 60°C to -20°C. The longitudinal organization of the TAG molecules and the lateral packing of the FA chains were characterized using small and wide angle XRD, respectively (**Figure 3**). The UFA-enriched and control TAG samples A showed different crystalline structures during the cooling. Both samples exhibited the successive crystallization of α 2L and α 3L crystals. However, the thickness of these two structures was higher in the UFA-enriched A sample. Besides, the 3L crystallized at lower temperature in the UFA-enriched A sample than in the control A sample. **Figure 4 A** shows the long spacings evolution of the crystalline structures identified at small angles as a function of temperature. **Figure 4 B and C** show the evolution of the intensity of the main diffraction peaks as a function of the temperature during the cooling of both samples.

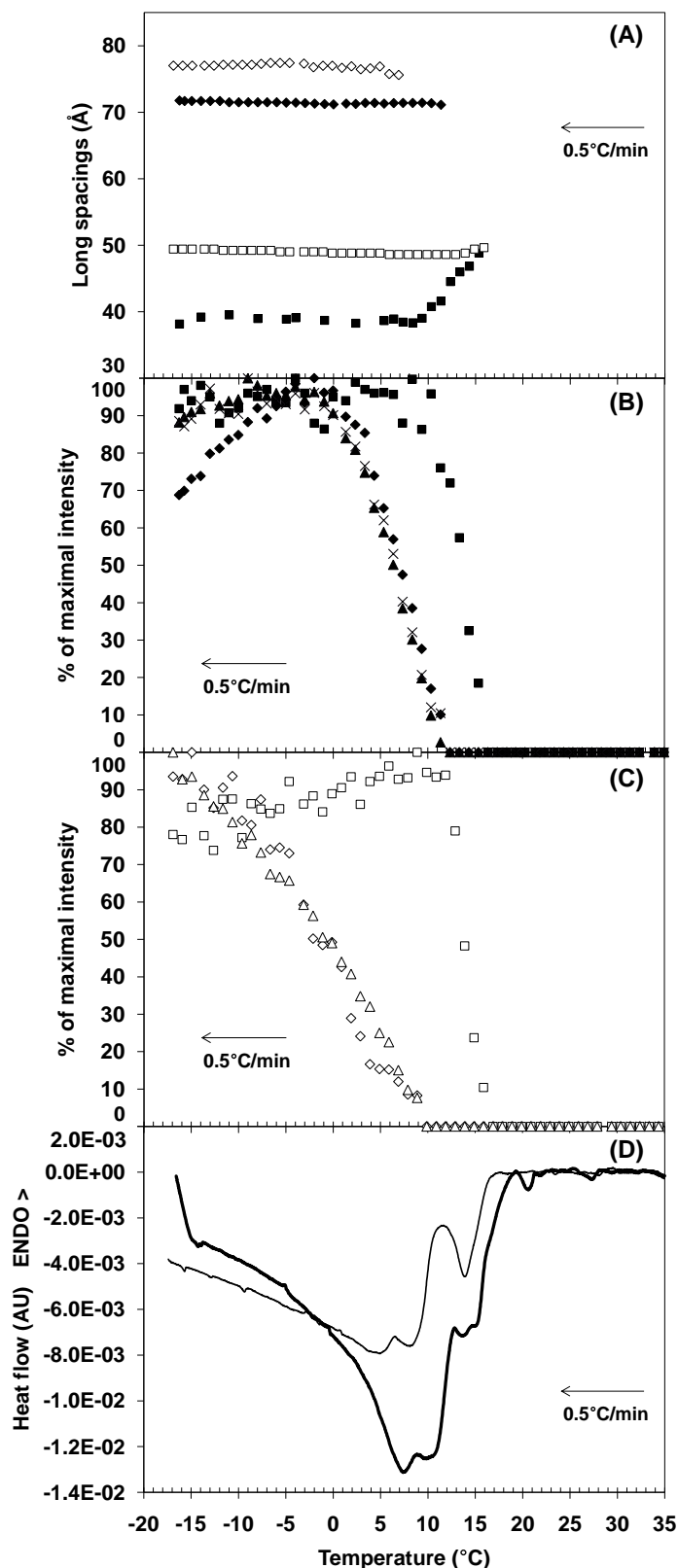


Figure 4: Structural parameters and thermal behavior recorded during the cooling of the control A and UFA-enriched A samples. **(A)** Long spacings of the crystalline structures measured thanks to small angles X-ray diffraction (\blacklozenge \lozenge 3L; \blacksquare \square 2L; full symbols correspond to control A TAG, empty symbols correspond to UFA-enriched A TAG). **(B)** Evolution of the maximal intensity of X-ray diffraction peaks recorded at small angles on cooling of the control A (\blacklozenge 3L₀₀₁; \blacksquare 2L₀₀₁; \blacktriangle 3L₀₀₂; \times 3L₀₀₃) and **(C)** UFA-enriched A samples (\lozenge 3L₀₀₁; \square 2L₀₀₁; \triangle 3L₀₀₂). (100% represents the highest intensity of each peak). **(D)** thermogram recorded on cooling of the control A (thick line) and UFA-enriched A (thin line) simultaneously to the X-ray diffraction experiment.

At small angles, the XRD patterns recorded for control A sample showed several XRD peaks appearing during cooling (**Figure 3 A**). The first XRD peak appeared at about 16°C with a maximum located at 48.9 Å which evolved to 39.0 Å until 9°C (**Figure 4 A**). This peak rapidly increased in intensity to 9°C, temperature from which it remained constant (**Figure 4 B**). This XRD peak was related to a 2L (48.9-39.0 Å) structure. 4 peaks located at 71.8 Å, 35.8 Å, 23.9 Å and 14.3 Å appeared at about 11°C. These 4 peaks were attributed to the first, second, third and fifth orders of a 3L structure of 71.8 Å thickness. No evolution in distance of this structure was encountered during the cooling (**Figure 4 A**). During the cooling, the peaks related to the 3L (71.8 Å) structure showed a quasi linear increase in intensity from 11°C to 0°C, temperature at which they reached their maximum, then the first order peak showed a little decrease in intensity until 70% at -20°C, whereas the others did not (**Figure 1 B**).

At wide angles, α and β' lateral packing were identified from about 16°C, characterized by a single peak at about 1.50 Å⁻¹ and the peak at 1.63 Å⁻¹ respectively (**Figure 3 A inset**). The α polymorphic form partly reorganized into sub- α at about -2°C, this polymorphic form being characterized by the sharp peak at 1.50 Å⁻¹ shifting to 1.49 Å⁻¹. The evolution of the structures identified during the cooling of control TAG A could therefore be summed up as:

liquid 1

-(16°C)-> 2L (48.9-39.0 Å); subcells: α , β' + liquid 2

-(11°C)-> 2L (39.0 Å) + 3L (71.8 Å); subcells: α , β' + liquid 3

-(2°C)-> 2L (39.0 Å) + 3L (71.8 Å) ; subcells: α , β' , sub- α + liquid 4

Lopez et al. (2005) showed that during cooling of anhydrous milk fat at 1°C/min, α 2L structures of 46 and 39 Å thickness appeared at about 15°C, then a α 3L (72 Å) structure appeared at about 10°C. At -10°C, Lopez et al. (2005) also observed sub- α form after cooling of anhydrous milk fat at 1°C/min just before the subsequent heating applied. However, Lopez et al. (2005) identified two 2L structures (46 and 38.5 Å), whereas we identified only one of 41.6 Å thickness. Our results could lack sufficient resolution to identify if one or two 2L structures were related to the XRD peak at 41.6 Å. Besides, the thickness of the 2L structure identified in our study was intermediate between the two thicknesses of the 2L structures identified in the work of Lopez et al. (2005), which could add in support of several 2L structures responsible for the XRD peak located at 41.6 Å. Therefore, the thermal analysis of control TAG sample A showed a double exotherm under the first crystallization event, which could be related to the crystallization of two different crystalline structures. The 2L (38.5 and 46 Å) identified by Lopez et al. (2005) did not disappeared during the cooling as the 2L (41.6 Å) that we identified. The lower cooling rate used in our study compared to that used in the work of Lopez et al. (2005) could explain the reorganization of the 2L to 3L (71.8 Å) during the cooling, and thus the disappearance of the peak related to the 2L (41.6 Å).

At small angles, the XRD patterns recorded for UFA-enriched A sample showed two XRD peaks appearing at 16°C on cooling, with maxima located at 49.4 Å and 15.8 Å (**Figure 3 B**).

According to the FA composition, these two XRD peaks were related to the first and third orders of diffraction of a double chain length (2L) structure of 49.4 Å thickness. No evolution in distance of this 2L was evidenced during the cooling (**Figure 4 A**). In terms of intensity, the peaks related to this 2L (49.4 Å) structure sharply increased from 16°C to 11°C, then remained of constant intensity during the rest of the cooling (**Figure 4 C**). 4 peaks located at 74.6 Å, 39.7 Å, 24.8 Å and 15.0 Å appeared at about 9°C. These peaks were attributed to the first, second, third and fifth orders of a 3L structure of 74.6 Å. As for the 2L (49.4 Å), the 3L (74.6 Å) structure did not evolve in distance either during the cooling (**Figure 4 A**). The peaks related to this 3L (74.6 Å) structure linearly increased to -10°C, temperature at which they reached their maximal intensity (**Figure 4 C**).

At wide angles (**Figure 3 B inset**), α and β' lateral packings were identified from about 16°C. The evolution of the structures identified during the cooling of UFA-enriched TAG A could therefore be summed up as:

liquid 1

-(15°C)-> 2L (49.4 Å); subcells: α , β' + liquid 2

-(8°C)-> 2L (49.4 Å) + 3L (74.6 Å); subcells: α , β' + liquid 3

3.2.5. Relating rheological, thermal behavior, and crystalline structures evolution

The increase in UFA content had consequences on the crystallization properties of milk TAG investigated at different scales on cooling from 60°C to -20°C at 0.5°C/min. The measurement of the storage modulus during cooling revealed a multiple step evolution, related to the thermal events and crystalline structures identified during the cooling.

Above 22.7°C, all the TAG in the samples were in liquid state, leading to a basic level of storage modulus measured by rheology and constant heat flow measured by DSC (**Figure 1 A and B**). The X-ray diffractograms did not show any other signal than the liquid diffusion band, located at 23-24 Å for small angles and 4.5-4.7 Å (1.3-1.4 Å⁻¹) for wide angles (**Figure 3**).

At about 22.7°C, a first G' increase was measured up to 10³-10⁴ Pa (**Figure 1 A**), although no other signal than the liquid was measured by DSC or XRD. The DSC and XRD measurements revealed temperatures of beginning of crystallization of about 16-17°C for all samples. However, the parameters T_{onset} 1, extracted from the DSC measurements and T_{II}, extracted from the rheological measurements (**Table 2**) relate to either the first TAG crystallizing, or the formation of a solid network. Although T_{II} show higher values than T_{onset} 1, the first G' increase was certainly related to the first TAG crystallizing. The shift between the two parameters could be a consequence of the differences in weight, volume of sample used and equipment designs which could impact the thermodynamics of the system, heat and mass transfer conditions (Toro-Vazquez et al., 2002 and 2004). Assuming this first rheological event was associated to the first exotherm, we deduced that the crystallization of the 2L (48.9-39.0 Å / 49.4 Å) in the control / UFA-enriched TAG samples, respectively, was responsible for the first exothermic event and for the first log G' increase, as these were the first crystalline structures appearing during the cooling.

At about 16.6 +/- 0.5°C in control TAG samples and 12.5 +/- 1.9°C in UFA-enriched TAG samples, a new log G' increase was measured as we observed a drastic change in the slope of log G'

as a function of temperature. Assuming there was a shift between the temperature measured by the rheometer, and the temperature measured by the DSC and XRD, the thermal parameter $T_{\text{onset } 2}$ could be related to the rheological parameter T_{III} . Indeed, the differences between the control TAG samples and the corresponding UFA-enriched TAG samples were quite similar for T_{III} and $T_{\text{onset } 2}$, with significantly higher values measured for the control TAG samples. Thus, the second log G' increase would be related to the second exotherm measured in average at $13.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$ in the control TAG samples and $9.7 \pm 1.1^\circ\text{C}$ in the UFA-enriched TAG samples. This thermal event was besides clearly associated to the crystallization of the 3L ($71.8 \text{ \AA} / 74.6 \text{ \AA}$) structure in the control A and UFA-enriched A TAG samples, respectively.

Therefore, it was possible to relate the crystallization enthalpy variation to the G' assessed at the end of the cooling. Indeed, the storage modulus of the sample at -20°C , $G'_{-20^\circ\text{C}}$, was the measure of the solid-like response of the crystal network formed during the whole cooling process. $G'_{-20^\circ\text{C}}$ could therefore be related to the energy needed to crystallize the TAG on the whole crystallization temperature range ΔH_{cryst} . Thus, the $G'_{-20^\circ\text{C}}$ among control TAG samples was the highest in sample B ($4.60 \pm 0.65 \cdot 10^7 \text{ Pa}$), as was ΔH_{cryst} ($85.4 \pm 7.7 \text{ J/g}$); among UFA-enriched samples, both parameters were the highest in sample B (without being significant) (**Table 2**).

Similarly, the slope of G' , which is the first derivative of the G' for given temperature could be related to the first derivative of the enthalpy variation, namely the heat flow measured by DSC. We thus compared the Heat Flow min values to the Slope_{III} values (**Table 2**). The Slope_{III} showed lower values in control TAG samples than in UFA-enriched TAG samples without being significant, just as the Heat Flow min.

The correlation coefficient calculated between T_{III} and $T_{\text{onset } 2}$ from the average values of each of the 6 TAG samples was 0.989; it was 0.954 between Slope_{III} and Heat flow min and 0.965 between $G'_{-20^\circ\text{C}}$ and ΔH_{cryst} . These very high correlation values weigh in favour of a strong link between these couples of parameters, hence of a similar unique phenomenon responsible, or at the origin of these parameters, i.e. the different crystallization properties of the TAG studied.

3.3. *Physical properties of control and UFA-enriched triacylglycerols on heating*

3.3.1. Rheological properties

Figure 5 A shows the evolution of the storage modulus (G') as a function of temperature during the heating of the control A and UFA-enriched A TAG samples from -20°C to 60°C at $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ after cooling from 60°C to -20°C at $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ and isothermal condition for 15 min. The **Figure 5 A inset** shows the final part of G' evolution, expressed in linear scale, as a function of temperature.

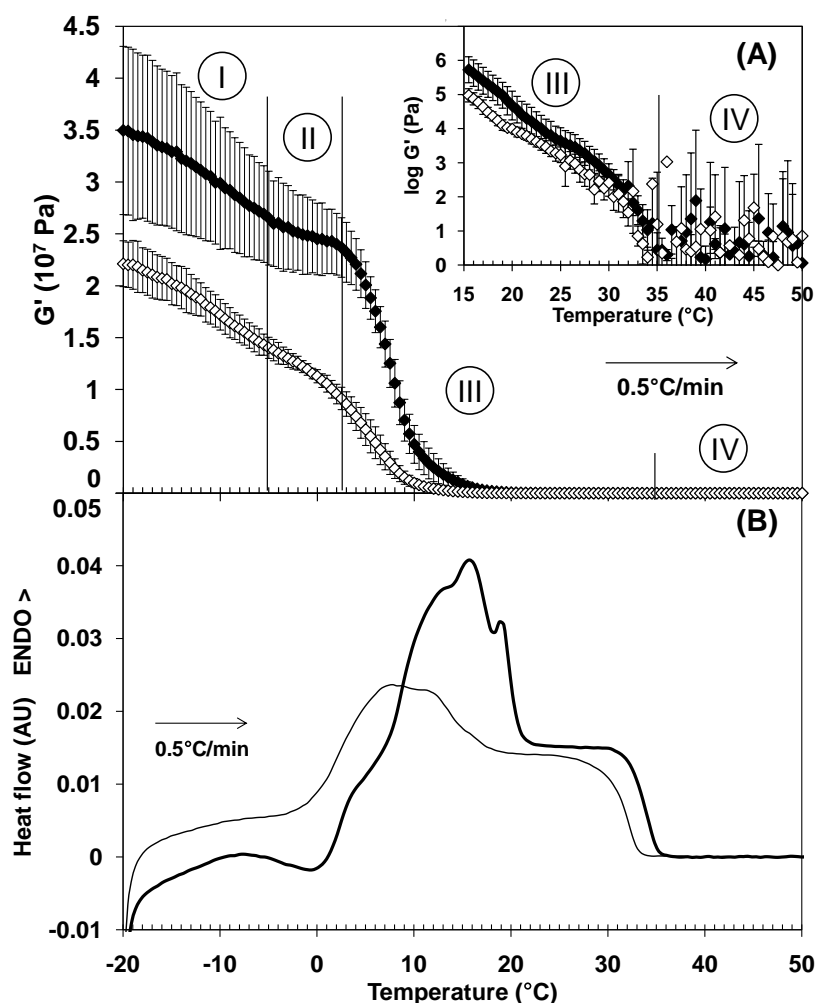


Figure 5: Temperature dependant behavior of the control A and UFA-enriched A triacylglycerols investigated using the combination of rheology and differential scanning calorimetry (DSC) on heating. **(A)** Storage modulus recorded as a function of temperature using small deformation rheology (control A = full symbols, UFA-enriched A = empty symbols). The vertical lines delimit the IV phases of evolution of G' (control A = full lines, UFA-enriched A = broken lines). **(B)** Thermograms recorded using DSC (control A = thick line, UFA-enriched = thin line).

From -20°C to -4°C , the G' decreased slowly in quasi linear regime for both TAG samples (phase I). The slope of G' decrease was the same for both samples. In the temperature range from -4°C to 4°C , the G' decreased slower, leading to a plateau in the control A TAG sample (phase II). Above 4°C , the G' dropped exponentially until it reached a basic level at about 35°C (phase III then IV). This drop was sharper in the control A sample than in the UFA-enriched A sample in the first temperature range between 4 and 15°C . On the whole temperature range where the G' was not at the baseline level, the G' was significantly lower in the UFA-enriched A sample than in the control A sample.

Table 3 compiles some parameters extracted from the recordings of the storage modulus as a function of temperature during the heating of each of the 6 TAG samples studied: i) the temperature of transition between phase II and phase III ($T_{II \rightarrow III}$), ii) the maximal slope of G' decrease during the initial part of phase III (Slope_{III}), iii) the temperature of final measurement of G' before baseline (T_f) and iv) the slope of final $\log G'$ decrease in the final linear part before baseline (Slope_f).

Chapitre I

Table 3: Rheological and thermal parameters of the control and unsaturated fatty acid (UFA) enriched triacylglycerols determined using rheology and differential scanning calorimetry (DSC) resp. on heating from -20°C to 60°C at 0.5°C/min after cooling from 60°C to -20°C at 0.5°C/min and subsequent tempering at -20°C during 15 min (mean values ± standard deviation; 3 individual values).

Fat source	Rheological properties				Thermal properties			
	T _{II->III} (°C)	Slope _{III} (10 ^b Pa/°C)	T _f (°C)	Slope _f (log Pa/°C)	T _{offset LMP} (°C)	Heat Flow max (AU)	T _{offset HMP} (°C)	Heat Flow _{25°C} (AU)
Control A	4.3 ± 1.1 ^b	-3.78 ± 0.65 ^a	35.8 ± 2.8 ^a	-0.453 ± 0.176 ^a	0.6 ± 0.1 ^b	39.8 ± 1.5 ^b	35.2 ± 0.1 ^c	14.9 ± 0.2 ^{bcd}
UFA-enriched A	1.8 ± 1.1 ^a	-1.46 ± 0.19 ^b	34.5 ± 3.5 ^a	-0.248 ± 0.041 ^a	0.5 ± 0.2 ^{ab}	23.0 ± 1.4 ^a	33.2 ± 0.1 ^a	13.4 ± 0.6 ^{abc}
Control B	5.2 ± 0.4 ^b	-4.41 ± 0.15 ^a	36.2 ± 1.1 ^a	-0.518 ± 0.140 ^a	0.2 ± 0.2 ^a	40.4 ± 3.3 ^b	35.3 ± 0.1 ^c	16.6 ± 1.4 ^d
UFA-enriched B	3.9 ± 1.4 ^b	-1.92 ± 0.43 ^b	35.3 ± 3.0 ^a	-0.249 ± 0.029 ^a	1.4 ± 0.1 ^c	25.4 ± 1.1 ^a	34.5 ± 0.2 ^b	12.0 ± 0.4 ^a
Control C	5.3 ± 0.5 ^b	-3.78 ± 0.59 ^a	35.7 ± 0.8 ^a	-0.509 ± 0.092 ^a	0.6 ± 0.1 ^{ab}	40.1 ± 1.3 ^b	35.5 ± 0.1 ^c	15.2 ± 0.5 ^{cd}
UFA-enriched C	4.8 ± 0.3 ^b	-1.74 ± 0.10 ^b	35.7 ± 1.6 ^a	-0.377 ± 0.071 ^a	1.2 ± 0.1 ^c	21.9 ± 1.2 ^a	35.6 ± 0.3 ^c	12.9 ± 0.7 ^{ab}
Control all	4.9 ± 0.9 ^a	-3.97 ± 0.57 ^a	35.7 ± 2.0 ^a	-0.490 ± 0.135 ^a	0.5 ± 0.2 ^b	40.1 ± 2.0 ^a	35.3 ± 0.2 ^a	15.6 ± 1.1 ^a
UFA-enriched all	3.5 ± 1.6 ^b	-1.71 ± 0.33 ^b	35.2 ± 2.7 ^a	-0.318 ± 0.088 ^b	1.0 ± 0.4 ^a	23.4 ± 1.9 ^b	34.4 ± 1.1 ^b	12.8 ± 0.8 ^b

T_{II->III} = temperature at the intersection of the G' plateau and the drop of G', Slope_{III} = maximum slope at the G' drop, T_f = temperature of the last G' measurement before baseline, Slope_f = maximum slope of log G' at the final G' decrease, T_{offset LMP} = offset temperature of the low melting point peak, Heat Flow max = maximum heat flow on the whole temperature range, T_{offset HMP} = offset temperature of the high melting point peak = final melting temperature, Heat Flow_{25°C} = heat flow at 25°C

^a, ^b, ^c: Results displaying different letters by columns are significantly different to Bonferroni multiple sample comparison tests (95% threshold).

Chapitre I

The parameters characterizing the drop of G' ($T_{II \rightarrow III}$ and $Slope_{III}$) were significantly lower in absolute values for UFA-enriched TAG samples compared to control TAG samples, all base diets taken together. The $T_{II \rightarrow III}$ was significantly different only between control A and UFA-enriched A TAG samples. The $Slope_{III}$ was systematically lower in absolute value in the UFA-enriched samples than in the corresponding control samples. The G' drop from 4°C was thus more abrupt in the control samples. The parameters characterizing the final change of G' as a function of temperature (T_f and $Slope_f$) did not show any significant difference between the UFA-enriched and the corresponding control samples. The $Slope_f$ was however lower in absolute value in the UFA-enriched samples all base diets taken together.

3.3.2. Thermal properties and solid fat content

The thermal properties of the control and UFA-enriched TAG were different on heating. **Figure 5 B** shows the thermograms of the control A and UFA-enriched A samples during the heating of the TAG from -20°C to 60°C after cooling from 60°C to -20°C and isothermal condition for 15 min.

Three main endotherms were observed in both samples noted as low melting point (LMP), medium melting point (MMP) and high melting point (HMP) peaks. The LMP ranged from -20°C to about -2°C, the MMP from about -2°C to 16°C in the UFA-enriched TAG sample A and from 0°C to 22°C in the control TAG sample A, and the HMP from 16/22°C to the final melting temperature at about 35°C. In both TAG samples, the MMP displayed the highest enthalpy variations. Nevertheless, the UFA-enriched TAG sample A showed lower enthalpy variation of the MMP, but higher enthalpy variation of the LMP than the control TAG sample A.

Table 3 shows some parameters extracted from the thermograms recorded on the 6 TAG samples studied on heating. The $T_{offset \text{ LMP}}$ was significantly higher in UFA-enriched TAG than in control TAG samples: 1.0 +/- 0.4°C vs 0.5°C +/- 0.2°C all base diets taken together, respectively (**Table 3**). The Heat Flow max was clearly lower in UFA-enriched TAG than in control TAG samples, without significant difference among UFA-enriched or control TAG: 23.4 +/- 1.9 AU vs 40.1 +/- 2.0 AU all base diets taken together, respectively. The $T_{offset \text{ HMP}}$ showed lower values in the UFA-enriched TAG than in the corresponding control TAG samples, except for samples C. The average difference between control and UFA-enriched TAG samples was about 0.9°C all base diets taken together (**Table 3**). The Heat Flow_{25°C} discriminated control TAG and UFA-enriched TAG samples: the UFA-enriched TAG samples needed 12.8 +/- 0.8 AU to melt at 25°C, whereas control TAG samples needed 15.6 +/- 1.1 AU.

Table 4 shows the thermal parameters determined on fusion of the 6 samples needed to calculate the solid fat content (SFC) adapted from [Lopez et al. \(2006\)](#).

Table 4: Solid fat content of the triacylglycerols determined at -20°C using differential scanning calorimetry (DSC) on heating (mean values \pm standard deviation; 3 individual values).

Fat source	ΔH_{fus} (J/g)	ΔH_{total} (J/g)	Est. SFC at -20°C (%)
Control A	89.3 \pm 5.3 ^a	103.8 \pm 1.4 ^{ab}	86.0 \pm 5.2 ^a
UFA-enriched A	68.4 \pm 1.3 ^b	79.8 \pm 1.5 ^d	85.7 \pm 2.3 ^a
Control B	93.7 \pm 6.6 ^a	109.3 \pm 2.2 ^a	85.7 \pm 6.3 ^a
UFA-enriched B	69.7 \pm 1.7 ^b	98.3 \pm 1.8 ^b	70.9 \pm 2.2 ^b
Control C	86.6 \pm 3.0 ^a	96.1 \pm 3.8 ^{bc}	90.1 \pm 4.7 ^a
UFA-enriched C	65.2 \pm 3.4 ^b	89.8 \pm 2.1 ^c	72.6 \pm 4.2 ^b
Control all	89.9 \pm 5.5 ^a	103.1 \pm 6.2 ^a	87.2 \pm 7.5 ^a
UFA-enriched all	67.8 \pm 2.9 ^b	89.3 \pm 8.2 ^b	75.9 \pm 7.7 ^b

ΔH_{fus} = partial fusion enthalpy variation determined between -20°C and 38°C; ΔH_{total} = total fusion enthalpy variation determined between -40°C and 38°C; Est. SFC at -20°C = estimated solid fat content at -20°C adapted from Lopez et al. (2006).

^{a, b, c, d}: Results displaying different letters by columns are significantly different to Bonferroni multiple sample comparison tests (95% threshold).

The partial fusion enthalpy variation was determined on heating of the 6 TAG samples. The total fusion enthalpy variation was also determined on heating of the 6 TAG samples from -50°C to 60°C (ΔH_{total}). The estimated solid fat content at -20°C ranged from 70 to 90% among all the samples. The estimated solid fat content at -20°C was significantly lower in UFA-enriched TAG samples than in control TAG samples for systems B and C. All base diets taken together, the UFA-enriched TAG samples had significantly lower SFC at -20°C than the control TAG samples, respectively.

3.3.3. Structural properties

The solid fat phase formed in the control A and UFA-enriched A samples was characterized during heating from -20°C to 60°C. The longitudinal organization of the TAG molecules and the lateral packing of the FA chains were characterized using small and wide angle XRD respectively (**Figure 6**).

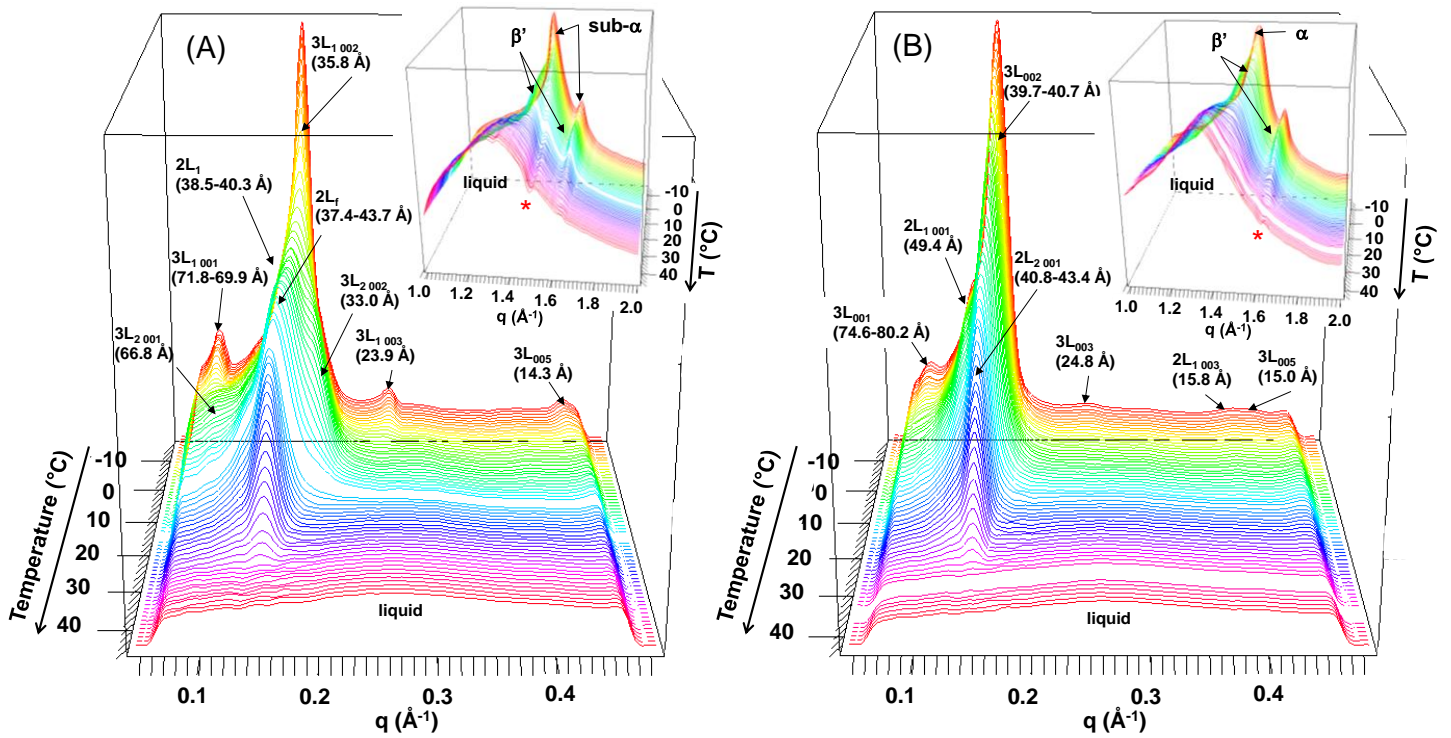


Figure 6: X-ray diffraction patterns recorded at small angles (main figures) and wide angles (insets) on heating of control A (A) and unsaturated fatty acid enriched A (B) triacylglycerols.
 * noise due to detector defaults

At small angles (**Figure 6 A**), the XRD patterns recorded for control TAG sample A showed 4 peaks existing at -20°C , disappearing during the heating, while several new peaks appeared during the heating. **Figure 7 A** shows the long spacings evolution of the crystalline structures identified at small angles as a function of temperature. **Figure 7 B and C** show the evolution of the intensity of the main diffraction peaks as a function of the temperature during the heating of both samples.

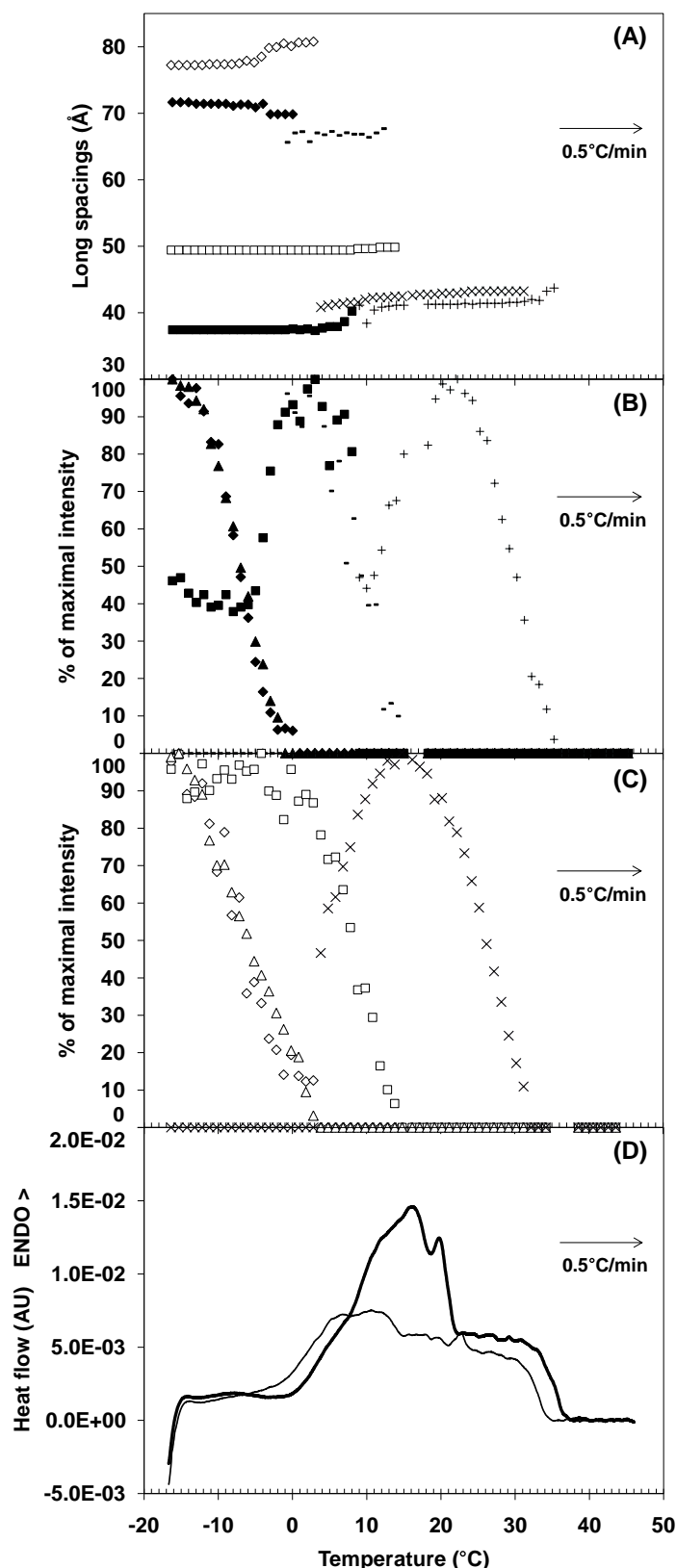


Figure 7: Structural parameters and thermal behavior recorded during the heating of the control A and UFA-enriched A samples. **(A)** Long spacings of the crystalline structures measured thanks to small angles X-ray diffraction (\blacklozenge \diamond $3L_1$; \blacksquare \square $2L$; $-$ $3L_2$; $+$ $2L_f$; first symbols correspond to control A TAG, second symbol correspond to UFA-enriched A TAG). **(B)** Evolution of the maximal intensity of X-ray diffraction peaks recorded at small angles on heating of the control A (\blacklozenge $3L_{1,001}$; \blacksquare $2L_{1,001}$; \blacktriangle $3L_{1,002}$; $-$ $3L_{2,001}$; $+$ $2L_{f,001}$) and **(C)** UFA-enriched A samples (\diamond $3L_{1,001}$; \square $2L_{1,001}$; \triangle $3L_{1,002}$; \times $2L_{f,001}$). (100% represents the maximum peak intensity). **(D)** thermogram recorded on heating of the control A (thick line) and UFA-enriched A (thin line) simultaneously to the X-ray diffraction experiment.

The 5 peaks identified at -20°C before heating were already identified on cooling as 3L_{1 001} (71.8 Å), 2L_{1 001} (38.5 Å), 3L_{1 002} (35.8 Å), 3L_{1 003} (23.9 Å), and 3L_{1 005} (14.3 Å) resp. The 3L₁ (71.8 Å) associated peaks decreased linearly in intensity to reach 0% at -1°C (**Figure 7 B**), temperature at which the 3L₁ (71.8 Å) structure reorganized into 3L₂ (66.8 Å), characterized by the XRD peaks at 66.8 Å (3L_{2 001}), 33.0 Å (3L_{2 002}). (**Figure 6 A, Figure 7 A**). The 3L₂ (66.8 Å) structure melted at about 13°C. The XRD peak related to the 2L₁ structure increased in intensity from -5°C to 2°C (**Figure 7 B**), which could be a consequence of the reorganization of the 3L₁ into 3L₂ and 2L₁. The 2L₁ then melted at about 8°C, where a new 2L_f structure appeared. The 2L_{f 001} peak at 37.4 Å sharply increased to its maximum at 22°C, then decreased until the final melting temperature at 35°C (**Figure 7 B**). During the heating, the 2L_f structure increased in thickness to 43.7 Å (**Figure 7 A**), probably due to the melting of shorter chain length TAG first (Lavigne, 1995; Lopez et al., 2001b).

At wide angles (**Figure 6 A inset**), the control TAG sample A showed the melting of the sub- α and α polymorphic forms first. Then, the α form transforms into the β' form, which melted at the final melting temperature at about 35°C. The temperature of melting of the α and sub- α polymorphic forms was difficult to determine precisely because of the overlap between the peaks of sub- α and β' , but we estimate them to melt completely between -3 and 3°C. The evolution of the structures identified during the heating of control TAG sample A could therefore be summed up as:

2L₁ (38.5 Å) + 3L₁ (71.8 Å); subcells: α , β' , sub- α + liquid 1
-(-1°C)-> 2L₁ (38.5-40.3 Å) + 3L₂ (66.8 Å); subcells: β' + liquid 2
-(8°C)-> 2L_f (37.4-40.6 Å) + 3L₂ (66.8 Å); subcells: β' + liquid 3
-(13°C)-> 2L_f (40.6-43.7 Å); subcells: β' + liquid 4
-(35°C)-> liquid

The cooling and heating rates were at variation with those of the study of Lopez et al. (2005), but we assume the heating rate had little influence on the reorganization of the crystalline structures on cooling. In their work, Lopez et al. (2005) showed that during heating of anhydrous milk fat at 2°C/min after comparable thermal history, the α 3L (72 Å) formed during cooling reorganized into β' 3L (67 Å) + β' 2L (40 Å) structures at about 7°C. From 7°C to about 15°C, the α 2L (46 Å) + α 2L (38.5 Å) structures formed during the cooling and the newly formed β' 3L (67 Å) reorganized into β' 2L (40-41.5 Å). This β' 2L (40-41.5 Å) structure was the more stable structure, being the only one remaining from 15°C to the complete melting of the sample. In our work, beside only one 2L structure was identified on the beginning of heating, the structural evolution was very similar than that described by Lopez et al. (2005), the final melting structure being a β' 2L with about 42 Å thickness.

At small angles (**Figure 6 B**), the XRD patterns recorded for UFA-enriched A TAG showed 6 peaks existing at -20°C, disappearing during the heating, while 1 new peak appeared during the heating. The 6 peaks identified at -20°C before heating were already identified on cooling as 3L₀₀₁ (74.6 Å), 2L_{1 001} (49.4 Å), 3L₀₀₂ (39.7 Å), 3L₀₀₃ (24.8 Å), 2L_{1 003} (15.8 Å) and 3L₀₀₅ (15.0 Å) resp. The 3L structure increased in thickness during the heating from 74.6 to 80.2 Å (**Figure 7 A**). The peaks

related to the 3L (74.6 Å) disappeared after a linear decrease in intensity from -20°C, being related to the complete melting of this structure at about 3°C (**Figure 7 C**). This coincides with the appearance of a new peak at 40.8 Å, being related to the reorganization of the 3L (74.6-80.2 Å) into 2L_f (40.8 Å). The 2L₁ (49.4 Å) structure melted from 0°C to about 14°C (**Figure 7 C**). As in the control A sample, the peak associated to the 2L_f structure evolved in distance, from 40.8 Å to 43.4 Å during the heating (**Figure 7 A**), which was probably related to the melting of shorter chain length TAG first (Lavigne, 1995; Lopez et al., 2001a). This peak reached a maximum in intensity at about 14°C, corresponding to the temperature of melting of the 2L₁ structure, and completely vanished at about 32°C (**Figure 7 C**).

At wide angles (**Figure 6 B inset**), the UFA-enriched TAG sample A showed the melting of the α polymorphic form first. Then the α form reorganizes into the β' form, which melted at the final melting temperature at about 32°C. The temperature of melting of the α polymorphic form was difficult to determine precisely for the same reason than above, but we estimate it melted between 0 and 5°C. The evolution of the structures identified during the heating of UFA-enriched TAG sample A could therefore be summed up as:

2L₁ (49.4 Å) + 3L (74.6-80.2 Å); subcells: α , β' + liquid 1

-(3°C)-> 2L₁ (49.4 Å) + 2L_f (40.8-42.9 Å); subcells: β' + liquid 2

-(14°C)-> 2L_f (42.9-43.4 Å); subcells: β' + liquid 3

-(32°C)-> liquid

3.3.4. Relating rheological, thermal behavior and crystalline structures evolution

The increase in the UFA content had consequences on the physical properties of milk TAG at different scales on heating. The measurement of the storage modulus during the heating revealed a multiple steps evolution, related to the thermal and structural events recorded.

For $T < 3^\circ\text{C}$, the UFA-enriched A and the control A samples contained two types of longitudinal structures: a 3L (74.6 Å for UFA-enriched A and 71.8 Å for control A sample) and a 2L₁ (49.4 Å for UFA-enriched and 38.5 Å for control A sample). Sub- α , α and β' lateral packings were identified in the control A sample at the beginning of the heating, while α and β' were identified in the UFA-enriched A sample. The heating from -20°C to 0 / 3°C melted the sub- α / α 3L₁ (71.8 / 74.6 Å) structure in the control A sample / UFA-enriched A sample, respectively, leading to a low decrease of the G' values and to small enthalpy of fusion characterizing the LMP. In this temperature range, no other crystalline structure melted.

From -3°C to 0°C, the sub- α / α 3L₁ (71.8 Å) reorganized into β' 3L₂ (66.8 Å) + β' 2L₁ (38.5 Å) structures for the control A sample, leading to a plateau of G', and to a small exotherm identified on the thermograms between the LMP and MMP. In this temperature range, the G' in the UFA-enriched A sample did not show any plateau. No evolution of the crystalline structures was recorded in this temperature range.

From 3°C to 23 / 18°C (control A / UFA-enriched A, resp.), the main thermal event was observed. It was associated to the reorganization of the β' 2L₁ (49.4 Å) structure in the UFA-enriched A into 2L_f (40.8 Å). In the control A sample, it was attributed to the reorganization of the β' 3L₂ (66.8 Å) and β' 2L₁ (38.5-40.3 Å) into β' 2L_f (37.4 Å). An exponential drop of G' to the final temperature was

Chapitre I

recorded from 3°C to the melting of the samples between 32 and 35°C. During the melting of the MMP and HMP, the G' decreased exponentially, but no particular rupture in the evolution of G' could be evidenced at the transition of the two endotherms at about 23 / 18°C (control A / UFA-enriched A, resp.).

In both samples, the main differences in terms of thermal behavior happened in the MMP, which corresponded to the drop of G' and to the melting of the β' 2L₁ (49.4 Å) for the UFA-enriched A sample and the β' 3L₂ (66.8 Å) and β' 2L₁ (38.5-40.3 Å) for the control A sample. This drop of G' and MMP was also associated to the formation of the β' 2L_f (37.4 / 40.8 Å) in the UFA-enriched A / control A samples, respectively. During the heating, no temperature shift was evidenced between the rheological, thermal and structural apparatus, as was observed during the cooling.

We related the plateau of G' in the -4°C - 4°C range in the control A sample to the structural reorganization, hence to the endothermic event recorded by DSC (**Table 3**). Indeed, the $T_{II->III}$ determined by rheology expressed the temperature at the beginning of the drop of G' , namely the temperature of the beginning of the drop in storage modulus. In terms of thermal parameter, we could determine the offset temperature of the low melting point peak $T_{\text{offset LMP}}$ as the transition temperature between the LMP and MMP, namely where the Heat flow was minimum. $T_{\text{offset LMP}}$ and $T_{II->III}$ are indirectly related to each other as $T_{\text{offset LMP}}$ could be seen as the temperature at the climax of the reorganization in the -4°C - 4°C range, whereas $T_{II->III}$ is the temperature at the end of the reorganization where the 3L₁ structure was melted. This could explain why the $T_{II->III}$ values were higher than the $T_{\text{offset LMP}}$. The $T_{\text{offset LMP}}$ would better be related to the temperature at the center of the plateau of G' , but it could not be determined precisely.

Assuming the value of G' determined by rheology was directly linked to the quantity and type of crystals formed at the temperature of measure, and thus to the enthalpy of the system, we deduce that the kinetic of diminution of the G' at a certain temperature during the heating of the TAG samples was related to the heat flow needed to melt the TAG at this temperature. Therefore, the Heat Flow max was determined by DSC and related to the Slope_{III} determined by rheology (**Table 3**). Indeed, the values of Heat Flow max showed the same trend between control and UFA-enriched samples as the Slope_{III} from rheological characterization: lower values of Heat Flow max were calculated in the UFA-enriched samples than in control samples. As for Slope_{III}, no significant differences could be evidenced among the control samples and among the UFA-enriched samples.

We related the rheological parameters determined at the end of the melting to the corresponding thermal parameters. Hence, $T_{\text{offset HMP}}$ was clearly related to the T_f . The T_f did not show significant differences between UFA-enriched and control samples because of the standard deviation on these values, but the trends between UFA-enriched and control samples values were the same as for $T_{\text{offset HMP}}$. Thus, the UFA-enriched samples had a lower final melting temperature than control samples on the basis of the thermal parameter. The Heat Flow_{25°C} and Slope_f could also be related together assuming the G' is directly linked to the enthalpy of the system. The Slope_f did not show any discrimination between UFA-enriched and control samples as seen by couples, but in average, the UFA-enriched samples had a lower absolute value than control samples. This parameter was well related to the Heat Flow_{25°C}, which separate well UFA-enriched samples to control samples.

4. General discussion

4.1. Relevance of the multiscale analysis

The multiscale approach used in this study allowed us to link the rheological behavior of milk triacylglycerols to their thermal behavior and polymorphism (Marangoni & Narine, 2002). In this study, we tried to explain the functional properties, as seen by the measure of the solid-like response of the samples studied, by the physical phenomena acting at molecular and supramolecular scales during the cooling / heating of samples. We pointed out the relationships between the storage modulus of the samples during crystallization / melting and the energy released or absorbed by the samples through characteristic comparable parameters.

Few authors already put in evidence the monitoring of milk fat crystallization by rheometry (Chouinard et al., 1998; Bobe et al., 2003; Couvreur et al., 2006). Toro-Vazquez et al. (2004) used viscoelastic oscillatory measurements to study cocoa butter crystallization and polymorphism under static temperature conditions. In their work, they show that rheological events, like the shift in the loss angle, are linked to thermal events and polymorphism transitions of cocoa butter during isothermal crystallization. The group of Dewettinck used oscillatory rheology to monitor the crystallization of palm oil (De Graef et al., 2006) and milk fat (Wiking et al., 2009) under isothermal conditions. According to this group, oscillatory rheology is a valuable complementary method to DSC and pulsed nuclear magnetic resonance as the polymorphic transitions can be monitored thanks to this technique, but also because information about the firmness of the fat crystal network can be established.

Gliguem et al. (2009) also reported the usefulness of monitoring the crystallization of fats thanks to the recording of viscoelastic properties. In their work, they followed milk fat crystallization in cheese matrixes as a function of temperature during cooling and heating. They demonstrate that the functional properties of milk fat in processed cheese, as a function of temperature during cooling and heating, can be related and explained by the crystallization and fusion behavior of the triglycerides. In the present work, we related not only the temperature of beginning of crystallization at different scales, but we also related the thermal and rheological parameters such as the storage modulus assessed at -20°C and cumulated enthalpy of crystallization at this temperature.

4.2. Effect of the composition of fatty acid on the physical properties of triacylglycerols at multiple scales

To our knowledge, only one study (Smet et al., 2009) has dealt with the crystallization properties of unsaturated fatty acid enriched milk fat. In this work, they show that an increase in UFA from 28.2% up to 38.6% lowered the solid fat content of milk fat with temperature ranging from 5°C to the final melting. Besides, they put in evidence slower crystallization kinetics with lower nucleation rate and longer induction time with UFA-enriched milk fat in isothermal conditions. However, they did not find any changes in the polymorphic crystal lattice identified.

The FA composition of the samples did play a role on the physicochemical properties of the triacylglycerols. At the molecular scale, we showed that similar types of crystalline structures were

formed in UFA-enriched and control samples on cooling: 2L and 3L longitudinal structures associated to $\alpha + \beta'$ polymorphic forms, but with different characteristic thicknesses. The FA composition of the 6 samples could explain the difference in thicknesses of the structures formed on cooling. This composition effect could be due to the chain length of the FA on the triacylglycerols involved in the formation of these structures. The 2L formed at the beginning of the cooling was 7.8 Å thicker in the UFA-enriched A sample, meaning the TAG forming this structure were 3.9 Å longer in average, corresponding to an average carbon number of 3.1 taking into account the carbon-carbon distance of 1.27 Å along the longitudinal axis of the FA chains (Small, 1986). Similarly, the 3L structure formed during the cooling was 2.8 Å thicker in the UFA-enriched A sample, meaning the TAG forming this structure were 0.9 Å longer in average, corresponding to an average carbon number of 0.7. We showed that the shorter FA were in lower proportions in the UFA-enriched TAG samples than in the control TAG samples. Inversely, the longer unsaturated FAs were in higher proportions in the UFA-enriched TAG samples. This increase in longer FAs and decrease in shorter FAs led to an increase in the average carbon number of the FAs, and could explain the higher thickness of the lamellar structures formed in the UFA-enriched TAG during the cooling.

We showed that UFA-enriched TAG samples displayed lower crystallization temperatures and melting enthalpies than in the corresponding control TAG samples. This is directly due to the relative proportion between saturated and unsaturated triglycerides, as unsaturated triglycerides are known to have a lower enthalpy of crystallization and fusion than saturated triglycerides of the same chain length (Perron, 1986, Wesdorp, 1990). Very high significant correlation coefficients could be evidenced between the ΔH_{cryst} and the total saturated FA content, and between the ΔH_{fus} and the total saturated FA content of the 6 samples studied: 0.962 and 0.986 respectively. Moreover, UFA-enriched triglyceride samples had a lower solid fat content at -20°C after their cooling from 60°C to -20°C at 0.5°C/min. This is also due to the unsaturated triglycerides which have a lower melting temperature than saturated triglycerides of the same chain length (Wesdorp, 1990). The lower melting temperature and lower enthalpy of crystallization and fusion of unsaturated triglycerides result from their molecular symmetry (Wei, 1999, Pinal, 2004) and crystal packing (Chickos et al., 2001, Katritzky et al., 2001) compared to saturated triglycerides.

After cooling at 0.5°C/min, we showed that the supramolecular organization of the control TAG and UFA-enriched TAG samples A were different, with smaller spherulitic particles formed in the UFA-enriched TAG sample A.

During the temperature protocol used in this study, we showed that the G' was lower in the UFA-enriched samples than in the control samples on the whole range of temperatures where the triglycerides were in solid state. This could be due to a difference in i) the crystalline structures, ii) the solid fat contents iii) the organization of the triacylglycerols crystals at the supramolecular level. The difference in storage modulus at -20°C was related to the FA composition: the samples B were more saturated than other samples for a given type of samples (control and enriched); samples B also had the highest $G'_{-20^\circ\text{C}}$ for a given type of sample. The proportion of UFA could explain these differences: we evidenced a high positive correlation between the total UFA content and the storage modulus of the samples. UFA are known to crystallize at lower temperatures than saturated FA (Wesdorp, 1990),

which implies a lower solid fat content for UFA-enriched samples than for control samples. The relation between the rheological properties and the solid fat content of triglycerides has largely been studied by the group of Marangoni et al. (Marangoni & Rousseau, 1996, Narine & Marangoni, 1999, Marangoni & Tang, 2008). They developed and used a fractal model to explain the relationship between G' and the SFC of triglycerides during crystallization. In our study, we evidenced a difference in storage modulus between control and UFA-enriched samples, observed in dynamic temperature conditions during cooling and heating. Several explanations for this difference in solid-like response were proposed here, all being linked with each other: i) the different FA composition, leading to different thickness of the crystalline structures observed at molecular scale, ii) the different size of spherulitic particles observed at supramolecular scale and iii) the lower solid fat content of the UFA-enriched samples on the whole temperature range studied.

5. Conclusions

As a conclusion, dairy fat can be enriched in UFA to face new nutritional quality standards. The physical properties of such modified TAG depend on their FA composition. Thanks to a multiscale approach with molecular and microscopic characterizations, thermal and rheological analysis, we showed that the rate of saturated FA was a main parameter to be considered to understand the rheological behavior as well as the thermal behavior in dairy fats. We also related the rheological behavior to the thermal events and to the molecular structures as a function of temperature, and discriminated UFA-enriched samples to control samples on this basis. Understanding the crystallization properties of dairy TAG is of great importance in increasing our fundamental knowledge on lipid structures and to understand and control functional properties of dairy products enriched in UFA in food industrial applications.

Acknowledgements

This work was funded by the French association for research (ANR, Paris, France) in the National Program for Food Research and the French dairy board (CNIEL, Paris, France) in the AGILAIT project (PNRA 2006). The authors thank CNIEL and ANRT for funding the PhD thesis of S. Bugeat.

References

- Blanton, T.N., Barnes, C.L., Lelental, M. Preparation of silver behenate coatings to provide low- to mid-angle diffraction calibration. *J. Appl. Cryst.* 2000, 33, 172-173.
- Bobe, G., Hammond, E.G., Freeman, A.E., Lindberg, G.L., Beitz, D.C. Texture of butter from cows with different milk fatty acid compositions. *J. Dairy Sci.*, 2003, 86, 3122-3127.
- Chen, S., Bobe, G., Zimmerman, S., Hammond, E.G., Luhman, C.M., Boylston, T.D., Freeman, A.E., Beitz, D.C. Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 3422-3428.
- Chickos, J.S., Nichols, G. Simple relationships for the estimation of melting temperatures of homologous series. *J. Chem. Eng. Data*, 2001, 46, 562-573.
- Chouinard, P.Y., Girard, V., Brisson, G.J. Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81, 471-481.
- Christie, W. W. (1995) in: *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 2, Lipids, 2nd ed. P. F. Fox, ed. Chapman & Hall, London, UK.
- Couvreur, S., Hurtaud, C., Lopez, C., Delaby, L., Peyraud, J.L. The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *J. Dairy Sci.*, 2006, 89, 1956-1969.
- De Graef, V., Dewettinck, K., Verbeken, D., Foubert, I. Rheological behavior of crystallizing palm oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2006, 108, 864-870.
- Glasser, F., Ferlay, A., Chilliard, Y. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.*, 2008, 91, 4687-4703.
- Gliguem, H., Ghorbel, D., Lopez, C., Michon, C., Ollivon, M., Lesieur, P. Crystallization and polymorphism of triacylglycerols contribute to the rheological properties of processed cheese. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 3195-3203.
- Goff, H.D. Instability and partial coalescence in whippable dairy emulsions. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80, 2620-2630.
- Gabielle-Madelmont, C., Perron, R. Calorimetric studies on phospholipid-water systems. 1. DL-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)-water system. *J. Colloid Interface Sci.* 1983, 95, 471-482.
- Gresti, J., Bugaut, M., Maniongui, C., Bezar, J. Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 1993, 76, 1850-1869.
- Jensen, R.G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.*, 2002, 85, 295-350.
- Joint FAO/WHO Expert Consultation. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO technical report series 916 (pp. 3–108). Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Katritzky A.R., Jain R., Lomaka A., Petrukhin R., Maran U., Karelson M. Perspective on the relationship between melting points and chemical structure. *Cryst. Growth Des.* 2001, 1, 261-265.
- Lavigne, F., Bourgaux, C., Ollivon, M. Phase transition of saturated triglycerides. *J. Phys. IV*, 1993, 3, 137-140.
- Lavigne, F., Ollivon, M. Milk fat and its fractions. *OCL-Oléagineux Corps Gras Lipides*, 1997, 4, 212-219.

Chapitre I

- Lopez, C., Lavigne, F., Lesieur, P., Bourgaux, C., Ollivon, M. Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. 1. Unstable species of anhydrous milk fat. *J. Dairy Sci.* 2001a, 84, 756-766.
- Lopez, C., Lavigne, F., Lesieur, P., Keller, G., C., Ollivon, M. Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. 2. Crystalline forms obtained by slow cooling. *J. Dairy Sci.* 2001b, 84, 2402-2412.
- Lopez, C., Lesieur, P., Bourgaux, C., Keller, G., Ollivon, M. Thermal and structural behavior of milk fat. 2. Crystalline forms obtained by slow cooling of cream. *J. Coll. Int. Sci.* 2001c, 240, 150-161.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Ollivon, M. Crystalline structures formed in cream and anhydrous milk fat at 4°C. *Lait*, 2002, 82, 317-335.
- Lopez, C., Lesieur, P., Bourgaux, C., Ollivon, M. Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. 3. Influence of cooling rate. *J. Dairy Sci.* 2005, 88, 511-526.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Camier, B., Gassi, J.-Y. Milkfat thermal properties and solid fat content determined during the ripening of emmental cheese. A differential scanning calorimetry study. *J. Dairy Sci.* 2006, 89, 2894-2910.
- Lopez, C., Briard-Bion, V. The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products. *Lait*, 2007, 87, 317-336.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., Besle, J.-M. Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 5226-5236.
- Lopez, C., Ollivon, M. Triglycerides obtained by dry fractionation of milk fat. 2. Thermal properties and polymorphic evolutions on heating. *Chem. Phys. Lipid*, 2009, 159, 1-12.
- Marangoni, A.G., Rousseau, D. Is plastic fat rheology governed by the fractal nature of the fat crystal network? *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 991-993.
- Marangoni, A.G., Lencki, R.W. Ternary phase behavior of milk fat fractions. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3879-3884.
- Marangoni, A.G., Narine, S.S. Identifying key structural indicators of mechanical strength in networks of fat crystals. *Food Res. Int.*, 2002, 35, 957-969.
- Marangoni, A., Tang, D. Modeling the rheological properties of fats: A perspective and recent advances. *Food Biophys.* 2008, 3, 113-119.
- Narine, S.S., Marangoni, A.G. Relating structure of fat crystal networks to mechanical properties: a review. *Food Res. Int.* 1999, 32, 227-248.
- Noakes, M., Nestel, P.J., Clifton, P.M. Modifying the fatty profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996, 63, 42-46.
- Ollivon, M. (1992) in: *Manuel des Corps Gras*. Karleskind, A., Wolff, J. P., Guttman, J. F., Eds. Lavoisier Paris.
- Ollivon, M., Perron, R. (1992) in: *Manuel des Corps Gras*. Karleskind, A., Wolff, J. P., Guttman, J. F., Eds. Lavoisier Paris.
- Ollivon, M., Keller, G., Bourgaux, C., Kalnin, D., Villeneuve, P., Lesieur, P. DSC and high resolution X-ray diffraction coupling. *J. Therm Anal. Calorim.* 2006, 85, 219-224.

Chapitre I

- Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D., Barbano, D.M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 1993, 76, 1753-1771.
- Park, P.W., Goins, R.E. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *J. Food Sci.* 1994, 59, 1262-1266.
- Perron, R.R. Tentative prevision for the thermal behavior of a fat, as a function of its triglyceride composition. 1. Principle and elaboration. *Rev. Fr. Corps gras.* 1986, 33, 195-204.
- Pinal, R. Effect of molecular symmetry on melting temperature and solubility. *Org. Biomol. Chem.* 2004, 2, 2692-2699.
- Small, D.M. (1986), in: *Handbook of lipid research. The physical chemistry of lipids. From alkanes to phospholipids.* Plenum press, New-York.
- Smet, K., Coudijzer, K., Frederick, E., De Campeneere, S., De Block, J., Wouters, J., Raes, K., Dewettinck, K. Crystallization behavior of milk fat obtained from linseed-fed cows. *J. Dairy Sci.*, 2009, 96, 495-505.
- Smet, K., De Block, J., van der Meeren, P., Raes, K., Dewettinck, K., Coudijzer, K. Influence of milk fatty acid composition and process parameters on the quality of ice cream. *Dairy Sci. Technol.*, 2010, 90, 431-447.
- Ten Grotenhuis, E., van Aken, G.A., van Malssen, K.F., Schenk, H. Polymorphism of milk fat studied by differential scanning calorimetry and real-time X-ray powder diffraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999, 76, 1031-1039.
- Timms, R. E. The phase behavior and polymorphism of milk fat, milk fat fractions, and fully hardened milk fat. *Aust. J. Dairy Technol.* 1980, 35, 47-53.
- Toro-Vazquez, J.F., Herrera-Coronado, V., Dibildox-Alvarado, E., Charo-Alonso, M., Gomza-Aldapa, C. Induction time of crystallization in vegetable oils, comparative measurements by differential scanning calorimetry and diffusive light scattering. *J. Food Sci.*, 2002, 67, 1057-1065.
- Toro-Vazquez, J.F., Perez-Martinez, D., Dibildox-Alvarado, E., Charo-Alonso, M., Reyes-Hernandez, J. Rheometry and polymorphism of cocoa butter during crystallization under static and stirring conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2004, 81, 195-201.
- Wei, J. Molecular symmetry, rotational entropy, and elevated melting points. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1999, 38, 5019-5027.
- Wesdorp, L.H. (1990) *Liquid-multiple solid phase equilibria in fats*, Ph.D. Thesis, Delft University, Netherlands.
- Wiking, L., De Graef, V., Rasmussen, M., Dewettinck, K., Relations between crystallization mechanisms and microstructure of milk fat. *Int. Dairy J.*, 2009, 19, 424-430.
- Williams, C.M. Dietary fatty acids and human health. *Ann. Zootech.*, 2000, 49, 165-180.
- Wright, A.J., Scanlon, M.G., Hartel, R.W., Marangoni, A.G. Rheological properties of milkfat and butter. *J. of Food Sci.* 2001, 66, 1056-1070.

C. Propriétés thermiques des triacylglycérols laitiers anhydres et détermination du taux de matière grasse solide en fonction de la température

Cette partie vise à proposer une méthode pour estimer le taux de matière grasse solide de triacylglycérols laitiers anhydres par microcalorimétrie différentielle (MCD). En effet, le taux de matière grasse solide est un des paramètres physiques expliquant en grande partie les propriétés de texture et donc de fonctionnalité des matières grasses en général (Wright *et al.*, 2001 ; Marangoni et Tang, 2008). Ce paramètre semble donc important à approcher. Pour cela, les matières grasses anhydres doivent subir un enregistrement calorimétrique. Or, la vitesse de refroidissement joue un rôle très important sur les phénomènes de nucléation et de croissance cristalline de ces molécules dû au phénomène de surfusion notamment (Boistelle, 1988), alors que la fusion ne présente pas de retard. Nous avons donc décidé d'entreprendre cette estimation lors d'une expérience de fusion.

Généralement, les logiciels d'analyse thermique proposent une intégration directe du signal calorimétrique pour estimer le taux de matière grasse solide. Cependant, cette approximation ne tient pas compte des différences de variations d'enthalpie de fusion des différents triacylglycérols dans le cas de matières grasses complexes. Pour être tout à fait juste, il faudrait donc corriger les aires intégrées du signal calorimétrique par les variations d'enthalpies de fusion de chaque triacylglycérols (Deroanne, 1977 ; Lambelet, 1983), mais cela est trop complexe pour la matière grasse laitière compte tenu de la diversité de triacylglycérols présents (Gresti *et al.*, 1993). Nous proposons donc d'estimer ce taux de matière grasse solide en fonction de la température en corrigeant tout de même les aires d'intégration du signal calorimétrique par les variations d'enthalpie des 3 grandes fractions de triacylglycérols laitiers à savoir les triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion (Timms, 1980 ; Marangoni et Lencki, 1998). Nous avons donc séparé les fractions des matières grasses B8 et B10, considérées comme les plus représentatives des groupes de matières grasses riches en acides gras saturés et riches en acides gras insaturés, respectivement.

1. Détermination des variations d'enthalpies spécifiques des fractions de triacylglycérols laitiers

Les propriétés thermiques des matières grasses anhydres et des différentes fractions séparées à 15°C puis à 0°C ont été étudiées par MCD au cours d'un chauffage à 2°C/min de -50°C à 60°C suite à un refroidissement à la même vitesse depuis 60°C. Comme précisé plus

haut, la fusion des triacylglycérols présente l'avantage de ne pas montrer de phénomènes de retard, c'est pourquoi nous avons opté pour déterminer les variations d'enthalpies des fractions de triacylglycérols laitiers en chauffage et non au cours du refroidissement. La **Figure CI-3** présente les thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des matières grasses anhydres et de leurs fractions.

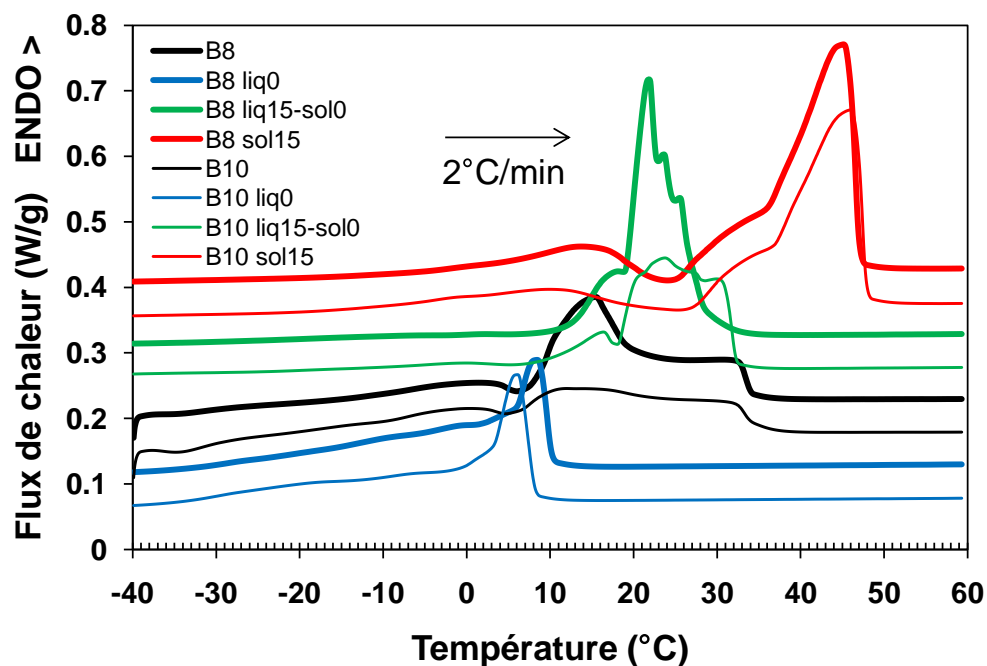


Figure CI-3 : thermogrammes enregistrés au cours du chauffage à 2°C/min de 60°C à -50°C des matières grasses B8 B10 et leurs fractions séparées à 15°C puis 0°C après un refroidissement de 60°C à -50°C à 2°C/min.

Les thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des différentes fractions des matières grasses B8 et B10 séparées à 0°C et 15°C présentent des profils très différents. Malgré tout, les fractions liquide à 0°C d'une part et solide à 15°C d'autre part des deux matières grasses montrent des profils en chauffage très proches. La grande différence entre ces deux matières grasses provient de la fraction et liquide à 15°C et solide à 0°C, pour laquelle le signal est beaucoup plus intense pour la matière grasse témoin. Cette fraction correspond aux triacylglycérols à moyen point de fusion d'après Timms (1980) et Marangoni et Lencki (1998). D'après la complexité des signaux enregistrés en **Figure CI-3**, les triacylglycérols qui fondent dans cette fraction présentent un polymorphisme évident. La variation d'enthalpie déterminée pour cette fraction résulte donc d'un ensemble de phénomènes endothermiques liés à la fusion des triacylglycérols mais également exothermiques liés aux phénomènes de réorganisations polymorphiques. L'absence d'exotherme pour les fractions liquides à 0°C nous conforte sur le fait que seuls les

triacylglycérols à bas point de fusion sont présents dans cette fraction liquide à 0°C. Pour la fraction solide à 15°C, un petit endotherme avant 25°C est enregistré, correspondant à un reste de triacylglycérols liquides à 15°C n'ayant pu être séparés lors du fractionnement. Malgré tout, cet endotherme représente une faible variation d'enthalpie comparé à la variation d'enthalpie de fusion totale de cette fraction. Nous avons toutefois assimilé cet endotherme à des triacylglycérols à moyen point de fusion pour le calcul de la variation d'enthalpie des triacylglycérols à haut point de fusion. Mis à part cet endotherme, aucun exotherme n'est enregistré pour cette fraction entre 25°C et 50°C, plage de température où fond à proprement parler la fraction solide à 15°C, ce qui nous conforte sur le fait que seuls le signal des triacylglycérols à haut point de fusion est enregistré dans cette fraction solide à 15°C à partir de 25°C. Les variations d'enthalpie spécifiques des triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion sont données dans le **Tableau CI-3** ; elles ont été déterminées par intégration directe du signal calorimétrique sur l'ensemble de la plage de fusion de chaque fraction, excepté pour la fraction à haut point de fusion, dont la variation d'enthalpie a été déterminée à partir de celle de la fraction à moyen point de fusion et du thermogramme enregistré au chauffage de la fraction solide à 15°C selon la formule :

$$\Delta H_H = (\Delta H_{sol15} - \Delta H_M * A_{Msol15}) / A_{Hsol15} \quad \text{Équation 13}$$

où : ΔH_H = variation d'enthalpie de la fraction à haut point de fusion

ΔH_M = variation d'enthalpie de la fraction à moyen point de fusion

ΔH_{sol15} = variation d'enthalpie totale de la fraction solide à 15°C

A_{Msol15} = aire (%) correspondant à l'endotherme des triacylglycérols à moyen point de fusion de la fraction solide à 15°C.

A_{Hsol15} = aire (%) correspondant à l'endotherme des triacylglycérols à haut point de fusion de la fraction solide à 15°C.

Tableau CI-3 : variations d'enthalpie de fusion spécifiques des triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion des matières grasses laitières issues des régimes témoins et riches en acides gras insaturés. Moyenne \pm écart-type (n=3).

Type de triacylglycérols	Groupe de fusion	ΔH_{fus} (J/g)
Triacylglycérols témoins	Pic à bas point de fusion	62,8 \pm 1,3
	Pic à moyen point de fusion	84,6 \pm 1,7
	Pic à haut point de fusion	117,1 \pm 2,1
Triacylglycérols enrichis en acides gras insaturés	Pic à bas point de fusion	58,7 \pm 0,7
	Pic à moyen point de fusion	74,8 \pm 1,5
	Pic à haut point de fusion	113,7 \pm 2,0

Les variations d'enthalpie des triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion de la matière grasse témoin étudiée ici sont en accord avec les valeurs obtenues par Lavigne (1995) et Brodin (1989). En revanche, les valeurs de variations d'enthalpie obtenues pour la matière grasse B10 issue d'un régime riche en acides gras insaturés sont plus faibles que pour la matière grasse témoin, en particulier pour la fraction à moyen point de fusion (liq15-sol0). Cela confirmerait l'hypothèse selon laquelle les triacylglycérols qui fondent dans cette fraction ne sont pas les mêmes entre les deux matières grasses.

Ces paramètres pourront être utilisés pour la détermination du taux de matière grasse solide en fonction de la température à partir de thermogrammes de MCD enregistrés sur des matières grasses laitières témoins ou issues de régimes riches en acides gras insaturés.

2. Calcul du taux de matière grasse solide en fonction de la température

La détermination du taux de matière grasse solide à partir des enregistrements calorimétriques est possible par intégration d'un signal de flux de chaleur, du moment qu'il est corrigé par les enthalpies de fusion des différentes familles de triacylglycérols qui fondent et forment le signal calorimétrique en fonction de la température (Deroanne, 1977 ; Lambelet, 1983 ; Lavigne, 1995). Cette correction prend en compte le fait que les triacylglycérols à plus bas point de fusion possèdent également la plus faible variation d'enthalpie de fusion. Lavigne (1995) propose une formule de correction basée sur les variations d'enthalpies de fusion spécifiques des triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion. Il propose la formule suivante que nous avons utilisé ici :

$$SFC_T = \left(\frac{S_B - S_T}{\Delta H_B} + \frac{S_M}{\Delta H_M} + \frac{S_H}{\Delta H_H} \right) / \left(\frac{S_B}{\Delta H_B} + \frac{S_M}{\Delta H_M} + \frac{S_H}{\Delta H_H} \right) * 100 \quad \text{Équation 14}$$

où SFC_T est le taux de matière grasse solide à la température donnée T , exprimé en % ; S_T est la surface sous le signal calorimétrique flux de chaleur en fonction de la température de -40°C , température de début de fusion estimée de la matière grasse laitière, et la température T ; S_B , S_M , S_H sont les surfaces sous le signal calorimétrique flux de chaleur en fonction de la température correspondant aux pics à bas, moyen et haut point de fusion, respectivement et ΔH_B , ΔH_M , ΔH_H sont les variations d'enthalpies de fusion spécifiques des triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion, respectivement, pour les matières grasses témoin ou enrichies en acides gras insaturés spécifiquement.

Le taux de matière grasse solide en fonction de la température est déterminé pour les matières grasses stabilisées à faible température afin qu'un minimum de réorganisations polymorphiques n'aie lieu au cours du chauffage, ce pour éviter d'obtenir des signaux exothermiques venant interférer avec les endothermes de fusion de la matière grasse. Ainsi, le

taux de matière grasse solide est estimé au cours du chauffage à 2°C/min des matières grasses laissées stabilisées à 4°C pendant $t > 72$ h puis refroidies à 2°C/min jusqu'à -50°C. Rigoureusement, la stabilisation aurait dû être faite à -50°C avant d'effectuer le chauffage pour la détermination du taux de matière grasse solide, mais il n'a pas été possible techniquement de réaliser cela.

Le temps de stabilisation à 4°C a cependant été optimisé afin d'obtenir une variation d'enthalpie de fusion totale de la matière grasse de 4°C à 45°C maximum comme le montre la **Figure CI-4**. En effet, la variation d'enthalpie de -40°C à 4°C n'est pas soumise à changement du fait du protocole de détermination du taux de matière grasse solide choisi, mais la variation d'enthalpie de fusion en chauffage de 4°C à 45°C est soumise à variations dues à la réorganisation des cristaux de triacylglycérols vers les variétés les plus stables au cours du stockage. Nous avons ainsi déterminé le temps à partir duquel cette variation d'enthalpie d'une matière grasse témoin (B8) ne variait plus et donc à partir duquel nous considérons que les cristaux de triacylglycérols formés sont les plus stables (**Figure CI-4**).

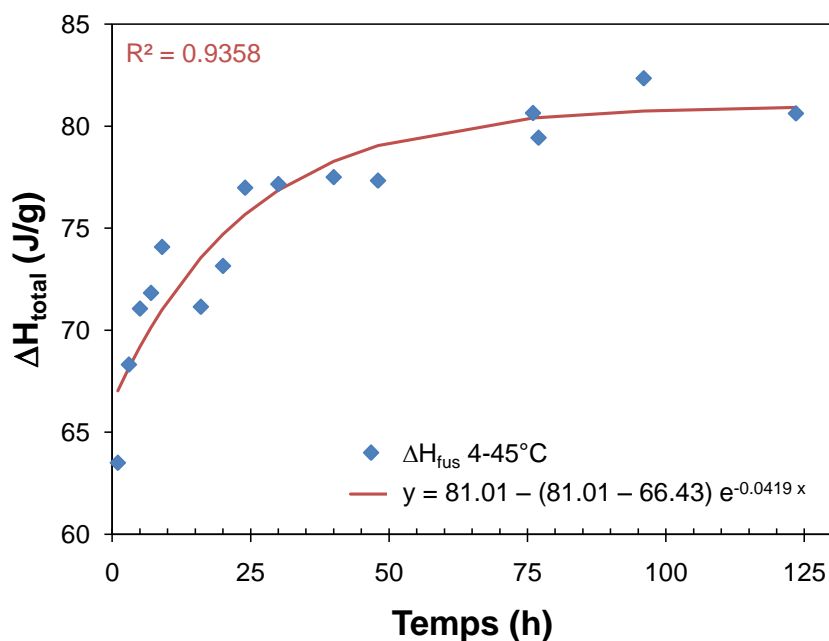


Figure CI-4 : variations d'enthalpie de fusion de la matière grasse témoin B8 déterminées de 4°C à 45°C au cours du chauffage de 4°C à 60°C à 2°C/min après stockage pendant différents temps à 4°C.

La courbe rouge sur la **Figure CI-4** est un ajustement des points expérimentaux en bleu et qui prend en compte une évolution logarithmique de la variation d'enthalpie de fusion de 4°C à 45°C de la matière grasse B8 ainsi qu'une asymptote horizontale à un temps infini. Les paramètres de cet ajustement sont la variation d'enthalpie de fusion pour un temps de

stockage nul (estimation du paramètre : 66,43 J/g), pour un temps de stockage infini (estimation du paramètre : 81,01 J/g) et le coefficient exponentiel ajustant la forme de la courbe aux points intermédiaires (-0,0419 J/g.h). Le coefficient de corrélation élevé (0,9358) atteste d'un bon ajustement de la courbe modèle aux points expérimentaux.

Les corrections enthalpiques déterminées précédemment sont ensuite appliquées à l'intégration du signal calorimétrique enregistré en chauffage sur les gammes de températures -40°C – 5°C pour le pic à bas point de fusion, 5°C – 25°C pour le pic à moyen point de fusion et 25°C – 45°C pour le pic à haut point de fusion, comme défini par Timms (1980) et Marangoni et Lencki (1998).

La **Figure CI-5** présente une comparaison du taux de matière grasse solide estimé en fonction de la température pour la matière grasse témoin B8 avec et sans correction des variations d'enthalpies spécifiques des différentes fractions de triacylgcérols laitiers.

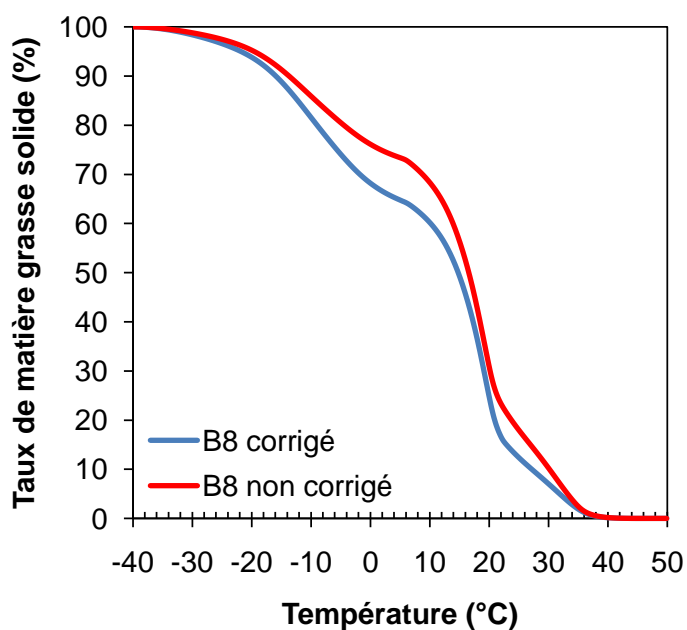


Figure CI-5 : comparaison de l'évolution du taux de matière grasse solide en fonction de la température pour la matière grasse témoin B8 : intégration du signal de flux de chaleur calorimétrique en chauffage avant et après correction par les variations d'enthalpie de fusion des différentes fractions de triacylgcérols laitiers.

La **Figure CI-5** permet de bien se rendre compte de la surestimation du taux de matière grasse solide sur l'ensemble de la plage de fusion des triacylgcérols laitiers par la méthode d'intégration directe du signal calorimétrique. Une différence allant jusqu'à près de 10% peut être observée notamment vers 4°C, température de stockage des produits laitiers. La

Figure CI-6 montre l'évolution du taux de matière grasse solide estimé après correction enthalpique pour l'ensemble des matières grasses étudiées.

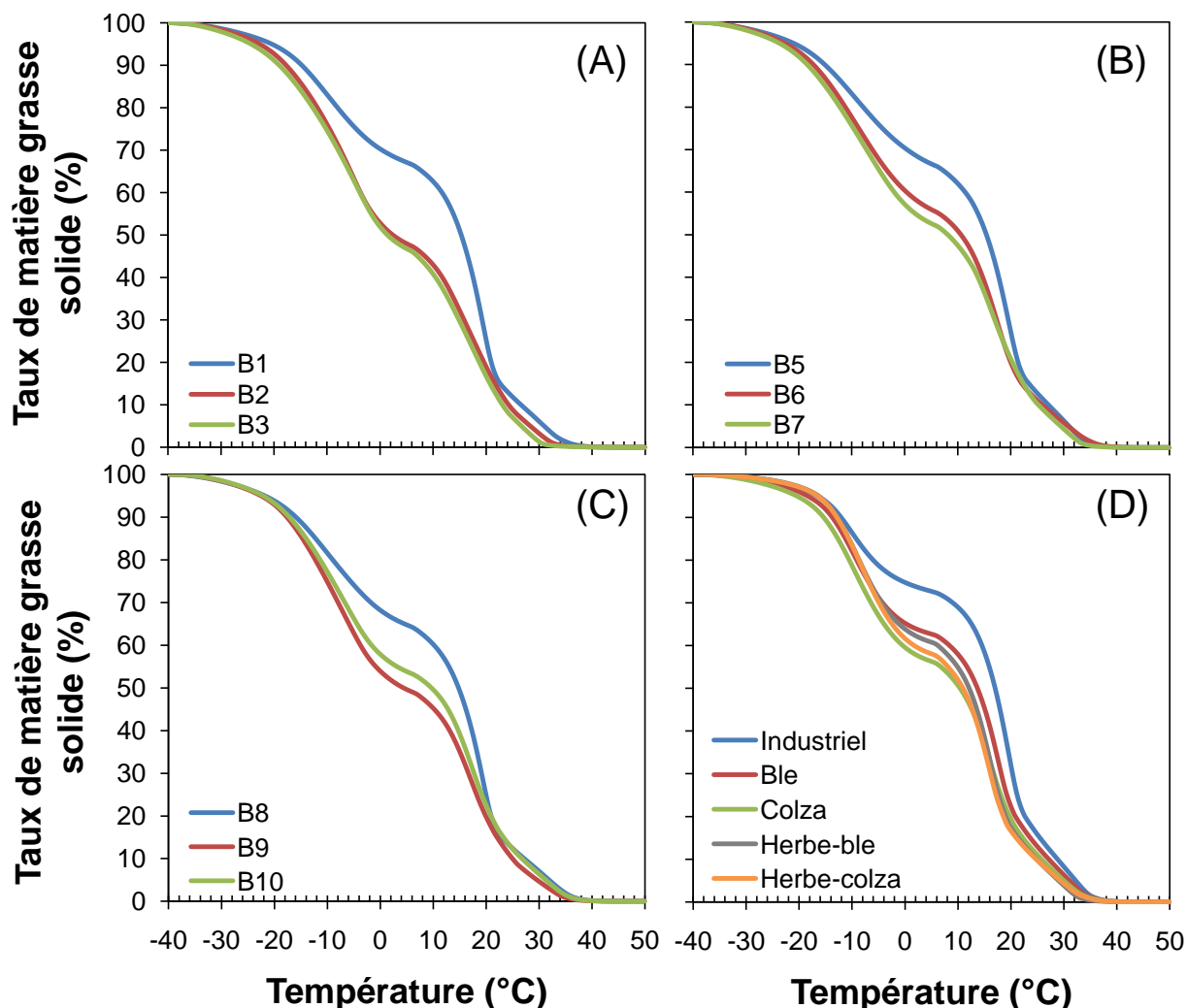


Figure CI-6 : taux de matière grasse solide moyen en fonction de la température pour l'ensemble des matières grasses étudiées. (A) matières grasses à base du mélange d'ensilage d'herbe, d'ensilage de maïs et de bouchon de luzerne déshydratés. (B) matières grasses à base d'ensilage de maïs. (C) matières grasses à base d'ensilage d'herbe. (D) matières grasses réalistes produites pendant la phase de validation.

L'évolution du taux de matière grasse solide en fonction de la température dans les matières grasses témoins et enrichies en acides gras insaturés suit la tendance de ce qui est déjà connue dans la littérature (Timms, 1980 ; Wright *et al.*, 2001 ; Smet *et al.*, 2009). Smet *et al.* (2009) ont montré qu'à 5°C, le taux de matière grasse laitière solide était de 60% dans une matière grasse issue d'un régime témoin, et de 46% seulement dans une matière grasse issue d'un régime riche en graines de lin, ce qui correspond bien aux chiffres que nous avons obtenus pour les différents types de matières grasses. De plus, Smet *et al.* (2009) ont également montré qu'il existait un point d'inflexion vers 20-25°C dans la courbe d'évolution

du taux de solide en fonction de la température, que nous retrouvons également systématiquement par nos mesures.

Le taux de matière grasse solide en fonction de la température estimé par notre méthode montre des valeurs systématiquement inférieures sur l'ensemble de la plage de température sur laquelle les triacylglycérols fondent pour les matières grasses issues des régimes riches en acides gras insaturés par rapport aux régimes témoins correspondants. L'écart peut atteindre 20% pour les matières grasses à base du mélange d'ensilage d'herbe, d'ensilage de maïs et de bouchon de luzerne déshydratés. En particulier, la plage de température entre 0°C et 20°C est la zone où l'on observe l'écart le plus important entre les matières grasses issues des régimes riches en acides gras et les matières grasses témoin. Cela pourrait avoir des conséquences sur les fonctionnalités des produits, notamment des propriétés de texture telle la tartinabilité de beurres enrichis en acides gras insaturés, comme déjà suggéré par plusieurs auteurs (Bobe et al., 2003 ; Chen et al., 2004 ; Bobe et al., 2006 ; Couvreur et al., 2006 ; Hurtaud et al., 2010). Cette plage de température est également celle qui présente une forte diminution du taux de matière grasse solide : de 60-70% à 0°C dans les matières grasses témoin, le taux de matière grasse solide passe à 15-20% à 20°C, qui est la température ambiante. Dans les matières grasses enrichies en acides gras insaturés, ce taux passe de 50-60% suivant la matière grasse à 15% à 20°C. A partir de 20°C, la différence entre les matières grasses témoins et enrichies en acides gras insaturés est quasi nulle.

IV. CONCLUSION

Ce premier chapitre a permis de montrer que malgré le grand nombre de régimes alimentaires différents offerts aux vaches, la variabilité de composition en acides gras des matières grasses issues des laits produits était relativement restreinte et se résumait à la constitution de deux grands pôles d'échantillons de matières grasses : les matières grasses témoins riches en acides gras saturés et les matières grasses expérimentales plus riches en acides gras insaturés et en C18:0.

La caractérisation des propriétés physiques de ces matières grasses a montré que la rigidité des matières grasses expérimentales enrichies en acides gras insaturés était plus faible de quasiment la moitié par rapport aux matières grasses témoins de composition en acides gras classique. Ces propriétés rhéologiques ont été vérifiées sur une large plage de températures au cours d'un refroidissement et d'un chauffage.

Chapitre I

Les matières grasses expérimentales enrichies en acides gras insaturés n'ont pas montré de différence franche de température de début de cristallisation par rapport aux matières grasses témoins de composition en acides gras classique. Cependant la cinétique de cristallisation générale semblait plus lente, en particulier pour la formation des cristaux de triacylglycérols de type 3L liée au deuxième exotherme de cristallisation enregistré en refroidissement.

Les types de cristaux formés ont montré à la fois des caractéristiques cristallines différentes, liées à la longueur des chaînes d'acides gras formant ces cristaux, et un polymorphisme de différente nature. Les cristaux de 3L formés au cours du refroidissement en particulier se réorganisent lors du chauffage pour former des cristaux de β' 3L₂ dans les matières grasses témoins de composition classique en acides gras, alors que les cristaux de 3L formés au cours du refroidissement dans les matières grasses expérimentales fondent simplement. Cette différence pourrait expliquer à la fois la différence de profil thermique enregistré pour le pic à moyen point de fusion au chauffage de ces différentes matières grasses, et également la différence de comportement rhéologique, montrant une certaine conservation de la rigidité dans le cas de matières grasses témoin, alors que la rigidité s'effondre dans cette plage de température pour les matières grasses expérimentales.

Enfin, le taux de matière grasse solide de ces matières grasses a été estimé par méthode calorimétrique et montre des valeurs systématiquement inférieures pour les matières grasses expérimentales par rapport aux matières grasses témoins et ce sur l'ensemble de la plage de fusion des triacylglycérols. Ce taux de matière grasse solide plus faible pourrait permettre d'expliquer la cinétique de cristallisation plus lente observée par DRX et la rigidité plus faible mesurée en rhéologie.

CHAPITRE II :
PROPRIETES DE CRISTALLISATION DES TRIACYLGLYCEROLS EN
EMULSION EN FONCTION DE LEUR COMPOSITION EN ACIDES
GRAS

Chapitre II

I. INTRODUCTION

Le **Chapitre I** avait pour objectif d'élucider les propriétés de cristallisation de matières grasses, qui est généralement dispersée sous forme de gouttelettes d'émulsions dans les produits laitiers. De plus, le lait lui-même est une émulsion naturelle de matière grasse, qu'il est intéressant de caractériser comme telle en tant qu'ingrédient ou qu'aliment brut. Dans ce **Chapitre**, nous nous sommes intéressés à caractériser les propriétés de cristallisation des triacylglycérols laitiers en milieu anhydre en fonction de leur composition en acides gras.

L'objectif du deuxième chapitre est d'approfondir les connaissances sur les propriétés de cristallisation des triacylglycérols non plus en milieu anhydre, mais dans leur état de dispersion natif que sont les globules gras. Pour cela, nous avons étudié les propriétés de cristallisation des triacylglycérols dans des crèmes fabriquées à partir des laits expérimentaux utilisés dans l'ensemble de la thèse et ce, selon trois protocoles de cinétiques en température : un refroidissement à vitesse intermédiaire (0,5°C/min), après un stockage long à 4°C et immédiatement à la suite d'une trempe à -7°C. Ces trois protocoles de cinétique en température visent à cristalliser les triacylglycérols sous différentes formes cristallines afin d'en étudier plus facilement le polymorphisme.

Dans un second temps, nous avons tenté de mettre en évidence le rôle de la taille des gouttelettes d'émulsion sur la cristallisation des triacylglycérols laitiers en fonction de leur composition en acides gras. Ces résultats, présentés ici sous forme d'article, ont été publiés dans la revue scientifique à comité de lecture *Food Research International* (*doi:10.1016/j.foodres.2011.01.003*).

II. ECHANTILLONS ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Il n'a pas été possible de réaliser des études des propriétés physiques des triacylglycérols pour des températures permettant de cristalliser l'ensemble des triacylglycérols de la matière grasse laitière sous peine de cristalliser l'eau présente dans les émulsions reconstituées ainsi que dans les échantillons de crèmes et donc de casser les gouttelettes d'émulsion. Ainsi, nous avons limité nos études à des températures minimales de -7°C afin d'étudier les propriétés de cristallisation des triacylglycérols de la matière grasse laitière en émulsions.

A. Echantillons de crèmes

Plusieurs échantillons de crèmes ont été utilisés afin d'étudier les propriétés de cristallisation des triacylglycérols en fonction de leur composition en acides gras dans les globules gras natifs du lait. Pour cela, un écrémage a été réalisé sur chaque lait reçu individuellement afin d'en récupérer la crème. Pour rappel, jusqu'à 14 échantillons de crèmes provenant de régimes différents offerts aux vaches ont été utilisés dans cette partie. Ces échantillons sont détaillés dans la partie **Matériels et méthodes**. Nous rappelons toutefois les codes utilisés dans le **Tableau CII-1**. Afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats, les crèmes ont été reçues de 3 à 4 fois sur des périodes de 2 semaines, exceptée pour les crèmes « Herbe-blé » et « Herbe-colza » reçues uniquement 1 fois. Chaque réception correspondait à une traite du soir et du matin combinée pour un cumul de 6 vaches au moins.

Tableau CII-1 : régimes alimentaires utilisés pour produire les laits témoins et enrichis en acides gras insaturés. EM = ensilage de maïs ; EH = ensilage d'herbe ; Luz = bouchons de luzerne déshydratés.

Code	Base d'alimentation	Additif
B1	EM + EH + Luz	- (<i>témoin</i>)
B2	EM + EH + Luz	5% huile de tournesol
B3	EM + EH + Luz	5% huile de lin
B5	EM	- (<i>témoin</i>)
B6	EM	5% huile de colza
B7	EM	5% huile de lin
B8	EH	- (<i>témoin</i>)
B9	EH	5% huile de colza
B10	EH	5% huile de lin
Indus	Lait de grand mélange Bretagne	- (<i>témoin</i>)
Blé	EM + EH	Blé
Colza	EM + EH	Graines de colza aplaties
Herbe-Blé	Herbe pâturée	Blé
Herbe-Colza	Herbe pâturée	Graines de colza aplaties

La teneur en matière grasse de chaque crème a été systématiquement mesurée par méthode butyrométrique et prise en compte dans les caractérisations calorimétriques notamment. D'une manière générale, la teneur en matière grasse des crèmes étudiées s'étendait de 340 à 670 g/kg (cf partie **Matériels et méthodes**). Une caractérisation granulométrique des crèmes a été systématiquement effectuée afin de s'assurer que les globules gras alors concentrés n'ont pas été abîmés lors de l'écrémage. Le diamètre moyen des globules gras des crèmes mesuré par granulométrie laser correspondait bien à ce qui est

connu dans la littérature, c'est-à-dire un mode centré sur 4 μm environ (Michalski *et al.*, 2004).

Une analyse par type de crème a été réalisée en DRX. Le détail des protocoles de DRX réalisés est donné dans la partie **Matériels et méthodes**. Brièvement, le **Tableau CII-2** présente le détail des analyses réalisées en DRX pour chaque type de crème.

Tableau CII-2 : détail des protocoles appliqués à chaque type de crème. « refroidissement-chauffage » = refroidissement à vitesse intermédiaire (0,5°C/min) depuis l'état fondu des triacylglycérols ; « variétés stables à 4°C » = statique à 4°C après un stockage pendant $t > 48\text{h}$ à cette température ; « trempe à -7°C » = statique à -7°C après une trempe depuis l'état fondu.

Code crème	Protocoles appliqués en DRX
B1	« refroidissement-chauffage » + « variétés stables à 4°C » + « trempe à -7°C »
B2	« refroidissement-chauffage » + « variétés stables à 4°C » + « trempe à -7°C »
B3	« refroidissement-chauffage » + « variétés stables à 4°C » + « trempe à -7°C »
B5	« refroidissement-chauffage » + « variétés stables à 4°C » + « trempe à -7°C »
B6	« refroidissement-chauffage » + « variétés stables à 4°C » + « trempe à -7°C »
B7	« refroidissement-chauffage » + « variétés stables à 4°C » + « trempe à -7°C »
B8	« refroidissement-chauffage » + « variétés stables à 4°C » + « trempe à -7°C »
B9	« variétés stables à 4°C » + « trempe à -7°C »
B10	« refroidissement-chauffage » + « variétés stables à 4°C » + « trempe à -7°C »
Industriel	« variétés stables à 4°C »
Blé	« variétés stables à 4°C »
Colza	« variétés stables à 4°C »
Herbe-blé	« variétés stables à 4°C »
Herbe-colza	« variétés stables à 4°C »

Pour les analyses réalisées en DRX sur la ligne du laboratoire CNRS de Châtenay-Malabry, les vitesses de balayages en température n'ont pas été suffisamment élevées (0,5°C/min) pour fournir un signal de calorimétrie exploitable à l'aide de Microcalix®. D'après Lopez *et al.* (2002a), la différence de comportement cristallographique et thermique des crèmes à 0,5°C/min et 2°C/min est suffisamment faible pour considérer que les mêmes événements se passent dans les échantillons. Nous avons donc réalisé des analyses en balayage sur le calorimètre DSC Q1000 de Rennes à des vitesses supérieures (2°C/min) pour nous permettre d'enregistrer les signaux calorimétriques permettant d'expliquer les phénomènes enregistrés sur les diagrammes de DRX. Pour chaque crème individuelle étudiée, 3 analyses en MCD ont ainsi été réalisées systématiquement afin de prendre en compte la répétabilité des mesures.

B. Emulsions reconstituées à taille de gouttelettes contrôlée

Le détail de la méthode de fabrication des émulsions à taille de gouttelettes contrôlées et leur caractérisation physico-chimique sont donnés dans l'article en partie **Résultats et discussion** de ce chapitre directement.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

C. Propriétés de cristallisation des triacylglycérols dans les globules gras natifs en fonction de leur composition en acides gras

Afin d'évaluer le polymorphisme des triacylglycérols dans les globules gras natifs, nous avons étudié le comportement thermique et cristallographique de crèmes de composition en acides gras variables selon les 3 types de passé thermiques détaillés dans la partie **Echantillons et protocoles expérimentaux** de ce chapitre. Afin d'alléger la lecture, les diagrammes de DRXT enregistrés au cours des étapes de balayages en température des crèmes autres que B8 et B10 seront consignés en **Annexes III, IV, V et VI**, les crèmes B8 et B10 étant représentatives des événements enregistrés dans les crèmes témoins et issues des régimes riches en acides gras insaturés, respectivement.

1. Propriétés de cristallisation au cours d'un cycle de refroidissement-chauffage à 0,5°C/min

1.1. Caractérisation des propriétés thermiques et identification des structures cristallines des triacylglycérols dans les crèmes au cours du refroidissement

Les propriétés thermiques des différentes crèmes ont été étudiées par MCD au cours d'un refroidissement à 2°C/min de 60°C à -5°C. La **Figure CII-1** présente les thermogrammes moyens enregistrés au cours du refroidissement de l'ensemble des crèmes étudiées, ainsi que le signal dérivé de ces thermogrammes par rapport à la température.

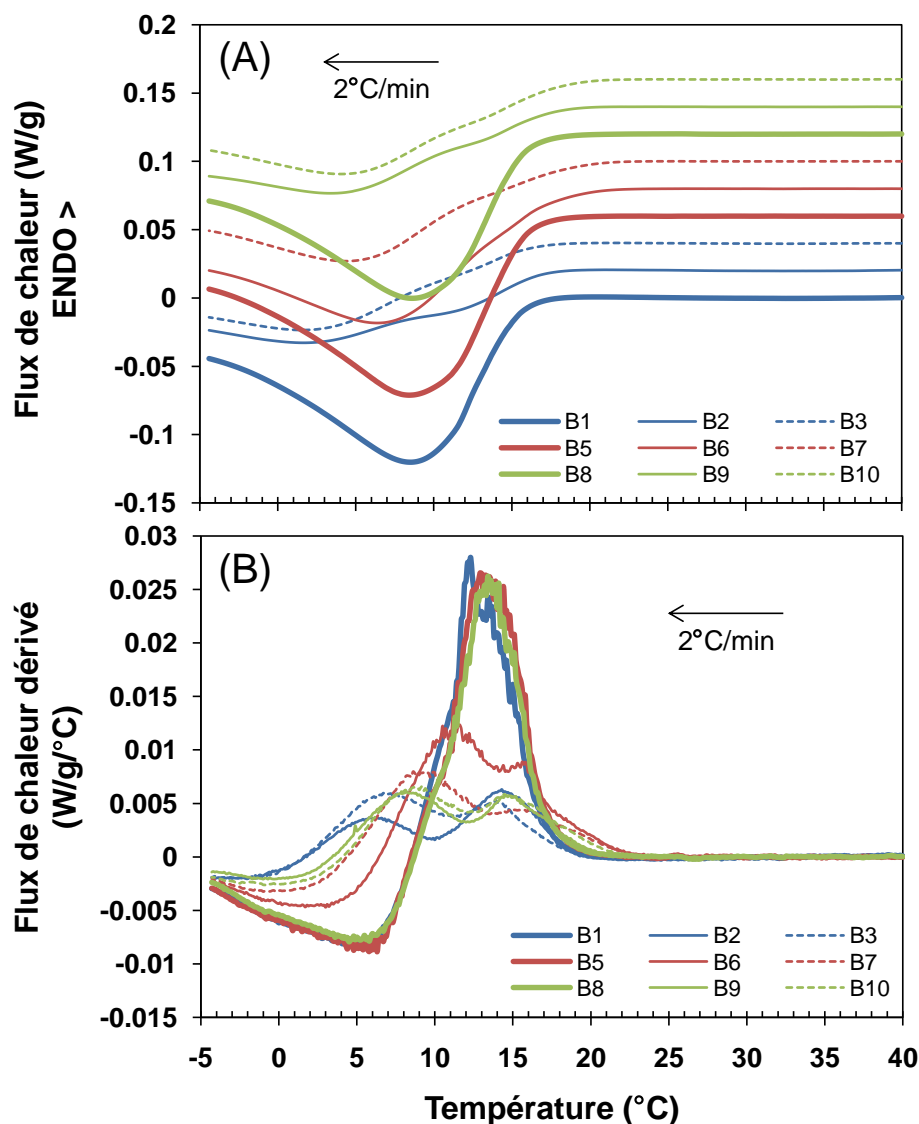


Figure CII-1 : thermogrammes (A) et signal dérivé (B) enregistrés au cours du refroidissement des crèmes de 60°C à -5°C à 2°C/min.

Les thermogrammes enregistrés au refroidissement des différentes crèmes montrent deux types de profils : les crèmes témoins présentent un exotherme unique, caractérisé par une variation d'enthalpie relativement élevée, alors que les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés présentent deux exothermes superposés, mais clairement identifiés sur le signal dérivé (**Figure CII-1-B**) qui présente deux pics. Le signal exothermique global pour les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés est caractérisé par une variation d'enthalpie relativement moindre que dans les crèmes témoins. Le profil thermique enregistré au refroidissement des crèmes témoins est similaire à celui enregistré par Lopez *et al.* (2002a) lors de la cristallisation de crèmes à vitesse comparable : un signal exothermique majeur est enregistré, correspondant vraisemblablement à deux pics exothermiques très rapprochés en

température. Afin de mieux caractériser les propriétés thermiques des triacylglycérols dans les crèmes, nous avons extraits plusieurs paramètres des thermogrammes enregistrés au cours du refroidissement (**Tableau CII-3**) : la température de début de cristallisation T_{onset} , déterminée à l'intersection de la ligne de base fondue et la droite de plus grande pente du premier exotherme, la température au signal minimum T_{min} et la variation d'enthalpie de cristallisation partielle ΔH_{crist} , déterminée par intégration de l'aire sous le signal exothermique global entre 23°C, température la plus basse à laquelle l'ensemble des signaux calorimétriques enregistrés se trouvent à la ligne de base, et -5°C.

Tableau CII-3 : paramètres extraits des thermogrammes enregistrés au cours du refroidissement des crèmes de 60°C à -5°C à 2°C/min (moyenne \pm écart-type).

	T_{onset} (°C)	T_{min} (°C)	ΔH_{crist} (J/g)
B1 (T)	15,6 \pm 0,4	8,5 \pm 0,3	48,6 \pm 1,7
B2	16,9 \pm 0,3	1,2 \pm 0,4	24,8 \pm 3,0
B3	16,4 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2	26,4 \pm 1,1
B5 (T)	15,9 \pm 0,2	8,4 \pm 0,3	45,3 \pm 1,8
B6	17,2 \pm 1,4	7,1 \pm 1,0	30,2 \pm 1,3
B7	15,3 \pm 0,4	4,3 \pm 0,2	24,6 \pm 0,9
B8 (T)	15,7 \pm 0,3	8,6 \pm 0,4	43,0 \pm 0,8
B9	16,2 \pm 0,8	3,3 \pm 0,5	20,9 \pm 1,7
B10	16,4 \pm 0,9	4,0 \pm 0,2	23,8 \pm 0,8

La variation d'enthalpie partielle ΔH_{crist} montre des valeurs largement supérieures dans les crèmes témoins par rapport aux crèmes issues des régimes riches en acide gras insaturés : 43-49 J/g contre 20-27 J/g, respectivement, excepté la crème B6 avec une valeur intermédiaire de 30 J/g. La température de début de cristallisation T_{onset} se situe entre 15,3 et 17,2°C pour l'ensemble des crèmes, et semble légèrement supérieure dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés, excepté la crème B7. Ainsi, la différence de variation d'enthalpie de près de 55% entre les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés et les crèmes témoins ne saurait être expliquée par une température de début de cristallisation si peu différente. Enfin, la température au signal minimum T_{min} montre des valeurs nettement inférieures dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés, avec une différence allant de 1,3°C à 7,3°C suivant les régimes de base. Cette température correspond à la température à laquelle la vitesse de cristallisation globale des triacylglycérols est la plus grande. Dans les crèmes témoins, T_{min} correspond au seul exotherme enregistré, alors que dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés, T_{min} se situe au 2^{ème} exotherme.

La cinétique de cristallisation semble donc largement différente entre les crèmes témoins et les crèmes issues des régimes riches en acide gras insaturés, avec une vitesse de cristallisation moindre dans le cas de ces dernières crèmes, et un découplage des événements exothermiques en température. Nous avons essayé d'identifier les types de cristaux qui se forment lors des différentes phases de cristallisation de ces crèmes afin d'expliquer les différences observées en MCD, notamment en termes de variation d'enthalpie et de cinétique de cristallisation.

Les structures cristallines formées dans les crèmes ont été identifiées par DRXT au cours d'un refroidissement de 60°C à -7°C à 0,5°C/min. Les **Figure CII-2** et **Figure CII-3** présentent les diagrammes de DRXT de ces crèmes enregistrés au cours du refroidissement des crèmes B8 et B10, représentatives des enregistrements effectués dans les crèmes témoins et issues des régimes riches en acides gras insaturés. Les diagrammes enregistrés en DRXT pour les autres crèmes sont consignés en **Annexe III**. Les diagrammes enregistrés aux plus hautes températures en **Figure CII-2** et **Figure CII-3** ne sont pas présentés car seul le signal des triacylglycérols fondus est présent.

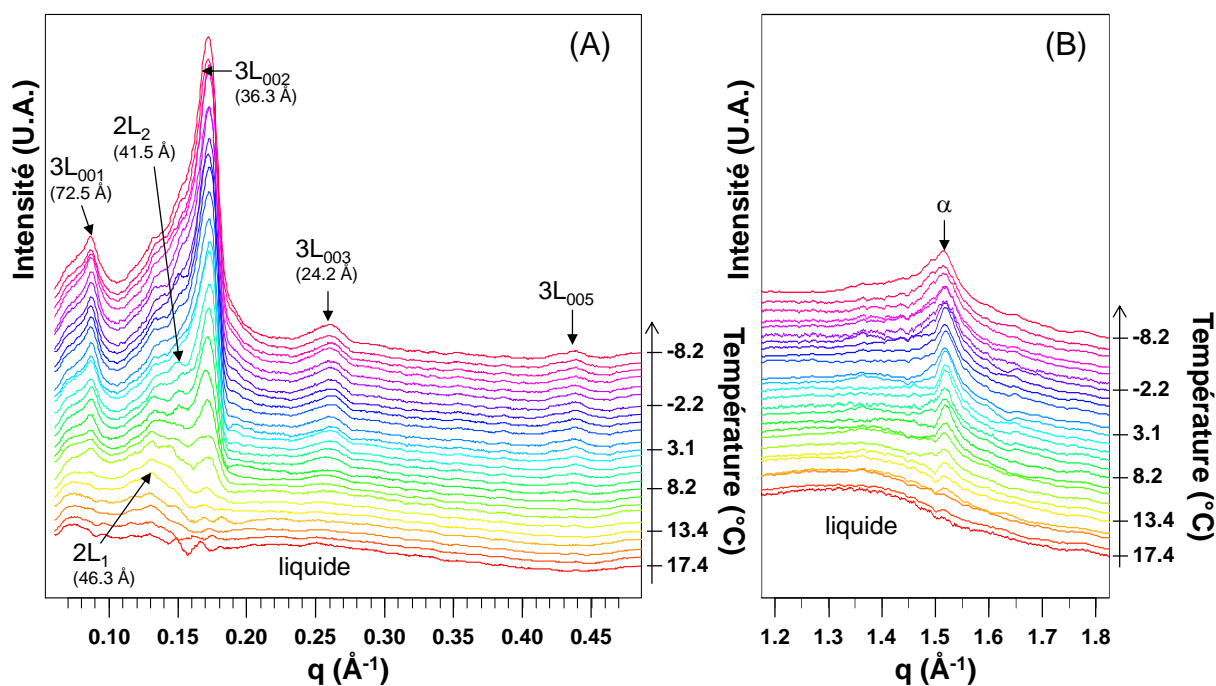


Figure CII-2 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du refroidissement de la crème B8 de 60°C à -7°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

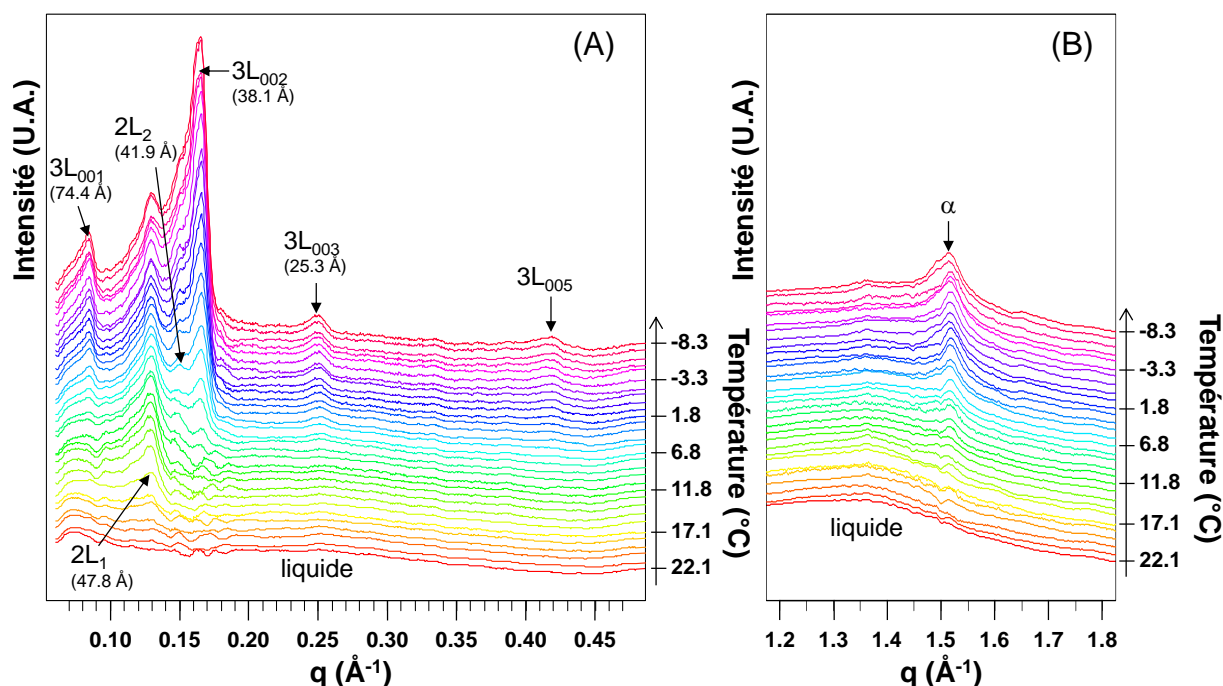


Figure CII-3 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du refroidissement de la crème B10 de 60°C à -7°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

Aux petits angles de diffraction, les diagrammes enregistrés au cours du refroidissement à 0,5°C/min depuis le fondu montrent l'apparition d'un premier pic vers 0,136 Å⁻¹ dans la crème B8 à 15,3°C et vers 0,131 Å⁻¹ dans la crème B10 à 18,1°C. Ces pics sont associés au premier ordre de diffraction d'une structure à 2 longueurs de chaînes 2L de 46,3 Å et 47,8 Å d'épaisseur respectivement. A partir de 12,4°C dans la crème B8 et 9,8°C dans la crème B10, plusieurs pics apparaissent de manière simultanée aux petits angles de diffraction. Dans la crème B8, les pics majeurs qui apparaissent à 12,4°C se situent à 0,087 Å⁻¹, 0,173 Å⁻¹, 0,260 Å⁻¹ et vers 0,433 Å⁻¹ ; un pic très peu intense apparaît également vers 0,151 Å⁻¹. Compte tenu de leur position, les 4 pics majeurs sont associés aux ordres 001, 002, 003 et 005 d'une structure 3L (72,5 Å), respectivement. Le pic peu intense situé vers 0,151 Å⁻¹ est relié à l'ordre 001 d'une structure longitudinale 2L (41,5 Å).

Dans la crème B10, les pics majeurs qui apparaissent à 9,8°C se situent à 0,084 Å⁻¹, 0,165 Å⁻¹, 0,248 Å⁻¹ et 0,414 Å⁻¹ environ ; un pic peu intense apparaît également vers 0,150 Å⁻¹. Compte tenu de leur position, les 4 pics majeurs sont associés aux ordres 001, 002, 003 et 005 d'une structure 3L (74,4 Å), respectivement. Le pic peu intense situé vers 0,150 Å⁻¹ est relié à l'ordre 001 d'une structure longitudinale 2L (41,9 Å).

Chapitre II

Aux grands angles de diffraction, les crèmes B8 et B10 présentent la même figure de diffraction : un pic unique à partir de 15,3°C et 18,1°C, respectivement, situé vers 1,5 Å⁻¹ sur le signal large de diffusion du liquide, correspondant à une structure transversale α .

Au cours du refroidissement, l'ensemble des pics identifiés aux petits angles comme aux grands angles de diffraction n'évoluent pas en position, signifiant que les structures cristallines formées ne se réorganisent pas ni n'évoluent en épaisseur. Les structures identifiées au refroidissement de la crème témoin B8 sont très proches de celles identifiées par Lopez *et al.* (2002a) au cours du refroidissement de crème à 1°C/min. En effet, dans leur étude, Lopez *et al.* (2002a) mettent en évidence la cristallisation vers 18°C de structures α 2L de 42 et 47 Å d'épaisseur, puis la cristallisation vers 15°C de α 3L (71,2 Å). La température de début de cristallisation plus faible observée dans notre étude pourrait provenir d'une plus faible sensibilité des signaux de DRX, ne permettant pas de détecter le début de la cristallisation des différentes structures aussi finement que dans l'étude de Lopez *et al.* (2002a). Malgré tout, nos enregistrements effectués en MCD sont en accord avec la température de début de cristallisation de la matière grasse dans les crèmes, compte-tenu de la surfusion plus importante qu'il peut exister lors d'un refroidissement à 2°C/min (vitesse thermique) par rapport à un refroidissement à 0,5°C/min (vitesse cristallographique) (Lopez *et al.*, 2002a). Les conditions de nucléation, notamment la présence d'impuretés ou de surfaces différentes, peuvent également être responsables de la température de début de cristallisation différente observée entre nos résultats et ceux de Lopez *et al.* (2002a).

En bref, dans les crèmes B8 et B10, deux types de structures cristallines majoritaires se forment au cours du refroidissement, correspondant à une première structure α 2L, de plus grande épaisseur dans B10 que B8 (47,8 Å contre 46,3 Å), puis une seconde structure α 3L également plus épaisse dans B10 que B8 (74,4 Å contre 72,5 Å). De plus, les températures de cristallisation de ces structures ne sont pas non plus les mêmes : la α 2L cristallise à plus haute température dans la crème B10 (18,1°C contre 15,3°C), en revanche, la α 3L cristallise à plus basse température dans la crème B10 (9,8°C contre 12,3°C). Ainsi, la différence de température entre la cristallisation de la structure α 2L et α 3L est beaucoup plus importante pour la crème B10 que pour la crème B8 : 8,3°C contre 2,9°C, respectivement.

L'analyse combinée des résultats acquis en MCD et en DRX montre donc que l'exotherme majeur unique observé pour les crèmes témoins est un signal cumulé d'événements de cristallisation de structures α 2L d'environ 42 et 46 Å d'épaisseur ainsi que de α 3L d'environ 71 Å d'épaisseur. Bien que ces structures ne cristallisent pas exactement à

Chapitre II

la même température, la faible différence de température de début de cristallisation de chaque structure fait que le signal cumulé enregistré en MCD se présente sous la forme d'un seul exotherme fortement énergétique. En revanche, dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés, deux exothermes sont enregistrés en MCD, correspondant à la cristallisation séparée de α 2L de 47 Å d'épaisseur puis d'un mélange de α 3L (75 Å) et α 2L (42 Å), respectivement. La cinétique de cristallisation de ces crèmes est donc plus lente que celle observée pour les crèmes témoins, ainsi que les propriétés cristallographiques des structures formées. La plus forte abondance relative de structure α 2L dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés pourrait provenir de la cristallisation retardée de α 3L, laissant la possibilité aux triacylglycérols de cristalliser en α 2L plus longtemps. La plus faible variation d'enthalpie observée dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés proviendrait soit de la différence de rapport 2L / 3L, soit de la différence de composition des triacylglycérols ayant cristallisés à -5 / -7°C.

1.2. Lien entre la composition en acides gras et les structures cristallines identifiées à -7°C après le refroidissement

Les structures cristallines formées dans l'ensemble des crèmes à l'issue d'un refroidissement à 0,5°C/min depuis le fondu ont été identifiées par DRX afin de comparer les structures cristallines formées et d'identifier les acides gras impliqués dans les différences de structures observées. La **Figure CII-4** présente la somme de 10 diagrammes de DRX enregistrés par crème à l'issue du refroidissement.

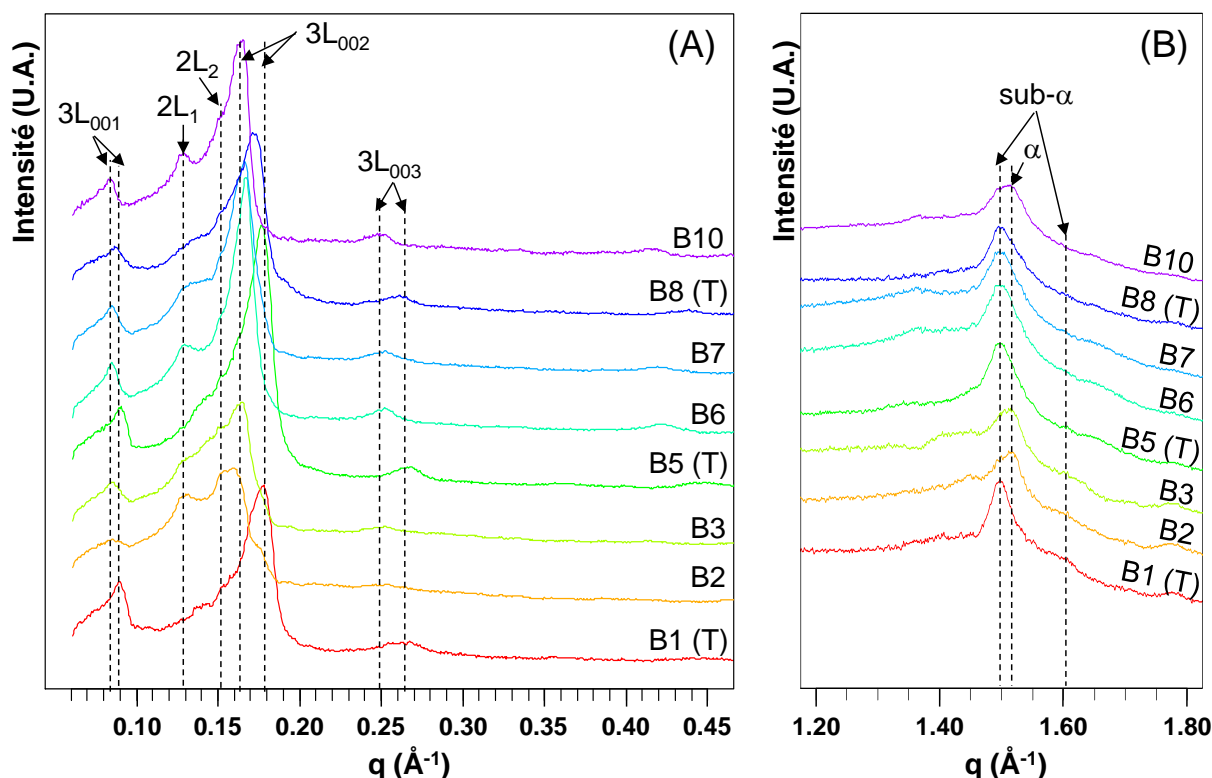


Figure CII-4 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) à -7°C à l'issue du refroidissement de 60°C à -7°C à $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sur l'ensemble des crèmes témoins (T) et issues des régimes riches en acide gras insaturés. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

Dans toutes les crèmes étudiées, les diagrammes de DRX nous montrent la présence de deux structures α 2L et d'une structure α 3L. Ces structures varient en épaisseur selon le régime alimentaire offert aux vaches. Plusieurs paramètres ont été extraits des diagrammes de DRX enregistrés aux petits angles, afin de mettre en lien la composition en acides gras des différentes crèmes avec les paramètres de structure des triacylglycérols de celles-ci. La position en vecteur de diffusion q et l'aire de chaque pic de diffraction ont été extraites à raison de 10 valeurs par pic, correspondant aux 10 enregistrements de DRX effectués. Les sommes des aires des pics de diffraction attribués à une même structure longitudinale ont également été calculées. Le **Tableau CII-4** présente les valeurs moyennes des différents paramètres extraits des diagrammes de DRX enregistrés aux petits angles de diffraction.

Tableau CII-4 : paramètres de pics extraits des diagrammes de DRX enregistrés à -7°C sur l'ensemble des crèmes après un refroidissement de 60°C à -7°C à 0,5°C/min (valeurs moyennes, n = 10). ^a : écart-type < 0,004 ; ^b, ^c : écart-type < 4.

	B1	B2	B3	B5	B6	B7	B8	B10
q_{max} 3L₀₀₁^a	0,089	0,084	0,085	0,090	0,085	0,085	0,086	0,084
q_{max} 3L₀₀₂^a	0,178	0,163	0,165	0,177	0,167	0,165	0,173	0,164
q_{max} 3L₀₀₃^a	0,264	0,251	0,250	0,266	0,251	0,252	0,259	0,248
q_{max} 2L_{1 001}^a	0,139	0,133	0,134	0,138	0,131	0,134	0,135	0,131
q_{max} 2L_{2 001}^a	0,155	0,151	0,150	0,151	0,150	0,150	0,151	0,149
%aire 3L₀₀₁^b	12,0	7,5	7,5	7,3	6,8	7,1	7,1	5,4
%aire 2L_{1 001}^b	9,8	40,7	30,3	15,6	21,5	25,0	16,8	32,2
%aire 2L_{2 001}^b	15,4	26,1	24,6	10,6	15,6	12,7	15,2	22,1
%aire 3L₀₀₂^b	59,2	24,2	35,7	64,2	53,7	52,5	58,4	38,4
%aire 3L₀₀₃^b	3,7	1,5	1,9	2,3	2,4	2,7	2,5	1,8
%aire 3L^c	9,8	40,7	30,3	15,6	21,5	25,0	16,8	32,2
%aire 2L₁^c	15,4	26,1	24,6	10,6	15,6	12,7	15,2	22,1
%aire 2L₂^c	74,8	33,2	45,1	73,8	62,9	62,2	68,0	45,7

Toutes les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés présentent des q_{max} inférieurs aux crèmes témoins correspondant, c'est-à-dire montrent des épaisseurs de structures longitudinales supérieures. Aux grands angles de diffraction, nous avons identifié que seule la forme polymorphique α s'était formée au cours du refroidissement. L'épaisseur des structures longitudinales est donc uniquement liée à la longueur des chaînes d'acides gras qui composent les triacylglycérols, et non pas à l'angle d'inclinaison des strates, celui-ci étant le même pour tous : 90°.

Nous avons ensuite voulu évaluer quels sont les paramètres qui contribuent le plus à expliquer les différences observées en DRX entre les crèmes, et si possible expliquer ces différences à l'aide de la composition en acides gras. Pour cela, nous avons réalisé une ACP sur les paramètres de DRX extraits, puis ajouté en variables non actives les acides gras les plus abondants (**Figure CII-5**). De plus, nous avons établi les corrélations qui existent entre ces mêmes acides gras et les paramètres contribuant le plus à la variabilité sur les structures cristallines formées par les triacylglycérols.

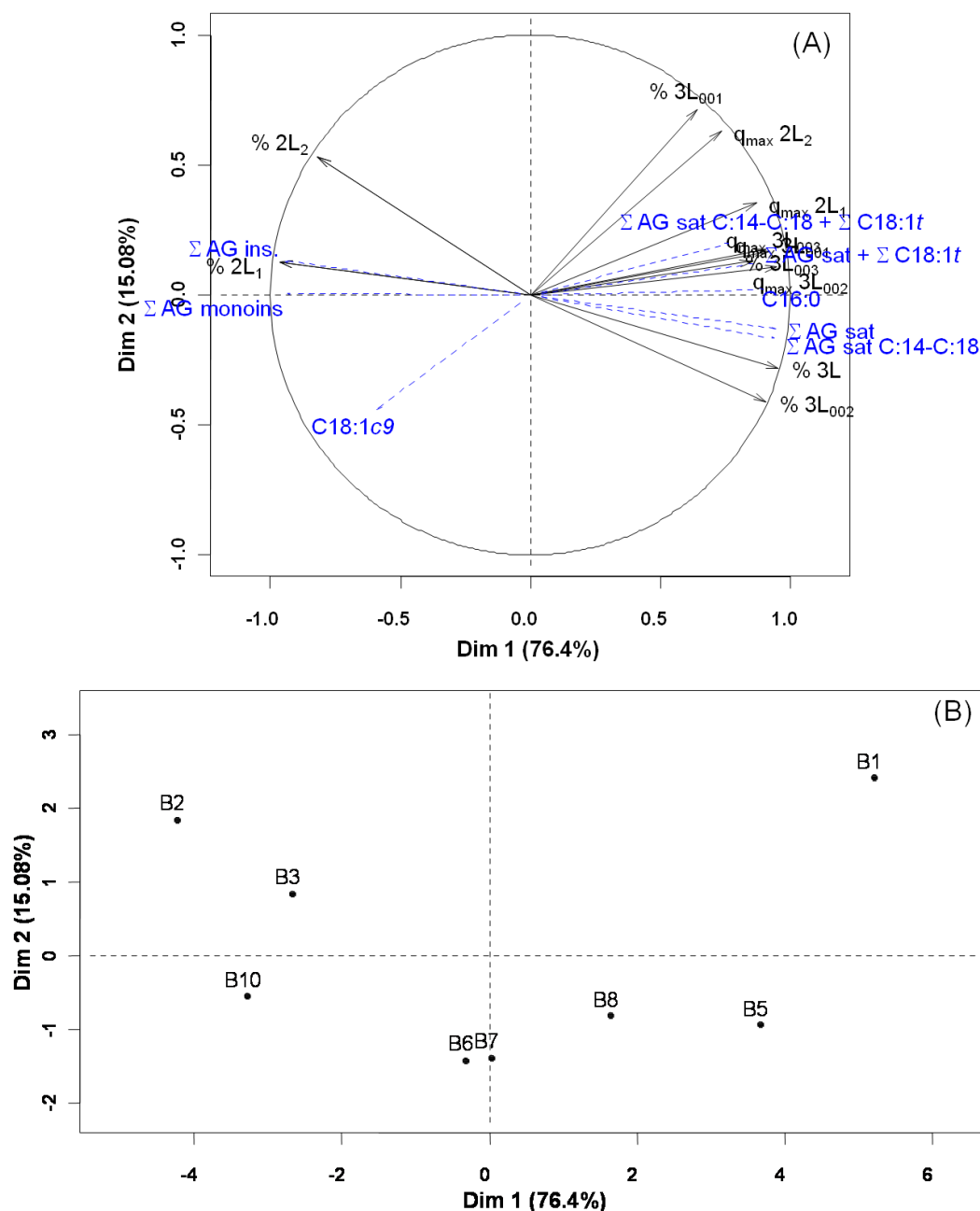


Figure CII-5 : résultats de l'analyse en composantes principales sur les paramètres extraits des diagrammes de DRX enregistrés sur les crèmes à l'issue du refroidissement de 60°C à -7°C à 0,5°C/min. **(A)** cercle des corrélations prenant les paramètres de pics de DRX en variables actives et des groupes d'acides gras en variables non actives. **(B)** carte des individus dans les composantes 1 et 2.

La première composante (Dim 1) explique une large part de la variabilité des structures cristallines longitudinales observées dans les crèmes : 76,4%. Cette composante sépare les crèmes témoins B1, B5 et B8 des crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés B2, B3, B6, B7 et B10. Cette première composante est constituée des paramètres de pics associés aux structures 2L₁ et 3L, plus qu'à la structure 2L₂, qui montrait un pic faible en

Chapitre II

intensité sur les diagrammes de DRX. Dans les crèmes témoins, les q_{\max} sont les plus grands, ainsi que le rapport des aires $3L / 2L$, alors que dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés, les q_{\max} des différents pics sont plus faibles, et le rapport d'aires $3L / 2L$ est plus faible. Ainsi, les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés présentent des structures cristallines longitudinales d'épaisseurs plus grandes que les crèmes témoins, et une proportion de structures $3L$ plus faible. Les crèmes B6 et B7 se positionnent en intermédiaires entre les témoins et les très enrichies en acides gras insaturés que sont B2, B3 et B10.

Cette séparation selon ce premier axe semble liée aux acides gras saturés à longue chaîne (C14:0 à C18:0), éventuellement associés aux acides gras *trans* d'une part et aux acides gras insaturés d'autre part. Plus les crèmes sont riches en acides gras saturés C14:0 et C16:0, moins elles présentent des structures cristallines longitudinales épaisses, au contraire des crèmes plus riches en acides gras insaturés. Cela peut se comprendre par le fait que les régimes riches en acides gras insaturés ont pour résultat d'augmenter le C18:0, acide gras saturé à longue chaîne au détriment des acides gras saturés à plus courtes chaînes comme le C14:0 et le C16:0. A -7°C , nous savons que l'ensemble des triacylglycérols du lait ne sont pas cristallisés. Cependant, les acides gras C14:0, C16:0 et C18:0 ont les points de fusion les plus élevés de tous les acides gras laitiers ; les triacylglycérols comprenant ces acides gras ont donc plus de probabilité d'être cristallisés à cette température. Ainsi, une crème produite à partir d'un régime riche en acides gras insaturé aura des rapports de concentration C14:0 / C18:0 et C16:0 / C18:0 plus faibles qu'une crème issue d'un régime témoin. L'épaisseur du pic de $3L_{002}$ est très représentative de l'axe 1 de l'ACP sur les paramètres DRX, permettant de séparer les crèmes suivant leur composition en acides gras.

Afin d'illustrer les relations qui peuvent exister entre les concentrations en acides gras et les paramètres cristallographiques extraits des données de DRX, nous avons établi et consigné en **Tableau CII-5** les coefficients de corrélation linéaires entre ces deux types de paramètres.

Tableau CII-5 : coefficients de corrélation entre les paramètres cristallographiques enregistrés sur les crèmes en DRX au cours de l'étape statique à -7°C suivant un refroidissement de 60°C à -7°C à 0,5°C/min et les concentrations en acides gras majeurs des crèmes.

	q_{\max} 3L ₀₀₁	q_{\max} 2L ₁	q_{\max} 2L ₂	q_{\max} 3L ₀₀₂	q_{\max} 3L ₀₀₃	%aire 2L ₁	%aire 2L ₂	%aire 3L
C4:0	0,778	0,770	0,690	0,879	0,778	-0,959	-0,653	0,888
C6:0	0,929	0,884	0,679	0,983	0,953	-0,925	-0,720	0,890
C8:0	0,944	0,894	0,656	0,980	0,974	-0,899	-0,748	0,883
C10:0	0,949	0,876	0,598	0,965	0,978	-0,850	-0,748	0,850
C12:0	0,944	0,870	0,569	0,945	0,974	-0,808	-0,734	0,817
C14:0	0,942	0,881	0,612	0,948	0,976	-0,835	-0,762	0,845
C14:1, c9	0,819	0,825	0,490	0,788	0,898	-0,590	-0,632	0,633
C15:1, c10	0,678	0,554	0,486	0,652	0,609	-0,770	-0,889	0,849
C16:0	0,933	0,867	0,631	0,959	0,983	-0,821	-0,709	0,816
C16:1, c9	0,813	0,740	0,544	0,845	0,908	-0,610	-0,508	0,599
C17:1, c10	0,562	0,611	0,384	0,692	0,696	-0,721	-0,696	0,745
C18:0	-0,664	-0,762	-0,459	-0,558	-0,717	0,225	0,110	-0,192
C18:1, t6,7,8,9	-0,759	-0,779	-0,532	-0,833	-0,870	0,692	0,567	-0,677
C18:1, t10	-0,751	-0,651	-0,478	-0,844	-0,781	0,921	0,913	-0,960
C18:1, t11	-0,719	-0,598	-0,487	-0,812	-0,758	0,895	0,918	-0,944
C18:1, c9	-0,826	-0,829	-0,584	-0,783	-0,847	0,487	0,194	-0,399
C18:2, t9,12	-0,602	-0,525	-0,498	-0,638	-0,700	0,541	0,606	-0,590
C18:2, c9,12	0,359	0,574	0,647	0,351	0,479	-0,083	0,221	-0,027
C18:3, c9,12,15	-0,078	0,099	0,148	0,091	0,063	-0,066	0,269	-0,057
C18:2, c9,t11	-0,668	-0,512	-0,391	-0,771	-0,674	0,903	0,924	-0,952
Σ AG sat.	0,902	0,795	0,595	0,960	0,935	-0,914	-0,819	0,919
Σ sat. C4-C8	0,913	0,875	0,688	0,976	0,933	-0,949	-0,729	0,909
Σ sat. C10-C15	0,946	0,876	0,591	0,952	0,977	-0,828	-0,749	0,836
Σ sat. C16-C20	0,821	0,683	0,557	0,915	0,855	-0,928	-0,841	0,937
Σ sat. > C22	-0,206	-0,106	-0,287	-0,265	-0,284	0,250	0,481	-0,349
Σ AG insat.	-0,902	-0,795	-0,595	-0,960	-0,935	0,914	0,819	-0,919
Σ monoinsat.	-0,933	-0,856	-0,645	-0,980	-0,973	0,884	0,734	-0,868
Σ polyinsat.	-0,645	-0,459	-0,330	-0,726	-0,648	0,845	0,943	-0,921

D'une manière générale, l'ensemble des acides gras ou sommes d'acides gras est bien corrélé avec les paramètres extraits des diagrammes de DRX. Deux groupes d'acides gras se distinguent alors : ceux qui sont corrélés positivement avec les paramètres et ceux qui sont corrélés négativement. Les acides saturés gras courts, à moyenne longueur de chaîne et le C16:0 sont tous fortement corrélés positivement aux paramètres d'épaisseur de structures q_{\max} . Autrement dit, plus il y a d'acides gras saturés de C4:0 à C16:0, plus les structures formées 2L1, 2L2 et 3L présentent des q_{\max} élevés observés par DRX et donc plus les structures sont de faibles épaisseur. En particulier, la structure 3L montre des corrélations très

Chapitre II

fortes entre ses paramètres d'épaisseur et ces acides gras. Au contraire, les acides gras C18:0 et l'ensemble des acides gras insaturés montrent des corrélations fortement négatives avec les q_{\max} des différents pics de DRX, à l'exception des C18:2, *c9,12* et C18:3, *c9,12,15* qui ne sont pas corrélés avec les q_{\max} . Cette tendance générale semble cohérente et s'explique par le fait que les acides gras C18 insaturés sont parmi les plus longs des acides gras laitiers, et seraient donc logiquement impliqués dans les structures cristallines les plus épaisses.

Par ailleurs, les abondances relatives des 3 structures cristallines longitudinales observées dans ces conditions de passé thermique et liées plus ou moins directement aux pourcentages d'aires des différents pics de DRX (Guinier, 1964 ; Mazzanti *et al.*, 2008 ; Mazzanti et Mudge, 2009), semblent elles aussi corrélées aux concentrations en acides gras. Le pourcentage d'aire de la 2L₂ est le moins corrélé de ces paramètres, en revanche, il existe clairement une balance entre le pourcentage d'aire de la 2L₁ et de la 3L : lorsque l'une augmente en aire, l'autre diminue et cela semble corrélé à la composition en acides gras. Là aussi, les mêmes groupes d'acides gras se dégagent par rapport aux paramètres d'épaisseur de structures qu'étaient les q_{\max} . Lorsque les crèmes sont riches en acides gras saturés C4:0-C16:0, la matière grasse dans les globules gras natifs cristallise préférentiellement sous forme 3L puisque les coefficients de corrélation linéaire entre ces acides gras et le pourcentage d'aire 3L sont fortement positifs. Egalement, lorsque les crèmes sont riches en acides gras C18:0 et insaturés, la matière grasse dans les globules gras natifs cristallise préférentiellement sous forme 2L. Cela pourrait sembler étonnant puisqu'il est établi que les acides gras insaturés favorisent la cristallisation des triacylglycérols sous forme 3L en général (Larsson, 1994), mais peut se comprendre puisque nous avons vu dans le chapitre I que la quantité de matière grasse laitière cristallisée était probablement inférieure dans les matières grasses enrichies en acides gras insaturés. Ainsi, la quantité de cristaux de type 2L₁ majoritaire pourrait être constante alors que la quantité de 3L varierait fortement entre les régimes, expliquant la proportion de 3L plus importante observée dans les régimes riches en acides gras insaturés.

Afin d'illustrer l'effet de la composition sur les paramètres cristallographiques observés à -7°C après un refroidissement de 60°C à -7°C à 0,5°C/min, des droites de régression linéaires ont été tracées en **Figure CII-6**.

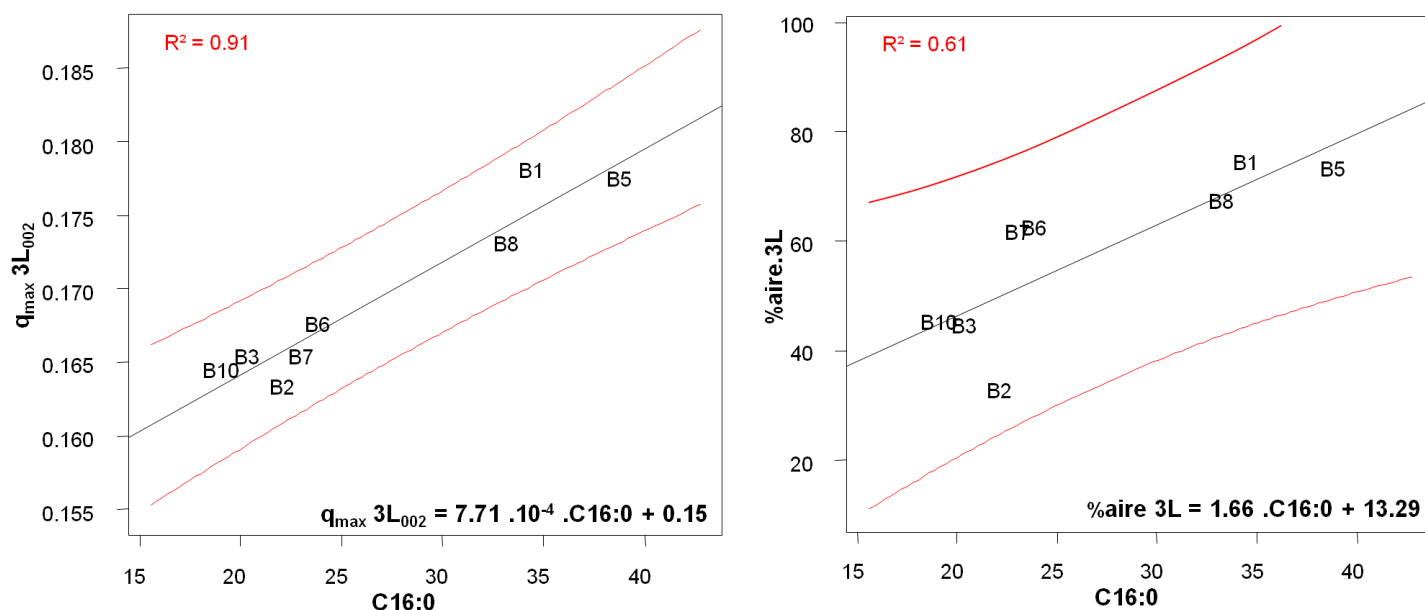


Figure CII-6 : régressions linéaires entre les paramètres d'épaisseur (q_{\max}) et d'abondance (%aire) du pic de $3L_{002}$ mesuré par DRX à -7°C après un refroidissement de 60°C à -7°C à $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et la concentration en C16:0 des crèmes étudiées. En noir sont représentées les régressions linéaires et en rouge les intervalles de confiance à 0,95%.

La **Figure CII-6** de gauche montre le q_{\max} du pic de $3L_{002}$ mesuré par DRX en fonction du taux en C16:0 des crèmes étudiées. Les 8 crèmes étudiées montrent un étalement le long d'une droite avec un coefficient de régression linéaire $R^2 = 0,91$. La **Figure CII-6** de droite montre le pourcentage d'aire du pic de $3L_{002}$ mesuré par DRX toujours en fonction du taux en C16:0 des crèmes étudiées. Les 8 crèmes étudiées montrent là aussi un étalement le long d'une droite avec un coefficient de régression linéaire $R^2 = 0,61$. Les crèmes qui s'éloignent le plus de cette droite sont B6, B7 et B2, l'ensemble des autres crèmes étant quasiment sur la droite.

1.3. Propriétés thermiques et identification des structures cristallines au cours du chauffage

Les propriétés thermiques des différentes crèmes ont été étudiées par MCD au cours d'un chauffage à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de -5°C à 60°C suite à un refroidissement à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ depuis 60°C . La **Figure CII-7** présente les thermogrammes enregistrés au cours du chauffage de l'ensemble des crèmes étudiées.

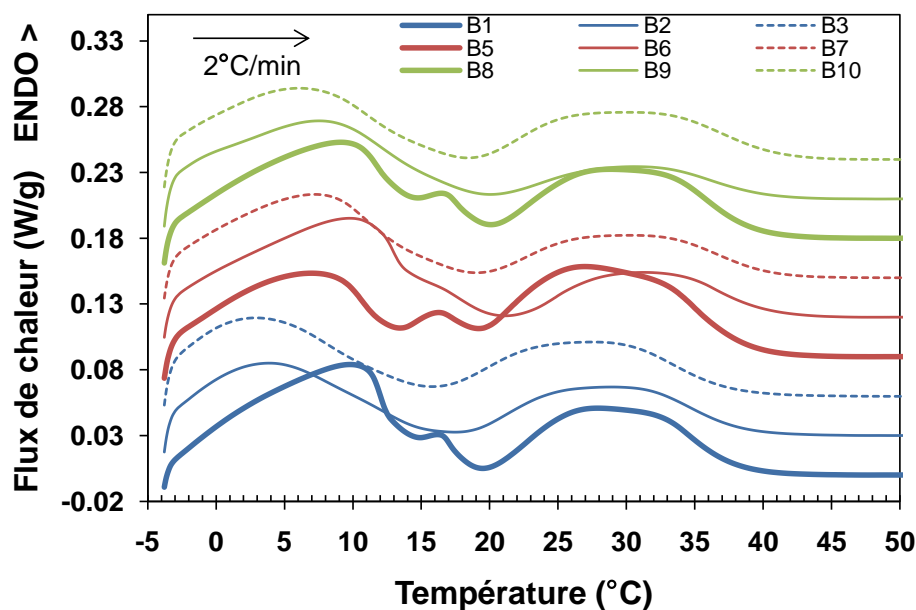


Figure CII-7 : thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des crèmes de -5°C à 60°C à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ suivant un refroidissement depuis 60°C à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Les crèmes témoins montrent des profils relativement proches, présentant trois massifs endothermiques principaux. Le premier endotherme relativement intense s'étend de -5°C à 13°C environ et est assimilé à la fusion des triacylglycérols à bas point de fusion. Le deuxième endotherme, moins intense, s'étend de 13°C à 19°C environ et est assimilé à la fusion des triacylglycérols à moyen point de fusion. Enfin, le troisième endotherme dispensant une enthalpie relativement élevée, s'étend de 19°C à 40°C environ. Les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés présentent des profils différents des crèmes témoins, mais relativement proches entre elles, excepté la crème B6, avec deux événements endothermiques majeurs. Le premier endotherme, relativement intense, s'étend de -5°C à une température allant de 15°C à 18°C suivant les crèmes. Le deuxième endotherme, dispensant une enthalpie relativement élevée, s'étend de $15-18^{\circ}\text{C}$ à 40°C environ. La crème B6 présente un profil intermédiaire entre celui des crèmes témoins et celui des autres crèmes issues de régimes riches en acides gras insaturés. A partir de 40°C , le signal enregistré dans toutes les crèmes est une ligne de base correspondant aux triacylglycérols fondus. Ainsi, d'une manière générale, il semble que le pic de fusion des triacylglycérols à moyen point de fusion soit diminué voire complètement absent dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés. Afin de mieux caractériser les propriétés thermiques des triacylglycérols dans les crèmes au cours du chauffage, nous avons extraits plusieurs paramètres des thermogrammes enregistrés (**Tableau CII-6**) : les températures au signal maximum des pics à bas et moyen

Chapitre II

point de fusion (T_{BPF} , T_{MPF} , respectivement), la variation d'enthalpie de fusion (ΔH_{fus}) et la température de fin de fusion déterminée à l'intersection de la ligne de base et de la droite de plus grande pente de la fin du dernier endotherme (T_{offset}).

Tableau CII-6 : paramètres extraits des thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des crèmes de -5°C à 60°C à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (moyenne \pm écart-type, $n=9$).

	T_{BPF} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{MPF} ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_{fus} (J/g)	T_{offset} ($^{\circ}\text{C}$)
B1 (T)	$10,0 \pm 0,3$	$16,1 \pm 0,3$	$49,9 \pm 1,0$	$38,6 \pm 0,7$
B2	$4,3 \pm 0,6$	-	$30,9 \pm 4,6$	$38,9 \pm 0,6$
B3	$3,2 \pm 0,7$	-	$28,2 \pm 1,8$	$37,5 \pm 0,5$
B5 (T)	$7,1 \pm 0,5$	$16,3 \pm 0,2$	$45,6 \pm 2,2$	$38,9 \pm 0,6$
B6	$10,1 \pm 0,8$	-	$33,3 \pm 1,0$	$40,6 \pm 0,4$
B7	$7,3 \pm 0,2$	-	$28,3 \pm 1,3$	$40,6 \pm 0,5$
B8 (T)	$9,2 \pm 0,1$	$16,5 \pm 0,1$	$43,3 \pm 1,3$	$39,4 \pm 0,1$
B9	$7,5 \pm 0,7$	-	$22,7 \pm 2,2$	$40,3 \pm 0,5$
B10	$6,2 \pm 0,1$	-	$27,1 \pm 0,9$	$41,1 \pm 0,7$

La température au maximum du pic à bas point de fusion montre des valeurs supérieures dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés contenant de l'ensilage d'herbe (B2, B3, B9 et B10) par rapport aux crèmes témoins issues des régimes de base associés. En revanche, dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés produites à partir d'ensilage de maïs seul (B6 et B7), la température au maximum du pic à bas point de fusion est supérieure ou égale à celle de la crème témoin B5 correspondant. Cette température au maximum du pic à bas point de fusion reflète la température à laquelle fondent le plus de triacylglycérols à bas point de fusion. La température au maximum du pic à moyen point de fusion n'existe pas dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés, dans le sens où nous n'avons pas identifié de pic dans cette gamme de températures. Par contre, la T_{MPF} montre des valeurs très proches entre les crèmes témoins : $16,3^{\circ}\text{C}$ en moyenne. La variation d'enthalpie de fusion globale déterminée entre -5°C et 43°C , température à laquelle le signal calorimétrique a atteint la ligne de base dans toutes les crèmes, présente des valeurs largement inférieures dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés par rapport aux crèmes témoins correspondantes. Parmi les crèmes témoins, les ΔH_{fus} varient entre 43 et 50 J/g, alors que les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés présentent des valeurs comprises entre 22 et 34 J/g. La crème B6, qui montrait un profil thermique intermédiaire entre les autres crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés et les crèmes témoins, présente également la ΔH_{fus} la plus élevée des crèmes enrichies en acides gras insaturés. La ΔH_{fus} des crèmes enrichies en acides gras

Chapitre II

insaturés représente donc 45% à 77% de celle des crèmes témoins. Enfin, la T_{offset} semble légèrement plus élevée dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés, excepté pour le couple B1-B2. Cela pourrait provenir de la teneur en acide gras C18:0 supérieure dans ces crèmes, sachant que cet acide gras a le point de fusion le plus élevé de l'ensemble des acides gras à teneur > 0,5% détectés. Malgré tout, la température de fin de fusion est relativement homogène entre les crèmes, allant de 37,5°C à 41,1°C. Ainsi, les propriétés thermiques de ces crèmes montrent que deux groupes se distinguent : les crèmes témoins et les crèmes enrichies en acides gras insaturés, avec la crème B6 en intermédiaire. La séparation se fait essentiellement sur la base de l'enthalpie de fusion partielle, plus faible dans les crèmes enrichies en acides gras insaturés ainsi que sur l'intensité du pic à moyen point de fusion. Afin d'identifier les structures cristallines formées par les triacylglycérols et associer certains types de triacylglycérols avec les différents pics de fusion déterminés en MCD, nous avons étudié le comportement cristallographique de ces crèmes au cours d'un chauffage.

Les structures cristallines formées dans les crèmes ont été identifiées par DRXT au cours d'un chauffage à 0,5°C/min de 60°C à -7°C suite à un refroidissement à 0,5°C/min depuis 60°C. Les **Figure CII-8** et **Figure CII-9** présentent les diagrammes de DRXT des crèmes B8 et B10 enregistrés au cours du chauffage. Les diagrammes de DRXT des autres crèmes sont consignés en **Annexe IV**. Les diagrammes enregistrés aux plus hautes températures ne sont pas présentés car seul le signal des triacylglycérols fondus est présent.

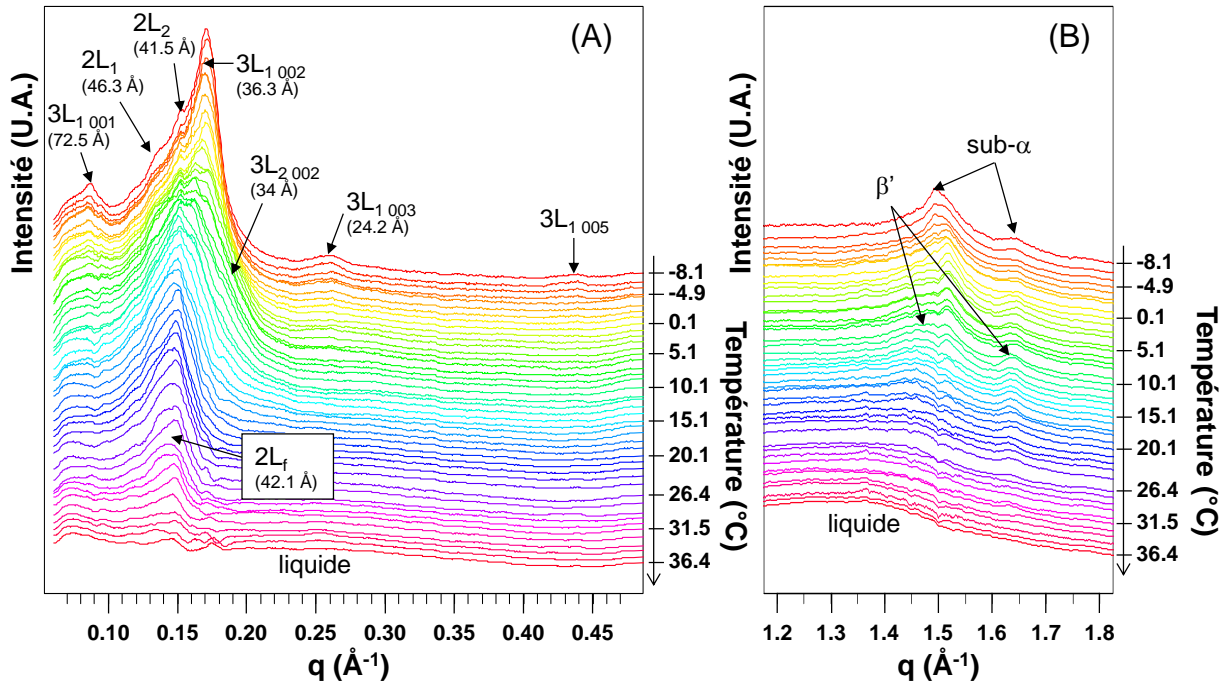


Figure CII-8 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du chauffage de la crème B8 de -7°C à 60°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

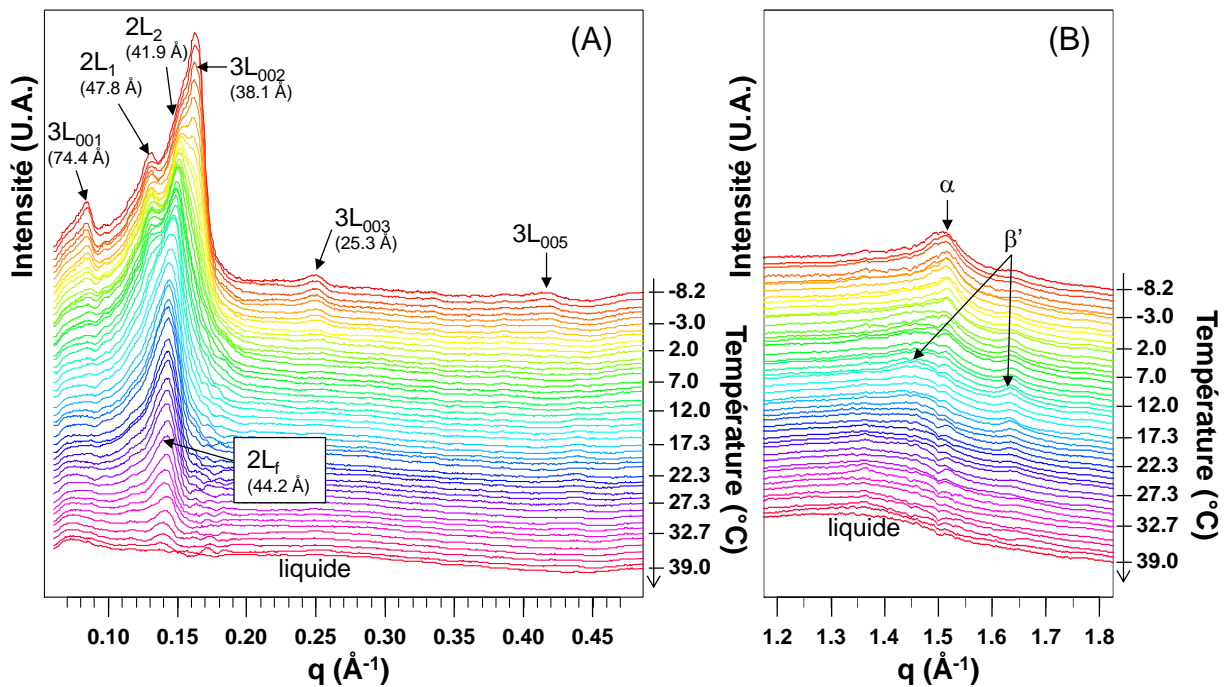


Figure CII-9 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du chauffage de la crème B10 de -7°C à 60°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

Chapitre II

Aux petits angles de diffraction, les diagrammes enregistrés au cours du chauffage à 0,5°C/min de -7°C à 60°C montrent la disparition progressive des pics attribués à la 3L dans les crèmes B8 et B10 rapidement au début du chauffage, vers 5°C. Dans la crème B10, seuls les pics attribués aux structures 2L₁ et 2L₂ subsistent à partir de 5°C, alors que dans la crème B8, un pic situé à 0,185 Å⁻¹ apparaît lors de la fusion de la 3L, que Lopez *et al.* (2002a) ont attribué à un ordre 002 d'une 3L₂ formée lors de la réorganisation de la α 3L (72,5 Å). Dans cette crème B8, les pics de 2L₁ et 3L₂ 002 disparaissent ensuite de manière simultanée vers 18°C, température à partir de laquelle il ne subsiste plus qu'une 2L, d'épaisseur 42,1 Å. Le pic de 2L_f (42,1 Å) situé vers 0,149 Å⁻¹ disparaît enfin vers 35°C, où nous n'avons plus enregistré que le signal large de diffusion des triacylglycérols liquides. Le comportement cristallographique de cette crème témoin est donc proche de celui observé par Lopez *et al.* (2002a) au cours d'un chauffage à 2°C/min suivant un refroidissement à 1°C/min depuis 60°C jusqu'à -8°C. Les paramètres cristallographiques caractérisant l'épaisseur des structures longitudinales et les formes polymorphiques sont très proches, mais les températures de réorganisations et fusion des structures cristallines sont différentes entre notre étude et celle de Lopez *et al.* (2002a). En particulier, la réorganisation de la 3L₁ en 3L₂ a lieu selon nos observations de DRX plus tôt que selon Lopez *et al.* (2002a) : vers 5°C contre 12°C, respectivement. Cela pourrait être dû aux différences de vitesse de refroidissement et de chauffage adoptées entre les deux études, ou bien à une sensibilité et une résolution plus faibles en DRX dans le cas de notre étude. Dans la crème B10, le pic de 2L₁ disparaît vers 12°C pour laisser place à un pic unique de 2L_f (44,2 Å) situé vers 0,142 Å⁻¹ qui disparaît ensuite vers 37°C, où nous n'avons plus enregistré que le signal large de diffusion des triacylglycérols liquides.

Aux grands angles de diffraction, les crèmes B8 et B10 présentent des évolutions peu différentes : le pic unique de α pour la crème B10 et le doublet de sub-α pour B8 diminuent en intensité au profit d'une signature typique de forme polymorphique β', avec un pic relativement intense vers 1,64 Å⁻¹ et un signal large plus diffus vers 1,5 Å⁻¹. Cette transition polymorphique se déroule dans la plage de température 5-15°C pour B8 et 5-12°C pour B10 environ. Les pics de β' sont présents jusqu'à 35-37°C, température de fusion de la matière grasse dans les crèmes B8 et B10, respectivement.

En bref, les crèmes B8 et B10 présentent des comportements structuraux au chauffage bien différents, en particulier dans la zone de température 5-15°C, comprenant le

pic des triacylglycérols à moyen point de fusion. La crème issue du régime riche en acides gras insaturés B10 ne présente pas de réorganisation de la structure α 3L formée au cours du chauffage comme peut le montrer la crème témoin B8 qui présente une structure β' 3L₂ (68 Å). De plus, la fusion de la structure 2L₁ a lieu à plus basse température dans la crème issue du régime riche en acides gras insaturés par rapport à la crème témoin, d'environ 3°C. Enfin, la dernière structure à fondre est dans les deux crèmes une β' 2L, mais d'épaisseur plus grande dans la crème B10 : 44,2 Å contre 42,1 Å. Cette différence d'épaisseur pourrait être due à une différence de longueur de chaîne d'acides gras des triacylglycérols impliqués dans cette structure, comme déjà discuté à plusieurs reprises dans ce document. La longueur moyenne des acides gras des triacylglycérols qui composent cette dernière structure à fondre serait de 17,1 carbones contre 16,2 carbones dans les crèmes B10 et B8, respectivement, soit une différence de 0,9 carbones d'après l'équation de Small (1986) définissant l'augmentation de distance observée en DRX d en fonction de l'élongation de chaîne des acides gras n de triacylglycérols saturés monoacides cristallisant en β' : $d = 2,32*n + 4,43$. La différence d'épaisseur de la 2L_f est donc expliquée par une différence de longueur des acides gras des triacylglycérols qui composent cette structure. Cette structure 2L_f étant la dernière à fondre, les triacylglycérols qui la composent sont donc ceux qui ont le plus haut point de fusion, c'est-à-dire composés selon Lavigne (1995), de C16:0 et C18:0 essentiellement. Cela est bien en accord avec le ratio de concentration C16:0 / C18:0 largement plus faible dans les crèmes enrichies en acides gras insaturés par rapport aux témoins : 1,1-1,9 contre 3,0-4,0, respectivement.

2. Variétés cristallines et comportement de fusion des triacylglycérols après stockage $t > 48h$ à 4°C

2.1. Identification des structures cristallines à 4°C

Les structures cristallines formées pour les 12 crèmes analysées en DRX à l'issue d'un stockage de $t > 48h$ à 4°C ont été identifiées afin de comparer les structures cristallines formées et de déterminer les acides gras impliqués dans les différences de structures observées. La **Figure CII-10** présente la somme de 10 diagrammes de DRX enregistrés pendant 2 minutes chacun par crème à l'issue du stockage.

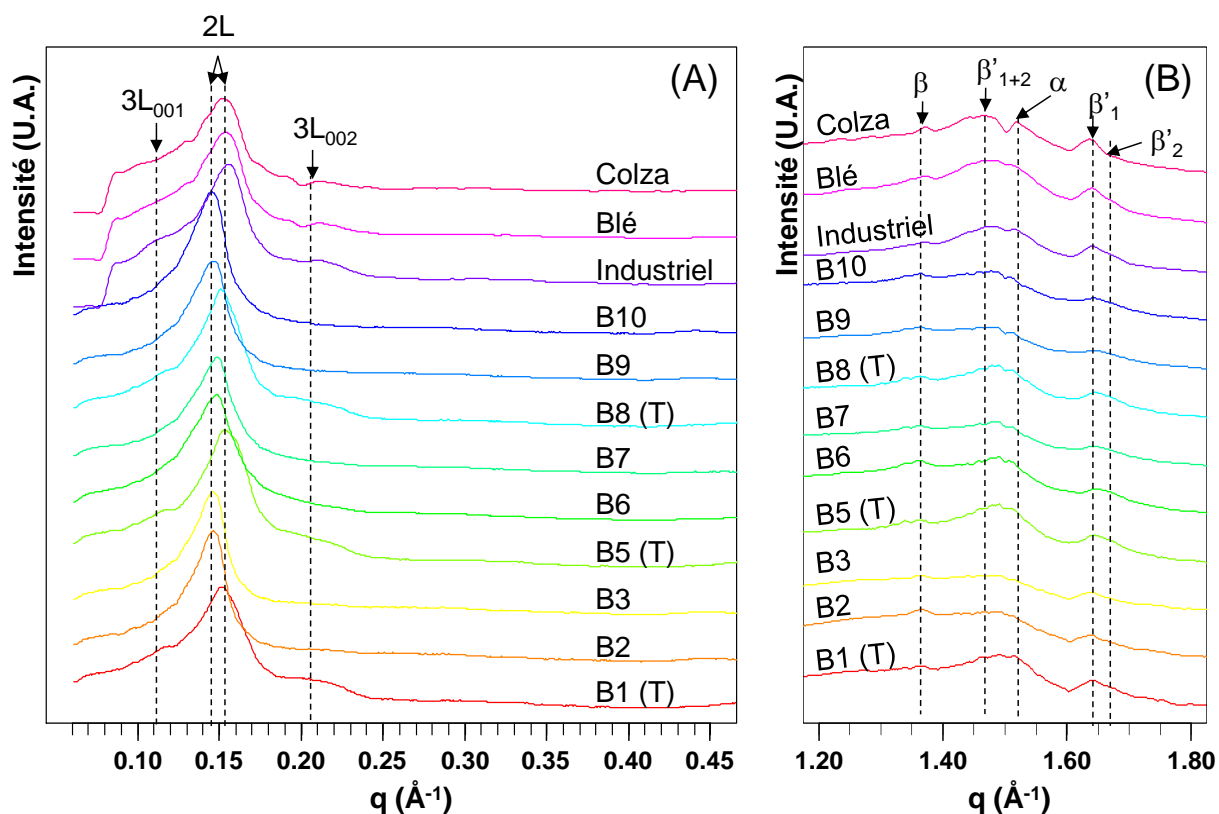


Figure CII-10 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) à 4°C après un stockage de $t > 48h$ à 4°C pour l'ensemble des crèmes témoins (T) et issues des régimes riches en acide gras insaturés. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

Dans les crèmes témoins (T) étudiées, les diagrammes de DRX aux petits angles de diffraction (**Figure CII-10-A**) nous montrent la présence d'une structure principale 2L, caractérisée par un premier ordre de diffraction vers $0,152 \text{ \AA}^{-1}$, et d'une structure en proportion plus faible 3L, caractérisée par ses deux premiers ordres de diffraction vers $0,111$ et $0,205 \text{ \AA}^{-1}$. Ces structures varient légèrement en épaisseur selon le régime alimentaire offert aux vaches. En revanche, dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés, un seul pic de diffraction est observé aux petits angles vers $0,145 \text{ \AA}^{-1}$, correspondant au premier ordre de diffraction d'une structure 2L d'épaisseur plus importante que celle observée dans les crèmes témoins. La crème B6 montre un très faible épaulement à ce pic de $2L_{001}$ vers les q plus grands, pouvant être un deuxième ordre de structure 3L très peu intense.

Aux grands angles de diffraction (**Figure CII-10-B**), toutes les crèmes présentent de nombreux pics, tous relativement peu intenses. Un pic vers $1,37 \text{ \AA}^{-1}$, dénote la présence de structure β . Un ou deux pics situés vers $1,64-1,67 \text{ \AA}^{-1}$, associés au signal large vers $1,47 \text{ \AA}^{-1}$, prouvent la présence de formes β'_1 et β'_2 , respectivement. Enfin, l'épaulement de ce signal

large vers $1,51 \text{ \AA}^{-1}$ pourrait dénoter la présence de structure α . Compte tenu de la faible intensité de ces pics aux grands angles, il est difficile d'apprécier les proportions relatives des différentes formes polymorphiques en présence et les éventuelles différences de profils entre les crèmes. Dans tous les cas, toutes ces crèmes semblent montrer la présence de 4 formes polymorphiques différentes.

Plusieurs paramètres ont été extraits des diagrammes de DRX enregistrés aux petits angles, afin de mettre en lien la composition en acides gras des différentes crèmes avec les paramètres de structure des triacylglycérols de celles-ci (**Tableau CII-7**). La position en distance de Bragg d et l'aire de chaque pic de diffraction ont été extraites à raison de 3 valeurs par pic, correspondant aux premier, quatrième et septième enregistrements de DRX sur les 10 effectués, soit 3 enregistrements répartis au long des 20 minutes d'enregistrement. Les sommes des aires des pics de diffraction attribués à une même structure longitudinale ont également été calculées.

Tableau CII-7 : paramètres de pics extraits des diagrammes de DRX enregistrés à 4°C sur l'ensemble des crèmes après un stockage de $t > 48\text{h}$ à 4°C (valeurs moyennes, $n = 3$). ^a : écart-type $< 0,7$; ^b, ^c : écart-type $< 2,4$.

	B1	B2	B3	B5	B6	B7	B8	B9	B10	Ind.	Col.	Blé.
d 3L₀₀₁ ^a	53,5	-	-	53,4	-	-	52,8	-	-	53,9	-	53,1
d 2L₀₀₁ ^a	41,3	42,9	42,9	40,6	42,5	42,3	41,4	43	43,2	40,2	41,0	40,7
d 3L₀₀₂ ^a	30,7	-	-	31,5	35,8	-	31,6	-	-	30,5	32,1	30,9
%3L₀₀₁ ^b	17,4	0,0	0,0	13,2	0,0	0,0	17,0	0,0	0,0	11,9	0,0	12,8
%2L₀₀₁ ^b	72,4	100,0	100,0	75,6	93,9	100,0	73,1	100,0	100,0	78,5	95,3	80,9
%3L₀₀₂ ^b	10,2	0,0	0,0	11,3	6,1	0,0	10,0	0,0	0,0	9,6	4,7	6,3
%3L ^c	27,6	0,0	0,0	24,4	6,1	0,0	26,9	0,0	0,0	21,5	4,7	19,1
%2L ^c	72,4	100,0	100,0	75,6	93,9	100,0	73,1	100,0	100,0	78,5	95,3	80,9

Les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés présentent des épaisseurs de structures longitudinales 2L jusqu'à $1,9 \text{ \AA}$ supérieures aux crèmes témoins correspondant (**Tableau CII-7**). La présence et l'abondance de structure 3L semblent liées fortement à la composition en acides gras des crèmes : plus les crèmes sont enrichies en acides gras insaturés, moins il y a de 3L. L'épaisseur de la structure 3L, en revanche, ne semble pas dépendre de la composition en acides gras. Aux grands angles de diffraction, nous avons identifié 4 formes polymorphiques ; l'épaisseur des structures longitudinales 2L n'est donc pas uniquement liée à la longueur des chaînes d'acides gras qui composent les triacylglycérols, mais aussi à l'angle d'inclinaison des strates dépendant des formes polymorphiques en présence. Il est donc important de caractériser les formes polymorphiques associées à cette structure 2L pour identifier d'où proviennent ces différences d'épaisseur.

Nous avons ensuite tenté d'évaluer quels sont les paramètres qui contribuent le plus à expliquer les différences observées en DRX entre les crèmes, et si possible expliquer ces différences à l'aide de la composition en acides gras. Pour cela, nous avons réalisé une ACP sur les paramètres de DRX extraits, puis ajouté en variables non actives les acides gras les plus abondants (**Figure CII-11**). De plus, nous avons établi les corrélations qui existent entre ces mêmes acides gras et les paramètres contribuant le plus à la variabilité sur les structures cristallines formées par les triacylglycérols.

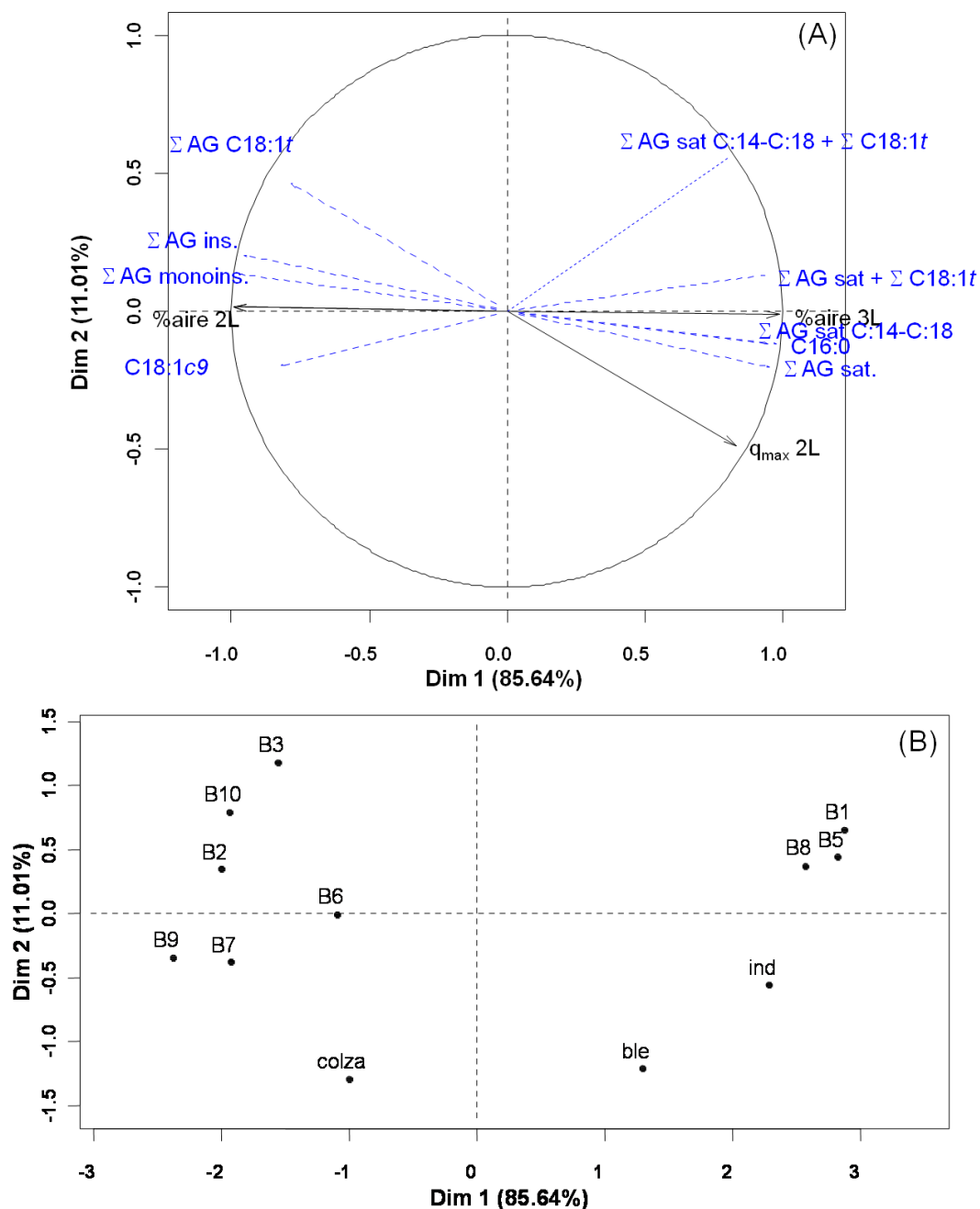


Figure CII-11 : résultats de l'analyse en composantes principales sur les paramètres extraits des diagrammes de DRX enregistrés sur les crèmes à 4°C après un stockage de $t > 48h$ à 4°C. (A) cercle des corrélations prenant les paramètres de pics de DRX en variables actives (en

Chapitre II

noir) et des groupes d'acides gras en variables non actives (en bleu). (B) carte des individus projetés sur les composantes 1 et 2 (ind = industriel).

La première composante (Dim 1) explique une très large part de la variabilité des structures cristallines longitudinales observées dans les crèmes : 85,6%. Cette composante sépare clairement les crèmes témoins B1, B5, B8 et Industriel des crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés B2, B3, B6, B7, B10, Colza. La crème Blé, bien qu'issue d'un régime riche en acides gras insaturés, se positionne en intermédiaire, voire avec le pôle des crèmes témoins. Cette première composante est constituée majoritairement de la proportion relative de structures 2L et 3L. Dans les crèmes témoins, le q_{\max} de la 2L est plus grand (cette structure est moins épaisse), ainsi que le rapport des aires 3L / 2L comparé aux crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés. Cette séparation selon ce premier axe semble liée aux acides gras saturés à longue chaîne (C14:0 à C18:0), éventuellement associés aux acides gras *trans* d'une part et aux acides gras insaturés d'autre part. Plus les crèmes sont riches en acides gras saturés C14:0 et C16:0, moins elles présentent des structures cristallines longitudinales épaisses, au contraire des crèmes plus riches en acides gras insaturés, comme obtenu sur les paramètres de DRX extraits de diagrammes de DRX enregistrés à -7°C après un refroidissement depuis 60°C à $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Afin d'illustrer les relations qui peuvent exister entre les concentrations en acides gras et les paramètres cristallographiques extraits des données de DRX, nous avons établi et consigné en **Tableau CII-8** les coefficients de corrélation linéaires entre ces deux types de paramètres.

Tableau CII-8 : coefficients de corrélation entre les paramètres cristallographiques enregistrés sur les crèmes en DRX au cours de l'étape statique à 4°C suivant un stockage pendant $t > 48h$ à 4°C et les concentrations en acides gras majeurs des crèmes.

	qmax 2L	%aire 2L	%aire 3L
C4:0	0,763	-0,350	0,350
C6:0	0,918	-0,657	0,657
C8:0	0,908	-0,884	0,884
C10:0	0,883	-0,919	0,919
C12:0	0,892	-0,922	0,922
C14:0	0,859	-0,913	0,913
C14:1, c9	0,959	-0,690	0,690
C15:1, c10	0,595	-0,441	0,441
C16:0	0,899	-0,959	0,959
C16:1, c9	0,889	-0,541	0,541
C17:1, c10	0,617	-0,459	0,459
C18:0	-0,648	0,569	-0,569
C18:1, t6,7,8,9	-0,725	0,852	-0,852
C18:1, t10	-0,835	0,923	-0,923
C18:1, t11	-0,806	0,717	-0,717
C18:1, c9	-0,700	0,750	-0,750
C18:2, t9,12	-0,784	0,694	-0,694
C18:2, c9,12	0,723	-0,433	0,433
C18:3, c9,12,15	-0,198	-0,161	0,161
C18:2, c9,t11	-0,820	0,775	-0,775
Σ AG sat.	0,912	-0,938	0,938
Σ sat. C4-C8	0,878	-0,549	0,549
Σ sat. C10-C15	0,876	-0,925	0,925
Σ sat. C16-C20	0,786	-0,920	0,920
Σ sat. > C22	0,469	-0,124	0,124
Σ AG insat.	-0,912	0,938	-0,938
Σ monoinsat.	-0,907	0,944	-0,944
Σ polyinsat.	-0,773	0,747	-0,747

Là aussi, l'ensemble des acides gras ou sommes d'acides gras est bien corrélé avec les paramètres extraits des diagrammes de DRX. Deux groupes d'acides gras se distinguent : ceux qui sont corrélés positivement avec les paramètres et ceux qui sont corrélés négativement. Les acides saturés gras courts, à moyenne longueur de chaîne et le C16:0 sont tous fortement corrélés positivement au paramètre d'épaisseur de la structure 2L q_{max} 2L. Autrement dit, plus il y a d'acides gras saturés de C4:0 à C16:0, plus cette structure 2L a une épaisseur faible. Au contraire, les acides gras C18:0 et l'ensemble des acides gras insaturés montrent des corrélations fortement négatives avec le q_{max} 2L à l'exception du C18:3, c9,12,15 qui n'est pas corrélé avec le q_{max} 2L. Cette tendance générale semble cohérente et

Chapitre II

s'explique par le fait que les acides gras C18 insaturés sont parmi les plus longs des acides gras laitiers, et seraient donc logiquement impliqués dans les structures cristallines les plus épaisses.

Par ailleurs, l'abondance relative des 2 structures cristallines longitudinales observées dans ces conditions de passé thermique et liées plus ou moins directement aux pourcentages d'aires des différents pics de DRX (Guinier, 1964 ; Mazzanti *et al.*, 2008 ; Mazzanti et Mudge, 2009), semble elle aussi corrélée aux concentrations en acides gras. Les mêmes groupes d'acides gras se dégagent par rapport au paramètre d'épaisseur de la 2L. Lorsque les crèmes sont riches en acides gras saturés C4:0-C16:0, la matière grasse dans les globules gras natifs cristallise préférentiellement sous forme 3L puisque les coefficients de corrélation linéaires entre ces acides gras et le pourcentage d'aire 3L sont fortement positifs. Également, lorsque les crèmes sont riches en acides gras C18:0 et insaturés, la matière grasse dans les globules gras natifs cristallise préférentiellement sous forme 2L. Cela s'explique de la même manière que pour les résultats obtenus à -7°C suite au refroidissement de 60°C à -7°C à $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$: il s'agirait d'une balance entre la quantité de matière grasse laitière cristallisée selon sa forme cristalline, la 2L cristallisant en premier lieu, la quantité de 3L varierait entre les régimes.

Afin d'illustrer l'effet de la composition sur les paramètres cristallographiques observés à 4°C après un stockage pendant $t > 48$ h à cette température, des droites de régression linéaires ont été tracées en **Figure CII-12**.

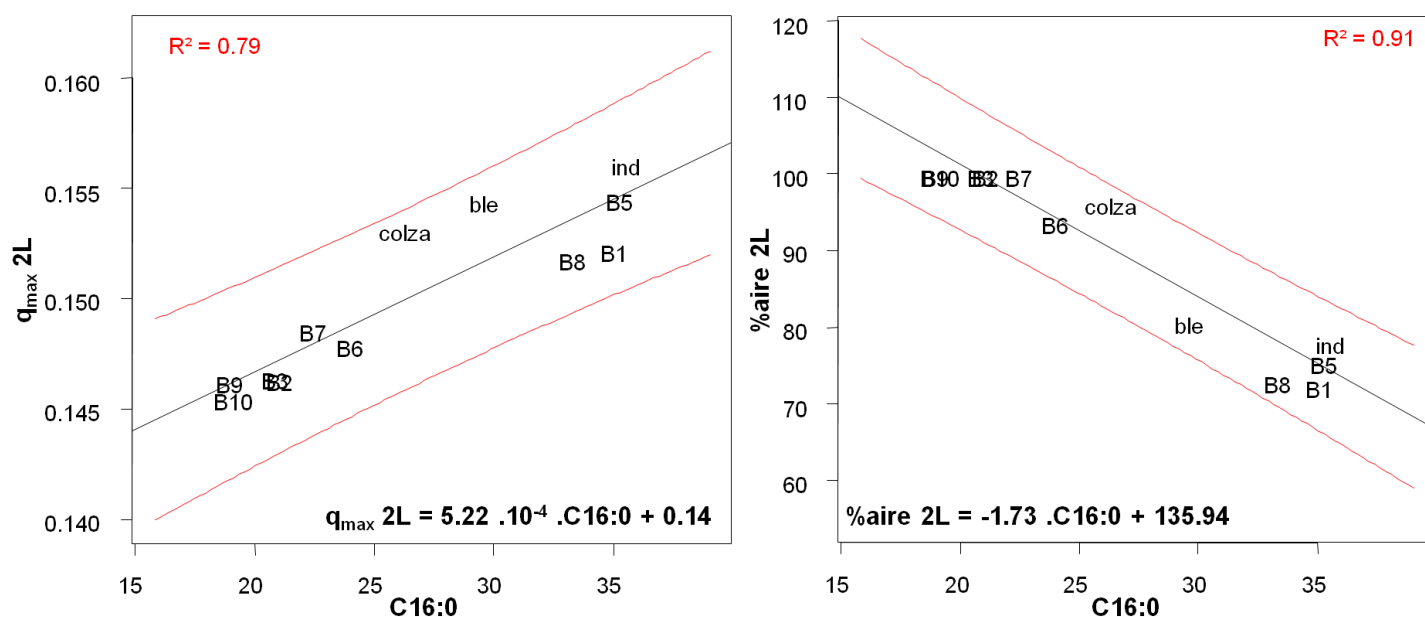


Figure CII-12 : régressions linéaires entre le paramètre d'épaisseur (q_{\max}) et d'abondance (%aire) du pic de 2L mesuré par DRX à 4°C après un stockage pendant $t > 48h$ à 4°C et la concentration en C16:0 des crèmes étudiées. En noir sont représentées les régressions linéaires et en rouge les intervalles de confiance à 0,95%.

La **Figure CII-12** de gauche montre le q_{\max} du pic de 2L mesuré par DRX en fonction du taux en C16:0 des crèmes étudiées. Les 12 crèmes étudiées montrent un étalement le long d'une droite avec un coefficient de régression linéaire $R^2 = 0,79$. La **Figure CII-12** de droite montre le pourcentage d'aire du pic de 2L mesuré par DRX toujours en fonction du taux en C16:0 des crèmes étudiées. Les 12 crèmes étudiées montrent là aussi un étalement le long d'une droite avec un coefficient de régression linéaire $R^2 = 0,91$. Dans les deux cas, les crèmes B6, Colza et Blé sont intermédiaires autant en concentration en C16:0 qu'en $q_{\max} 2L$ ou pourcentage d'aire de la 2L.

En résumé, nous avons identifié dans ces crèmes la présence de quatre formes polymorphiques et seulement une ou deux structures longitudinales. Un type de cristaux étant formé normalement d'une seule forme polymorphique associé à une structure longitudinale, il est donc probable que nous n'ayons pas identifié toutes les structures longitudinales réellement présentes. Pour cela et pour associer les différentes formes polymorphiques à leur structure longitudinale respective, notamment dans le cas des crèmes témoins qui présentent 2L et 3L, nous avons étudié les propriétés cristallographiques des crèmes au cours d'un chauffage. Lors de ce chauffage, nous devrions observer la fusion différentielle des différentes formes polymorphiques associées à leur structure longitudinale.

2.2. Propriétés thermiques au cours du chauffage

Les propriétés thermiques des différentes crèmes ont été étudiées par MCD au cours d'un chauffage à 2°C/min de 4°C à 60°C après stockage de $t > 48h$ à 4°C. La **Figure CII-13** présente les thermogrammes moyens enregistrés au cours du chauffage de l'ensemble des crèmes étudiées.

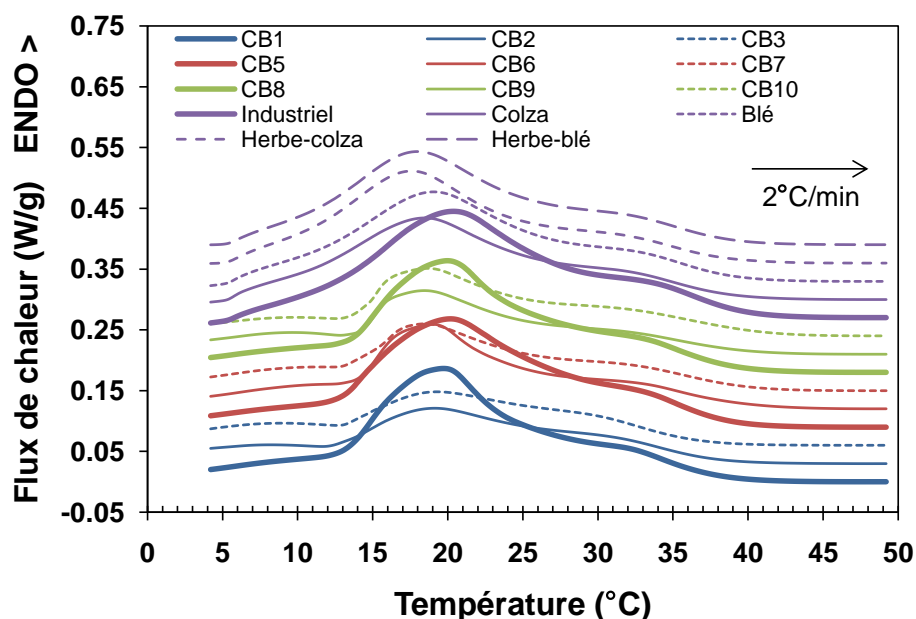


Figure CII-13 : thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des crèmes de 4°C à 60°C à 2°C/min après stockage de $t > 48h$ à 4°C.

Les profils thermiques des crèmes enregistrés au cours du chauffage de 4°C à 60°C à 2°C/min après stockage de $t > 48h$ à 4°C sont relativement proches entre toutes les crèmes. La fusion des triacylglycérols se passe en deux temps : de 4°C à 25°C environ, un signal endothermique majeur correspondant aux triacylglycérols à moyen point de fusion a lieu, dont la température au maximum se situe entre 17 et 20°C. A partir de 25°C, le signal est relativement constant en intensité, correspondant à la fusion des triacylglycérols à haut point de fusion, jusqu'à 33°C, où cet endotherme se termine pour rejoindre la ligne de base des triacylglycérols fondus vers 40°C. Malgré tout, plusieurs différences apparaissent en fonction de l'origine des crèmes. Le signal endothermique du pic à moyen point de fusion est plus intense dans les crèmes témoins, alors que sa température au maximum est augmentée. Afin de mieux comparer ces thermogrammes, plusieurs paramètres ont été extraits en **Tableau CII-9** : la température au maximum du pic à moyen point de fusion T_{MPF} , l'enthalpie globale de fusion déterminée entre 4 et 43°C ΔH_{fus} et la température de fin de fusion T_{offset} .

déterminée à l'intersection de la ligne de base et de la droite de plus grande pente de la fin de l'endotherme à haut point de fusion. La variation d'enthalpie totale des matières grasses anhydres est également donnée dans le **Tableau CII-9** telle que déterminée dans le **Chapitre I**, afin d'estimer le taux de matière grasse solide moyen à 4°C (SFC_{4°C}) dans les globules gras natifs des crèmes. Pour cela, la formule adaptée de Lopez *et al.* (2006) a été utilisée.

Tableau CII-9 : paramètres extraits des thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des crèmes de 4°C à 60°C à 2°C/min après stockage de t > 48h à 4°C (moyenne ± écart-type, n=9).

	T _{MPF} (°C)	ΔH _{fus} (J/g)	T _{offset} (°C)	ΔH _{tot} (J/g)	SFC _{4°C} est. (%)
B1 (T)	19,8 ± 0,3	72,3 ± 3,9	38,1 ± 0,8	104,5 ± 4,6	70 ± 5
B2	19,2 ± 0,4	39,4 ± 5,3	37,9 ± 0,5	90,3 ± 4,4	44 ± 6
B3	19,2 ± 0,8	39,8 ± 4,8	36,9 ± 0,5	82,1 ± 4,4	48 ± 6
B5 (T)	20,3 ± 0,4	78,0 ± 3,2	38,9 ± 0,1	105,5 ± 3,8	74 ± 4
B6	19,1 ± 0,2	55,5 ± 4,4	39,1 ± 3,9	97,1 ± 2,6	57 ± 5
B7	18,6 ± 0,4	50,8 ± 3,7	40,2 ± 0,5	92,6 ± 4,8	55 ± 5
B8 (T)	20,2 ± 0,4	72,0 ± 6,0	39,3 ± 0,5	101,6 ± 4,8	71 ± 7
B9	18,5 ± 0,3	42,4 ± 2,3	40,1 ± 0,8	94,3 ± 2,5	45 ± 3
B10	18,7 ± 0,3	48,4 ± 2,8	41,4 ± 1,2	93,4 ± 4,0	52 ± 4
Industriel (T)	20,3 ± 0,1	87,4 ± 2,3	40,2 ± 0,1	107,0 ± 3,1	82 ± 3
Blé	19,0 ± 0,1	74,3 ± 1,3	39,5 ± 0,2	103,3 ± 2,1	72 ± 2
Colza	18,5 ± 0,2	67,4 ± 1,4	39,3 ± 0,2	96,5 ± 2,0	70 ± 2
Herbe-blé	18,0 ± 0,1	71,5 ± 1,9	39,1 ± 0,1	107,0 ± 1,2	67 ± 2
Herbe-colza	17,6 ± 0,1	68,7 ± 2,4	38,9 ± 0,1	105,1 ± 4,2	65 ± 4

La température au maximum du pic à moyen point de fusion est inférieure dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés, de 0,6°C à 2,7°C. Entre les crèmes témoins, la T_{MPF} est relativement homogène. En revanche, les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés présentent une large distribution de valeurs. La composition en acides gras des crèmes témoins est relativement proche ; en revanche, celle des crèmes enrichies en acides gras insaturés est beaucoup plus disparate, ce qui pourrait expliquer les observations sur la T_{MPF}. La variation d'enthalpie de fusion partielle entre 4°C et 43°C montre des valeurs clairement supérieures dans les crèmes témoins : 72 à 88 J/g, contre 39 à 74 J/g dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés. Cela a pour conséquence une plus faible estimation du taux de matière grasse solide dans les crèmes enrichies en acides gras insaturés à 4°C.

Nous pouvons ensuite nous demander quels paramètres contribuent le plus à expliquer les différences observées en MCD entre les crèmes, et si possible expliquer ces différences à l'aide de la composition en acides gras. Pour cela, nous avons réalisé une ACP

sur les paramètres de MCD extraits, puis ajouté en variables non actives les acides gras les plus abondants, de la même manière que nous l'avons fait auparavant pour les paramètres de DRX (Figure CII-14). Ensuite, nous avons établi les corrélations qui existent entre ces mêmes acides gras et les paramètres contribuant le plus à la variabilité sur les structures cristallines formées par les triacylglycérols.

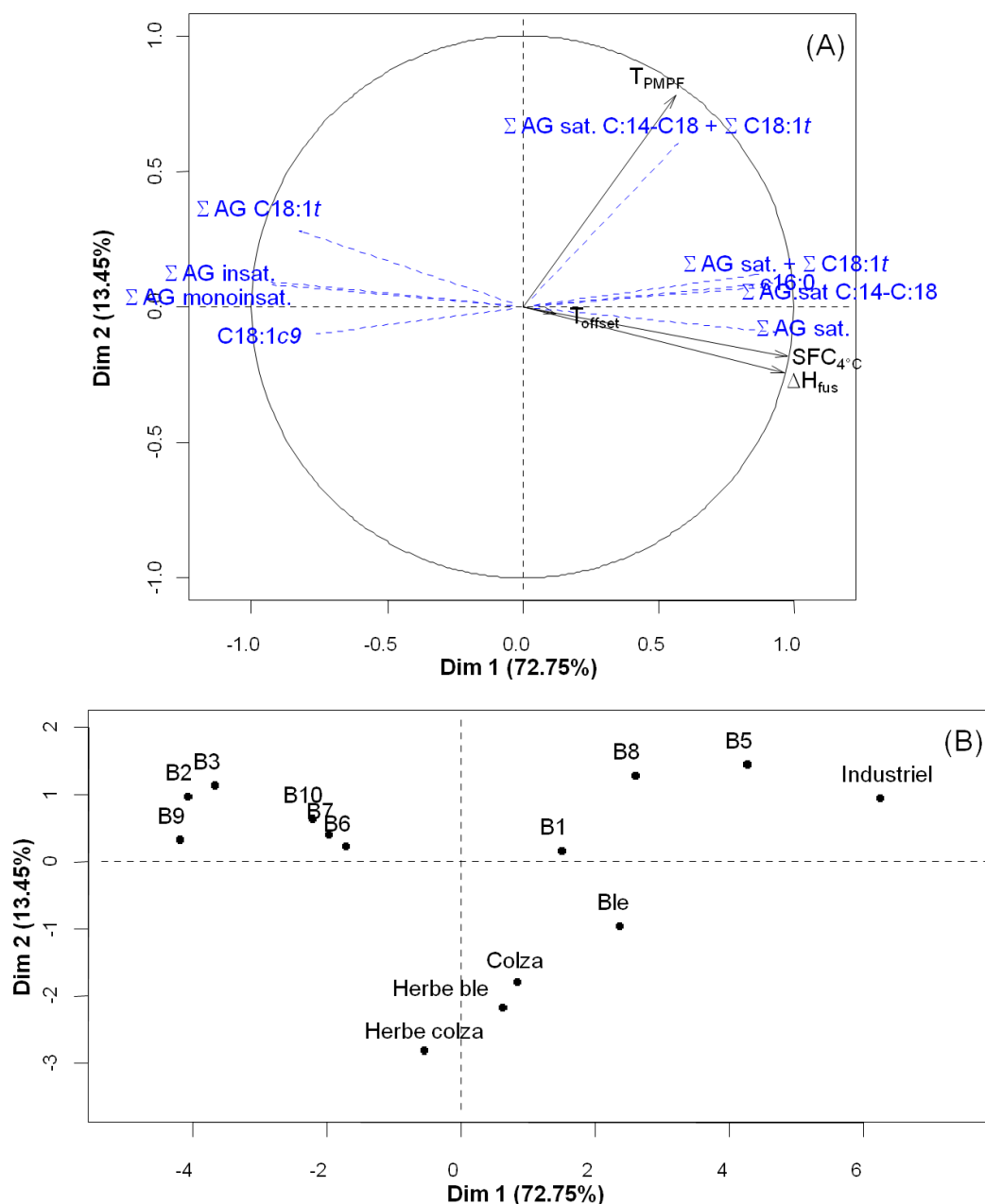


Figure CII-14 : résultats de l'analyse en composantes principales sur les paramètres extraits des thermogrammes de MCD enregistrés au cours du chauffage des crèmes de 4°C à 60°C à 2°C/min après un stockage de $t > 48h$ à 4°C. (A) cercle des corrélations prenant les paramètres de pics de DRX en variables actives (en noir) et des groupes d'acides gras en variables non actives (en bleu). (B) carte des individus projetés sur les composantes 1 et 2.

Chapitre II

La première composante (Dim 1) explique une très large part de la variabilité des paramètres thermiques observées dans les crèmes : 72,8%. Cette composante sépare les crèmes témoins le plus à droite des crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés situés vers la gauche. Les crèmes de composition intermédiaire en acides gras, c'est-à-dire Blé, Colza, Herbe-blé et Herbe-colza, sont situées en position intermédiaire sur la carte des individus. Cette première composante est constituée majoritairement des variations d'enthalpies absolue et relative ($SFC_{4^{\circ}C}$). Cette séparation selon ce premier axe semble liée aux acides gras saturés à longue chaîne (C14:0 à C18:0), éventuellement associés aux acides gras *trans* d'une part et aux acides gras insaturés d'autre part. Plus les crèmes sont riches en acides gras saturés C14:0 et C16:0, plus leur variation d'enthalpie déterminée entre 4°C et 45°C est élevée et plus le taux de matière grasse solide estimé est également élevé. La température au maximum du pic à moyen point de fusion T_{PMPF} semble plutôt contribuer à l'axe 2 (Dim 2), représentant 13,5% de la variabilité totale. Ce paramètre n'est pas très discriminant vis-à-vis des différents types de crèmes. Enfin, la température de fusion finale T_{offset} est très peu représentée sur les axes 1 et 2 et ne contribue donc que très peu à la variabilité totale. A titre d'exemple, la **Figure CII-15** montre la qualité de la régression linéaire obtenue entre le taux de matière grasse solide estimé à 4°C ($SFC_{4^{\circ}C}$) et le taux en C16:0 des crèmes étudiées.

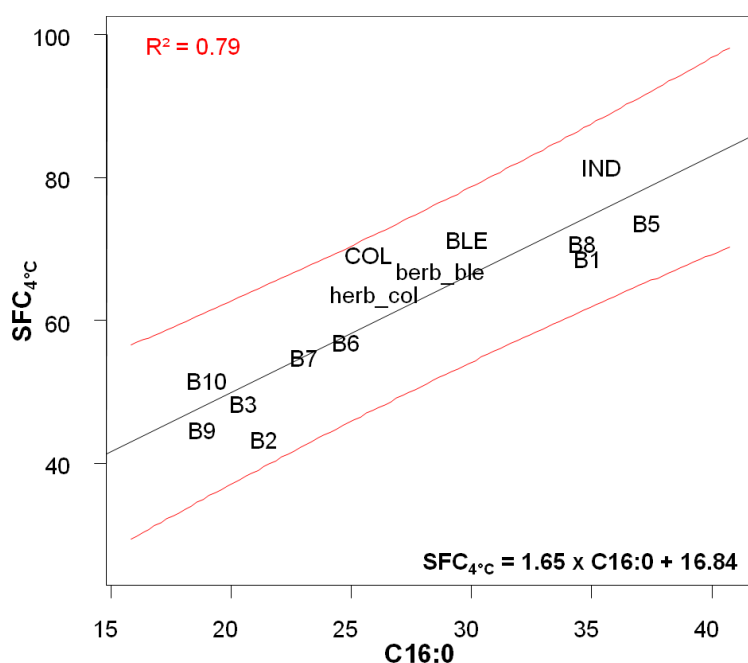


Figure CII-15 : régression linéaire entre le taux de matière grasse estimé à 4°C ($SFC_{4^{\circ}C}$) et la concentration en C16:0 des crèmes étudiées. En noir sont représentées les régressions linéaires et en rouge les intervalles de confiance à 0,95%.

L'ensemble des crèmes est bien aligné selon une droite, le coefficient de corrélation linéaire étant de 0,79 pour le C16:0 (**Figure CII-15**). Cette régression pourrait permettre de prédire le taux de matière grasse solide à partir de la composition en acides gras des crèmes et notamment le C16:0 qui est un des acides gras majeurs du lait.

2.3. identification des structures cristallines au cours du chauffage

Les structures cristallines formées dans les crèmes ont été identifiées par DRXT au cours d'un chauffage de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après un stockage de $t > 48\text{h}$ à 4°C. Les **Figure CII-16** et **Figure CII-17** présentent les diagrammes de DRXT des crèmes B8 et B10 enregistrés au cours du chauffage. Les diagrammes de DRXT enregistrés pour les autres crèmes sont consignés en **Annexe V**. Les diagrammes enregistrés aux plus hautes températures ne sont pas présentés car seul le signal des triacylglycérols fondus est présent.

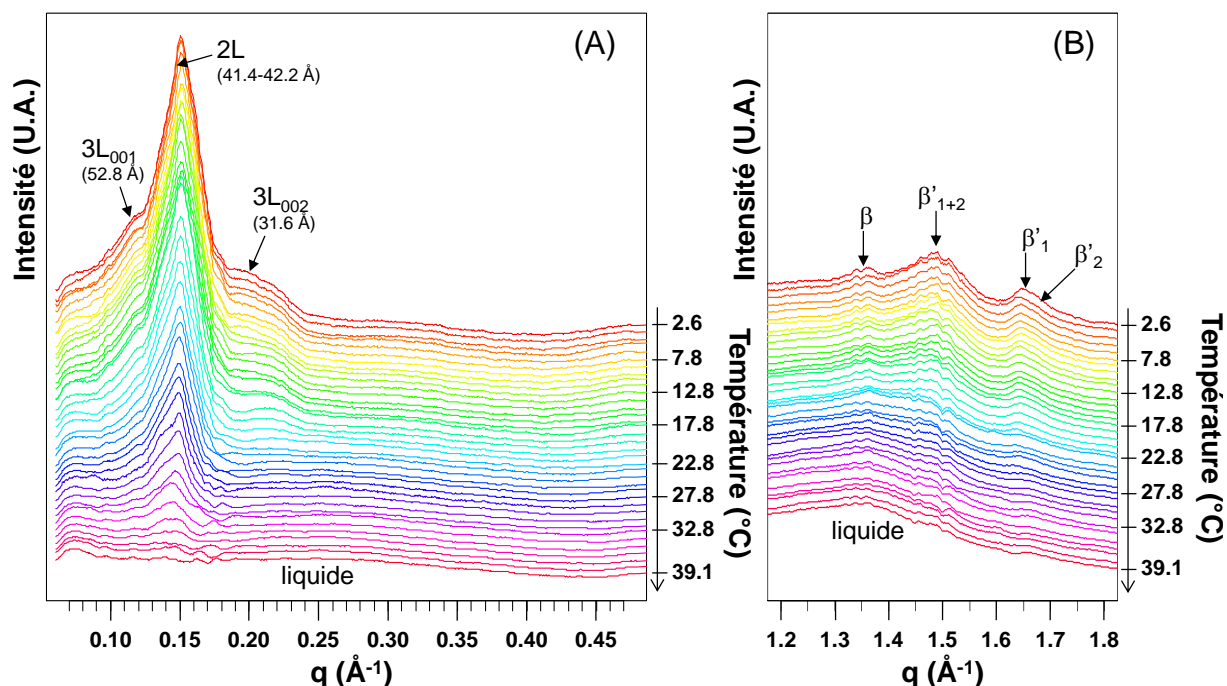


Figure CII-16 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours du chauffage de la crème B8 de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après stockage de $t > 48\text{h}$ à 4°C. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

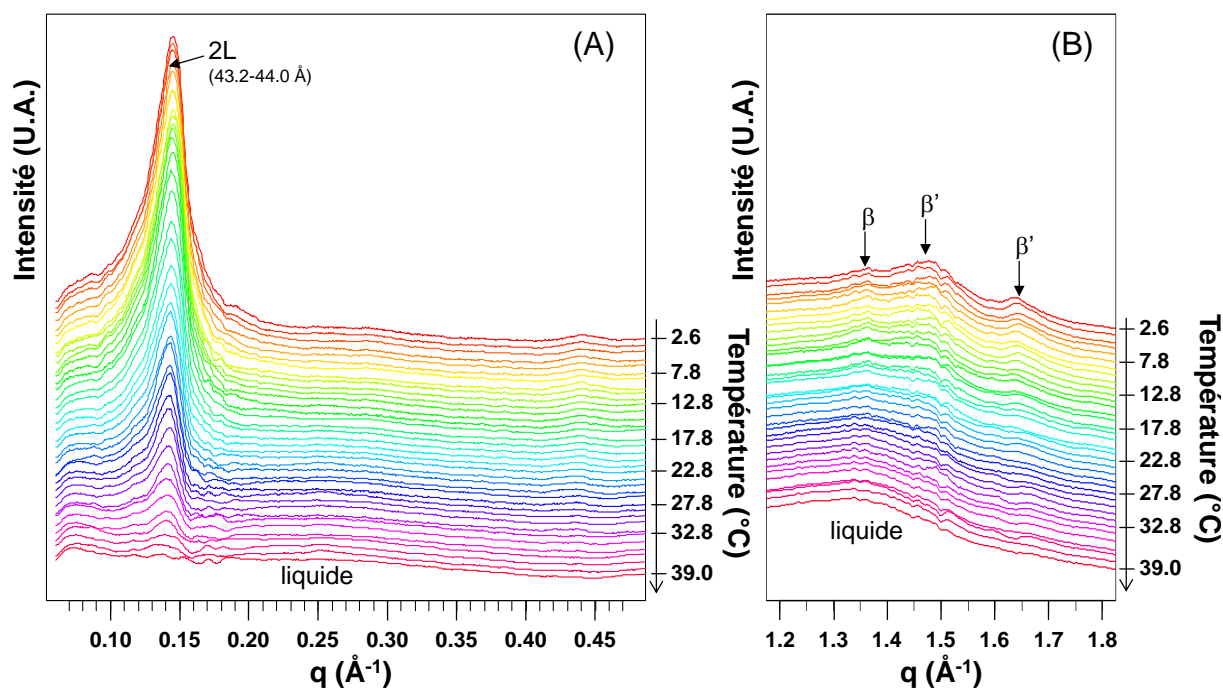


Figure CII-17 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours du chauffage de la crème B10 de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après stockage de $t > 48\text{h}$ à 4°C. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

Dans les deux crèmes étudiées au cours du chauffage, les pics de diffraction identifiés aux petits et grands angles diminuent en intensité au fur et à mesure du chauffage. Dans la crème témoin B8, les pics attribués à la structure 3L (52,8 Å) diminuent progressivement en intensité et disparaissent vers 23°C. Ces pics n'évoluent pas en distance, ce qui signifie que cette 3L (52,8 Å) conserve la même épaisseur jusqu'à sa fusion totale à 23°C. Le pic majoritaire de 2L (41,4 Å) diminue progressivement en intensité au cours du chauffage jusqu'à sa disparition complète vers 37°C. Ainsi, entre 23°C et 37°C, seule la structure 2L est présente dans la crème B8. Au cours du chauffage, l'épaisseur de cette 2L augmente légèrement de 41,4 Å à 42,2 Å. Cela pourrait être dû à la fusion des triacylglycérols plus courts à plus bas point de fusion au début de la fusion de cette structure comme proposé par Lavigne (1995). Dans la crème issue du régime riche en acides gras insaturés B10, le pic de 2L (43,2 Å) identifié à 4°C diminue progressivement en intensité au cours du chauffage jusqu'à sa disparition complète vers 37°C. Cette structure augmente également en épaisseur au cours de sa fusion de 43,2 Å à 44,0 Å. Aux grands angles de diffraction, les pics identifiés dans les deux crèmes présentent tous une intensité faible, rendant difficile la détection de leur gamme d'existence en température. Malgré tout pour la crème B8, le pic de la forme polymorphique β disparaît vers 23°C, alors que les pics associés à la forme β'_1 disparaissent

vers 37°C. Les pics de forme β'_2 sont dur à dissocier de la forme β'_1 , mais il semble à l'observation du signal large vers $1,5 \text{ \AA}^{-1}$ que cette forme β'_2 disparaisse également vers 23°C. Dans la crème B10, la pic de β semble disparaître vers 20°C environ, alors que les pics associés à la β' perdurent jusqu'à 37°C. A partir de 37°C, seul le signal large de diffusion des triacylglycérols fondus est enregistré aux petits angles vers $0,25 \text{ \AA}^{-1}$ et aux grands angles vers $1,35 \text{ \AA}^{-1}$ dans les deux crèmes.

La comparaison des deux crèmes nous mène à penser que la structure 3L (52,8 Å) identifiées dans la crème B8 est associée à la forme polymorphique β'_2 , puisque ces deux structurations n'existent pas dans la crème B10. De plus, l'augmentation d'épaisseur de la 2L au cours du chauffage dans les deux crèmes pourrait être reliée également à la fusion de deux structures 2L très proches en épaisseur, qui expliquerait qu'un seul pic de 2L soit identifié aux petits angles, mais avec deux formes polymorphiques : β et $\beta'_{(1)}$. Le comportement de fusion des triacylglycérols dans ces deux crèmes pourrait donc être résumé par les diagrammes suivants :

Crème B8 : $(\beta + \beta'_1) 2L (41,4 \text{ \AA}) + \beta'_2 3L (52,8 \text{ \AA}) + \text{liq.}_{B8-1}$
-(23°C)-> $\beta'_1 2L (41,4-42,2 \text{ \AA}) + \text{liq.}_{B8-2}$
-(37°C)-> liquide_{B8}

Crème B10 : $(\beta + \beta') 2L (43,2 \text{ \AA}) + \text{liq.}_{B10-1}$
-(20°C)-> $\beta' 2L (43,2-44,0 \text{ \AA}) + \text{liq.}_{B10-2}$
-(37°C)-> liquide_{B10}

3. Propriétés de cristallisation à la suite d'une trempe à -7°C

Les structures cristallines formées dans l'ensemble des crèmes à l'issue d'une trempe de 60°C à -7°C ont été identifiées par DRX afin de comparer les structures cristallines formées et d'identifier les acides gras impliqués dans les différences de structures observées. La **Figure CII-18** présente le diagramme de DRX enregistré au cours de la première minute de trempe pour chaque crème.

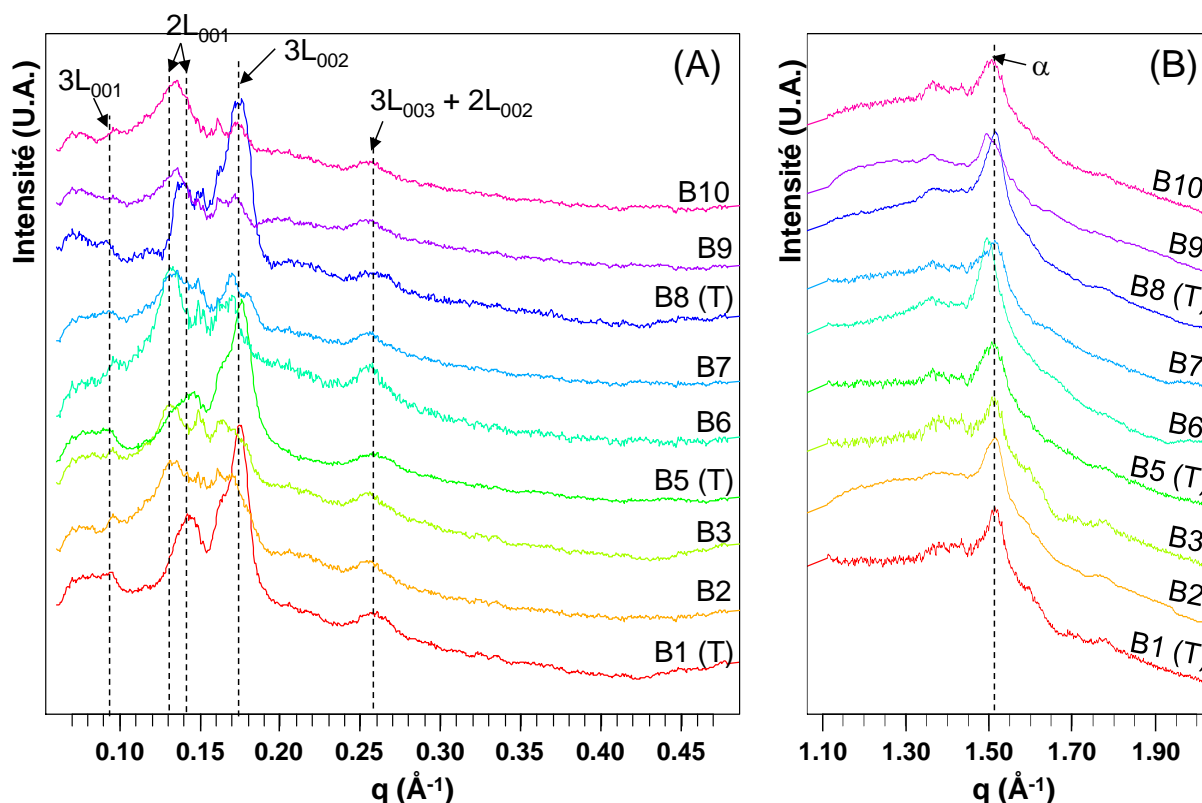


Figure CII-18 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) à -7°C au cours de la première minute suivant une trempe de 60°C à -7°C pour l'ensemble des crèmes témoins (T) et issues des régimes riches en acide gras insaturés. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

Dans toutes les crèmes étudiées, les diagrammes de DRX nous montrent la présence de 4 pics aux petits angles et un pic aux grands angles. Aux petits angles, un pic peu intense vers $0,090\text{-}0,100 \text{ \AA}^{-1}$ a été attribué à un premier ordre d'une structure 3L de $72\text{-}75 \text{ \AA}$ d'épaisseur. Un pic intense vers $0,173 \text{ \AA}^{-1}$ a été également identifié, correspondant à l'ordre $_{002}$ de cette même structure 3L, alors qu'un pic moins intense vers $0,25\text{-}0,26 \text{ \AA}^{-1}$ correspondrait à l'ordre $_{003}$ de cette 3L. Un autre pic intense a été identifié vers $0,13\text{-}0,15 \text{ \AA}^{-1}$, ne pouvant être attribué à aucun ordre de la 3L, mais qui a été indexé comme le premier ordre d'une structure 2L de $44\text{-}48 \text{ \AA}$ d'épaisseur. Aux grands angles de diffraction, le pic unique intense identifié à $1,51 \text{ \AA}^{-1}$ correspond au pic de diffraction caractéristique de la forme polymorphique α . Il semblerait également qu'il subsiste un peu de forme β , caractérisée par le pic à $1,37 \text{ \AA}^{-1}$, probablement la signature de cristaux β résiduels d'avant l'élimination du passé thermique à 60°C . Cependant, compte tenu de la faible intensité de ce pic par rapport au pic de α , cette forme polymorphique doit être en très faible proportion. En fait, comme montré par Lopez *et al.* (2000) et Lopez *et al.* (2001c) dans une matière grasse laitière

Chapitre II

anhydre et une crème de composition classique, le pic situé à 0,25-0,26 Å⁻¹ serait formé d'un doublet de pics attribués à l'ordre ₀₀₂ de la 2L et l'ordre ₀₀₃ de la 3L. La présence de forme polymorphique α en quasi totalité dans tous les échantillons de crème ne peut donc pas être un critère discriminant entre les types crèmes, nous nous intéresserons donc aux paramètres cristallographiques déterminés aux petits angles de DRX.

Plusieurs paramètres ont été extraits des diagrammes de DRX enregistrés aux petits angles, afin de mettre en lien la composition en acides gras des différentes crèmes avec les paramètres de structure des triacylglycérols de celles-ci. La position en distance de Bragg d et l'aire de chaque pic de diffraction ont été extraites à raison de 3 valeurs par pic, correspondant à 3 analyses par le logiciel PeakFit® du même diagramme de DRX. Les distances des pics de DRX obtenues par déconvolution des diagrammes de DRX enregistrés aux petits angles de diffraction nous renseignent sur les longueurs de chaînes des acides gras des triacylglycérols qui cristallisent. En effet, la forme polymorphique observée dans toutes les crèmes est α . La variation de grande distance réticulaire d en fonction du nombre d'atomes de carbones des chaînes d'acides gras n est connue pour des triacylglycérols saturés monoacides cristallisant sous forme α et obéit à l'équation $d = 2,59 n + 4,10$ (Small, 1986, Ollivon, 1992). Bien que cette équation ne soit valable en théorie que pour des triacylglycérols trisaturés monoacides formant des structures longitudinales 2L, Lopez *et al.* (2006b) l'ont utilisé pour déterminer la longueur moyenne des chaînes d'acides gras des triacylglycérols qui cristallisent dans la fraction stéarique de la matière grasse laitière. En adaptant cette équation pour des triacylglycérols monoacides saturés imaginaires qui seraient capables de former des structure α 3L comme celles identifiées dans les crèmes, nous obtiendrions l'équation : $d = 2,59 * 3/2 n + 4,10 * 2 = 3,89 n + 8,2$. Ainsi, il est possible d'approcher la longueur moyenne des acides gras des triacylglycérols l qui cristallisent dans les structures observées en DRX dans les crèmes à la suite de la trempée. Le **Tableau CII-10** présente les valeurs moyennes des différents paramètres extraits des diagrammes de DRX enregistrés aux petits angles de diffraction.

Tableau CII-10 : paramètres de pics extraits des diagrammes de DRX enregistrés à -7°C sur l'ensemble des crèmes après 1 minute de trempe de 60°C à -7°C (valeurs moyennes, n = 3). d = distance de Bragg, % = aire (%), l = longueur moyenne d'acides gras des triacylglycérols (nombre d'atomes de carbones). ^a : écart-type < 0,6 ; ^b : écart-type < 3,2 ; ^c : valeurs déterminées à partir de l'ordre ₀₀₁ de la 2L et ₀₀₂ de la 3L.

	B1	B2	B3	B5	B6	B7	B8	B9	B10
d 2L₀₀₁^a	43,9	47,0	47,3	44,2	47,6	46,8	44,6	47,0	46,7
d 3L₀₀₂^a	36,0	37,4	37,4	35,8	37,6	36,5	36,1	37,0	36,7
d 2L₀₀₂ + 3L₀₀₃^a	24,2	24,6	24,5	24,2	24,6	24,5	24,3	24,7	24,6
% 2L₀₀₁^b	45,0	54,4	54,6	30,3	58,3	61,0	36,3	74,9	74,6
% 3L₀₀₂^b	55,0	45,6	45,4	69,7	41,7	39,0	63,7	25,1	25,4
l 2L^c	15,4	16,6	16,7	15,5	16,8	16,5	15,6	16,6	16,4
l 3L^c	16,4	17,1	17,1	16,3	17,2	16,7	16,5	16,9	16,8

La longueur moyenne estimée des acides gras déterminée selon les équations adaptée de Small (1986) nous permet de voir que les acides gras des triacylglycérols qui cristallisent lors de cette trempe à -7°C sont plus longs pour les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés par rapport aux crèmes témoins. Cela semble logique compte tenu de la composition en acides gras des crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés qui montrent des teneurs plus élevées en acides gras plus longs (C18:0 et acides gras insaturés C18). Cependant, cette observation nous permet également de conclure sur le fait que les triacylglycérols qui cristallisent à -7°C lors de la trempe contiennent probablement aussi plus d'acides gras insaturés. La différence de longueur de chaîne entre les crèmes des régimes témoins et riches en acides gras insaturés est de l'ordre de 1,1 carbones pour la 2L et 0,6 pour la 3L. De plus, la longueur moyenne des acides gras des triacylglycérols qui cristallisent en 3L est légèrement mais systématiquement plus élevée que ceux de la 2L pour une même crème. Cela va bien dans le sens où les acides gras saturés, plus courts en moyenne que les acides gras insaturés du lait, font cristalliser les triacylglycérols plutôt en 2L et les acides gras insaturés en 3L.

Les structures cristallines formées immédiatement après une trempe de 60°C à -7°C ont vocation à se réorganiser car très instables (Lopez *et al.*, 2000, 2001c). Nous avons étudié les mécanismes de réorganisation des structures formées au cours de la première minute de trempe pendant 20 minutes dans les crèmes en laissant les capillaires de DRX contenant ces crèmes dans le calorimètre à -7°C immédiatement après la trempe. Les **Figure CII-19** et **Figure CII-20** présentent les diagrammes de DRXT des crèmes B8 et B10 ; les diagrammes de DRXT des autres crèmes sont consignés en **Annexe VI**.

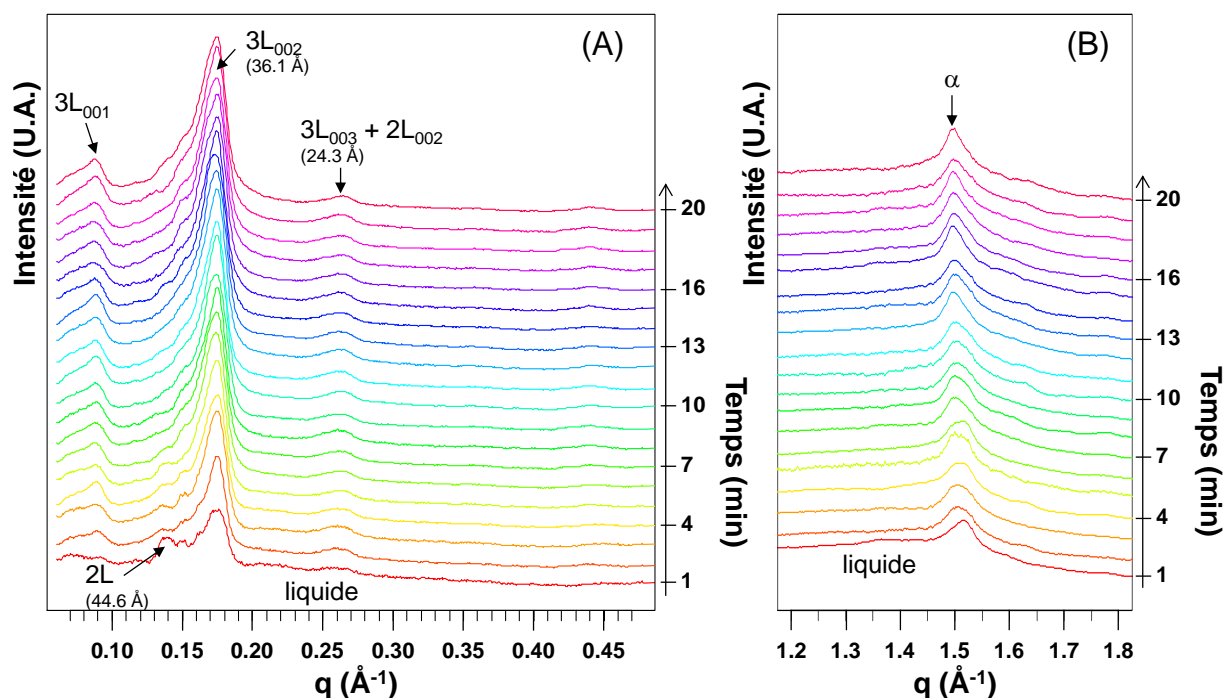


Figure CII-19 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) à -7°C au cours des 20 minutes suivant une trempe de 60°C à -7°C pour la crème témoin B8. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

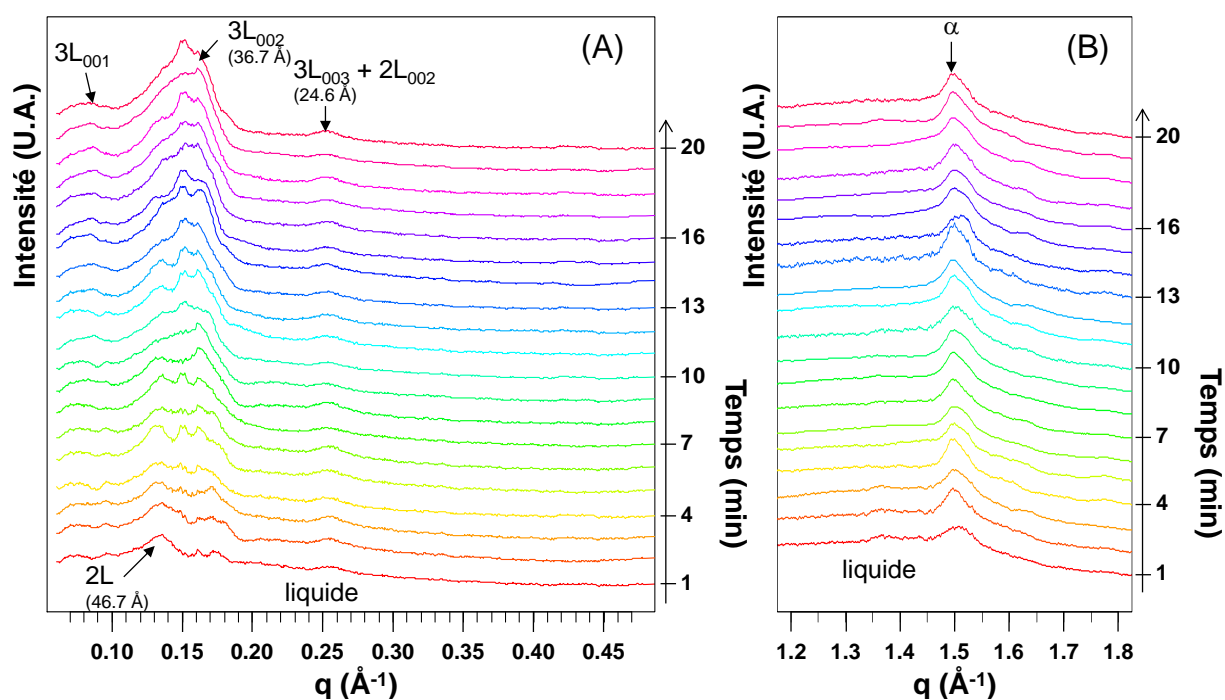


Figure CII-20 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) à -7°C au cours des 20 minutes suivant une trempe de 60°C à -7°C pour la crème issue du régime riche en acides gras insaturés B10. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

Chapitre II

Dans les deux crèmes étudiées au cours de l'étape statique de trempe à -7°C , le pic attribué à la forme polymorphique α identifié aux grands angles est conservé. Aucune évolution polymorphique n'est donc observée pendant les 20 minutes de trempe ; seule l'intensité du pic de α augmente, dénotant l'augmentation du taux de matière grasse cristallisée pendant ce temps. Aux petits angles, la coexistence de structures longitudinales 2L et 3L a été montrée au cours de la première minute de trempe ; au cours des 20 minutes d'observation, la structure longitudinale 2L se réorganise en 3L dans les deux crèmes car son pic de premier ordre diminue en intensité au profit des pics attribués aux différents ordres de la 3L. Cela est en accord avec les travaux de Lopez *et al.* (2000), qui ont mis en évidence les évolutions structurales des triacylglycérols dans de la crème de composition classique en acides gras au cours d'une trempe de 30 minutes à -8°C . Les diagrammes de DRXT enregistrés sur la crème témoin B8 montrent la disparition du pic de 2L au cours des premières minutes de trempe, alors que ceux enregistrés sur la crème B10 montrent la disparition complète du pic de 2L au bout de 16 à 20 minutes seulement. Ainsi, la cinétique de cristallisation des triacylglycérols de la crème issue du régime riche en acides gras insaturés est plus lente que celle de la crème témoin, en tous cas pour la structure longitudinale 3L.

4. Conclusion

Nous avons montré que le polymorphisme des triacylglycérols laitiers dans les globules gras natifs dépend beaucoup de leur composition en acides gras. L'enrichissement en acides gras insaturés que nous avons étudié, c'est-à-dire par le biais de l'alimentation animale, a eu plusieurs conséquences sur la cristallisation des triacylglycérols dans les globules gras natifs. Tout d'abord, les épaisseurs des structures cristallines longitudinales sont plus grandes dans les crèmes issues des régimes riches en acides gras insaturés, ce que nous avons attribué à une différence de composition en acides gras des triacylglycérols qui cristallisent, quel que soit le passé thermique. La température de début de cristallisation de la structure 3L est abaissée, ainsi que sa cinétique de cristallisation ; nous l'avons clairement observé après le stockage à 4°C et lors du refroidissement à $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, respectivement. Les acides gras insaturés pourraient être responsables de ces changements, puisque il semble évident d'après les observations réalisés à la suite de la trempe à -7°C que les triacylglycérols qui cristallisent n'ont pas la même composition en acides gras. Enfin, quel que soit le passé thermique appliqué, la dernière structure à fondre lors du chauffage des crèmes est toujours une β' 2L

Chapitre II

possédant toujours la même épaisseur. Cela est donc en accord avec la littérature, puisque le polymorphisme des triacylglycérols est de type monotropique (Ollivon, 1992), les variétés polymorphiques fondent donc par ordre de stabilité croissante, et que la présence de fraction liquide favorise ces transitions polymorphiques (Wright *et al.*, 2005).

***D. Article accepté pour publication dans Food Research International :
L'enrichissement en acides gras insaturés et la taille des gouttelettes
d'émulsion affectent le comportement de cristallisation des
triacylglycérols laitiers après stockage à 4°C***

Enrichment in unsaturated fatty acids and emulsion droplet size affect the crystallization behaviour of milk triacylglycerols upon storage at 4°C

Simon Bugeat^{a,b,c,d}, Valérie Briard-Bion^{b,c}, Javier Perez^e, Philippe Pradel^f, Bruno Martin^g, Sylviane Lesieur^d, Claudie Bourgaux^d, Michel Ollivon^{d,†}, Christelle Lopez^{b,c,*}

^a CNIEL, 42 rue de Châteaudun, F-75314 Paris, France

^b INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 rue de Saint-Brieuc, F-35042 Rennes, France

^c AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 rue de Saint-Brieuc, F-35042 Rennes, France

^d CNRS, UMR8612 Université Paris-Sud XI, 5 rue J.-B. Clément, F-92296 Châtenay-Malabry, France

^e Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, FRANCE

^f INRA Domaine expérimental de Marcenat, F-15190 Marcenat, France

^g INRA, URH1213 Unité de Recherches sur les Herbivores, F-63122 Saint-Genes-Champanelle, France

* corresponding author.

E-mail address: Christelle.Lopez@rennes.inra.fr

Phone number: +33 2 23 48 56 17

Fax number: +33 2 23 48 53 50

† This paper is dedicated to Michel Ollivon

ABSTRACT

Increasing the unsaturated fatty acid (UFA) content in milk fat is of primary importance to face nutritional recommendations. However, such changes can affect the crystallization properties of milk triacylglycerols (TAG) and their functional properties. The objectives of this study were to investigate the crystallization properties of milk fat as a function of its FA composition and emulsion droplet size upon storage at refrigerated temperature. UFA-enriched TAG were obtained using cow diet supplemented with linseed oil and compared to control TAG. Homogenization was used to vary the size of emulsion droplets, from 1.7 to 0.2 μm . The crystallization properties of TAG were studied using synchrotron X-ray diffraction coupled to differential scanning calorimetry. We characterized the coexistence of several solid fat phases with a liquid phase, the characteristics of which depended on the temperature, FA composition and droplet size. The enrichment in UFA from 29 to 51 wt% led to a decrease in the enthalpy ratio at 4°C from 64 ± 4 to $54 \pm 4\%$ and to the formation of 2L (41.8 Å) structure with β_1 , β'_1 , and β'_2 polymorphic forms while 2L (39.5 Å) and 3L (56.6 Å) structures with β_1 , β_2 , β'_1 and β'_2 polymorphic forms were formed with control TAG. The decrease in the size of the emulsion droplets led to lower melting enthalpy variations and enthalpy ratio, lower final temperature of melting of TAG and higher proportion of β polymorphic form. Such experiments increased the

Chapitre II

knowledge about the crystallization properties of TAG dispersed in emulsion and will be useful for industrial applications and the development of UFA-enriched dairy products with improved nutritional properties.

Keywords: Milk fat crystallization; Triglyceride emulsion; Milk fat globules; Synchrotron X-ray diffraction; Fatty acid composition; Polymorphism

1. Introduction

Milk fat is partially crystallized, i.e. a mixture of crystals and oil, over a wide range of temperature including technological processing and storage temperatures. Fat crystals are essential in the manufacture of dairy products (butter, whipped cream) and determine the physical properties of high-fat content food products (Goff, 1997; Wright et al., 2001). They also affect the physical stability of emulsion droplets (Rousseau, 2000; Fredrick et al., 2010) and then can alter the quality of food products. However, few studies focused on the mechanisms of milk fat crystallization in confined systems such as emulsion droplets. Moreover, information about the crystallization and functional properties of milk fat enriched in unsaturated fatty acids to improve its nutritional properties is scarce (Smet et al., 2009; Smet et al., 2010). Hence, it is interesting for physico-chemists and food industrials to improve the knowledge about milk fat crystallization behavior, particularly as a function of its fatty acid composition and dispersion state.

Population studies have long established relationships between saturated fatty acids (SFA) in the diet and the incidence of coronary heart diseases (Keys, 1970), which is a leading cause of death in most industrialized countries. Thus, the decrease in the consumption of food products rich in SFA in favor of unsaturated dietary fats is highly recommended by nutritionists to prevent cardiovascular disease risks (Joint FAO/WHO Expert Consultation, 2003). Whole milk and some dairy products have been listed as one of the risk factors in coronary heart disease due to their high content of SFA (Noakes et al., 1996). Milk fat mainly contains triacylglycerols (TAG; 98% of milk lipids) (Christie, 1995) in which more than 400 fatty acids of various chain length and degree of unsaturation have been identified (Jensen & Newburg, 1995). Bovine milk fat contains high amounts of SFA, i.e. 65 to 70% of total fatty acids (Jensen & Newburg, 1995). Improving the fatty acid composition of milk by reducing the SFA rate and increasing the unsaturated fatty acid (UFA) content is therefore of considerable interest for food industry, in agreement with healthy nutrition.

A number of ways exist to increase the UFA content of milk fat, such as (i) technology, mainly with dry fractionation of fat, (ii) chemical methods such as enzymatic interesterification, (iii) mixing of milk fat with UFA-rich vegetable oil or fish oil, (iv) selection of cows and (v) dietary manipulation by means of feeding dairy animals (Palmquist et al., 1993; Smet et al., 2009; Smet et al., 2010; Lopez et al., 2008). Numerous studies have been published on the use of cow dietary supplements to increase UFA in milk fat since it is among the most natural and efficient ways known to alter the milk fatty acid composition. A recent review focused on the influence of the addition of vegetable seeds and oils, namely linseed, rapeseed, soybeans and sunflower on milk FA composition (Glasser et al. 2008).

The increase in the UFA content of TAG will undoubtedly change the physicochemical properties of the resulting milk fat and dairy products, especially their thermal properties and crystallization behavior (Ollivon, 1992; Smet et al., 2010). This may affect the functional properties and texture of dairy products as well as the consumer acceptability (Bobe et al., 2003; Chen et al., 2004). In this context, investigating both crystallization process and resulting structural organization of UFA-enriched milk TAG is of primary importance. From a general point of view, the difficulty of studying milk fat crystallization lies in the large distribution of the FA residues among the TAG (more than 200 TAG species according to Gresti et al., 1993), which therefore partition into liquid and crystalline solid states

Chapitre II

over a wide range of temperatures spanning from -40°C to 40°C (Timms, 1980; Lopez et al., 2009a). Furthermore, TAG molecules individually exhibit a monotropic polymorphism which notably complicates the thermal behavior of their mixes and consequently the control of the structure of the milk fat in its solid state as a function of the temperature applied during processing and conditioning treatments (Ollivon & Perron, 1992). Under such thermal conditions, milk fat is partially crystallized (Lopez and Ollivon, 2009a). The knowledge of the polymorphic behavior of the TAG constituting the solid fraction of the fat appears then essential to anticipate the texture and functional properties of dairy products (Wright et al., 2001). Moreover, TAG molecules are naturally dispersed in milk in the form of emulsion droplets called milk fat globules ranging from $0.2\ \mu\text{m}$ to $10\ \mu\text{m}$ in diameter with an average close to $4\ \mu\text{m}$ (Mulder and Walstra, 1974; Lopez & Briard-Bion, 2007a). Milk is often homogenized to increase its physical stability toward creaming, which leads to the decrease in fat droplet size and adsorption of caseins at the interface (Lopez & Briard-Bion, 2007a). Then, for academic research and for industrial purposes, thermal behavior of aqueous milk fat dispersions deserves to be investigated beside that of dry extracts, all the more so as nucleation mechanism and crystal growth of TAG in submicron emulsions have not been fully elucidated and yet less the influence of an enrichment in UFA.

A number of works has been focused on milk fat thermodynamics by using differential scanning calorimetry (DSC) to give an insight into TAG phase behavior in bulk (Timms, 1980; Marangoni and Lencki, 1998; Lopez et Ollivon, 2009a) and in emulsions (Walstra and van Beresteyn, 1975; Lopez et al., 2002a; Michalski et al., 2004). The authors have accordingly described complex crystallization and melting processes characterized by the existence of three distinct non-isothermal solid-to-liquid phase transitions referred to as high- medium- and low-melting point fractions and corresponding to partial segregation of the mix constituting TAG species (Timms, 1980; Lavigne & Ollivon, 1997; Marangoni and Lencki, 1998; Lopez and Ollivon, 2009a). Structural characterization of the solid phases formed in milk TAG emulsions has been also undertaken by the group of Michel Ollivon using the coupling synchrotron X-ray diffraction and DSC (Lopez et al., 2000, 2001b, 2002a, 2002b, 2005; Michalski et al., 2004; Ben Amara-Dali et al., 2008). The crystalline arrangement of TAG in native bovine milk fat globules was especially investigated (Lopez et al. 2000, 2001b, 2002a, 2002b; Michalski et al., 2004). In summary, the longitudinal organizations of milk TAG in native emulsions correspond to double-chain length (2L in the $40.5\text{--}48.3\ \text{\AA}$ range) or triple-chain length (3L in the $54.2\text{--}72\ \text{\AA}$ range) lamellar arrangements (Lopez et al., 2007b) while the polymorphic forms corresponding to the lateral packing of the TAG hydrocarbon chains already identified in milk fat emulsions are sub- α , α , β' and β forms (Lopez et al., 2000, 2001b, 2002a, 2002b). Recently, Smet et al. (2010) investigated the crystallization behavior of UFA-milk fat in bulk using DSC and X-ray diffraction. However, none of these previous studies has been addressed to emulsions of UFA-enriched TAG.

The objective of this work was to investigate the effect of increased UFA content on the crystallization properties of milk TAG dispersed as emulsion droplets upon storage at 4°C that is the refrigerated temperature usually imposed for many food products to limit the chemical and biological deteriorations. Experiments using DSC and time-resolved X-ray diffraction as a function of temperature were implemented to compare phase behaviors and structural organizations of either

control TAG or UFA-enriched milk TAG when they are dispersed as emulsions. Varying droplet size ranges were moreover investigated to better understand the effect of homogenization on the structures characterizing the solid fraction of the fat.

2. Materials and methods

2.1. Control and UFA-enriched TAG: production and preparation

Milks containing control TAG or UFA-enriched TAG were obtained from two distinct groups of six Holstein cows at the same lactation stage and producing close amounts of milks with similar compositions. During four consecutive weeks, the cows received daily 1.7 kg dry matter (DM) of hay and grass silage *ad libitum* and either 3.1 kg DM of cereals (control TAG group) or 0.6 kg DM of soybean meal (70% barley and 30% maize) and 0.7 kg of oil from linseed (UFA-enriched TAG group). Linseed oil was dispersed on the silage and the quantities of oil were adjusted individually to bring an oil level of 5% dry matter for each cow. For each group of cows, the milk productions recovered twice a day from milkings in the morning and evening were mixed and refrigerated at 4°C. Milk fat globules were concentrated from the milks by centrifugation at 45°C to about 50% wt/wt fat content with a plate-separator (Elecrem, Vanves, France) and stored at -20°C. Then, the concentrated milk fat globules were stored for 1 night at 4°C. TAG samples were prepared by churning milk fat globules at 10°C, heating at 70°C for 10 min to melt TAG and separation of TAG from the aqueous phase by centrifugation at 1500 g at 55°C for 10 min. The supernatant composed of the TAG and referred to as bulk TAG in the following was taken and stored at -20°C until further experiments.

2.2. Fractionation of the solid fat phase formed upon storage at 4°C

The fractionation of the solid fat phase formed by milk TAG upon storage at 4°C has been adapted from [Kaylegian and Lindsay \(1994\)](#). The control and UFA-enriched TAG were melted at 60°C in mixture with 1:4 v/v acetone (PA, Carlo Erba Réactifs, Val De Reuil, France) to reduce the viscosity and were stored for 48 hours at 4°C to allow crystallization, as for the emulsions. The solid fat fraction was then separated from the liquid fat phase by filtration at 4°C on Whatman filter paper N°40 (Whatman International Ltd, Maidstone, England). Residual acetone has been removed from the filtered solid fat fraction by evaporation under nitrogen stream for 2 hours at 60°C.

2.3. Fatty acid composition

Overall fatty acid compositions of total and fractioned TGs were determined according to the method adapted from [Park and Goins \(1994\)](#). This consisted in the conversion of initial TGs into fatty acid (FA) methyl esters which were then analyzed by gas chromatography (GC). This was performed by using an Agilent 7890 GC system (Agilent Technologies France, Massy, France) with instrument parameters already reported by [Lopez et al. \(2008\)](#), i.e., with 2 capillary columns (50 m by 0.32 mm; film thickness 0.25 µm each one) coated with 70% Cyanopropyl polysilphenylenesiloxane (BPX-70, SGE, Ringwood, Vic., Australia) mounted in series. Experimental conditions were as follows: initial temperature of on-column injection (1 µL) was 40°C for 0.2 min; the temperature injector was programmed to increase to 200°C at a rate of 200°C/min, an isotherm at 200°C for 6 min and a

Chapitre II

decrease in temperature to 40°C at a rate of 200°C/min. The Flame Ionization Detector temperature was 250°C; carrier gas was hydrogen at a pressure of 138 kPa. Oven temperature was programmed as follows: 50°C for 10 min followed by an increase to 175°C at a rate of 10°C/min; the oven was maintained at this temperature for 27 min. Then, temperature was increased to 215°C at a rate of 4°C/min and maintained during 16 min. Total analysis time was 75.50 min. Retention times were determined by injection of commercial mixes of FA methyl esters standards (Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden) and *trans* FAs all purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The analyses were performed in triplicate from two independent samples.

2.4. *Emulsions preparation*

Control and UFA-enriched TAG were heated at 60°C for 20 min to ensure complete melting of existing TAG crystals. The continuous aqueous medium was prepared by dissolving 4% dry weight sodium casein powder (Armor Protéines, Saint Brice en Coglès, France) into distilled water under stirring at 60°C for 1 hour and then at room temperature for 1 night. Emulsion was prepared at 60°C by mixing the melted TAG and the aqueous medium to reach 40 to 42% v/v fat. The pre-emulsification was performed using Polytron PT 3100 rotor stator system (Kinematica, Littau-Lucerne, Switzerland) equipped with a 30 mm PT-DA 3030/2EC head (Kinematica, Littau-Lucerne, Switzerland) working at 4000 rpm for 3 min. Preparation of the emulsions was then achieved at 60°C with a high-pressure valve homogenizer (Stansted, Harlow, Essex, UK), by recycling 10 times the samples before collection, at a pressure of 40 to 50.10⁵, 200.10⁵ or 500.10⁵ Pa, depending on the final droplet size desired. The homogenizer chamber was previously heated by injecting distilled water at 40°C to prevent crystallization of the fat inside the homogenizer. Sodium azide (0.02% w/v) was added to prevent bacterial growth. The final pH was controlled to be 6.7, i.e., equivalent to the standard milk pH. The recovered TAG-in-water emulsions were stored at 4°C for at least 48 h before further thermal and structural analyses. In these conditions, the emulsions were stable in size for at least 6 days.

2.5. *Fat droplet size measurements*

The size distribution of the emulsion droplets was measured by laser light scattering using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK) equipped with a He/Ne laser at 633 nm and an electroluminescent diode at 466 nm, able to measure particle diameters down to 20 nm. For measurements, the emulsions were dispersed in 100 mL milliQ water in order to reach 10% obscuration. In these conditions, the emulsions remained stable and the residual casein concentration could be neglected so that the refractive index of the aqueous phase could be considered as the same as that of water, i.e. 1.330. The refractive index values were 1.458 and 1.460 for milk fat at 633 nm and 466 nm, respectively (Michalski et al., 2001). The size distribution and related parameters were calculated by the software according to the Mie theory. The modal diameter corresponded to the population of fat droplets the most present in the size distribution. The volume-weighted average diameter was defined as $d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$ (where n_i is the number of fat droplets of diameter d_i), the volume/surface average diameter as $d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$ and the specific surface area as $S = 6. \phi / d_{32}$

(where φ is the volume fraction of milk fat). The analyses were carried out in triplicate from independent sampling.

2.6. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC measurements were performed with a DSC Q1000 (TA Instruments, Newcastle, DE). Apparatus calibration was made with indium standard (156.66°C and 28.41 J/g melting temperature and enthalpy variation, respectively). Total sample masses, typically ranging from 9 to 16 mg, were introduced in 20 μ L aluminum pans (pans: 900793.901, lids: 900794.901, TA Instruments, Newcastle, DE) which were hermetically sealed after sample introduction. An empty and hermetically sealed pan was used as reference. The sample pans were stored at 4°C for at least 48 h before DSC recordings. For each scan, the pans were introduced into the DSC apparatus previously set to 4°C, equilibrated at 4°C for 5 min and then cooled from 4°C to -5°C at 2°C/min to avoid the interference of the launching of the calorimeter prior to heating from -5°C to 60°C at 2°C/min. Thermal parameters including medium melting point (MMP) temperatures T_{MMP} and total melting completion or offset temperatures T_{offset} as well as partial melting enthalpy variations were determined by using Universal Analysis 2000 v 4.1 D software (TA Instruments, Newcastle, DE). Partial melting enthalpy variations over either the total heating temperature range explored ($\Delta H_{\text{partial}}$) or intermediate ranges corresponding to medium and high melting point (HMP) fractions of TAG (ΔH_{MMP} and ΔH_{HMP} , respectively) were determined.

In order to compare the orders of magnitude of solid fractions formed by control TAG and UFA-enriched TAG after 48 to 60 hours of storage at 4°C, we determined the enthalpy ratios using DSC (Lopez et al., 2006). This consisted in calculating the ratio of the partial enthalpy variation corresponding to the melting of the TAG molecules which partly crystallized within the emulsion droplets to the total enthalpy variation measured upon melting of total TAG in the anhydrous bulk state. For this purpose, control and UFA-enriched bulk TAG were melted at 60 °C and introduced in aluminum pans, subsequently stored at 4°C for 48 hours, as for the emulsions. DSC recordings were carried out by placing the sample pans into the calorimeter previously cooled at 4°C and first cooling the bulk TAG down to -50°C at 0.1°C/min in order to achieve complete crystallization of the TAG in their stable polymorphic form. Then, heating scans were performed up to 60°C at 2°C/min and the melting enthalpy variation of total TAG, ΔH_{total} , was determined from the total area of the recovered endotherms from -40°C to 43°C, temperature at which the DSC signal reached the baseline after total melting of TAG. Enthalpy ratios calculated as $100 \times (\Delta H_{\text{partial}} / \Delta H_{\text{total}})$ were then taken into account to give an estimate of solid fractions formed at 4°C by approximating a mean latent heat of fusion for all TAG contained in the mixtures, the polymorphic forms (Zeberg-Mikkelsen and Stenby, 1999) and the amount of the solid fat phases. This enthalpy ratio is equal to the solid fat amount only for a pure substance that does not undergo polymorphic changes. However, it gives trends of evolution of the solid fraction for complex mixtures of TAG having different latent heats of fusion.

All measurements were performed in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) was carried out on the thermal parameters by taking fat composition (control versus UFA-enriched TAG) and emulsion droplet size (small, medium and large) as qualitative factors of the ANOVA model.

2.7. Coupling of DSC and temperature-controlled and time-resolved synchrotron XRD

X-ray diffraction (XRD) experiments were performed at SOLEIL synchrotron (Gif-sur-Yvette, France) on the SWING beam line. Data were collected by a two-dimension charge-coupled device detector. The diffracted intensity was reported as a function of the scattering vector $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$ where 2θ is the scattering angle and λ the wavelength of the incident beam ($\lambda = 0.828 \text{ \AA}$; 15 keV). The sample-to-detector distance was set to 554 mm to allow recording of XRD patterns in the q -range from 0.08 \AA^{-1} to 1.8 \AA^{-1} , thus covering the small- and wide-angle regions of interest for TAG molecules. Calibration of the q -range was carried out with pure β -tristearin (Lavigne et al., 1993) for wide angles and silver behenate (Blanton et al., 2000) for small angles. Intensity values were normalized for beam intensity, acquisition time and sample transmission. Each XRD pattern recorded as a function of time or temperature displayed concentric signal rings which were integrated circularly to yield the intensity versus q .

The samples (around 20 μL) were introduced into thin quartz capillaries of 1.5 mm diameter (GLAS W. Muller, Berlin, Germany) and placed within a specially designed calorimeter (Microcalix®, Ollivon et al., 2006) which was inserted in the beam pathway. Emulsions were heated at 60°C to facilitate loading and filled capillaries were then stored at 4°C for at least 48 h before analysis. For measurements, the capillaries were introduced into the calorimeter previously cooled at 4°C to maintain sample physical state reached during storage. First, 30 XRD patterns were acquired at 4°C, for 6 s each (4.5 s life time; 1.5 s dead time) and summed to obtain an average XRD pattern of 180 s (135 s life time; 45 s dead time). Then, the samples were submitted to controlled heating at a rate of 2°C/min from 4°C up to 60°C while differential scanning calorimetry (DSC) signals and XRD patterns were simultaneously recorded as a function of time. During temperature scan, XRD patterns (180 total number) were recorded every 7.5 s (6 s life time; 1.5 s dead time). For graphic representation, each XRD pattern corresponded to the sum of four successive ones and then to temperature amplitude of 1°C. DSC data were collected using a home-made computing system. Temperature calibration of the calorimeter was ensured by using pure lauric acid as standard (43.7°C melting temperature, Grabielle-Madémont and Perron, 1983). The precision of temperature regulation was $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Structural parameters were determined from the XRD patterns using PeakFit® software (Jandel Scientific, Germany). Positions and maximum intensities of the Bragg reflections were deduced from fit with gaussian or lorentzian sum (amplitude) function (Lopez et al. 2001b). The XRD area of each of the phases was obtained by summing the areas of each of the small angle XRD reflection corresponding to the same longitudinal stacking of TAG. The total diffracted area was calculated as the sum of all the XRD peak areas. Similar analysis of the XRD data has been previously proposed (Lopez et al., 2001a and 2001b). R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) was used to display the XRD patterns recorded as a function of time in 3-dimensional representations.

3. Results and discussion

3.1. Fatty acid compositions of total TAG and solid TAG fractions formed at 4°C.

Table 1: Fatty acid (FA) compositions^x of total fat and solid fat phase at 4°C of control and unsaturated fatty acid (UFA)-enriched milk triacylglycerols (TAG) (% weight; mean ± standard deviation, n=3). Only the FA with contents higher than 0.05% are presented.

Fatty acids	Total bulk fat [§]		Solid fat phase at 4°C [§]	
	Control TAG	UFA-enriched TAG	Control TAG	UFA-enriched TAG
C4:0	3.77 ± 0.07 ^c	2.63 ± 0.41 ^b	2.53 ± 0.27 ^b	1.85 ± 0.14 ^a
C6:0	2.03 ± 0.03 ^d	1.11 ± 0.11 ^b	1.44 ± 0.12 ^c	0.78 ± 0.04 ^a
C8:0	1.02 ± 0.01 ^d	0.48 ± 0.03 ^b	0.74 ± 0.04 ^c	0.34 ± 0.01 ^a
C10:0	2.30 ± 0.02 ^d	0.96 ± 0.05 ^b	1.81 ± 0.06 ^c	0.76 ± 0.02 ^a
C12:0	3.07 ± 0.02 ^d	1.29 ± 0.03 ^b	2.58 ± 0.04 ^c	1.12 ± 0.01 ^a
C14:0	11.63 ± 0.02 ^c	6.42 ± 0.06 ^a	11.44 ± 0.04 ^b	6.40 ± 0.02 ^a
C14:1 c9	0.81 ± 0.01 ^d	0.33 ± 0.01 ^b	0.57 ± 0.01 ^c	0.22 ± 0.01 ^a
C15:0	1.09 ± 0.01 ^c	0.98 ± 0.01 ^a	1.15 ± 0.01 ^d	1.08 ± 0.01 ^b
C15:1 c10	0.24 ± 0.01 ^b	0.17 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.01 ^b	0.18 ± 0.01 ^a
C16:0	33.65 ± 0.06 ^c	18.57 ± 0.10 ^a	40.46 ± 0.25 ^d	22.45 ± 0.04 ^b
C16:1 c9	1.33 ± 0.04 ^d	0.75 ± 0.01 ^b	0.84 ± 0.01 ^c	0.47 ± 0.01 ^a
C17:0	0.56 ± 0.01 ^b	0.50 ± 0.01 ^a	0.69 ± 0.01 ^d	0.63 ± 0.01 ^c
C17:1 c10	0.21 ± 0.01 ^d	0.16 ± 0.01 ^c	0.14 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.01 ^a
C18:0	11.10 ± 0.05 ^a	15.85 ± 0.27 ^c	14.97 ± 0.20 ^b	23.22 ± 0.12 ^d
C18:1 t6-7-8-9	0.37 ± 0.01 ^a	1.35 ± 0.15 ^b	0.30 ± 0.01 ^a	1.25 ± 0.04 ^b
C18:1 t10	0.25 ± 0.06 ^a	3.20 ± 0.75 ^b	0.24 ± 0.03 ^a	3.12 ± 0.25 ^b
C18:1 t11	1.58 ± 0.06 ^a	8.75 ± 0.71 ^b	1.44 ± 0.04 ^a	8.52 ± 0.24 ^b
C18:1 c9	20.70 ± 0.04 ^b	28.57 ± 0.16 ^d	15.01 ± 0.12 ^a	20.94 ± 0.05 ^c
C18:2 t9,12	0.44 ± 0.02 ^a	1.51 ± 0.01 ^c	0.47 ± 0.01 ^b	1.70 ± 0.01 ^d
C18:2 c9,12	1.22 ± 0.02 ^c	1.29 ± 0.02 ^d	0.80 ± 0.01 ^a	1.06 ± 0.02 ^b
C18:3 n6 c6,9,12	0.06 ± 0.01 ^{ab}	0.11 ± 0.03 ^c	0.04 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^{bc}
C18:3 n3 c9,12,15	0.76 ± 0.01 ^d	0.51 ± 0.01 ^c	0.47 ± 0.01 ^b	0.32 ± 0.01 ^a
C18:2 c9,t11	0.70 ± 0.02 ^b	3.36 ± 0.08 ^d	0.43 ± 0.03 ^a	2.22 ± 0.05 ^c
Saturated FA	70.7 ± 0.1 ^c	49.3 ± 0.3 ^a	78.3 ± 0.1 ^d	59.2 ± 0.1 ^b
Unsaturated FA	29.3 ± 0.1 ^b	50.7 ± 0.3 ^d	21.7 ± 0.1 ^a	40.8 ± 0.1 ^c
Monounsaturated FA	25.8 ± 0.1 ^b	43.7 ± 0.4 ^d	19.1 ± 0.1 ^a	35.2 ± 0.1 ^c
Polyunsaturated FA	3.5 ± 0.1 ^b	7.1 ± 0.1 ^d	2.6 ± 0.1 ^a	5.6 ± 0.1 ^c
Total C18:1 <i>trans</i>	2.2 ± 0.1 ^b	13.3 ± 0.1 ^d	2.0 ± 0.1 ^a	12.9 ± 0.1 ^c
Saturated FA + C18:1 <i>trans</i>	72.9 ± 0.1 ^c	62.6 ± 0.2 ^a	80.3 ± 0.1 ^d	72.0 ± 0.1 ^b
C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 <i>trans</i> mean carbon number	16.1 ± 0.1 ^a	16.9 ± 0.1 ^c	16.2 ± 0.1 ^b	16.9 ± 0.1 ^c

[§] all analysis of variance P-value < 0.001. Results displaying different superscript letters by rows are significantly different to Tukey's Honestly Significant Difference test.

Table 1 shows the FA compositions of the bulk TAG recovered from the milks produced by either the cows fed the control diet or the cows fed the linseed-oil-supplemented diet and the compositions of the solid fat fractions separated at 4°C. The supplementation of the cow diet with linseed oil led to a significant decrease of the saturated fatty acid (SFA) content from about 71% to 49% and to an increase in the unsaturated fatty acid (UFA) content of milk fat from about 29% to 51%, i.e. 1.7-fold ($P < 0.001$) (**Table 1**). Such increase in the UFA content of milk fat is important compared with those reported in literature (Glasser et al., 2008; Smet et al., 2010) and confirms the potentialities of lipid-enriched diets to adapt milk fat composition. Regarding monounsaturated FA, the C18:1 c9 rate was 1.4-fold ($P < 0.001$) higher. The content of C18:1 *trans* isomers was increased by a substantial factor of 6 especially due to the high rate of vaccenic acid (C18:1 t11) found at 8.8 % against 1.6% for the control TAG. With respect to polyunsaturated FA, the amount of C18:2 c9,c12 was little changed, the amount of C18:3 c9,c12,c15 decreased while rumenic acid (C18:2 c9,t11) was increased 4.8-fold ($P < 0.001$). The enrichment in unsaturated fatty acids observed for TAG issued

Chapitre II

from the linseed-oil supplemented diet was offset by the decrease in saturated FA content, mainly short-chain (C4:0 and C6:0), medium-chain (C8:0 to C14:0) and C16:0 FA with rates smaller than 1.6-fold, 2.2-fold and 1.8-fold ($P < 0.001$), respectively, compared to the control TAG (**Table 1**). The C18:0 was increased by a factor close to 1.4. The differences in the FA composition of milk TAG observed in this study result from the supplementation of the diet performed with linseed oil, to the metabolism of lipids in the rumen and to the desaturation of FA in the mammary gland. The increase in the C18:1 *c9* content mainly results from desaturation of the C18:0 in the mammary gland. The increase in the C18:2 *c9,t11* results from ruminal biohydrogenation and desaturation of the C18:1 *t11* performed by the delta 9 desaturase (Corl et al., 2001). The low amounts of the essential polyunsaturated FA, linoleic and linolenic acids, and the high amounts of C18:0 and C18:1 *trans* FA in the UFA-enriched TG result from isomerisation and biohydrogenation of the polyunsaturated FA performed by ruminal bacteria (Chilliard et al., 2000; Glasser et al., 2008). As a whole, the milk fat provided by the linseed-oil-supplemented diet undoubtedly contained significant amounts of TAG bearing unsaturated hydrocarbon chains and therefore referred to as UFA-enriched TAG in the following.

The solid fat fractions at 4°C exhibited lower contents of short-chain saturated FA up to C12 length and no change of the C14:0 level compared to the total bulk TAG (**Table 1**). In contrast, the propensity to crystallize of TAG with saturated long-chain FA contributed to increase, in similar proportions for control and UFA-enriched TAG, the amounts of C16:0 (1.8-fold, $P < 0.001$) and C18:0 (close to 1.6-fold) in the solid fractions at 4°C. With respect to monounsaturated FA, while the proportion of the C18:1 *trans* isomers was slightly reduced, the amounts of oleic acid (C18:1 *c9*) recovered in the solid fractions were significantly smaller for both control and UFA-enriched TAG and close to 1.4-fold less (**Table 1**). The contents of polyunsaturated FA C18:2 *c9,c12*, C18:3 *c9,c12,c15* and C18:2 *c9,t11* were decreased from bulks to solid fractions at 4°C as well. In summary, the liquid to solid state transition of TAG at 4°C predominantly involved TAG bearing C14:0, C16:0, C18:0 and C18:1 *trans* FA chains to the detriment of C18:1 *cis* FA ones, whatever the milk source.

Increasing the UFA content of milk fat could also lead to changes in their TAG composition, i.e. type and position of the FA on the glycerol backbone (Gresti et al., 1993). It is expected that an increase in the UFA content would increase the content of UUU and SUU TAG at the expense of the proportion of SSS and SSU compared to control TAG (where U = unsaturated FA and S = saturated FA). Considering UFA, we should precise the *cis* or *trans* geometry since they lead to different physical properties of the FA, i.e. their melting point. The main UFA found in the samples, C18:1 *c9*, is liquid at refrigerated temperature, and then TAG molecules containing C18:1 *c9* may not be present in the solid fat phase. Regarding the *trans* FA, we found that the linseed-oil supplemented diet led to solid fat fractions at 4°C significantly enriched in C18:1 *trans* FA compared to the control diet (6.5-fold, **Table 1**). This means that, as a result of their melting point, TAG molecules containing *trans* FA may be mainly present in the solid fat phase formed at 4°C.

3.2. Size distribution of control and UFA-enriched TAG emulsions

Table 2: Size parameters of control triacylglycerols (TAG) and unsaturated fatty acid (UFA)-enriched TAG emulsions as a function of homogenization pressure.

Composition	Homogenization pressure (Pa)	Emulsion droplet size	Mode ^{a,e} (μm)	d ₃₂ ^{b,e} (μm)	d ₄₃ ^{c,e} (μm)	Specific surface area ^{d,e} (m ² /g fat)
UFA-enriched TAG	40.10 ⁵	Large	1.67 ± 0.01	1.20 ± 0.02	1.72 ± 0.01	5.4 ± 0.1
	200.10 ⁵	Medium	0.59 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.56 ± 0.01	16.1 ± 0.1
	500.10 ⁵	Small	0.18 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.21 ± 0.01	45.3 ± 0.4
Control TAG	50.10 ⁵	Large	1.45 ± 0.01	1.02 ± 0.02	1.45 ± 0.01	6.4 ± 0.1
	200.10 ⁵	Medium	0.55 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.51 ± 0.01	17.7 ± 0.1
	500.10 ⁵	Small	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.20 ± 0.01	48.2 ± 0.1

^a diameter of the most abundant droplets

^b $d_{32} = \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$, where n_i is the number of fat globules of diameter d_i

^c $d_{43} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$, where n_i is the number of fat globules of diameter d_i

^d Specific surface area was calculated as $6 \cdot \varphi / d_{32}$ with φ , the volume fraction of milk fat

^e standard deviations were determined from measurements performed in triplicate

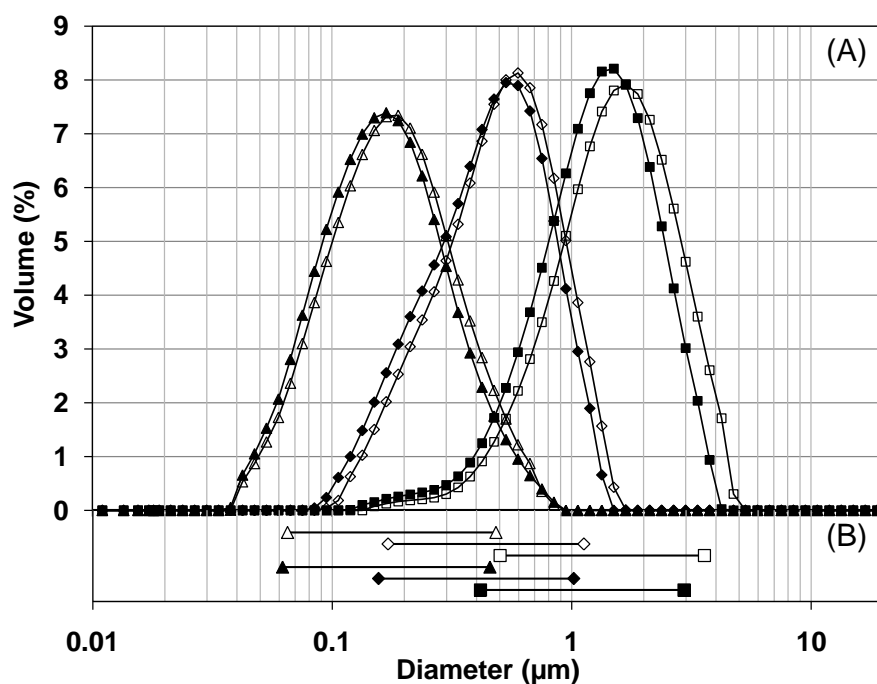


Figure 1. Droplet size distributions (A) and diameter ranges of 95% droplet population (B) characterizing the emulsions prepared from control triacylglycerols (filled symbols) and unsaturated fatty acids-enriched triacylglycerols (empty symbols) by applying homogenization pressures of 40.10⁵ Pa (■), 50.10⁵ Pa (□), 200.10⁵ Pa (◆, ◇) and 500.10⁵ Pa (▲, △), respectively.

Both control and UFA-enriched TAG emulsions formed by high-pressure homogenization showed monomodal size distributions. The diameter ranges were shifted as a function of the applied pressure. The mean diameters corresponded to 1.45 - 1.67 μm for the large droplets, 0.55 – 0.59 μm for the medium-size droplets and 0.17 - 0.18 μm for the small droplets (Fig. 1, Table 2). The mean diameters and specific surface areas were different and interestingly ranked the small-size emulsions as nanoemulsions (Table 2). The size of the emulsion droplets was not significantly dependent on the FA composition. For the two TAG sources studied, three distinct populations of fat droplets were thus obtained, small-size and large-size emulsions which showed no diameter overlapping of 95% of their

droplets and medium-size emulsions with a size distribution which partly overlapped the two others (Fig. 1). When either cooled at 4°C for one week or submitted to heating from 4°C up to 60°C, all the emulsions remained totally stable in droplets size and did not show any signs of coalescence process.

3.3. Melting behavior of control and UFA-enriched TAG in bulk and in emulsions

Bulks and emulsions composed by either control TAG or UFA-enriched TAG were cooled down to 4°C and stored at this temperature for 48 to 60 hours. Under these conditions of storage, partial crystallization of TAG occurred. The melting behavior of the solid fat phase was characterized by recording heating thermograms from 4°C up to 60°C using DSC.

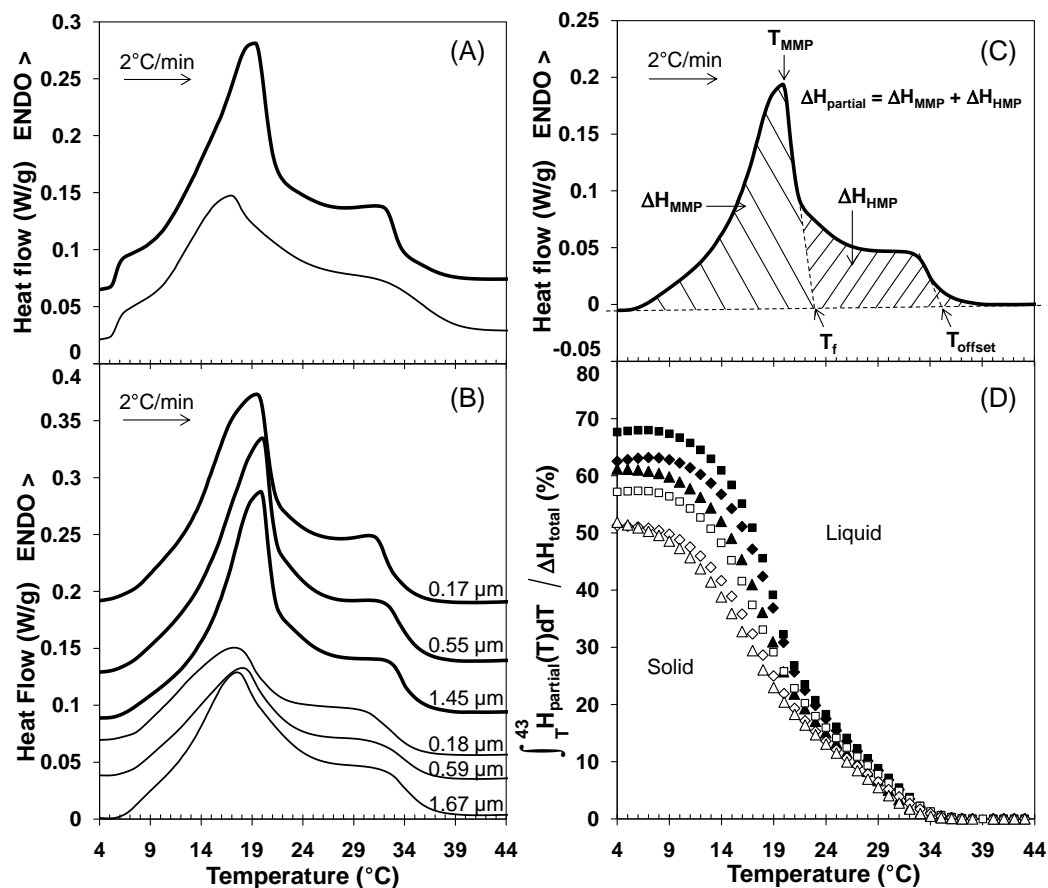


Figure 2. Thermal properties of control and unsaturated fatty acid (UFA)-enriched triacylglycerols (TAG) after storage at 4°C for 48 to 60 hours. Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of (A) bulk TAG and (B) emulsions of control TAG (thick lines) and UFA-enriched TAG (thin lines). Heating scans were performed from -5°C to 60°C at 2°C/min. Heat flow was related to the dry mass of total TAG contained in the sample; thermograms were offset vertically for clarity. (C) Figure illustrating the determination of the thermal parameters from DSC recordings characterizing TAG phase behaviour for large-size-droplet emulsion of control TAG: medium melting point (MMP) temperature (T_{MMP}), offset temperature (T_{offset}), completion temperature of melting for the MMP TAG subpopulations (T_f) kept at the intercept of the tangent to the right side of the main endothermic peak, medium melting point (ΔH_{MMP}), high melting point (ΔH_{HMP}) and partial ($\Delta H_{partial}$) enthalpy variations. (D) Evolution of the ratio of the partial enthalpy variation integrated from temperature T to 43°C to the total melting enthalpy variation (%) versus temperature for control TAG (filled symbols) and UFA-enriched TAG (empty symbols) emulsions with large (■, □), medium (◆, ◇) or small (▲, △) droplet mean diameters indicated on thermograms in (B).

Chapitre II

Very similar profiles in shape with two main broad endothermic peaks were observed whatever the dispersion state of TAG, i.e. bulk vs. emulsion, and FA composition, i.e. control vs. UFA-enriched TAG (**Fig. 2 A,B**). According to previous studies ([Timms, 1980](#); [Marangoni and Lencki, 1998](#); [Lopez and Ollivon, 2009a](#)), these DSC profiles correspond to the melting of two distinct groups of TAG, below and above a critical temperature which has been attributed to the medium melting point of milk TAG. This temperature, noted here T_f , can be evaluated from the end of the mid transition peak as shown in **Fig. 2 C** and interpreted as the melting completion of the medium-melting-point (MMP) group of TAG.

Table 3: Thermal parameters calculated from the differential scanning calorimetry thermograms recorded on heating from 4°C up to 60°C at 2°C/min of the control and unsaturated fatty acids (UFA)-enriched triacylglycerols (TAG) which have been previously stored at 4°C for 48 to 60 hours (mean \pm standard deviation, $n=3$): medium melting point temperature (T_{MMP}), total melting completion temperature (T_{offset}), medium melting point (ΔH_{MMP}), high melting point (ΔH_{HMP}) and partial ($\Delta H_{partial}$) enthalpy variations (in Joules per gram of total dry fat).

Fat source	Droplet size	$T_{MMP} [T_f]^{w\$}$ (°C)	$T_{offset}^{\$}$ (°C)	$\Delta H_{partial}^{x\$}$ (J/g)	$\Delta H_{MMP}^{y\$}$ (J/g)	$\Delta H_{HMP}^{y\$}$ (J/g)	Enthalpy ratios ^{z§} at 4°C (%)
UFA-enriched TAG	Bulk	16.9 ± 0.1^a [24.8 ± 0.7]	38.7 ± 0.1^e	60.9 ± 0.5^c	40.2 ± 0.8^{de}	20.7 ± 1.3^d	68 ± 2^d
	Large	17.4 ± 0.1^b [24.7 ± 0.1]	36.6 ± 0.1^d	51.3 ± 0.6^b	35.3 ± 0.4^b	16.0 ± 0.5^b	57 ± 1^b
	Medium	17.7 ± 0.1^c [23.9 ± 0.5]	36.0 ± 0.3^c	46.1 ± 1.1^a	32.2 ± 0.6^a	13.9 ± 1.2^a	51 ± 2^a
	Small	17.4 ± 0.1^{bc} [24.1 ± 0.5]	35.3 ± 0.1^b	46.6 ± 0.6^a	32.6 ± 0.2^a	14.0 ± 0.8^a	52 ± 1^a
Control TAG	Bulk	19.4 ± 0.2^d [22.4 ± 0.1]	34.7 ± 0.1^a	77.8 ± 1.2^e	51.2 ± 1.3^f	26.6 ± 0.1^f	81 ± 3^e
	Large	20.2 ± 0.1^e [22.4 ± 0.1]	35.8 ± 0.1^c	64.9 ± 1.1^d	41.9 ± 0.9^e	23.0 ± 0.2^e	68 ± 3^d
	Medium	20.1 ± 0.1^e [22.4 ± 0.1]	35.4 ± 0.2^{bc}	60.0 ± 0.8^c	39.2 ± 0.7^{cd}	20.8 ± 0.2^d	62 ± 2^c
	Small	19.6 ± 0.1^d [22.3 ± 0.1]	34.7 ± 0.2^a	58.7 ± 0.6^c	38.7 ± 0.4^c	20.0 ± 0.2^c	61 ± 2^c

^w T_f corresponds to the melting completion of the medium-melting-point TAG (intercept of the tangent to the right side of the main endothermic peak, Fig. 2C)

^x determined from the total areas of the endothermic signals (from 4°C to 43°C) in Fig. 2A,B

^y MMP and HMP enthalpy variations were determined from the partial areas of the endothermic signals in Fig. 2A,B corresponding to the 4°C- T_f and T_f -43°C ranges, respectively (see Fig. 2C)

^z Enthalpy ratios correspond to the ratio of partial melting enthalpy variations ($\Delta H_{partial}$) to total melting enthalpy variation measured in the -40°C to 43°C temperature range from either control or UFA-enriched bulk TAG previously crystallized at -50°C. Total melting enthalpy variations were found equal to 96.1 ± 3.3 and 89.8 ± 1.9 J/g dry fat for control and UFA-enriched TAG, respectively

[§] results displaying different superscript letters by columns are significantly different to Tukey's Honestly Significant Difference test $P < 0.05$.

The high-melting-point (HMP) group of TAG is constituted by all TAG which remain in the solid state above T_f . Temperatures of MMP completion (T_f) were found invariable and equal to 22.4°C for the sample series of control TAG and quasi-constant with an average at 24.3 ± 0.5 °C for the UFA-enriched TAG one (**Table 3**). These critical temperature values ranged both among the typically reported ones for milk fat ([Timms, 1980](#); [Marangoni and Lencki, 1998](#); [Lopez and Ollivon, 2009a](#)). The

second temperature frequently used to characterize the melting behavior of the medium melting point group of TAG is that corresponding to the maximum of the mid transition peak also called medium-melting-point temperature or T_{MMP} (**Fig. 2 C**). This latter as well as total melting offset temperature (T_{offset}) and melting enthalpy variations related either to the total solid phases formed at 4°C ($\Delta H_{partial}$) or to each of the MMP and HMP groups of TAG (ΔH_{MMP} , ΔH_{HMP}) are reported in **Table 3** for bulk and emulsified TAG.

Regarding first TAG in bulk (**Fig. 2A**), all DSC data agreed to show that the increase in UFA content modified the thermal behavior of milk TAG. Melting enthalpy variation ($\Delta H_{partial}$) was significantly reduced by more than 20% ($P < 0.001$). A difference was also observed for the melting enthalpy variation of the total bulk TAG which was decreased from 96.1 J/g down to 89.8 J/g, however by only about 6.5% ($P < 0.001$). Beside possible influence of fatty acid composition and polymorphic forms on the specific latent heat of fusion of TAG, these results mainly suggest the lower propensity of UFA-enriched TAG to crystallize upon storage at 4°C. The solid fractions formed at 4°C for control and UFA-enriched TAG, can be compared on the basis of partial to total enthalpy ratios. Taking into account the fairly homothetic shapes of the thermal events characterizing the control and UFA-enriched TAG, significant differences in these ratios should arise from effective differences in the amounts of solid fraction formed at 4°C, despite the influence of TAG composition on the respective latent heats of fusion. The enthalpy ratio calculated for UFA-enriched TAG in bulk was found of 68 % against 81 % for the control TAG, i.e., smaller by around 16% (**Table 3**). The comparison of ΔH_{MMP} and ΔH_{HMP} however tends to indicate that the relative proportion of MMP and HMP groups of TAG was equivalent for control and UFA-enriched TAG in bulk (30%, $P < 0.001$). The offset temperature of melting was shifted from 4°C toward higher temperature ($P < 0.001$) with the enrichment in UFA and the MMP temperature T_{MMP} was reduced by 2.5°C ($P < 0.001$) (**Fig. 2; Table 3**).

Similar DSC melting profiles with two main endotherms were observed when TAG were dispersed as emulsion droplets. However a significant ($P < 0.001$) decrease i) in the melting enthalpy variations ($\Delta H_{partial}$, ΔH_{MMP} , ΔH_{HMP}) and ii) in the enthalpy ratios calculated at 4°C was determined whatever the FA composition (**Table 3**). These results mean that the dispersion of TAG molecules within confined systems such as emulsion droplets affects their thermal properties. Moreover, the decrease in the melting enthalpy variations and enthalpy ratios at 4°C were significantly more pronounced for the submicronic emulsions with medium (0.55 - 0.59 μm) and small (0.17 - 0.18 μm) droplets showing very close behavior compared with the emulsions with large (1.45 - 1.67 μm) droplet sizes. The enthalpy ratio calculated at 4°C was significantly higher ($P < 0.001$) in the control TAG emulsions than in the UFA-enriched TAG emulsions, with an average at $64 \pm 4\%$ against only $54 \pm 3\%$, respectively. Offset and MMP temperatures were comparatively slightly affected by the emulsion state versus bulk, the tendency being an increase in T_{MMP} and either an increase (control TAG emulsions) or a decrease (UFA-enriched TAG emulsions) in T_{offset} . The solid fat phases formed in the emulsions at 4°C were characterized by distinct melting parameters as a function of FA composition. Namely, all emulsions confounded, T_{MMP} reached $17.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ for UFA-enriched TAG versus $20.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$ for control TAG while T_{offset} was of $35.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $36.0 \pm 0.6^\circ\text{C}$, respectively (**Table 3**). Such differences in the thermal properties show that the FA composition of milk fat affects the

characteristics of the solid fat phase formed upon storage at 4°C, i.e. TAG composition, polymorphic forms, proportion of the solid fat phase.

Changes in the ratios of the melting enthalpy variations as a function of temperature on heating from 4°C to 60°C, also called solid fractions in this paper, are presented in **Fig. 2 D**. These profiles were obtained by direct integration of the heat flow measured during the DSC scans and its normalization to the melting enthalpy variation of the total bulk TAG, therefore by neglecting the variations of latent heats of fusion as a function of the different TAG melting from 4°C (Lopez et al., 2006). In these conditions, the values plotted at 4°C correspond to the enthalpy ratios reported in **Table 3**. Until melting completion temperature of the MMP group of TAG (T_f), the enthalpy ratio of UFA-enriched TAG emulsion remained below that of control TAG ones. Moreover, the larger the emulsion droplet size, the higher the enthalpy ratio value (**Fig. 2D**). For $T > T_f$, the decrease in the enthalpy ratio of the HMP group of TAG was similar for control and UFA-enriched TAG and independent of the size of emulsion droplets.

3.4. *Steady-state X-ray diffraction at 4°C of control and UFA-enriched TAG emulsions*

3.4.1. Identification of the crystalline structures formed at 4°C

The solid fat phases formed upon storage at 4°C for 48 to 60 h of the control and UFA-enriched TAG emulsions were characterized by synchrotron XRD. XRD patterns which were recorded simultaneously at small and wide angles yielded information respectively on the longitudinal organization of TAG in the lamellar structures and on the fatty acid chain packing (polymorphic forms). **Fig. 3** gathers the small (**Fig. 3A**) and wide angles (**Fig. 3B**) XRD patterns which have been recorded at 4°C as a function of the fatty acid composition and emulsion droplet size.

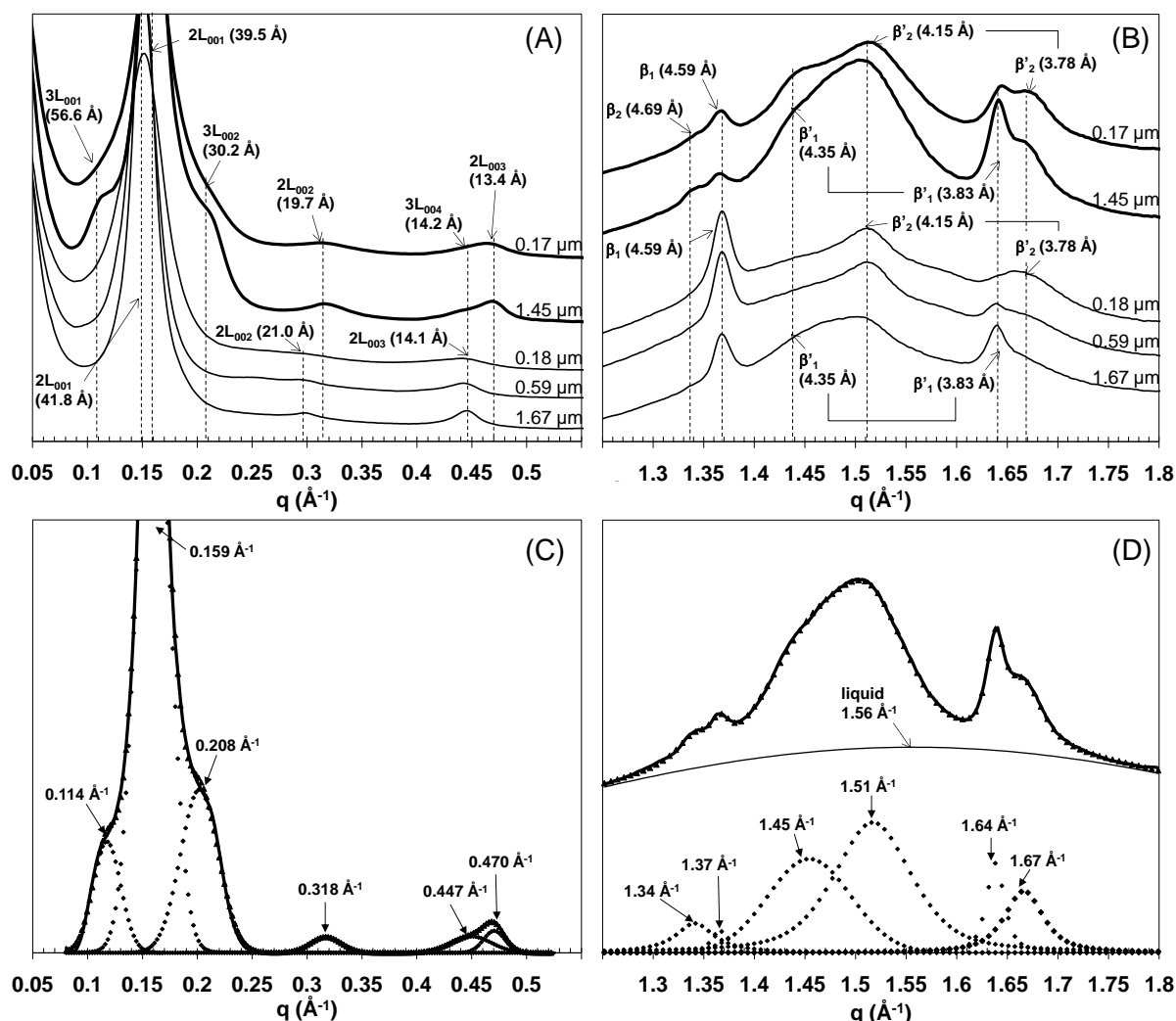


Figure 3. Structural characterization of the solid fat phase formed by control and unsaturated fatty acid (UFA)-enriched triacylglycerols (TAG) dispersed in emulsion droplets upon their storage at 4°C for 48 to 60h. **(A)** Small angles and **(B)** wide angles X-ray diffraction (XRD) patterns of UFA-enriched TAG (thin lines) and control TAG (thick lines) emulsions as simultaneously recorded at 4°C. Mean diameters of emulsion droplets are indicated on the patterns as well as identifications of long-range lamellar structures (A) or short-range hydrocarbon chain arrangements (B). Characteristic distances are in parentheses. Decomposition of the small angles **(C)** and wide angles **(D)** XRD patterns recorded for the control TAG dispersed in large droplets emulsion. The thick line is the experimental pattern, the thin line corresponds to the liquid diffusion bump, the dots correspond to the peak fits and their sum. Peak maxima indicated are expressed in scattering vector q .

Regarding the crystalline structures formed by UFA-enriched TAG, small angle XRD patterns revealed three Bragg reflections located at 41.8 Å, 21.0 Å, and 14.1 Å for the three emulsion droplet sizes studied (**Fig. 3 A**), indicative of a lamellar organization. According to the FA composition of the solid fat fraction at 4°C, this lamellar organization corresponds to a double-chain length stacking with a thickness of 41.8 Å, noted 2L (41.8 Å). At wide angles (**Fig. 3 B**), five diffraction peaks were observed, located at 4.59 Å, 4.35 Å, 4.15 Å, 3.83 Å and 3.78 Å. As the droplet size decreased, the peaks located at 4.35 Å and 3.83 Å decreased and even vanished in the small droplets emulsion, while the area of the peaks at 4.15 Å and 3.78 Å remained constant. Consequently, the peaks located at 4.35 Å and 3.83 Å were attributed to the same β'_2 polymorphic form, while the peaks located at 4.15 Å and 3.78 Å

Chapitre II

were attributed to a β'_1 polymorphic form. However, the peak located at 4.15 Å could also at least partially be related to α polymorphic form. The peak at 4.59 Å was attributed to a β_1 polymorphic form. Therefore, in the UFA-enriched TAG emulsions, the crystalline structures identified at 4°C were 2L (41.8 Å) displaying β_1 , β'_1 and β'_2 subcells.

In the control TAG emulsions, small-angle XRD patterns showed six Bragg reflections located at 56.6 Å, 39.5 Å, 30.2 Å, 19.7 Å, 14.2 Å and 13.4 Å (**Fig. 3 A**). The peaks located at 56.6 Å, 30.2 Å and 14.2 Å sharply decreased as the droplet size decreased compared to the other peaks. These three peaks should therefore originate from the same lamellar structure. According to the FA composition of the solid fraction at 4°C, this structure corresponds to a triple-chain length 3L (56.6 Å) organization. The peaks located at 39.5 Å, 19.7 Å and 13.4 Å were ascribed to the first three diffraction orders of a 2L (39.5 Å) longitudinal structure. At wide angles (**Fig. 3 B**), the XRD patterns showed 6 diffraction peaks located at 4.69 Å, 4.59 Å, 4.35 Å, 4.15 Å, 3.83 Å and 3.78 Å, whatever the size of the emulsion droplets. The peaks at 4.69 Å and 4.59 Å suggest the existence of two β polymorphic forms. As for UFA-enriched TAG emulsions, the other peaks detected at wide-angles were attributed to β'_1 (4.15 Å and 3.78 Å) and β'_2 (4.35 Å and 3.83 Å) polymorphic forms. However, the peak located at 4.15 Å could also at least partially be related to α polymorphic form. In the control TAG emulsions, the crystalline structures identified at 4°C were 2L (39.5 Å) and 3L (56.6 Å) associated to the following four polymorphic forms: β_1 , β_2 , β'_1 and β'_2 . The β_1 , β'_1 and β'_2 polymorphic forms were identified in the emulsion droplets containing the control TAG and the UFA-enriched TAG, whereas the β_2 form associated to the peak at 4.69 Å was only formed in the control TAG emulsions. Thus, the β_2 polymorphic form was probably associated to the 3L (56.6 Å) longitudinal structure in control TAG emulsions. The association of the longitudinal structures to more than one polymorphic form could be due to the existence of more than one structure under the XRD peaks identified at small angles. For example, the 2L (41.8 Å) structure was associated to β'_1 , β'_2 and β_1 polymorphic forms, reinforcing the hypothesis about the existence of more than one 2L structure under the broad XRD peak. Moreover, the divergence from the expected value of 2.0 of the ratio of positions of the first two diffraction orders of the 3L structure could be explained by the presence of several 3L structures as already discussed in the work of [Lopez et al. \(2002b\)](#). The complex crystalline state of the TAG evidenced in the emulsion droplets at 4°C did not allow us to associate unambiguously the polymorphic forms to their respective longitudinal organizations.

The solid fat phases identified in this study after storage of control TAG emulsion droplets at 4°C for 48 to 60h, i.e. 2L (39.5 Å) and 3L (56.6 Å) with the β'_1 , β'_2 , β_1 and β_2 polymorphic forms, are in agreement with the work previously reported by [Söderberg \(1989\)](#) and [Lopez et al \(2002b\)](#). [Söderberg et al. \(1989\)](#) reported that the main structure formed by control TAG within milk fat globules after long-time storage at low temperature was a bilayer with a thickness of 39 Å. [Lopez et al. \(2002b\)](#) studied the crystallization properties of TAG within native milk fat globules and identified 2L (42.5 Å) and 3L (54.2 Å) longitudinal structures, associated to α , β'_1 , β'_2 and β polymorphic forms after storage for $t > 100$ h at 4°C. However, we evidenced the existence of a β_2 polymorphic form in the control TAG emulsions droplets that was not observed within milk fat globules nor anhydrous fat on storage for $t > 100$ h at 4°C ([Lopez et al.,2002b](#)). The formation of β_2 polymorphic form could result i) from the FA

composition, compared to UFA-enriched TAG emulsion droplets; ii) to the segregation of some TAG molecules that may occur in smaller emulsion droplets (1.45 – 0.17 μm) compared to native milk fat globules (4 μm ; [Lopez et al., 2002b](#)), both having a similar FA composition. The differences observed in the thickness of the lamellar structure may arise from the larger size of milk fat globules compared to the emulsion droplets prepared in this study, i.e. 4 μm vs 1.45 and 0.17 μm respectively.

3.4.2. Relative XRD areas related to the solid fat phases formed in the emulsions droplets upon storage at 4°C

The decomposition of the small and wide-angle XRD patterns recorded at 4°C was performed using PeakFit® software to determine the relative XRD areas associated to the different solid phases formed by TAG molecules within emulsion droplets. XRD areas directly reflect the electron density of the TAG molecules forming the considered crystalline organization ([Guinier, 1964](#)). **Fig. 3 C and D** show the decomposition which was performed for the control TAG dispersed in large emulsion droplets (1.45 μm) as an example. For wide-angle XRD, the areas under the Bragg reflections have been determined after removing of the X-ray diffusion bump centered at $1.55 \pm 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ at 4°C, which corresponds to the organization of TAG in their liquid state (**Fig. 3 D**). The XRD area associated with each of the longitudinal stacking and polymorphic form was obtained by summing the areas of all Bragg reflections corresponding to the same crystalline organization. Such analysis of XRD data was previously proposed for milk fat globules ([Lopez et al., 2001b](#)) and bulk milk fat ([Lopez et al., 2001a](#)). The relative XRD areas (in %), for longitudinal organizations of TAG characterized at small angles, are reported in **Table 4** as well as those corresponding to the polymorphic forms identified at wide angles.

Table 4: Relative proportion of the solid fat phases formed in the control triacylglycerols (TAG) and unsaturated fatty acid (UFA)-enriched TAG emulsions after storage at 4°C for 48 to 60 hours. The data were calculated from the relative integrated intensities of Bragg reflections recorded by X-ray diffraction at small and wide angles.

Fat source	Droplet size	Relative XRD areas of the crystalline structures in the solid phase at 4°C (%)					
		Longitudinal stacking		Polymorphic forms			
		2L	3L	β_1	β_2	β'_1	β'_2
UFA-enriched TAG	Large (1.67 μm)	100	0	12	0	31	57
	Medium (0.59 μm)	100	0	27	0	16	57
	Small (0.18 μm)	100	0	30	0	0	70
Control TAG	Large (1.45 μm)	75	25	2	2	27	70
	Small (0.17 μm)	82	18	3	2	20	75

2L: double-chain length organisation; 3L: triple-chain length organisation

Lateral packing of the fatty acid chains: β_1 (4.59 \AA); β_2 (4.69 \AA); β'_1 (4.35 \AA + 3.83 \AA); β'_2 (4.15 \AA + 3.78 \AA)

Longitudinal stacking of triacylglycerols: 2L (39.5 \AA) in the control TAG, 2L (41.8 \AA) in the UFA-enriched TAG; 3L (56.6 \AA)

[Guinier \(1964\)](#) reported that the sum of integrals of the whole diffraction peaks of a phase is roughly proportional to the abundance of the considered solid phase in the material. Hence, the proportionality factors that exist between the different phases need to be taken into account to relate the XRD areas to the proportions of the different crystalline phases ([Mazzanti & Mudge, 2009](#); [Mazzanti et al., 2008](#)). As highlighted in the highly relevant work performed by Mazzanti and

collaborators, the determination of the proportionality factor associated to each phase is highly difficult to perform. Indeed, each crystalline phase formed in the studied fat emulsions, has difference in molecular stacking and polymorphic form, that affect the specific volumes of the TAG molecules, and presumably differs from the others by its TAG composition due to the 4°C-fractionation occurring in the emulsion droplets. However, we were not able to relate the XRD areas to the amount of each of the crystalline structures formed in the emulsion droplets on storage at 4°C. Nevertheless, in this work the comparison of XRD patterns recorded for each sample, especially that of the relative XRD areas, deserved attention since the relationship between the evolution of these parameters versus both FA composition and emulsion droplet size revealed as plainly informative.

Regarding the UFA-enriched TAG, the XRD area related to the β_1 polymorphic form increased in the medium and small droplets compared to the large droplets, i.e. 27 to 30% vs 12% of the total XRD area determined at wide angles, respectively. The XRD area related to the β'_1 polymorphic form decreased as a function of the size of the emulsion droplets and was absent for the small droplets (**Table 4**). The XRD area related to the β'_2 polymorphic form was higher in the small droplets, i.e. 70% vs 57%, compared to the large and medium-size droplets. Thus, decreasing the size of emulsion droplets led to larger relative XRD area of the β and β'_2 polymorphic forms while the XRD area related to the β'_1 forms was smaller. Similar results were observed for the control TAG (**Table 4**). A larger XRD area associated to the β_1 (4.59 Å) crystals was observed in the UFA-enriched TAG emulsions compared to the control TAG emulsions, whereas the XRD area related to the β' polymorphic forms was decreased in the control TAG emulsions (**Fig. 3, Table 4**). Thus, the increase in UFA content seemed to enhance the formation of β crystals in the emulsion droplets to the detriment of β' forms. Regarding the control TAG, the XRD areas associated with the 2L (39.5 Å) and 3L (56.6 Å) structures were significantly different for the large and small droplets emulsions. For the large emulsion droplets, the XRD area for the 3L structure was 25 % of the total XRD area, whereas it was 18 % for the small emulsion droplets. This may have consequences on the physical properties and on the texture of the emulsions.

3.5. *Structural evolution of control and UFA-enriched TAG upon regular heating from 4°C up to 60°C.*

To achieve understanding of the thermal properties of control and UFA-enriched TAG in emulsion, structural organization of the solid fat phase was characterized as a function of temperature in the 4°C - 60°C range, i.e., from the storage temperature up to the complete TAG melting. Time-resolved synchrotron XRD experiments were performed simultaneously with DSC recordings from emulsion droplets allowed to crystallize at 4°C for 48 to 60 h.

The small and wide angles XRD patterns which were recorded upon the heating of UFA-enriched TAG and control TAG dispersed in large and small droplets are displayed in **Fig. 4 and 5**, respectively. **Fig. 6** shows the simultaneous evolution of the short and long range repeat distances which were recorded during the heating of the crystalline structures formed by UFA-enriched TAG (**Fig. 6 A and B**) and control TAG (**Fig. 6 C and D**) dispersed within large (**Fig. 6 A and C**) and small (**Fig. 6 B and D**) emulsion droplets. **Fig. 7** shows the evolution of the maximal intensities of the small

angle XRD peaks (Fig. 7 A and D) and the thermal behavior (Fig. 7 B, C, E and F) of the emulsions containing control TAG and UFA-enriched TAG, which were recorded simultaneously on heating. As the first diffraction order of the 2L (39.5 Å) in the control TAG emulsions overlapped with the first and second diffraction orders of the 3L (56.6 Å) structure, the second diffraction order of the 2L (39.5 Å) was used to determine the evolution of the intensity presented in Fig. 7.

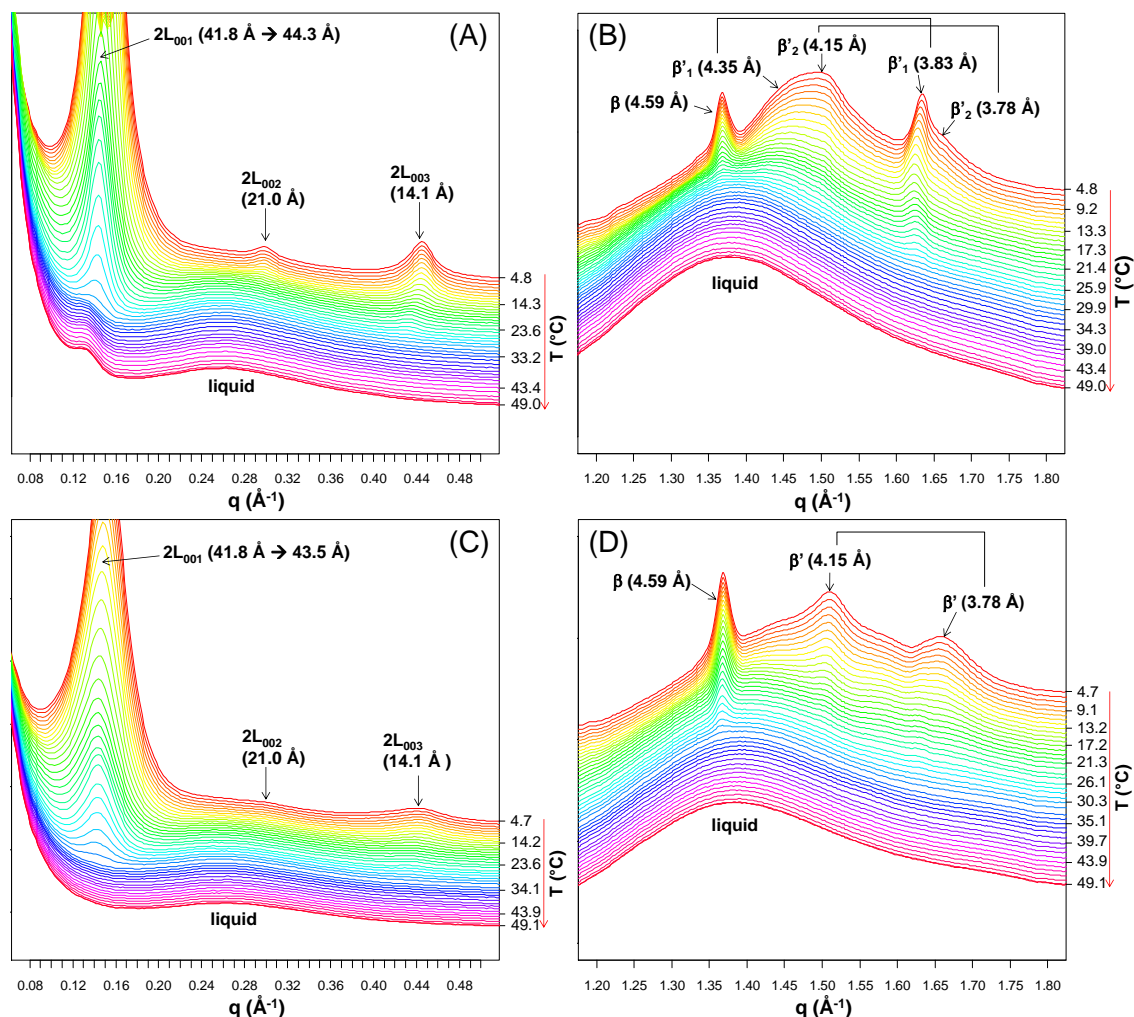


Figure 4. Time-resolved X-ray diffraction patterns recorded as a function of temperature on heating at 2°C/min of the UFA-enriched TAG dispersed (A, B) in large emulsion droplets, i.e. 1.67 μm and (C,D) in small emulsion droplets, i.e. 0.18 μm. Small-angle (A,C) and wide-angle (B,D) acquisitions were performed simultaneously upon sample heating. Identifications of long-range lamellar structures or short-range hydrocarbon chain arrangements are indicated on the patterns (characteristic distances are in parentheses).

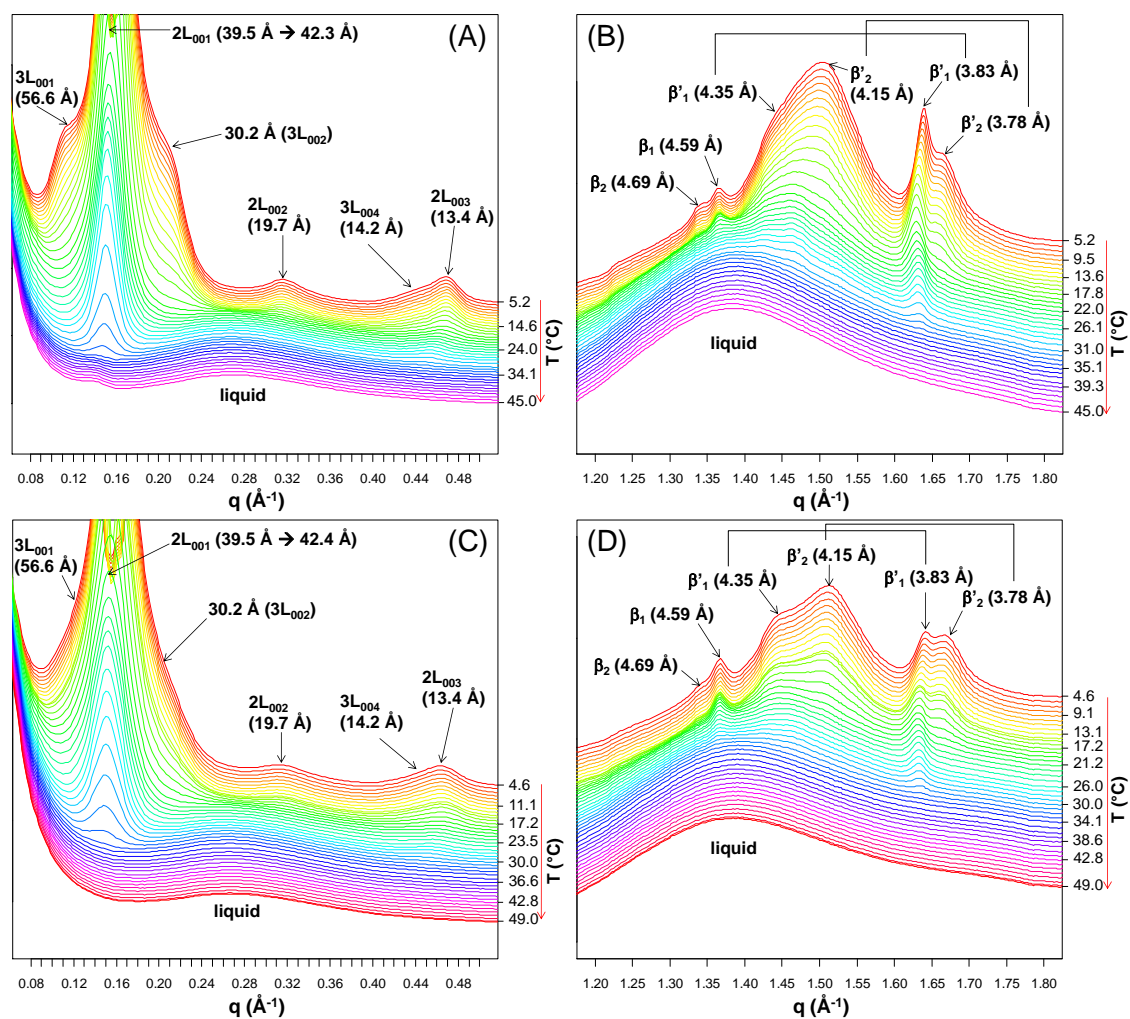


Figure 5. Time-resolved X-ray diffraction patterns recorded as a function of temperature on heating at 2°C/min of the control TAG dispersed **(A, B)** in large emulsion droplets, i.e. 1.45 μm and **(C,D)** in small emulsion droplets, i.e. 0.17 μm . Small-angle (A,C) and wide-angle (B,D) acquisitions were performed simultaneously upon sample heating. Identifications of long-range lamellar structures or short-range hydrocarbon chain arrangements are indicated on the patterns (characteristic distances are in parentheses).

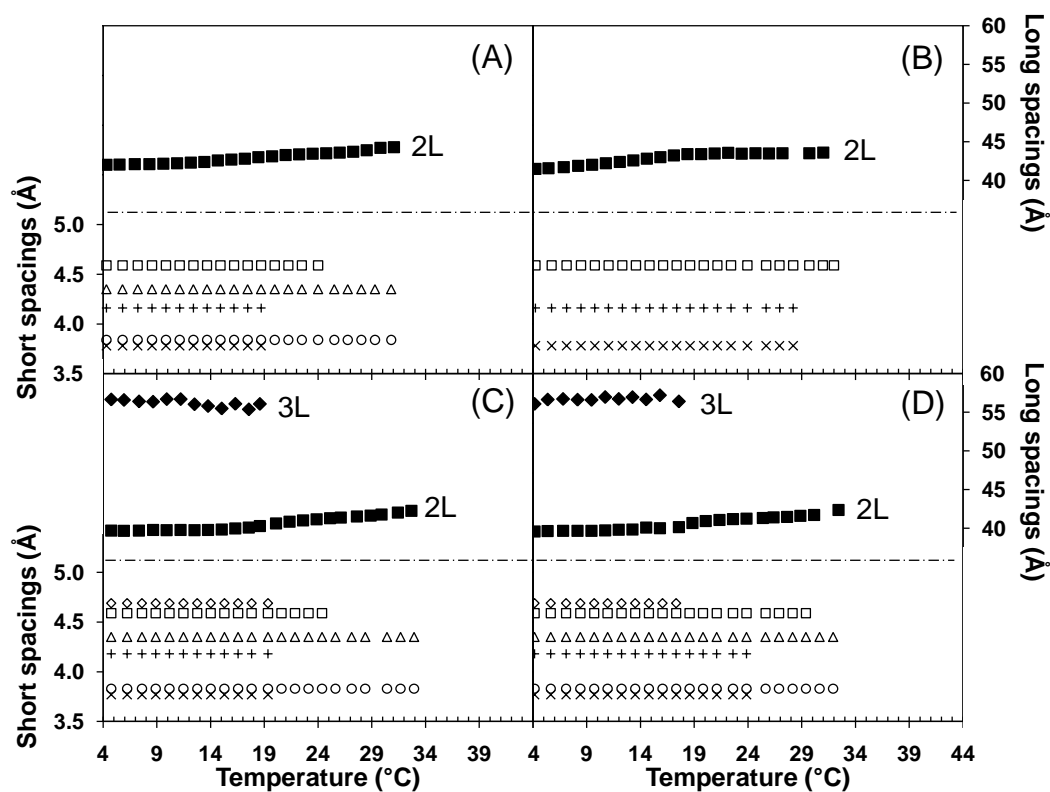


Figure 6. Evolution versus temperature of the repeat distances characteristic of the solid-state structures of UFA-enriched TAG (A,B) and control TAG (C,D) dispersed as either large (1.67 μm (A) and 1.45 μm (C) mean diameters) or small (0.18 μm (B) and 0.17 μm (D) mean diameters) droplet emulsions. The filled symbols correspond to the lamellar spacings attributed to 2L (■) or 3L (◆) structures while the other symbols are related to the inter-reticular distances characterizing the hydrocarbon chain packing of forms β₁ (□), β₂ (◇), β'₁ (Δ,○), β'₂ (+,x).

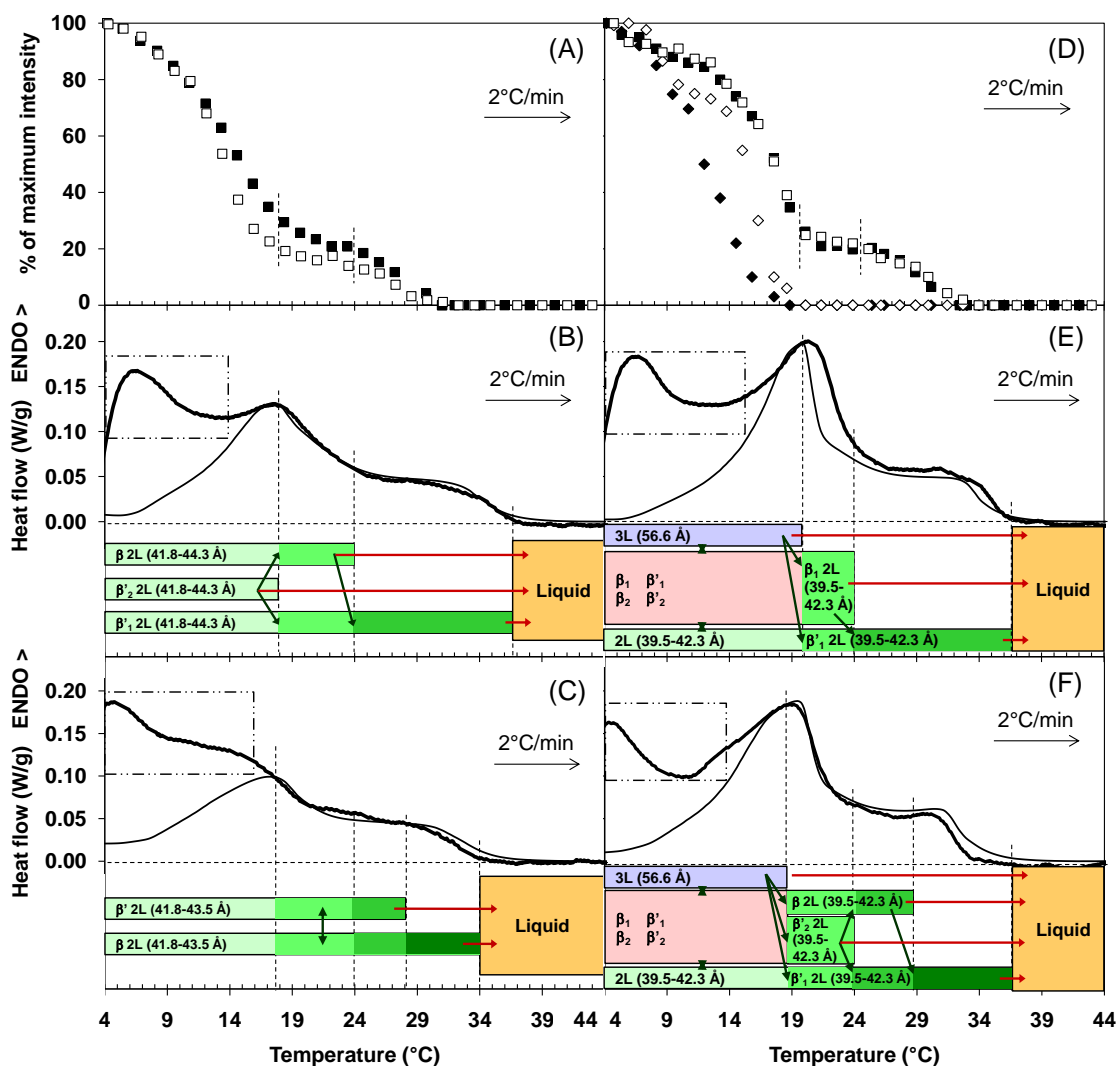


Figure 7. Structural and thermal behavior of triacylglycerols (TAG) emulsions on heating from 4°C to 60°C at 2°C/min, after storage at 4°C for 48 to 60 h. Maximum intensity versus temperature profiles of main Bragg reflections related of the solid-state structures of UFA-enriched TAG **(A)** and control TAG **(D)** dispersed as either large (filled symbols) or small (empty symbols) droplet emulsions (1.67 and 0.18 μm for UFA-enriched TAG emulsions, and 1.45 and 0.17 μm , for control TAG emulsions, respectively). The filled symbols correspond to the large emulsion droplets; 2L₀₀₂ (■, □), 3L₀₀₁ (◆, ◇). DSC thermograms of UFA-enriched TAG recorded for the large droplets 1.67 μm **(B)** and the small droplets 0.18 μm **(C)** emulsions. DSC thermograms of control TAG recorded for the large droplets 1.45 μm **(E)** and the small droplets 0.17 μm **(F)** emulsions; heat flow was related to the dry mass of total TAG contained in the sample; thick lines correspond to the thermograms recorded simultaneously to the XRD experiment, thin lines correspond to the other DSC experiments. The long-range lamellar structures and polymorphic forms identified as a function of temperature are indicated below DSC recordings, as well as the solid to liquid transitions (red colour) and the potential solid to solid transitions (green colour) that may occur on heating of the emulsions.

Considering first the UFA-enriched TAG **(Fig. 4)**, the XRD patterns recorded at small angles for both droplets sizes showed the progressive decrease in intensity of the three diffraction orders arising from the 2L (41.8 Å) longitudinal structure as the temperature increased **(Fig. 4, fig. 6, fig. 7)**. This behavior was interpreted as the progressive melting of the 2L (41.8 Å) structure until melting completion for $T > 32^\circ\text{C}$. In fact, the 2L (41.8 Å) structure showed a three-step melting behavior, with a sharp decrease in peak intensity from 4°C to 18°C, followed by a plateau up to 24°C and a slower

decrease in intensity from 24°C to 32°C (**Fig. 7 A**). The long-range repeat distance of this 2L structure progressively increased from 41.8 Å to 44.3 Å in the large droplets and to 43.5 Å in the small droplets, the main increase being observed in the 16°C to 20°C temperature range (**Fig. 6 A and B**). This increase in the thickness of the lamellar structures could be interpreted as the melting of TAG with shorter FA chains in the emulsion droplets, the remaining crystals containing TAG with longer FA chains ([Lopez et al., 2002a](#)). At wide angles, the XRD patterns of the large droplets showed the simultaneous disappearance at 18°C of the two peaks attributed to the β'_2 polymorphic form (**Fig. 4 B, fig. 6 A**). The peak attributed to the β polymorphic form (4.59 Å), vanished at 24°C. The peaks attributed to the β'_1 polymorphic form (4.35 Å and 3.84 Å), disappeared at 32°C. Thus, the structural behavior on heating of the UFA-enriched TAG dispersed in large droplets (1.67 μm) could be summed up as follows (changes in the FA composition of the liquid phase as a function of temperature T are noted with numbers until final melting of all UFA-enriched TAG noted liquid UFA_{Tf}):

2L (41.8-42.8 Å); subcells β β'_1 β'_2 + liquid UFA_T

-(18°C) → 2L (42.8-43.6 Å); subcells β β'_1 + liquid UFA_{T+1}

-(24°C) → β'_1 2L (43.6-44.3 Å) + liquid UFA_{T+2}

-(32°C) → liquid UFA_{Tf}

In the small droplets of the UFA-enriched TAG emulsion, the structural behavior on heating was different from that observed in the large droplets since no β'_1 polymorphic form was evidenced at 4°C. The XRD patterns recorded at wide angles (**Fig. 4 D**) showed a two-step evolution, with the vanishing of the peak attributed to the β' polymorphic forms at 28°C, while the peaks attributed to the β' polymorphic forms completely disappeared at 32°C (**Fig. 6 B**). The structural behavior on heating of the UFA-enriched TAG dispersed in small droplets (0.18 μm) could therefore be summed up as follows (changes in the FA composition of the liquid phase as a function of the temperature T are noted with numbers until final melting of all UFA-enriched TAG noted liquid UFA_{Tf}):

2L (41.8-43.5 Å); subcells β β' + liquid UFA_T

-(28°C) → β 2L (43.5 Å) liquid UFA_{T+1}

-(32°C) → liquid UFA_{Tf}

The XRD patterns recorded for the control TAG dispersed in the small and large droplets are presented in **Fig. 5**. The XRD patterns recorded at small angles for both droplets sizes showed the progressive decrease in intensity of the peaks attributed to the 3L (56.6 Å) until 20°C (**Fig. 5 A and C, Fig. 7 D**). For temperatures comprised between 20°C and 33°C, only the peaks related to the 2L (39.5-42.3 Å) structure were observed. These results are in agreement with [Lopez et al. \(2002b\)](#) who reported the successive melting of the 3L (54.2 Å) and then 2L (40.5 Å) structures formed during storage at 4°C of milk fat globules and anhydrous milk fat. **Fig. 7 D** shows that the intensity of the peaks related to the 2L (39.5 Å) decreased sharply from 4°C to 20°C, and then slowly until the melting completion of the 2L (39.5 Å) structure. As for the UFA-enriched TAG emulsions, the long-range repeat distance of this 2L longitudinal structure progressively increased from 39.5 Å to 42.3 Å during the heating, in a multiple-step regime with the main increase being within the temperature range 17-21°C (**Fig. 6 C and D, Fig. 7D**). At wide angles, the XRD patterns recorded for the large and small

droplets (**Fig. 5 B and D, Fig. 6 C and D, Fig 7D**) showed the complete disappearance of the peak located at 4.69 Å, related to the β_2 polymorphic form, at 20°C and 18°C, respectively, which are the melting temperatures of the 3L (56.6 Å) (**Fig. 6 C,D**). The peaks attributed to the β'_2 polymorphic form, located at 4.15 Å and 3.78 Å, vanished at 20°C and 24°C in the large and small droplets, respectively (**Fig. 6 C,D**). The peak attributed to the β_1 polymorphic form vanished at 24°C for the large droplets emulsion, and at 29°C for the small emulsion droplets. The peaks attributed to the β'_1 polymorphic form, located at 4.35 Å and 3.83 Å, vanished completely at 33°C in the large droplets (**Fig. 6 C**) and 32°C in the small droplets (**Fig. 6 D**). The structural behavior on heating of the control TAG dispersed in large droplets could therefore be summed up as follows (changes in the FA composition of the liquid phase as a function of temperature T are noted with numbers until final melting of all control TAG noted liquid control_{Tf}):

2L (39.5-40.5 Å) + 3L (56.6 Å); subcells $\beta_1 \beta_2 \beta'_1 \beta'_2$ + liquid control_T
-(20°C)→ 2L (40.5-41.1 Å); subcells $\beta_1 \beta'_1$ + liquid control_{T+1}
-(24°C)→ β'_1 2L (41.1-42.3 Å) + liquid control_{T+2}
-(33°C)→ liquid control_{Tf}

Regarding control TAG dispersed in small droplets, their structural behavior on heating could be summed up as follows:

2L (39.5-40.5 Å) + 3L (56.6 Å); subcells $\beta_1 \beta_2 \beta'_1 \beta'_2$ + liquid control_T
-(18°C)→ 2L (40.5-41.7 Å); subcells $\beta_1 \beta'_1 \beta'_2$ + liquid control_{T+1}
-(24°C)→ 2L (40.5-41.7 Å); subcells $\beta_1 \beta'_1$ + liquid control_{T+2}
-(29°C)→ β'_1 2L (41.7-42.4 Å) + liquid control_{T+3}
-(32°C)→ liquid control_{Tf}

The coupling of small and wide angle XRD recorded as a function of temperature with DSC recordings allowed us to relate the structural information to the thermal behavior of TAG dispersed within emulsion droplets. Comparing the XRD and DSC data, the complete melting of the 2L structures identified in all the emulsion droplets was observed at lower temperatures than the final melting temperature of the TAG determined by DSC. This artifactous lower final melting temperature measured by XRD compared to DSC could be due to the low amount of TAG crystals at this temperature, leading to low probability of emulsion droplets containing TAG crystals going through the X-ray beam. **Fig. 7 B, C, E and F** show the delimitation of temperature domains in which the solid phases exist. On heating, the melting of some compound crystals formed by different TAG species may lead both to a solid to liquid phase transition and to a solid to solid phase transition (Lopez et al., 2009a). The transfer of some TAG from one crystal to another on heating may lead to reorganization in the structural arrangement of the crystals, and to polymorphic transitions, for example from β' to β . The solid to liquid phase transitions and the potential solid to solid phase transitions that may occur on heating are indicated by arrows in **Fig. 7**.

Fig. 8 shows the comparison of XRD areas recorded at small angles upon heating with the thermal events recorded simultaneously. Changes in the XRD areas related to the 2L and 3L phases

formed in the emulsion droplets containing control TAG and UFA-enriched TAG as well as the cumulative melting enthalpies were plotted as a function of temperature. XRD areas related to the 2L phase (UFA-enriched TAG) or the 2L and 3L phases (control TAG) were decreased with increasing temperature.

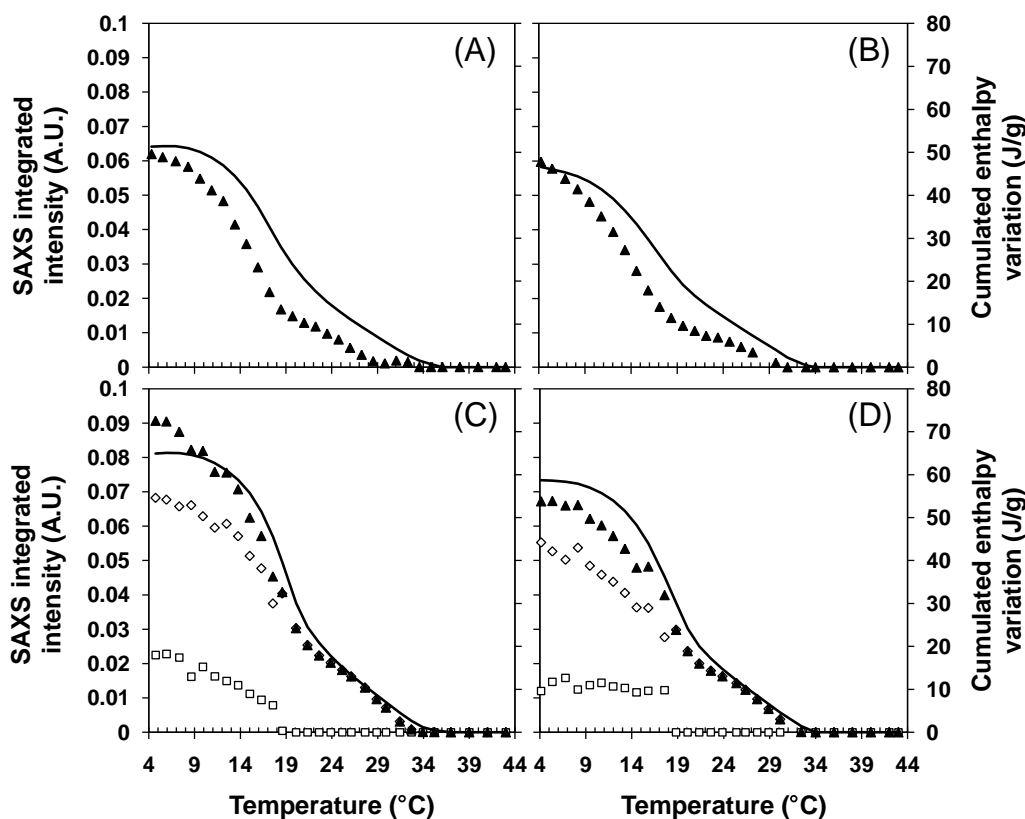


Figure 8. Changes in the X-ray diffraction (XRD) areas related to the longitudinal stackings (\diamond = 2L; \square = 3L; \blacktriangle = total diffracted area) and cumulative melting enthalpy variation determined as a function of temperature for the unsaturated fatty acid (UFA)-enriched triacylglycerols (TAG) (**A** = large droplets, 1.67 μm ; **B** = small droplets, 0.18 μm) and control TAG (**C** = large droplets, 1.45 μm ; **D** = small droplets, 0.17 μm) emulsions. The XRD area corresponding to each phase was determined by integration of the XRD patterns recorded at small angles and by summing the area under Bragg reflections related to the same longitudinal structure.

Interestingly, total XRD area and cumulated melting enthalpy variation exhibited similar evolutions as a function of temperature. This suggests that the proportionality factors between XRD areas the proportions of the 2L and 3L phases (Guinier, 1964; Mazzanti & Mudge, 2009). This may be due to the fact that the 2L and 3L phases are mixed crystals composed of various TAG. This also suggests that a solid fraction (SFC) can be roughly estimated from the enthalpy ratio of complex TAG mixture, considering a mean latent heat of fusion for all TAG, whatever their crystalline form and FA composition.

3.6. *The FA composition and the size of emulsion droplets affect the crystallization properties of milk TAG*

From this study, it is clear that the composition of milk fat can be modified by adding linseed oil in cow diet to increase the UFA content, and that such changes greatly affect the crystallization properties of milk TAG. Moreover, this study reveals that the crystallization behavior of milk TAG dispersed in emulsion droplets is complex. In refrigerated conditions, we identified the coexistence of up to 4 different types of crystals within emulsion droplets. These crystals, which correspond to the segregation of TAG species, are compound crystals. They may result from polymorphic reorganizations within emulsion droplets during the storage at 4°C, as already reported for bulk milk TAG and native milk fat globules (Lopez et al., 2002a & 2002b). The effects of the enrichment in UFA and emulsion droplet size on the solid fat phase formed by milk TAG are particularly discussed below.

3.6.1. Influence of the FA composition on the characteristics of the solid fat phase formed by milk TAG

The enrichment in UFA content affected the thermal behavior and the crystallization properties of milk TAG in bulk and in emulsion. The enrichment in UFA from 29 to 51% significantly decreased the enthalpy ratio at 4°C compared to control TAG, i.e. from 81% to 68% in bulk. Although controversies exist, several authors reported that DSC is a valuable method to estimate the solid contents of fats by calculating the ratio of the partial to the total heat of fusion determined over the whole melting range of the fat (Norris and Taylor, 1977; van Beresteyn, 1972). Studies showed that the solid fat contents estimated by DSC are higher than the corresponding NMR values (Norris and Taylor, 1977; Lambelet, 1983a; Lambelet, 1983b; van Beresteyn, 1972). This difference may be primarily attributed to the fact that DSC method does not take into account for differences in the heats of fusion of different TAG (Norris and Taylor, 1977) nor for the different polymorphic forms and transition that can occur during the thermal treatment (van Beresteyn, 1972). Then, the enthalpy ratios determined in our study (i.e. from 81% to 68% in bulk) cannot be solely related to the solid fat content. Using NMR, Walstra and van Beresteyn (1975) determined a SFC of 54% in bulk fat stored for 24 h at 0°C. Smet et al. (2010) measured a decrease in the solid fat content (SFC) from 60% to 46% at 5°C when the UFA content of milk fat was increased from 28.2 to 38.7%. As expected, the enthalpy ratios that we determined using DSC are higher than the SFC reported by Smet et al. (2010) and by Walstra and van Beresteyn (1975) using NMR. However, according to Smet et al. (2010), the decrease in the enthalpy ratios that we measured may be at least partially related to a decrease in the solid fat content for UFA-enriched TAG. In emulsion, we found a decrease in the enthalpy ratio from $64 \pm 4\%$ to $54 \pm 3\%$ whatever the fat droplet size when the UFA content of TAG increased (Table 3).

The coupling of DSC and XRD experiments allowed us to determine the thermal properties as a function of temperature and to identify the crystalline structures. We showed that the enrichment in UFA affected the type of crystalline structures that were formed in refrigerated conditions. Upon storage at 4°C, control TAG crystallized in 2L (39.5 Å) and 3L (56.6 Å) lamellar structures with 4 polymorphic forms, i.e. β_1 , β_2 , β'_1 , β'_2 , while UFA-enriched TAG crystallized in 2L (41.8 Å) lamellar structure displaying 3 polymorphic forms, i.e. β_1 , β'_1 and β'_2 . The absence of 3L longitudinal stacking in

Chapitre II

the UFA-enriched TAG emulsions was surprising. Indeed, it has been previously reported in the literature that 3L structures are constituted by TAG with an irregularity in their structure, namely containing long-chain unsaturated *cis* FA and/or short chain FA (Larsson, 1994). Hence, we could have expected more 3L crystalline structures in the UFA-enriched TAG emulsions compared to control TAG emulsions. We also showed that the UFA-enriched TAG emulsions had significantly lower melting enthalpy variations ($\Delta H_{\text{partial}}$, ΔH_{MMP} , ΔH_{HMP}) and enthalpy ratios compared to the control TAG emulsions. Thus, it is possible that the enrichment in UFA decreased the melting point of SUU or UUU TAG compared to SSU TAG. Hence, some TAG composed by UFA may not be in the solid state upon storage of the emulsion droplets at 4°C.

Whatever the FA composition of TAG and the size of emulsion droplets, the main crystalline structures formed by TAG molecules within emulsion droplets were 2L lamellar structures. The thickness of these 2L structures was 2 to 2.5 Å higher for the UFA-enriched TAG emulsions than for the control TAG emulsions on the whole temperature range during the heating from 4°C to the melting completion. At 4°C in particular, the thickness of this 2L longitudinal structure was 41.7 Å for UFA-enriched vs. 39.5 Å for control TG dispersed in the large emulsion droplets. The differences in the thickness of the 2L lamellar structures could be related to the FA composition of the TAG implicated in these 2L structures. To check this hypothesis, we considered i) that 2L structures are mainly formed by high-melting temperature long-chain saturated FA with a difference in the carbon number below 4 among them (Larsson, 1994), and ii) that the linear chain structure of C18:1 *trans* FA integrated 2L structures (Van Mechelen et al., 2008). The calculation of the mean FA carbon number of the combined C14:0, C16:0, C18:0 and C18:1 *trans* FA from the FA composition analysis of the solid fractions of TAG at 4°C corresponded to 16.2 ± 0.1 in control TAG vs 16.9 ± 0.1 in UFA-enriched TAG (difference = 0.7 atoms of carbon). On the other hand, taking into account the carbon-carbon distance of 1.27 Å along the longitudinal axis of the FA chains (Small, 1986), it was possible to evaluate the carbon number implicated in a layer of the 2L structures for the control TAG and UFA-enriched TAG emulsions from the repeat distances determined by XRD: $39.5 / (2 * 1.27)$ vs $41.7 / (2 * 1.27)$ respectively, leading to mean carbon numbers of 15.6 and 16.4 respectively. The difference in the number of carbon atoms in a layer was 0.8 carbons (we did not consider any angle of tilt of the TAG molecules). Since the difference in the mean FA carbon number calculated from the FA composition is close to the difference from the structural data, we showed that the TAG molecules crystallized in the 2L crystals after storage at 4°C for $t > 48\text{h}$ contain longer FA chains for UFA-enriched TAG emulsions compared to control TAG emulsions.

Regarding the polymorphic forms, the high XRD area related to the β form in the UFA-enriched TAG emulsions could be due to the segregation in the solid phase of C18:1 *trans* fatty acids, the amount of which was more than 6-fold higher in the UFA-enriched TAG than in the control TAG solid fractions at 4°C (Table 1). Indeed, *trans* fatty acids are known to have melting point and melting enthalpy variations much more comparable to saturated fatty acids than to *cis* UFA (Perron, 1986; Wesdorp, 1990) and thus to adopt similar crystalline structures able to accommodate to form β polymorphic form (Larsson, 1994, Van Mechelen et al., 2008).

3.6.2. Influence of the emulsion droplet size on the mechanisms of TAG crystallization

We showed that, compared to bulk TAG, the dispersion of TAG within emulsion droplets and the size of emulsion droplets affected the thermal properties and the enthalpy ratios recorded on heating from 4°C up to 60°C. Moreover, the size of emulsion droplets affected the type of crystals that were formed. Hence, the crystallization behavior of milk fat is greatly affected by its dispersion state. These differences may be explained by the theory of nucleation in dispersed systems. In emulsions, at least one nucleus must be formed in each droplet to achieve full crystallization and the time needed to obtain the nucleus is inversely proportional to droplet volume. Consequently, higher supercooling is needed to induce crystallization in a dispersed system with small fat droplets (Walstra and van Beresteyn, 1975). Upon storage for 48 to 60 h, the proportion of fat globules crystallized in the large droplets emulsion may be higher than in the medium and small droplets. Whatever the FA composition, the melting enthalpy variations ($\Delta H_{\text{partial}}$, ΔH_{MMP} , ΔH_{HMP}) decreased and the enthalpy ratios decreased by 5 to 7% between the large droplets (1.45-1.67 μm) and the small droplets (0.17-0.18 μm) (Table 3). Campbell et al. (2002) reported that the solid fat content of emulsified lard TAG depends on the droplet size after isothermal crystallization equilibration at different temperatures. The lower the droplet size, the lower the solid fat fraction. They interpreted this to the mechanism of nucleation and degree of undercooling. Palanuwech et al (2003) suggested the dependence of the fraction of droplets crystallizing by heterogeneous nucleation on the mean droplet diameter. They reported that confectionary coating fat emulsified by sodium caseinate crystallized by heterogeneous nucleation for droplets with a mean diameter > 5 μm , and via homogeneous nucleation at lower temperature for droplets with a mean diameter < 1 μm . This led to lower nucleation kinetics, which could explain the decrease of solid fat content as the droplet size decreased. In this work, the relative decrease in the melting enthalpy variations ($\Delta H_{\text{partial}}$) and in the enthalpy ratios observed when the size of the fat droplets was reduced should indicate hindering to fat solidification (Campbell et al., 2002), despite it was approximated by assuming invariable latent heat of fusion.

Moreover, the mechanisms of TAG crystallization in emulsion may be affected by the size of the droplets due to the curvature of their interface or indirectly to fast relaxation due to supercooling and crystallization in each droplet that can induce more defects in the crystal structure or lead to the segregation of TAG molecules in solid fat phases. Authors reported that the type of crystals and the degree of the organization of milk TAG molecules within the crystals may be different within native milk fat globules of various sizes covered by their biological membrane (Michalski et al., 2004) and within emulsion droplets of various sizes covered by proteins (Lopez et al., 2002a). The size of emulsion droplets affected the final melting temperature of the emulsions: small droplets melted with a lower T_{offset} compared to large droplets (Table 3). This is in agreement with Bunjes et al. (2000) who reported that decreasing particle size leads to shifts of TAG melting to lower temperatures. Montenegro et al. (2003) attributed the decrease in final melting temperature of alkanes dispersed in emulsion droplets when the droplet size decreased from 500 to 100 nm to a reduction in surface curvature and to crystal structure.

The size of emulsion droplets affected the crystalline structures formed by control TAG and UFA-enriched TAG. The decrease in emulsion droplet size led to an increase in the XRD area related

to the β_1 polymorphic form characterized by the XRD peak at 4.59 Å and a decrease in the XRD area related to the β'_1 polymorphic form characterized by the XRD peaks at 4.35 Å and 3.83 Å with an absence of this polymorphic form in the smallest droplets of UFA-enriched TAG. Whatever the FA composition, the XRD area related to the β'_2 polymorphic structure was little affected by the size of the emulsion droplets. These results could be related to the work of [Montenegro et al \(2003\)](#), who estimated that below a critical size of about 250 nm, the confinement has a strong influence on the crystalline structure of C18 to C24 even alkanes in emulsion. However, they showed that the confinement in small droplets changes the crystal structure from a triclinic to an orthorhombic structure. This is not in agreement with our observations. These differences may be explained by the composition of the lipid phase. In our study where the fat phase is composed by mixtures of complex TAG, the confinement in small emulsion droplets seems to enhance the segregation of some TAG and the formation of β (triclinic) polymorphic form to the detriment of β' (orthorhombic) polymorphic form.

4. Conclusions

Dairy TAG can be enriched in UFA to face new nutritional quality standards. Thanks to the coupling between synchrotron X-Ray diffraction and differential scanning calorimetry, we showed that at the temperature of storage of dairy products, i.e. 4°C, UFA-enriched TAG dispersed within emulsion droplets presented different crystalline structures as well as lower melting enthalpy variations and enthalpy ratios than control TAG. The size of emulsion droplets also proved to modify the crystallization properties of TAG at 4°C after 48 h storage. Small droplets of about 0.18 μm slightly decreased the melting enthalpy variation and enthalpy ratio at 4°C and altered the crystals stability. Understanding the crystallization properties of dairy TAG in emulsion droplets is of great importance in terms of fundamental knowledge on lipid crystallization in confined systems and for industrial applications to better understand and control the functional properties of dairy products enriched in UFA.

Acknowledgements

This work was funded by the French association for research (ANR, Paris, France) in the National Program for Food Research and the French dairy board (ARILAIT Recherches / CNIEL, Paris, France) in the AGILAIT project (ANR-06-PNRA-012). The authors thank the French dairy board ARILAIT Recherches / CNIEL and ANRT for funding the PhD thesis of S. Bugeat. The authors thank synchrotron SOLEIL for allocating beamtime on the SWING beamline (proposal 20080314; C. Lopez), as well as A. Buléon (INRA, BIA, Nantes, France) and all the members of the Scientific Users Committee of INRA. Prof. G. Mazzanti (Guelph, Canada) is acknowledged for stimulating discussions about the proportionality factors between XRD area and amount of the phases. S. Bouhallab (INRA, STLO, Rennes, France) is warmly acknowledged for his support and F. Rousseau for help in the laser light scattering experiments.

References

- Blanton, T.N., Barnes, C.L., & Lelental, M. (2000). Preparation of silver behenate coatings to provide low- to mid-angle diffraction calibration. *Journal of Applied Crystallography*, 33, 172-173.
- Ben Amara-Dali, W., Lopez, C., Lesieur, P., & Ollivon, M. (2008). Crystallization properties and polymorphism of triacylglycerols in goat's milk fat globules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4511-4522.
- Bobe, G., Hammond, E.G., Freeman, A.E., Lindberg, G.L., Beitz, D.C. (2003). Texture of butter from cows with different milk fatty acid compositions. *Journal of Dairy Science*, 86, 3122-3127.
- Bunjes, H., Koch, M.H.J., & Westesen, K. (2000). Effect of particle size on colloidal solid triglycerides. *Langmuir*, 16, 5234-5241.
- Campbell, S.D., Goff, H.D., & Rousseau, D. (2002). Comparison of crystallization properties of a palm stearin/canola oil blend and lard in bulk and emulsified form. *Food Research International*, 35, 935-944.
- Chen, S., Bobe, G., Zimmerman, S., Hammond, E.G., Luhman, C.M., Boylston, T.D., Fremman, A.E., & Beitz, D.C. (2004). Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acids compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3422-3428.
- Chilliard, Y., Frelay, A., Mansbridge, R.M., & Doreau, M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annals of Zootechnology*, 49, 181-205.
- Christie, W. W. (1995) In *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 2, Lipids, 2nd ed. P. F. Fox, ed. Chapman & Hall, London, UK.
- Corl, B.A., Baumgard, L.H., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Phillips, B.S., & Bauman, D.E. (2001). The role of delta 9 desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 622-630.
- Fredrick, E., Walstra, P., and Dewettinck, K. (2010). Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 153, 30-42.
- Glasser, F., Ferlay, A., & Chilliard, Y. (2008). Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 91, 4687-4703.
- Goff, H. D. (1997). Instability and partial coalescence in whippable dairy emulsions. *Journal of Dairy Science*, 80, 2620-2630.
- Gabielle-Madellmont, C., & Perron, R. (1983). Calorimetric studies on phospholipid-water systems. 1. DL-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)-water system. *Journal of Colloid Interface Science*, 95, 471-482.
- Gresti, J., Bugaut, M., Maniongui, C., & Bezard, J. (1993). Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat. *Journal of Dairy Science*, 76, 1850-1869.
- Guinier, A. (1964). In *Théorie et pratique de la radiocristallographie*. (3rd ed.) Paris: Dunod.
- Jensen, R.G., & Newburg, D.S. (1995) *Handbook of Milk Composition*. R.G. Jensen ed.
- Joint FAO/WHO Expert Consultation. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO technical report series 916 (pp. 3-108). Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Chapitre II

- Kaylegian, K.E., & Lindsay, R.C. (1994). In Handbook of milk fat fractionation technology and application. AOCS Press, American Association of oil chemists, Champaign, IL.
- Keys, A. (1970). Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, 41, 1162-1175.
- Lambelet, P. (1983a). Comparison of N.M.R. and D.S.C. methods for determining solid content of fats. Application to milk-fat and its fractions. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 16, 90-95.
- Lambelet, P. (1983b). Comparison of NMR and DSC methods for determining solid fat content of fats: Application to cocoa butter and its admixtures with milk fat. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 16, 200-202.
- Larsson, K. (1994). In *Lipids: molecular organization, physical functions and technical applications*. The oily press.
- Lavigne, F., Bourgaux, C., & Ollivon, M. (1993). Phase transition of saturated triglycerides. *Journal de Physique IV*, 3, 137-140.
- Lavigne, F., & Ollivon, M. Milk fat and its fractions. (1997). *OCL-Oléagineux Corps Gras Lipides*, 4, 212-219.
- Lopez, C., Lesieur, P., Keller, G., & Ollivon, M. (2000). Thermal and structural behavior of milk fat. 1. Unstable species of cream. *Journal of Colloid and Interface Science*, 229, 62-71.
- Lopez, C., Lesieur, P., Bourgaux, C., Keller, G., & Ollivon, M. (2001b). Thermal and structural behavior of milk fat. 2. Crystalline forms obtained by slow cooling of cream. *Journal of Colloid and Interface Science*, 240, 150-161.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Bernadou, S., Keller, G., & Ollivon, M. (2002a) Thermal and structural behavior of milk fat. 3. Influence of cooling rate and droplet size on cream crystallization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 254, 64-78.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., & Ollivon, M. (2002b). Crystalline structures formed in cream and anhydrous milk fat at 4°C. *Lait*, 82, 317-335.
- Lopez, C., Karray, N., Lesieur, P. & Ollivon, M. (2005). Crystallisation and melting properties of dromedary milk fat globules studied by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry. Comparison with anhydrous dromedary milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 673-683.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Camier, B., & Gassi, J.-Y. (2006). Milkfat thermal properties and solid fat content determined during the ripening of emmental cheese. A differential scanning calorimetry study. *Journal of Dairy Science*, 89, 2894-2910.
- Lopez, C., Briard-Bion, V. (2007a). The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products. *Lait*, 87, 317-336.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., & Besle, J-M. (2008). Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5226-5236.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P. & Ollivon, M. (2007b). Coupling of time-resolved synchrotron X-ray diffraction and DSC to elucidate the crystallisation properties and polymorphism of triglycerides in milk fat globules, *Lait*, 87, 459-480.

Chapitre II

- Lopez, C., & Ollivon, M. (2009a). Triglycerides obtained by dry fractionation of milk fat. 2. Thermal properties and polymorphic evolutions on heating. *Chemistry and Physics of Lipid*, 159, 1-12.
- Marangoni, A.G., & Lencki, R.W. (1998). Ternary phase behavior of milk fat fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3879-3884.
- Mazzanti, G., Marangoni, A.G., Idziak, S.H.J. (2008) Modeling of a two-regime crystallization in a multicomponent lipid system under shear flow. *European Physical Journal E*, 27, 135-144.
- Mazzanti, G., & Mudge, E.M. (2009) Development of a rheo-NMR system to study the crystallisation of bulk lipids under shear flow. In: *Magnetic Resonance in Food Science*. Gudjonsdottir, M., Belton, P.S., Eds. Royal Society of Chemistry, London.
- Michalski, M.C., Briard, V., & Michel, F. (2001). Optical parameters of milk fat globules for laser light scattering measurements. *Lait*, 81, 787-796.
- Michalski, M.C., Ollivon, M., Briard, V., Leconte, N., & Lopez, C. (2004). Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior. *Chem. Phys. Lipids*, 132, 247-261.
- Montenegro, R., & Landfester, K. (2003). Metastable and stable morphologies during crystallization of alkanes in miniemulsion droplets. *Langmuir*, 19, 5996-6003.
- Mulder, H., & Walstra, P. (1974), *The milk fat globule: emulsion science as applied to milk fat products and comparable foods*. North Holland, Amsterdam.
- Norris, R., Taylor, M.W. (1977) Comparison of NMR and DSC methods for the estimation of solid fat content. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 12, 160-165.
- Noakes, M.; Nestel, P.J.; & Clifton, P.M. (1996). Modifying the fatty acid profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63, 42-46.
- Ollivon, M. (1992) In *Manuel des Corps Gras*. Karleskind, A., Wolff, J. P., Guttman, J. F., Eds. Lavoisier Paris.
- Ollivon, M., Keller, G., Bourgaux, C., Kalnin, D., Villeneuve, P., & Lesieur, P. (2006). DSC and high resolution X-ray diffraction coupling. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 85, 219-224.
- Ollivon, M., & Perron, R. (1992) In *Manuel des Corps Gras*. Karleskind, A., Wolff, J. P., Guttman, J. F., Eds. Lavoisier Paris.
- Palanuwech, J., & Coupland, J.N. (2003). Effect of surfactant type on the stability of oil-in-water emulsions to dispersed phase crystallization. *Colloids and Surfaces A*, 223, 251-262.
- Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D., & Barbano, D.M. (1993). Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science*, 76, 1753-1771.
- Park, P.W., & Goins, R.E. (1994). In Situ Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods. *Journal of Food Science*, 59, 1262-1266.
- Perron, R.R. (1986). Tentative prevision for the thermal behavior of a fat, as a function of its triglyceride composition. 1. Principle and elaboration. *Revue Française des Corps Gras*, 33, 195-204.
- Rousseau, D. (2000). Fat crystals and emulsion stability – a review. *Food Research International*, 33, 3-14.

Chapitre II

- Small, D.M. (1986). In Handbook of lipid research. The physical chemistry of lipids. From alkanes to phospholipids. Plenum press, New-York.
- Smet, K., J. De Block, P. Van der Meeren, K. Raes, K. Dewettinck, and K. Coudijzer. (2009). Influence of milk fatty acid composition and process parameters on the quality of ice cream. Dairy Science & Technology, 90, 431-447.
- Smet, K., Coudijzer, K., Fredrick, E., De Campeneere, S., De Block, J., Wouters, J., Raes, K., & Dewettinck, K. (2009). Crystallization behavior of milk fat obtained from linseed-fed cows. Journal of Dairy Science, 93, 495-505.
- Söderberg, I., Hernqvist, L., & Buchheim, W. (1989). Milk fat crystallization in natural milk fat globules. Milchwissenschaft, 44, 403-406.
- Timms, R. E. (1980). The phase behavior and polymorphism of milk fat, milk fat fractions, and fully hardened milk fat. Australian Journal of Dairy Technology, 35, 47-53.
- van Beresteyn, E.C.H. (1962) Polymorphism in milk fat in relation to the solid/liquid ratio. Netherlander Milk Dairy Journal, 26, 117-130.
- Van Mechelen, J.B., Peschar, R., & Schenk, H. (2008). Structures of mono-unsaturated triacylglycerols. III. The b-2 polymorphs of trans-mono-saturated triacylglycerols and related fully saturated triacylglycerols. Acta Crystallographica B, 64, 240-248.
- Walstra, P., & van Berensteyn, E.C.H. (1975). Crystallization of milk fat in the emulsified state. Netherlands Milk Dairy Journal, 29, 35-65.
- Wesdorp, L.H. (1990) Liquid-multiple solid phase equilibria in fats, Ph.D. Thesis, Delft University, Netherlands
- Wright, A.J., Scanlon, M.G., Hartel, R.W., & Marangoni, A.G. (2001). Rheological properties of milkfat and butter. Journal of Food Science, 66(8), 1056-1070.
- Zeberg-Mikkelsen, C.K., & Stenby, E.H. (1999). Predicting the melting points and the enthalpies of fusion of saturated triglycerides by a group contribution method. Fluid Phase Equilibria, 162, 7-17.

IV. CONCLUSION

Ce deuxième chapitre nous a permis d'étudier les propriétés de cristallisation des triacylglycérols laitiers dont la composition en acides gras était modifiée dans des systèmes émulsionnés, en particulier les globules gras laitiers natifs. D'après nos observations, le polymorphisme des triacylglycérols laitiers dans les globules gras est relativement proche de celui des mêmes triacylglycérols en milieu anhydre. Comme observé en milieu anhydre, nous avons ici mis en évidence que le taux de matière grasse solide dans les globules gras natifs de composition enrichie en acides gras insaturés était inférieur à celui dans les globules gras de composition témoin classique.

De plus, l'étude du polymorphisme de ces triacylglycérols dans des gouttelettes d'émulsion de diamètre inférieur au micromètre nous a montré que les types de cristaux formés à 4°C après un stockage de plus de 48 h étaient différents de ceux observés dans des gouttelettes de diamètre supérieur, plus proches structurellement des globules gras natifs. Pour des émulsions à petites tailles de gouttelettes, nos résultats, en accord avec la littérature, tendent à montrer que le mécanisme de nucléation des cristaux de triacylglycérols est différent de celui rencontré dans les globules gras natif du fait d'un confinement plus important.

A 4°C particulièrement, nous avons observé une forte différence de structuration de la matière grasse cristallisée entre des triacylglycérols laitiers de composition témoin classique en acides gras et des triacylglycérols laitiers enrichis en acides gras insaturés. Ces différences se placent à plusieurs niveaux : les types de cristaux ne sont pas les mêmes (formes polymorphiques et structures longitudinales différentes), et il semblerait que les taux de matière grasse solide soient également différents. Afin d'étudier plus en détail les effets de composition en acides gras des triacylglycérols sur leurs propriétés de cristallisation à 4°C, nous avons effectué un fractionnement physique de plusieurs matières grasses anhydres (témoins et enrichies en acides gras insaturés) à cette température puis nous avons étudié les propriétés de cristallisation des fractions produites par différentes techniques physiques. Ces résultats sont détaillés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III :
PROPRIETES DE CRISTALLISATION DES FRACTIONS DE MATIERE
GRASSE LAITIERE ANHYDRE SEPARÉES A 4°C EN RELATION
AVEC LEUR COMPOSITION EN ACIDES GRAS

Chapitre III

I. INTRODUCTION

Dans la partie précédente, nous avons étudié les propriétés de cristallisation des triacylglycérols laitiers dans leur structure native qu'est le globule gras. Nous avons identifié des différences de cinétique de cristallisation des triacylglycérols suivant leur composition en acides gras, ainsi que des différences de structures cristallines. En particulier, nous avons identifié dans les globules gras natifs stockés plus de 48 h à 4°C que la présence d'une structure cristalline 3L dépendait de la composition en acides gras des triacylglycérols. Notamment, plus les triacylglycérols sont insaturés, moins cette structure 3L est présente après un stockage à 4°C pendant $t > 48$ h. Cette différence de structure générale entre les crèmes témoins de composition classique en acides gras et les crèmes expérimentales enrichies en acides gras insaturés tient directement à la composition en acides gras des triacylglycérols qui sont laissés longtemps à cristalliser à cette température.

Afin d'identifier l'origine de cette structure 3L, nous avons fractionné à 4°C la matière grasse laitière extraite des crèmes utilisées dans la partie précédente et évalué le polymorphisme des lipides contenus dans les fractions solide et liquide à cette température en fonction de leur composition en acides gras. L'analyse de la structure cristalline des fractions produites en fonction de leur passé thermique en lien avec leur composition en acides gras nous permet ainsi d'en connaître davantage sur l'origine de la différence structurale des matières grasses en fonction de leur composition observée à 4°C.

De plus, le fractionnement des matières grasses permet également de simplifier la composition triglycéridique des mélanges obtenus. L'étude du comportement de cristallisation des fractions de matière grasse est ainsi un moyen intéressant pour appréhender et mieux comprendre le polymorphisme des matières grasses globales. Dans notre cas, en fractionnant à 4°C, nous nous séparons d'une part les triacylglycérols à bas point de fusion et d'autre part les triacylglycérols à moyen et haut point de fusion (comme vu dans le **Chapitre I**). Cette séparation pourrait nous permettre de mieux comprendre le polymorphisme des triacylglycérols à bas point de fusion, ainsi qu'à moyen point de fusion, ayant identifié que ces triacylglycérols sont au cœur de la différence de comportement physique générale entre les matières grasses témoins et enrichies en acides gras insaturés.

II. ECHANTILLONS ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Les propriétés de cristallisation de fractions de matières grasses laitières de compositions contrôlées en acides gras ont été étudiées au cours de cinétiques de

refroidissement et chauffage. Pour cela, plusieurs matières grasses ont été fractionnées à différentes températures.

Quatre matières grasses ont été fractionnées à 4°C dans l'acétone selon le mode opératoire détaillé dans la partie **Matériels et méthodes** : B1, B3, B8 et B10 qui constituent deux couples de matières grasses de composition classique et très enrichies en acides gras insaturés. Les fractions solide et liquide à 4°C ont ainsi été extraites. Le **Tableau CIII-1** détaille les codes utilisés pour les différentes fractions étudiées.

Tableau CIII-1 : codes des fractions de matières grasses utilisées.

Code de la matière grasse d'origine	B1	B3	B8	B10
Régime utilisé	EM + EH + Luz	EM + EH + Luz + 5% huile lin	EH	EH + 5% huile lin
Fraction solide à 4°C	B1 sol4	B3 sol4	B8 sol4	B10 sol4
Fraction liquide à 4°C	B1 liq4	B3 liq4	B8 liq4	B8 liq4

La composition en acides gras des fractions extraites a été déterminée en triple analyse pour chaque fraction par chromatographie en phase gazeuse. Les propriétés thermiques des fractions ont été déterminées par MCD en triple analyses. Les propriétés cristallographiques des fractions séparées à 4°C ont été étudiées à l'aide du couplage DRXT-MCD sur le synchrotron SOLEIL. Le **Tableau CIII-2** présente les cinétiques en température utilisées lors de l'étude des propriétés thermiques et cristallographiques des fractions.

Tableau CIII-2 : cinétiques en température utilisées lors de l'étude des propriétés thermiques et cristallographiques des fractions, caractérisé par MCD et DRXT-MCD respectivement.

	MCD (DSC Q1000)	DRXT-MCD (fractions séparées à 4°C seulement)
Conditionnement	5 min à 60°C	5 min à 60°C
Refroidissement	60°C → -50°C à 2°C/min	60°C → -20°C à 3°C/min
Statique	5 min à -50°C	env. 5 min à -20°C
Chauffage	-50°C → 60°C à 2°C/min	-20°C → 60°C à 3°C/min

Les analyses calorimétriques réalisées à une vitesse de 2°C/min ont fourni des résultats semblables aux analyses réalisées à une vitesse de 3°C/min pour l'ensemble des matières grasses. Cependant, dans un souci d'homogénéité avec les analyses thermiques réalisées dans les autres chapitres, nous ne présentons ici que les résultats obtenus lors de cycles réalisés à 2°C/min. En revanche, les analyses de DRXT-MCD ont été réalisées uniquement à des vitesses de 3°C/min afin de gagner du temps d'analyse sur le créneau synchrotron qui nous avait été alloué pour ces expérimentations. Egalement, la température

limite inférieure choisie pour les analyses de DRXT-MCD est de -20°C, le calorimètre Microcalix® utilisé pour ces expérimentations permettant difficilement de descendre plus bas dans sa configuration actuelle. Ainsi, les propriétés thermiques et cristallographiques des triacylglycérols seront étudiées au cours d'un refroidissement et d'un chauffage à des vitesses rapides de balayage, respectivement 2 et 3°C/min sans distinction. Ces vitesses rapides de balayages en température ont pour conséquence de former la variété cristalline de triacylglycérols la plus instable, c'est-à-dire la variété α , nous permettant de déduire facilement des données de DRX les longueurs de chaînes moyennes d'acides gras.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

A. Composition en acides gras des fractions séparées à 4°C

La composition en acides gras des matières grasses anhydres et des fractions solide et liquide séparées à 4°C ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse selon le mode opératoire détaillé dans la partie **Matériels et méthodes**. Les **Tableau CIII-3** et **Tableau CIII-4** présentent la composition en acides gras majeurs de ces matières grasses.

Tableau CIII-3 : composition en acides gras des fractions de matières grasses B8 et B10 séparées à 4°C (moyenne \pm écart-type). Seuls les acides gras $>$ à 0,5% sont présentés.

	B8	B8 liq4	B8 sol4	B10	B10 liq4	B10 sol4
C4:0	3,77 \pm 0,07	4,45 \pm 0,20	2,53 \pm 0,27	2,63 \pm 0,41	3,39 \pm 0,26	1,85 \pm 0,14
C6:0	2,03 \pm 0,03	2,37 \pm 0,08	1,44 \pm 0,12	1,11 \pm 0,11	1,38 \pm 0,11	0,78 \pm 0,04
C8:0	1,02 \pm 0,01	1,22 \pm 0,03	0,74 \pm 0,04	0,48 \pm 0,03	0,58 \pm 0,04	0,34 \pm 0,01
C10:0	2,30 \pm 0,02	2,69 \pm 0,04	1,81 \pm 0,06	0,96 \pm 0,05	1,11 \pm 0,07	0,76 \pm 0,02
C12:0	3,07 \pm 0,02	3,58 \pm 0,03	2,58 \pm 0,04	1,29 \pm 0,03	1,41 \pm 0,06	1,12 \pm 0,01
C14:0	11,63 \pm 0,02	12,01 \pm 0,02	11,44 \pm 0,04	6,42 \pm 0,06	6,55 \pm 0,06	6,40 \pm 0,02
C14:1 c9	0,81 \pm 0,01	1,03 \pm 0,01	0,57 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,39 \pm 0,03	0,22 \pm 0,01
C15:0	1,09 \pm 0,01	1,04 \pm 0,01	1,15 \pm 0,01	0,98 \pm 0,01	0,94 \pm 0,02	1,08 \pm 0,01
C16:0	33,65 \pm 0,06	26,11 \pm 0,19	40,46 \pm 0,25	18,57 \pm 0,10	16,43 \pm 1,13	22,45 \pm 0,04
C16:1 c9	1,33 \pm 0,04	1,90 \pm 0,14	0,84 \pm 0,01	0,75 \pm 0,01	0,90 \pm 0,08	0,47 \pm 0,01
C17:0	0,56 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	0,69 \pm 0,01	0,50 \pm 0,01	0,43 \pm 0,04	0,63 \pm 0,01
C18:0	11,10 \pm 0,05	7,62 \pm 0,10	14,97 \pm 0,20	15,85 \pm 0,27	11,82 \pm 2,11	23,22 \pm 0,12
C18:1 t6-9	0,37 \pm 0,01	0,46 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	1,35 \pm 0,15	1,52 \pm 0,12	1,25 \pm 0,04
C18:1 t10	0,25 \pm 0,06	0,39 \pm 0,17	0,24 \pm 0,03	3,20 \pm 0,75	2,99 \pm 0,85	3,12 \pm 0,25
C18:1 t11	1,58 \pm 0,06	1,70 \pm 0,14	1,44 \pm 0,04	8,75 \pm 0,71	8,88 \pm 0,82	8,52 \pm 0,24
C18:1 c9	20,70 \pm 0,04	27,16 \pm 0,19	15,01 \pm 0,12	28,57 \pm 0,16	32,34 \pm 2,23	20,94 \pm 0,05
C18:2 t9,12	0,44 \pm 0,02	0,41 \pm 0,02	0,47 \pm 0,01	1,51 \pm 0,01	1,42 \pm 0,05	1,70 \pm 0,01
C18:2 c9,12	1,22 \pm 0,02	1,68 \pm 0,03	0,80 \pm 0,01	1,29 \pm 0,02	1,38 \pm 0,05	1,06 \pm 0,02
C18:3 c9,12,15	0,76 \pm 0,01	1,07 \pm 0,01	0,47 \pm 0,01	0,51 \pm 0,01	0,62 \pm 0,06	0,32 \pm 0,01
C18:2 c9,t11	0,70 \pm 0,02	0,92 \pm 0,02	0,43 \pm 0,03	3,36 \pm 0,08	3,95 \pm 0,33	2,22 \pm 0,05

Chapitre III

Tableau CIII-4 : composition en acides gras des fractions de matières grasses B1 et B3 séparées à 4°C (moyenne ± écart-type). Seuls les acides gras > à 0,5% sont présentés.

	B1	B1 liq4	B1 sol4	B3	B3 liq4	B3 sol4
C4:0	1,66 ± 0,01	4,47 ± 0,51	2,57 ± 0,13	1,28 ± 0,12	3,66 ± 0,11	1,61 ± 0,06
C6:0	1,32 ± 0,01	2,41 ± 0,23	1,48 ± 0,06	0,82 ± 0,01	1,44 ± 0,03	0,68 ± 0,01
C8:0	0,95 ± 0,01	1,38 ± 0,31	0,77 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,32 ± 0,01
C10:0	2,30 ± 0,01	2,84 ± 0,15	1,84 ± 0,03	1,13 ± 0,01	1,23 ± 0,01	0,80 ± 0,01
C12:0	3,12 ± 0,01	3,76 ± 0,11	2,56 ± 0,02	1,60 ± 0,01	1,63 ± 0,01	1,34 ± 0,01
C14:0	12,29 ± 0,01	12,75 ± 0,11	11,65 ± 0,03	7,62 ± 0,02	7,19 ± 0,01	7,54 ± 0,02
C14:1 c9	0,76 ± 0,01	0,97 ± 0,03	0,50 ± 0,14	0,41 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,24 ± 0,01
C15:0	1,06 ± 0,01	1,01 ± 0,01	1,08 ± 0,01	0,93 ± 0,01	0,84 ± 0,01	1,00 ± 0,01
C16:0	34,71 ± 0,13	26,25 ± 0,37	40,36 ± 0,08	20,63 ± 0,06	17,31 ± 0,05	24,23 ± 0,08
C16:1 c9	1,19 ± 0,01	1,64 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,78 ± 0,01	0,41 ± 0,01
C17:0	0,57 ± 0,01	0,41 ± 0,03	0,66 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,68 ± 0,01
C18:0	11,45 ± 0,01	7,18 ± 0,26	14,05 ± 0,08	12,59 ± 0,04	8,45 ± 0,05	18,26 ± 0,05
C18:1 t6-9	0,71 ± 0,01	0,70 ± 0,06	0,51 ± 0,02	1,55 ± 0,06	1,70 ± 0,04	1,43 ± 0,11
C18:1 t10	0,48 ± 0,12	0,45 ± 0,04	0,31 ± 0,08	2,96 ± 0,45	3,32 ± 0,77	1,69 ± 1,17
C18:1 t11	1,88 ± 0,12	2,03 ± 0,06	1,65 ± 0,07	12,74 ± 0,50	11,21 ± 0,72	13,52 ± 1,07
C18:1 c9	21,02 ± 0,04	26,50 ± 0,60	20,70 ± 0,04	24,43 ± 0,07	26,22 ± 0,09	20,70 ± 0,04
C18:2 t9,12	0,47 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,45 ± 0,01	1,51 ± 0,01	1,35 ± 0,01	1,56 ± 0,01
C18:2 c9,12	1,54 ± 0,01	1,85 ± 0,10	1,00 ± 0,04	1,27 ± 0,01	3,14 ± 0,13	2,54 ± 0,03
C18:3 c9,12,15	0,53 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,27 ± 0,01
C18:2 c9,t11	0,83 ± 0,02	1,01 ± 0,04	0,80 ± 0,02	5,41 ± 0,03	6,10 ± 0,06	3,49 ± 0,02

Les différences de composition en acides gras des matières grasses d'origine, témoins et enrichies en acides gras insaturés, sont discutées dans le **Chapitre I**. D'une manière générale, les compositions en acides gras des fractions extraites à 4°C des matières grasses d'origine (B1, B3 ; B8 et B10) suivent les mêmes tendances. Les acides gras à courtes chaînes C4:0 à C8:0 montrent des teneurs plus fortes dans les fractions liquides à 4°C comparé aux matières grasses d'origine correspondantes : entre 1,2-1,3 fois pour les matières grasses B8 et B10 et jusqu'à 2,9 fois pour les matières grasses B1 et B3. En revanche, ces acides gras courts montrent des concentrations plus faibles dans les fractions solides à 4°C par rapport aux matières grasses d'origine correspondantes, excepté pour les acides gras C4:0 et C6:0 des matières grasses B1 et B3. Cela semblerait signifier que les analyses des matières grasses B1 et B3 d'origine sont sous-estimées pour ces acides gras. Les acides gras saturés à chaînes moyennes C10:0 à C15:0 présentent les mêmes tendances que les acides gras courts entre les fractions et les matières grasses d'origines correspondantes. En revanche, les acides gras saturés à longue chaîne, essentiellement C16:0 et C18:0, présentent des tendances inverses aux acides gras courts et moyens en termes de concentration : ils sont enrichis dans les fractions solides à 4°C par rapport aux matières grasses d'origine correspondantes, mais

logiquement appauvris dans les fractions liquides à 4°C, d'un rapport 0,7-0,9. Enfin, l'ensemble des acides gras insaturés dérivés du C18 montrent des tendances similaires : un enrichissement dans les fractions liquides à 4°C et un appauvrissement dans les fractions solides à 4°C d'un facteur 0,6-1,0. Seul le C18:2 *t9,t12* montre une tendance inversée, mais avec des rapports faibles.

Afin d'évaluer les sources de variabilité de composition en acides gras entre les différentes matières grasses et leurs fractions, une ACP a été réalisée sur l'ensemble des données de composition en acides gras. La **Figure CIII-1** présente la combinaison de la carte des individus dans les axes PC1 – PC2 et des contributions des acides gras à ces deux axes principaux sous la forme d'un cercle des corrélations.

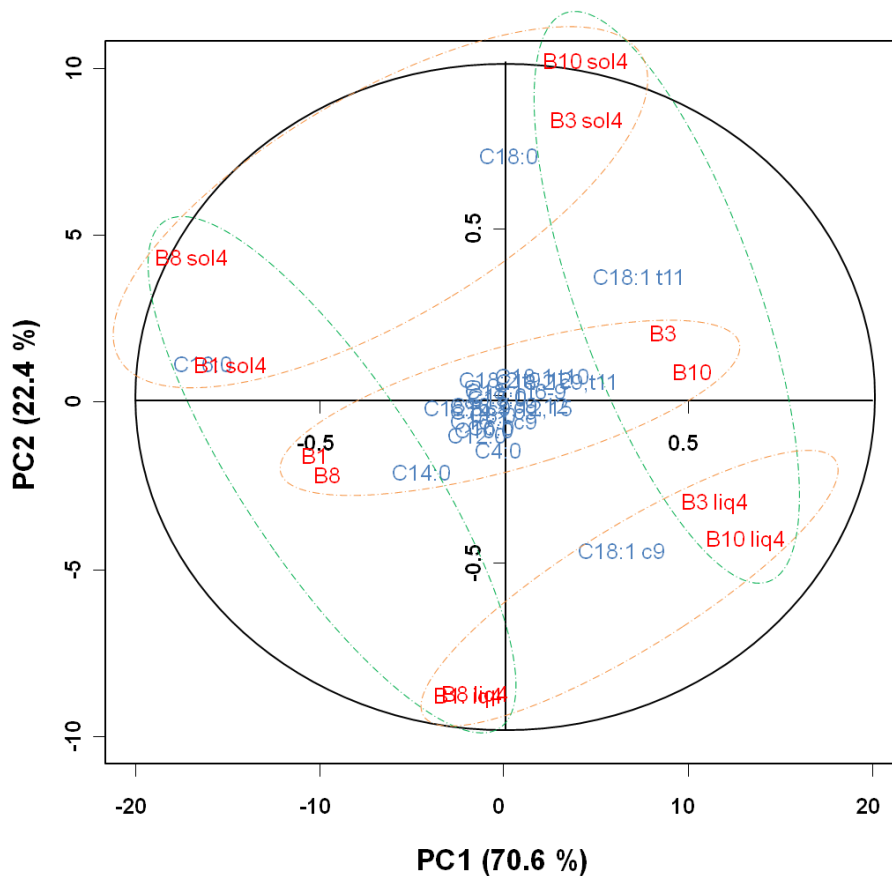


Figure CIII-1 : Résultat de l'analyse en composantes principales sur les données de composition en acides gras des fractions séparée à 4°C des matières grasses B1, B3, B8 et B10. Les acides gras contribuant le plus à la variabilité de composition entre les matières grasses (en bleu) sont représentés sur le cercle des corrélations ; les coordonnées moyennes des matières grasses dans le plan PC1 - PC2 (en rouge) sont représentées sur les axes vertical de gauche et horizontal du bas.

Chapitre III

Le premier axe, défini essentiellement par les acides gras C16:0, C18:1 *c9* et C18:1 *t11*, permet de séparer les matières grasses issues des régimes témoins (B1, B8 et leurs fractions) de celles issues des régimes enrichis en acides gras insaturés (B3, B10 et leurs fractions) selon les cercles en vert sur la **Figure CIII-1**. Les différentes fractions séparées à 4°C sont relativement peu distinguables selon le premier axe. En revanche, le deuxième axe, défini par les acides gras C18:0, C18:1 *c9* essentiellement et C18:1 *t11* dans une moindre mesure, permet de distinguer les fractions séparées à 4°C issues d'un même régime de base, comme représenté par les cercles oranges sur la **Figure CIII-1**. Ainsi, selon les résultats de cette ACP, quatre acides gras majoritaires permettent d'expliquer une grande part de la variabilité de composition constatée entre les six échantillons de matières grasses étudiées : C16:0, C18:0, C18:1 *c9* et C18:1 *t11*.

B. Propriétés de cristallisation des triacylglycérols fractionnés à 4°C au cours d'un refroidissement à vitesse rapide

1. Propriétés thermiques étudiées au cours d'un refroidissement à 2°C/min

Les propriétés thermiques des matières grasses anhydres et des fractions solide et liquide séparées à 4°C ont été étudiées par MCD au cours d'un refroidissement à 2°C/min de 60°C à -50°C. La **Figure CIII-2** présente les thermogrammes enregistrés au cours du refroidissement des matières grasses anhydres et de leurs fractions séparées à 4°C.

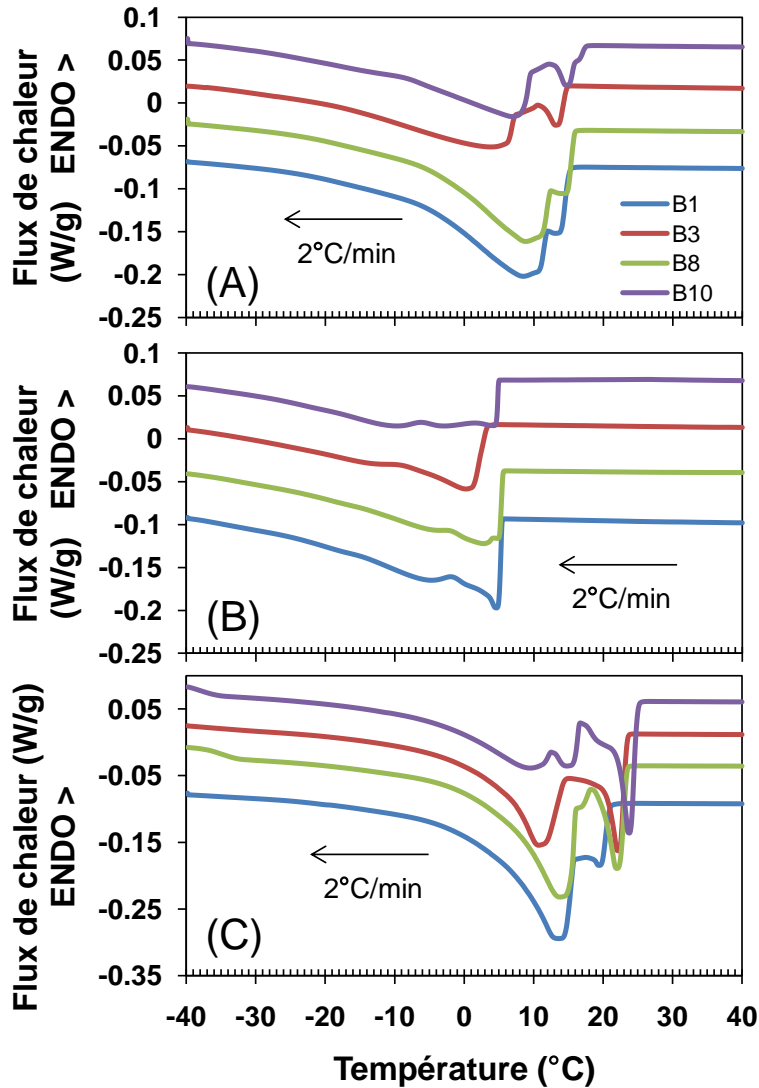


Figure CIII-2 : thermogrammes enregistrés au cours du refroidissement des matières grasses B1, B3, B8 et B10 à 2°C/min de 60°C à -50°C (A), ainsi que leurs fractions liquides à 4°C (B) et solides à 4°C (C).

Les thermogrammes enregistrés au cours du refroidissement des matières grasses anhydres d'origine présentent deux événements exothermiques principaux. Les matières grasses B1 et B8, les plus riches en acides gras saturés, présentent des profils en refroidissement très similaires. Au-dessus de 16°C, les triglycérides sont dans l'état fondu. A 16°C, le début du premier événement exothermique est observé. Celui-ci correspond à la cristallisation d'une partie des lipides. Puis à environ 12-13°C, le second événement exothermique, nettement plus important, est enregistré. Les matières grasses B3 et B10, les moins riches en acides gras saturés, présentent des profils en refroidissement similaires mais qui semblent décalés en température l'un par rapport à l'autre. La matière grasse B3 présente un premier exotherme de cristallisation des premiers triacylglycérols à partir de 16°C. Un

Chapitre III

second exotherme minoritaire semble avoir lieu entre 11°C et 8°C, avant qu'un troisième exotherme majeur soit enregistré à partir de 8°C jusqu'à -40°C. La matière grasse B10 présente un profil similaire, mais décalé vers les températures supérieures d'environ 2°C. La similitude des profils thermiques des matières grasses B1 + B8 et B3 + B10 va dans le même sens que le groupement de ces matières grasses suivant leur degré d'insaturation visualisé sur la carte de l'ACP (**Figure CIII-1**).

Les fractions liquides à 4°C des différentes matières grasses présentent des profils en refroidissement relativement proches. Un premier exotherme brutal est enregistré à partir de 4-6°C, dénotant la cristallisation des premiers triacylgcérols. Un événement exothermique mineur est également enregistré à plus basse température, en particulier vers -2°C pour les fractions liquides à 4°C des matières grasses témoins B1 et B8. Dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B3 et B10, la présence d'autres événements thermiques que la première cristallisation brutale est discutable, le signal calorimétrique enregistré montrant des fluctuations faibles. Dans toutes les fractions liquides à 4°C, le signal exothermique se poursuit jusqu'à -40°C, température où il rejoint la ligne de base.

Les fractions solides à 4°C des différentes matières grasses présentent les profils thermiques en refroidissement les plus complexes, avec trois à quatre événements exothermiques enregistrés. A part la fraction solide à 4°C de la matière grasse B1, les autres présentent toutes un pic exothermique de forte amplitude à partir de 23-25°C, correspondant à la cristallisation des premiers triacylgcérols. Dans la matière grasse B1, ce pic n'est pas si intense, et n'apparaît qu'à partir de 21°C. Ce premier exotherme est suivi de un à deux exothermes de moindre amplitude avant qu'un autre exotherme de forte énergie soit enregistré à partir de 17°C dans les fractions solides à 4°C des matières grasses témoins B1 et B8, et à partir de 13-15°C dans les fractions solides à 4°C des matières grasses B3 et B10. La présence de pics exothermiques à des températures supérieures à la température de début de cristallisation des matières grasses anhydres d'origine est expliquée par l'élimination des triacylgcérols à plus faibles point de fusion. Les triacylgcérols à plus haut point de fusion sont dissous dans la phase liquide dans les matières grasses anhydres d'origine pour des températures légèrement supérieures à la température de début de cristallisation. L'élimination des triacylgcérols à plus bas point de fusion par fractionnement permettrait alors à des triacylgcérols à plus haut point de fusion de cristalliser dans les fractions solides à 4°C (Marangoni et Lencki, 1998).

Afin de décrire au mieux ces thermogrammes et pouvoir les comparer, nous avons extrait plusieurs paramètres, détaillé sur la **Figure CIII-3** et compilés dans les **Tableau CIII-**

5 et **Tableau CIII-6**, tels la température de début de cristallisation T_{onset} , les températures aux maximum des pics exothermiques identifiés $T_{min 1}$, $T_{min 2}$, $T_{min 3}$ et $T_{min 4}$, la variation d'enthalpie ΔH déterminée entre le début de la cristallisation et -40°C et les variations d'enthalpie associées aux différents pics exothermiques exprimés en pourcentages ΔH_1 , ΔH_2 , ΔH_3 et ΔH_4 .

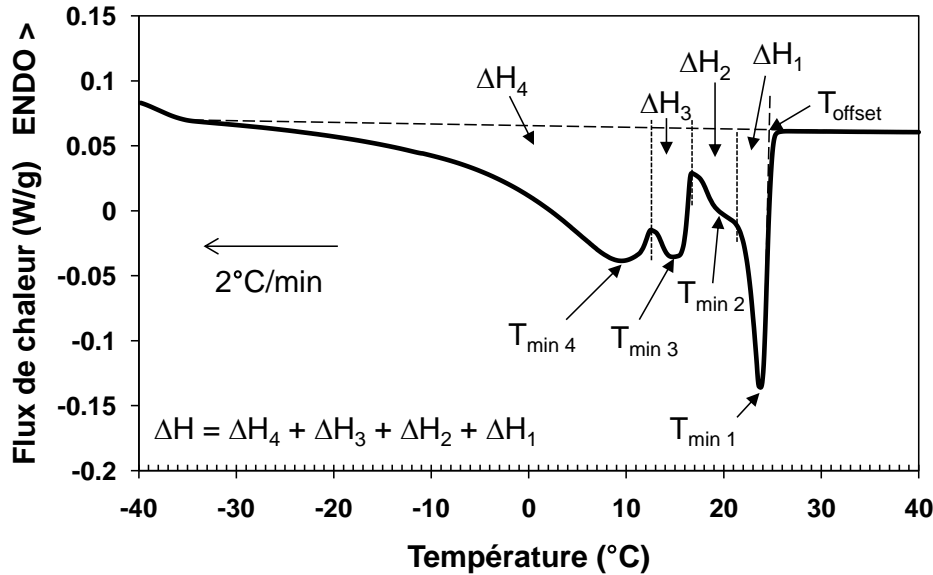


Figure CIII-3 : paramètres extraits des thermogrammes enregistrés au cours du refroidissement de 60°C à -50°C à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ des matières grasses B8, B10 et de leurs fractions séparées à 4°C . Exemple de paramètres extraits sur B10 sol4.

Tableau CIII-5 : températures caractéristiques des événements relevés sur les thermogrammes au cours du refroidissement de 60°C à -50°C à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ des matières grasses anhydres B1, B3, B8 et B10.

	T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{min 1}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{min 2}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{min 3}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{min 4}$ ($^{\circ}\text{C}$)
B1	$15,28 \pm 0,16$	$13,82 \pm 0,04$	-	$8,74 \pm 0,09$	-
B3	$13,91 \pm 0,73$	$12,21 \pm 0,85$	$8,04 \pm 0,23$	$3,77 \pm 0,18$	-
B8	$16,08 \pm 0,61$	$13,93 \pm 0,62$	-	$9,06 \pm 0,30$	-
B10	$16,35 \pm 0,01$	$14,18 \pm 0,61$	$10,47 \pm 0,19$	$6,79 \pm 0,22$	-
B1 liq4	$5,44 \pm 0,06$	-	-	-	-
B3 liq4	$3,91 \pm 0,87$	-	-	-	-
B8 liq4	$5,76 \pm 0,18$	-	-	-	-
B10 liq4	$5,07 \pm 0,14$	-	-	-	-
B1 sol4	$20,88 \pm 0,07$	$19,77 \pm 0,08$	$16,5 \pm 0,32$	-	$13,44 \pm 0,19$
B3 sol4	$23,42 \pm 0,03$	$22,21 \pm 0,07$	$16,75 \pm 0,48$	-	$10,97 \pm 0,42$
B8 sol4	$23,42 \pm 0,03$	$22,12 \pm 0,11$	$17,01 \pm 0,01$	-	$13,84 \pm 0,10$
B10 sol4	$24,76 \pm 0,32$	$23,80 \pm 0,02$	$19,04 \pm 0,18$	$14,87 \pm 0,10$	$9,59 \pm 0,07$

Tableau CIII-6 : variations d'enthalpie partielles relevées sur les thermogrammes enregistrés au cours du refroidissement de 60°C à -50°C à 2°C/min des fractions solides à 4°C des matières grasses anhydres B1, B3, B8 et B10.

	ΔH (J/g)	ΔH_1 (%)	ΔH_2 (%)	ΔH_3 (%)	ΔH_4 (%)
B1	72,92 ± 1,62	7,4 ± 0,6	-	92,6 ± 0,6	-
B3	51,59 ± 0,16	6,2 ± 1,0	5,2 ± 0,3	88,7 ± 1,2	-
B8	74,40 ± 2,51	8,4 ± 1,4	-	91,6 ± 1,4	-
B10	56,66 ± 0,19	6,5 ± 1,4	4,7 ± 0,5	88,9 ± 0,9	-
B1 liq4	56,43 ± 1,04	-	-	-	-
B3 liq4	42,98 ± 0,93	-	-	-	-
B8 liq4	54,24 ± 1,07	-	-	-	-
B10 liq4	45,65 ± 5,08	-	-	-	-
B1 sol4	86,55 ± 0,98	7,2 ± 0,3	4,6 ± 0,2	-	88,2 ± 0,1
B3 sol4	84,30 ± 1,06	15,3 ± 0,8	11,5 ± 0,8	-	73,1 ± 0,1
B8 sol4	86,46 ± 0,13	15,7 ± 0,1	4,3 ± 0,3	-	80,1 ± 0,3
B10 sol4	80,02 ± 0,42	17,6 ± 0,4	8,8 ± 0,5	13,0 ± 0,7	60,6 ± 0,5

Les paramètres extraits des thermogrammes enregistrés sur les matières grasses anhydres d'origine ont déjà été discutés dans le **Chapitre I**, bien que la cristallisation des triacylglycérols se poursuive entre -5°C et -40°C, aucun événement thermique supplémentaire n'est enregistré dans cette plage de température. Les paramètres extraits des thermogrammes enregistrés sur les matières grasses anhydres d'origine ne seront donc pas détaillés ici, mais serviront de référence pour comparer avec ceux extraits des thermogrammes enregistrés sur les fractions.

Les températures de début de cristallisation T_{onset} sont relativement homogènes entre les fractions liquides à 4°C et entre les fractions solides à 4°C. La température de début de cristallisation des fractions liquides à 4°C des différentes matières grasses est le reflet direct de la température de fractionnement théorique 4°C. En revanche, la T_{onset} des fractions liquides à 4°C, située entre 3,9°C et 5,8°C, est largement inférieure à celle des matières grasses anhydres d'origine, alors que la T_{onset} des fractions solides à 4°C, située entre 20,9°C et 24,8°C est largement supérieure. Cette augmentation de la température de début de cristallisation entre les fractions solides à 4°C et leur matière grasse anhydre d'origine est expliquée par la cristallisation des triacylglycérols à plus haut point de fusion, impossible dans les matières grasses anhydres d'origine car dissous par la présence d'une phase liquide (Marangoni et Lencki, 1998).

Les variations d'enthalpie déterminées dans les fractions liquides à 4°C entre le début de la cristallisation et -40°C représentent 73% à 77% de celles déterminées dans les

Chapitre III

matières grasses anhydres d'origine pour les matières grasses témoins B1 et B8, mais 81% à 83% des matières grasses enrichies en acides gras insaturés B3 et B10. Cette diminution de variation d'enthalpie de cristallisation des fractions liquides à 4°C par rapport à leur matière grasse anhydre d'origine est due à la présence de triacylglycérols globalement plus insaturés, dont les chaleurs latentes de fusion/cristallisation sont plus faibles (Sato et Gardi, 1988 ; Ollivon, 1992 ; Knothe et Dunn, 2009). Les variations d'enthalpie déterminées dans les fractions liquides à 4°C montrent des valeurs inférieures pour les matières grasses enrichies en acides gras insaturés B3 et B10. Cela pourrait provenir de la différence de composition de ces matières grasses, donnant naissance lors de la cristallisation à un type de cristaux majoritaires mixtes – puisqu'un seul exotherme majoritaire étendu est enregistré – de nature différente mais qui commencent à cristalliser à la même température.

Les variations d'enthalpie déterminées dans les fractions solides à 4°C entre le début de la cristallisation et -40°C représentent 116% à 119% de celles déterminées dans les matières grasses anhydres d'origine pour les matières grasses témoins B1 et B8 et de 141% à 163% pour les matières grasses enrichies en acides gras insaturés B3 et B10. De façon similaire aux fractions liquides à 4°C, cette augmentation de variation d'enthalpie de cristallisation des fractions liquides à 4°C par rapport à leur matière grasse anhydre d'origine est due à la présence de triacylglycérols globalement plus saturés, dont les chaleurs latentes sont plus fortes (Sato et Gardi, 1988 ; Ollivon, 1992 ; Knothe et Dunn, 2009). La variation d'enthalpie déterminée dans la fraction solide à 4°C de B10 montre une valeur inférieure à celle déterminée dans la fraction solide à 4°C de B3.

Dans les fractions solides à 4°C, la variation d'enthalpie déterminée entre le début de la cristallisation et -40°C a été séparée de manière à déterminer les pourcentages relatifs associés aux différents exothermes identifiés. Hormis la fraction solide à 4°C issue de la matière grasse B1, le pourcentage de variation d'enthalpie associé au premier exotherme (ΔH_1) est quasiment égal dans les autres fractions solides à 4°C, aux alentours de 16%. En fait, il se pourrait que la fraction solide à 4°C de la matière grasse B1 contienne une quantité non négligeable de fraction liquide, provenant de la séparation des fractions lors du fractionnement. Cette fraction liquide augmentant la dissolution des triacylglycérols à plus haut point de fusion, pourrait être responsable de la faible intensité du premier exotherme de cristallisation comparativement aux autres fractions solides à 4°C. En revanche, les pourcentages de variation d'enthalpie associés aux deuxième et troisième exothermes sont significativement supérieurs dans les fractions solides à 4°C issues des matières grasses enrichies en acides gras insaturés B3 et B10, avec un cumul entre ΔH_2 et ΔH_3 de 11,5% pour

Chapitre III

B3 et 21,8% pour B10, alors qu'il n'y a que 4,2-4,5% pour B1 et B8 dans ces exothermes intermédiaires. Enfin, le dernier exotherme de variation d'enthalpie ΔH_4 , qui est l'exotherme majoritaire, présente des pourcentages de variation d'enthalpie significativement plus faibles dans les fractions solides à 4°C issues des matières grasses enrichies en acides gras insaturés par rapport aux témoins. De plus, le pourcentage de ΔH_4 présente des valeurs supérieures dans les fractions solides à 4°C issues du régime de base « ensilage d'herbe + ensilage de maïs + bouchons de luzerne déshydratés » (B1 et B3). Ce dernier pic exothermique semble correspondre à la cristallisation des triacylglycérols du dernier pic exothermique majeur identifié dans les matières grasses anhydres d'origine, et d'une partie des triacylglycérols qui cristallisent dans la fraction liquide à 4°C.

Afin d'identifier les organisations cristallines qui se forment lors de chacun des événements exothermiques relevés par MCD et de comprendre quels types de triacylglycérols sont impliqués dans ces structures, nous avons réalisé des analyses de DRXT-MCD.

2. Comportement structural des matières grasses anhydres B8 et B10 au cours d'un refroidissement à 3°C/min

Les structures cristallines formées dans les matières grasses anhydres B8 et B10 ont été identifiées par DRXT-MCD au cours d'un refroidissement à 3°C/min de 60°C à -20°C. La **Figure CIII-4** présente les diagrammes de DRXT des matières grasses B8 et B10 enregistrés au cours du refroidissement. Les diagrammes enregistrés entre 60°C et 45°C ne sont pas présentés car seul le signal des triacylglycérols fondus est présent.

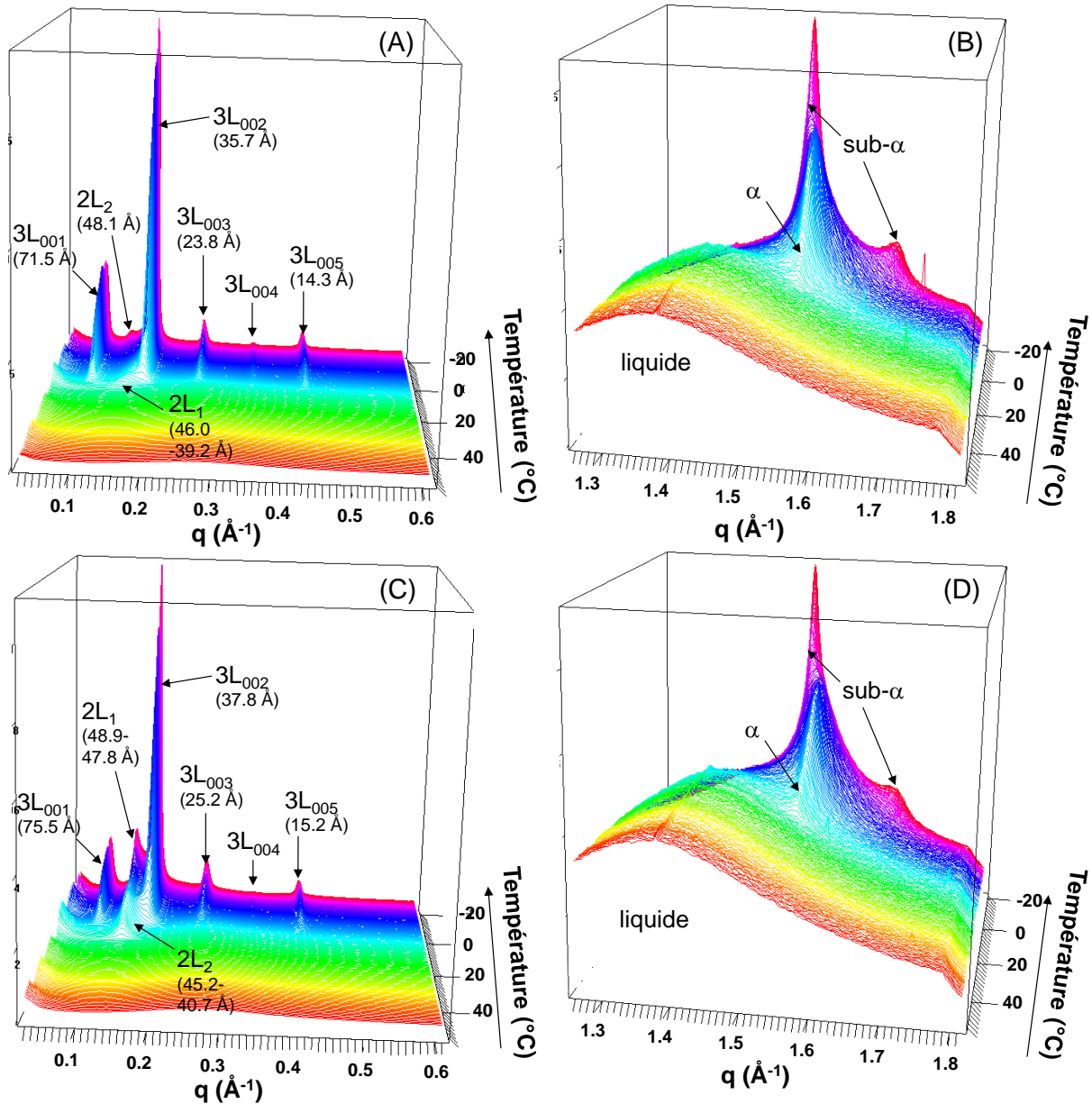


Figure CIII-4 : diagrammes de diffraction des rayons X enregistrés aux petits (A, C) et grands angles (B, D) au cours du refroidissement de 60°C à -20°C à 3°C/min des matières grasses B8 (A, B) et B10 (C, D).

Le comportement structural des matières grasses B8 et B10 enregistré au cours du refroidissement de 60°C à -20°C à 3°C/min est très similaire à celui déjà mis en évidence lors d'un refroidissement à même vitesse jusqu'à -5°C (**Chapitre I**). Dans la matière grasse B8, une structure 2L₂ (48,1 Å) caractérisée par une réflexion supplémentaire à 0,131 Å⁻¹ apparaît en plus vers -10°C. De plus, quand la température atteint -5°C, la forme α, de sous-cellule hexagonale, se réorganise partiellement en forme pseudo-hexagonale sub-α, caractérisée aux grands angles par deux réflexions respectivement à 1,5 Å⁻¹ (4.18 Å) et 1,67 Å⁻¹ (3.76 Å). Les thermogrammes enregistrés de manière simultanée aux diagrammes de diffraction des rayons

X à l'aide du calorimètre Microcalix® au cours du refroidissement des matières grasses B8 et B10 peuvent ainsi être indexés comme sur la **Figure CIII-5** et ainsi permettre de comprendre l'origine des événements calorimétriques enregistrés.

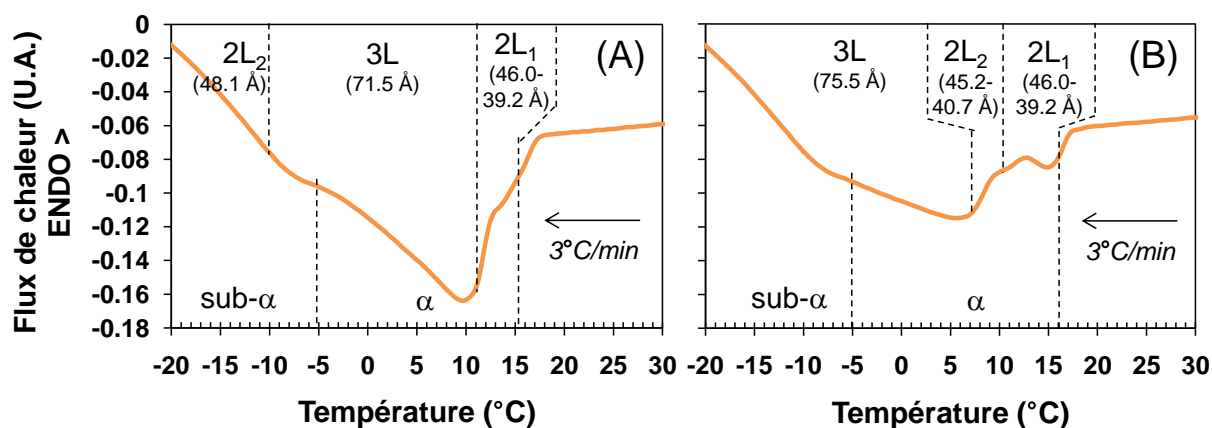


Figure CIII-5 : thermogrammes enregistrés au cours du refroidissement des matières grasses anhydres B8 et B10 en même temps que les diagrammes de DRXT. Les structures longitudinales qui se forment lors des événements thermiques sont indiquées au-dessus du signal, les structures transversales sont indiquées sous le signal.

Le comportement structural de ces matières grasses est détaillé dans la **Figure CIII-5** ; les diagrammes suivants permettent de le résumer :

- **B8** : liquide (liq.)
 -(15,6°C)→ α 2L₁ (46,0-39,2 Å) + liq.
 -(11°C)→ α 2L₁ (39,2 Å) + α 3L (71,5 Å) + liq.
 -(5°C)→ sub- α 2L₁ (39,2 Å) + sub- α 2L₂ (48,1 Å) + sub- α 3L (71,5 Å) + liq.
- **B10** : liquide (liq.)
 -(15,6°C)→ α 2L₁ (48,9-47,8 Å) + liq.
 -(10°C)→ α 2L₁ (47,8 Å) + α 2L₂ (45,2 Å) + liq.
 -(7°C)→ α 2L₁ (48,9 Å) + α 2L₂ (45,2-40,7 Å) + α 3L (75,5 Å) + liq.
 -(5°C)→ sub- α 2L₁ (47,8 Å) + sub- α 2L₂ (40,7 Å) + sub- α 3L (75,5 Å) + liq.

3. Comportement structural des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours d'un refroidissement à 3°C/min

Les structures cristallines formées dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 ont été identifiées par DRXT-MCD au cours d'un refroidissement à 3°C/min de 60°C à -20°C. La **Figure CIII-6** présente les diagrammes de DRXT des fractions liquides des matières grasses B8 et B10 enregistrés au cours du refroidissement. Les diagrammes enregistrés entre 60°C et 20°C ne sont pas présentés car seul le signal des triacylglycérols fondus est présent.

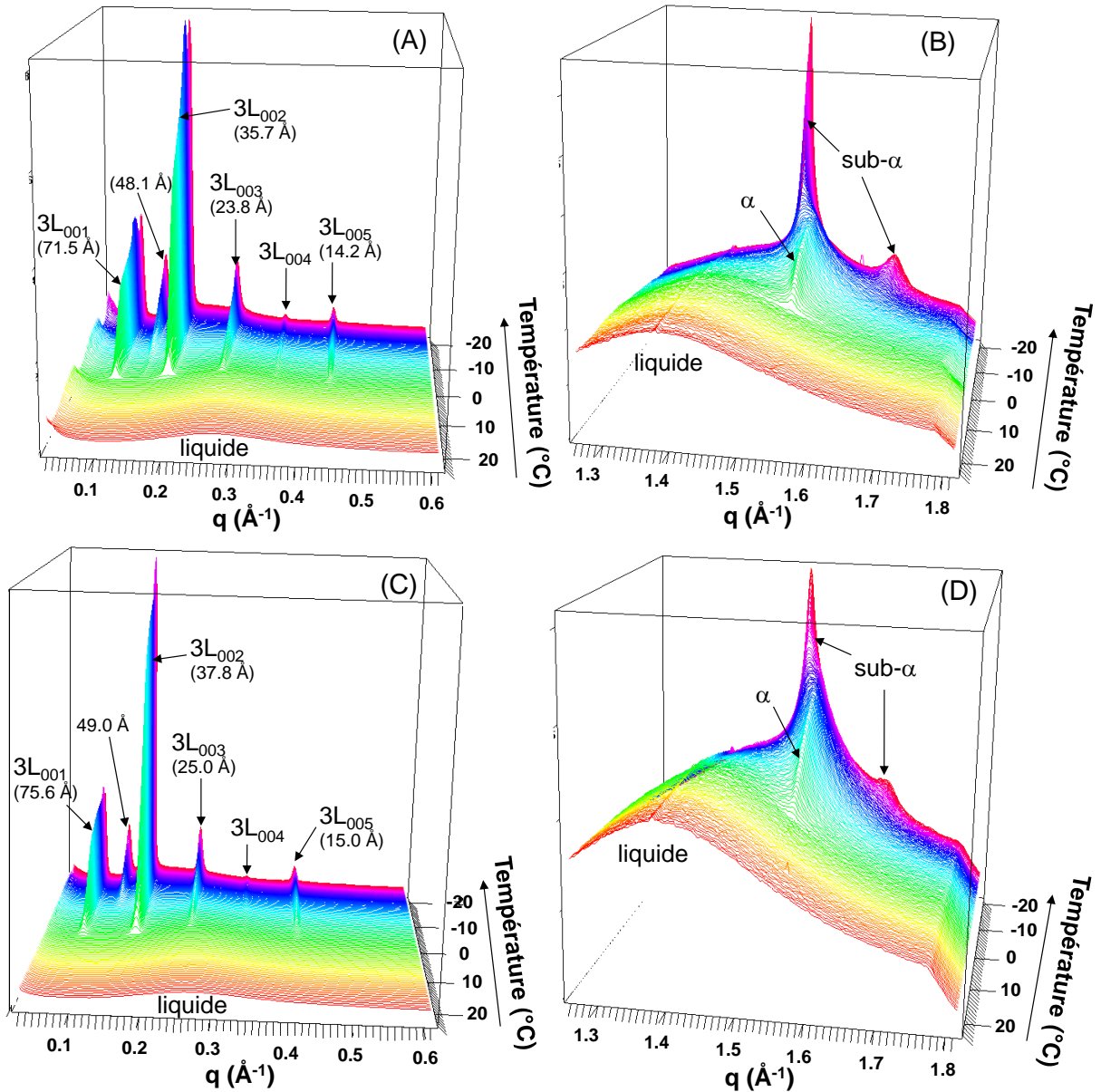


Figure CIII-6 : diagrammes de diffraction des rayons X enregistrés aux petits (A, C) et grands angles (B, D) au cours du refroidissement de 60°C à -20°C à 3°C/min des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 (A, B) et B10 (C, D).

Au-dessus de 4,5°C, les triacylglycérols des fractions liquides des matières grasses B8 et B10 sont dans l'état liquide (fondu) et donnent lieu à un signal large de diffusion centré autour de 0,28 Å⁻¹ (22 Å) aux petits angles de DRX et 1,38 Å⁻¹ (4.55 Å) aux grands angles de DRX. A partir de 4,5°C, les premiers triacylglycérols commencent à cristalliser dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10. Les diagrammes de DRX présentent alors 5 réflexions de Bragg aux petits angles, situés à des vecteurs de diffusion de 0,088 Å⁻¹, 0,176 Å⁻¹, 0,266 Å⁻¹, 0,352 Å⁻¹ environ et 0,441 Å⁻¹ pour la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B8, et à 0,083 Å⁻¹, 0,168 Å⁻¹, 0,254 Å⁻¹, 0,336 Å⁻¹ environ et 0,420 Å⁻¹ pour la

Chapitre III

fraction liquide à 4°C de la matière grasse B10. Ces pics présentent des rapports d'intensités relatifs et des positions en vecteurs de diffusion q permettant de les attribuer à une même structure longitudinale à 3 longueurs de chaînes 3L (71,5 Å) et 3L (75,6 Å) dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement. Aux grands angles de diffraction, un pic unique situé à un vecteur de diffusion de $1,53 \text{ \AA}^{-1}$ dénote la présence d'une structure de type hexagonale correspondant à l'existence d'une phase α dans les deux fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 à partir de 4,5°C.

Dans la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B8, un pic peu intense situé à un vecteur de diffusion de $0,131 \text{ \AA}^{-1}$ apparaît également à partir de 4,5°C puis augmente fortement à partir de -1°C. Ce pic est attribué à un arrangement longitudinal dont une distance caractéristique est de 48,1 Å. Dans la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B10, un pic situé à un vecteur de diffusion de $0,128 \text{ \AA}^{-1}$ apparaît à partir de -5°C. Cette réflexion indique la présence d'une organisation longitudinale distincte caractérisée par une distance de 49,0 Å.

Aux grands angles, la réflexion caractéristique de la phase α ($1,53 \text{ \AA}^{-1}$; 4,10 Å) tend à disparaître au profit de deux réflexions situées respectivement à $1,51 \text{ \AA}^{-1}$ (4,16 Å) et $1,67 \text{ \AA}^{-1}$ (3,76 Å) présentes respectivement à partir de -12°C et -17°C pour les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement. Ces changements observés en DRX sont attribués à une transition réversible $\alpha \rightarrow \text{sub-}\alpha$, déjà mis en évidence lors de refroidissements rapides et à basses températures par ten Grotenhuis *et al.* (1999), Lopez *et al.* (2002a) et Lopez *et al.* (2005a) dans des matières grasses laitières.

A -20°C, le rapport d'intensité entre les pics de premier ordre de la 2L et de la 3L dans chacune des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 est très proche : 0,4 et 0,5, respectivement. La structuration cristalline globale de ces fractions est donc très similaire pour les deux matières grasses, malgré leur différence de composition en acides gras avérée.

La **Figure CIII-7** présente l'évolution en fonction de la température de refroidissement des grandes distances caractéristiques des structures formées, mesurées aux petits angles et déduites des différentes réflexions en tenant compte de l'ordre de chacune d'entre elles (**Figure CIII-7 A et B**). Parallèlement, nous avons tracé l'évolution de l'intensité de ces réflexions exprimée (**Figure CIII-7 C et D**) ainsi que le signal de calorimétrie simultané (**Figure CIII-7 E et F**).

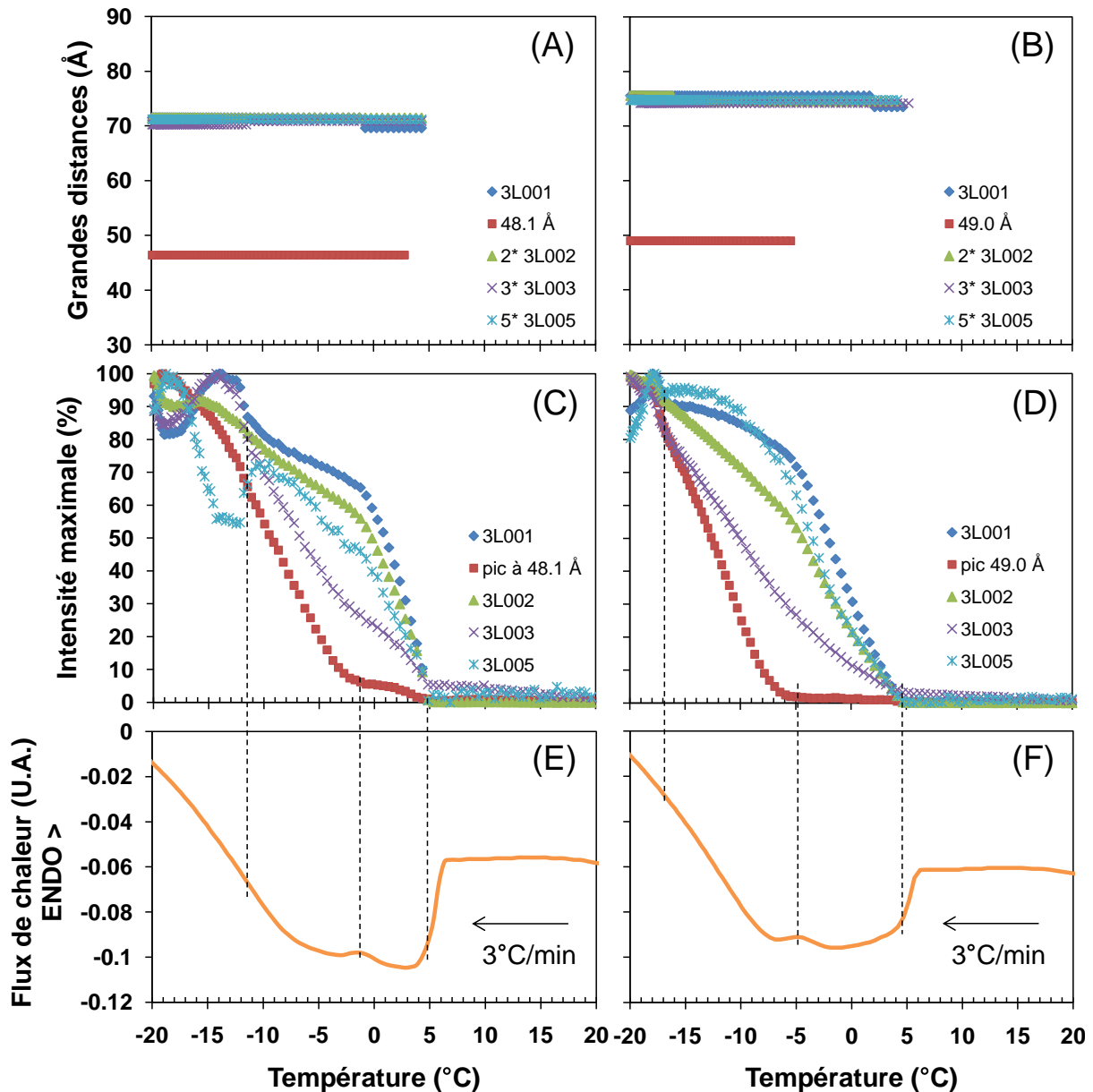


Figure CIII-7 : évolution des grandes distances (A, B) et des intensités maximales (C, D) des pics identifiés aux petits angles de diffraction des rayons X et thermogrammes (E, F) enregistrés de manière simultanée lors du refroidissement des fractions liquide à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement.

Les pics initialement attribués aux ordres 001 , 002 , 003 et 005 de la structure 3L dans chacune des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 ne montrent pas d'évolution de distance au cours du refroidissement.

Les pics assimilés aux ordres 001 , 002 et 005 des structures 3L présentent des évolutions en intensité très similaires entre 4,5°C et la température de transition $\alpha \rightarrow$ sub- α . En revanche, les pics initialement attribués aux ordres 003 des structures 3L présentent des évolutions en intensité différentes des autres ordres de diffraction, nous poussant à l'attribuer

Chapitre III

à une autre structure. A partir de la température de transition $\alpha \rightarrow \text{sub-}\alpha$, le rapport des intensités des différents ordres de diffraction de la 3L changent, ce qui explique les différences d'évolution d'intensité observées entre ces différents ordres de diffraction. Le changement des rapports d'intensité entre les différents ordres pourrait provenir d'un changement du facteur de forme des 3L dû à la transition $\alpha \rightarrow \text{sub-}\alpha$ ou d'une modification d'organisation lamellaire. Hormis ce qui peut se produire à la transition $\alpha \rightarrow \text{sub-}\alpha$, deux étapes permettent de décrire l'évolution de l'intensité des pics 001 , 002 et 005 des 3L. De $4,5^\circ\text{C}$ à -1°C pour la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B8 et de $4,5^\circ\text{C}$ à -5°C pour la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B10, une première augmentation linéaire de l'intensité des pics 001 , 002 et 005 des structures 3L a lieu, avec une vitesse moyenne sur les 3 ordres considérés de $12\%/^\circ\text{C}$ et $6\%/^\circ\text{C}$, respectivement. Cette première étape de cristallisation à vitesse linéaire est reliée au premier exotherme de cristallisation identifié par MCD couplée à la DRXT qui commence vers 6°C . Cet exotherme est donc dû majoritairement à la cristallisation des triacylglycérols dans les structures 3L. La vitesse d'augmentation de l'intensité des pics 001 , 002 et 005 des structures 3L diminue à partir de -1°C et -5°C dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement. Cela pourrait être dû à la croissance des structures de $48,1\text{-}49,0 \text{ \AA}$ d'épaisseur, dont les pics de diffraction d'ordre 001 augmentent alors avec une vitesse de $12\%/^\circ\text{C}$ dans les fractions liquides à 4°C des deux matières grasses. A cette température, les triacylglycérols qui cristallisent se ségrègent alors en deux structures : la 3L déjà présente et une structure de $48,1 \text{ \AA}$ d'épaisseur, présente en faible proportion dans la fraction liquide à 4°C de B8, mais absente dans la fraction liquide à 4°C de B10. Ce changement de vitesse de croissance des structures 3L, associé à la croissance des structures de $48,1\text{-}49,0 \text{ \AA}$ d'épaisseur serait relié au second exotherme de cristallisation identifié par MCD couplée à la DRXT qui commence à -1°C et -5°C respectivement. La présence de cet exotherme est donc due à la cristallisation des triacylglycérols dans les structures 3L et de $48,1\text{-}49,0 \text{ \AA}$ d'épaisseur.

Les pics initialement attribués aux ordres 003 des structures 3L présentent des évolutions en intensité intermédiaires entre celles des autres pics de diffraction des structures 3L et celles des pics de diffraction associés aux structures de $48,1\text{-}49,0 \text{ \AA}$ d'épaisseur, ce qui nous a mené à l'attribuer à une combinaison de $3L_{003}$ et d'un pic d'ordre de diffraction 002 de la structure de $48,1\text{-}49,0 \text{ \AA}$. En fait, il semblerait qu'environ la moitié de ce pic de diffraction puisse être attribuée à la structure $48,1\text{-}49,0 \text{ \AA}$ et l'autre moitié à la $3L_{003}$ en considérant les intensités relatives des autres pics de diffraction attribués à ces deux structures. A -20°C

Chapitre III

notamment, les pics à 48,1-49,0 Å et 23,8-25,0 Å présentent des rapports d'intensité proches de 1. Ainsi, le rapport d'intensité entre le premier et le second ordre de diffraction de cette structure de 48,1-49,0 Å serait donc d'environ 1/2, soit bien plus élevé que celui habituellement observé pour les structures 2L et bien inférieur à celui habituellement observé pour les structures 3L. La nature de cette structure de 48,1-49,0 Å est donc difficile à déterminer. Nous la discuterons dans la partie discussion.

A -20°C, les pics de diffraction des structures longitudinales formées n'ont pas atteint leur intensité maximale, donc la totalité des triacylglycérols n'a pas encore cristallisé au sein de ces structures, en particulier la structure se formant à plus basse température qui montre une vitesse d'augmentation de l'intensité de ses pics de diffraction encore maximale à cette température.

Le comportement structural des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 est donc différent au cours du refroidissement appliqué. Ces deux matières grasses commencent à cristalliser à 4,5°C majoritairement en une structure α 3L de 71,5 et 75,6 Å d'épaisseur, respectivement. La fraction liquide à 4°C de B8 présente également une structure α de 48,1 Å d'épaisseur qui nucléée à partir de 4,5°C, mais qui ne croît véritablement qu'à partir de -1°C. La fraction liquide à 4°C de B10 montrent l'apparition d'une structure α de 49,0 Å d'épaisseur qui ne cristallise qu'à partir de -5°C uniquement. A partir de -12°C et -17°C, respectivement, nous avons observé la transition $\alpha \rightarrow$ sub- α aux grands angles de diffraction. Le comportement structural des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours du refroidissement peut donc être résumé dans les diagrammes suivants :

- B8 liq4 : liquide (liq.)
 - (4,5°C) \rightarrow (α (48,1 Å)) + α 3L (71,5 Å) + liq.
 - (-1°C) \rightarrow α (48,1 Å) + α 3L (71,5 Å) + liq.
 - (-12°C) \rightarrow sub- α (48,1 Å) + sub- α 3L (71,5 Å) + liq.
- B10 liq4 : liquide (liq.)
 - (4,5°C) \rightarrow α 3L (75,6 Å) + liq.
 - (-5°C) \rightarrow α (49,0 Å) + α 3L (75,6 Å) + liq.
 - (-17°C) \rightarrow sub- α (49,0 Å) + sub- α 3L (75,6 Å) + liq.

4. Comportement structural des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours d'un refroidissement à 3°C/min

Les structures cristallines formées dans les fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 ont été identifiées par DRXT-MCD au cours d'un refroidissement à 3°C/min de 60°C à -20°C. La **Figure CIII-8** présente les diagrammes de DRXT des fractions

liquides des matières grasses B8 et B10 enregistrés au cours du refroidissement. Les diagrammes enregistrés entre 60°C et 45°C ne sont pas présentés car seul le signal des triacylglycérols fondus est présent.

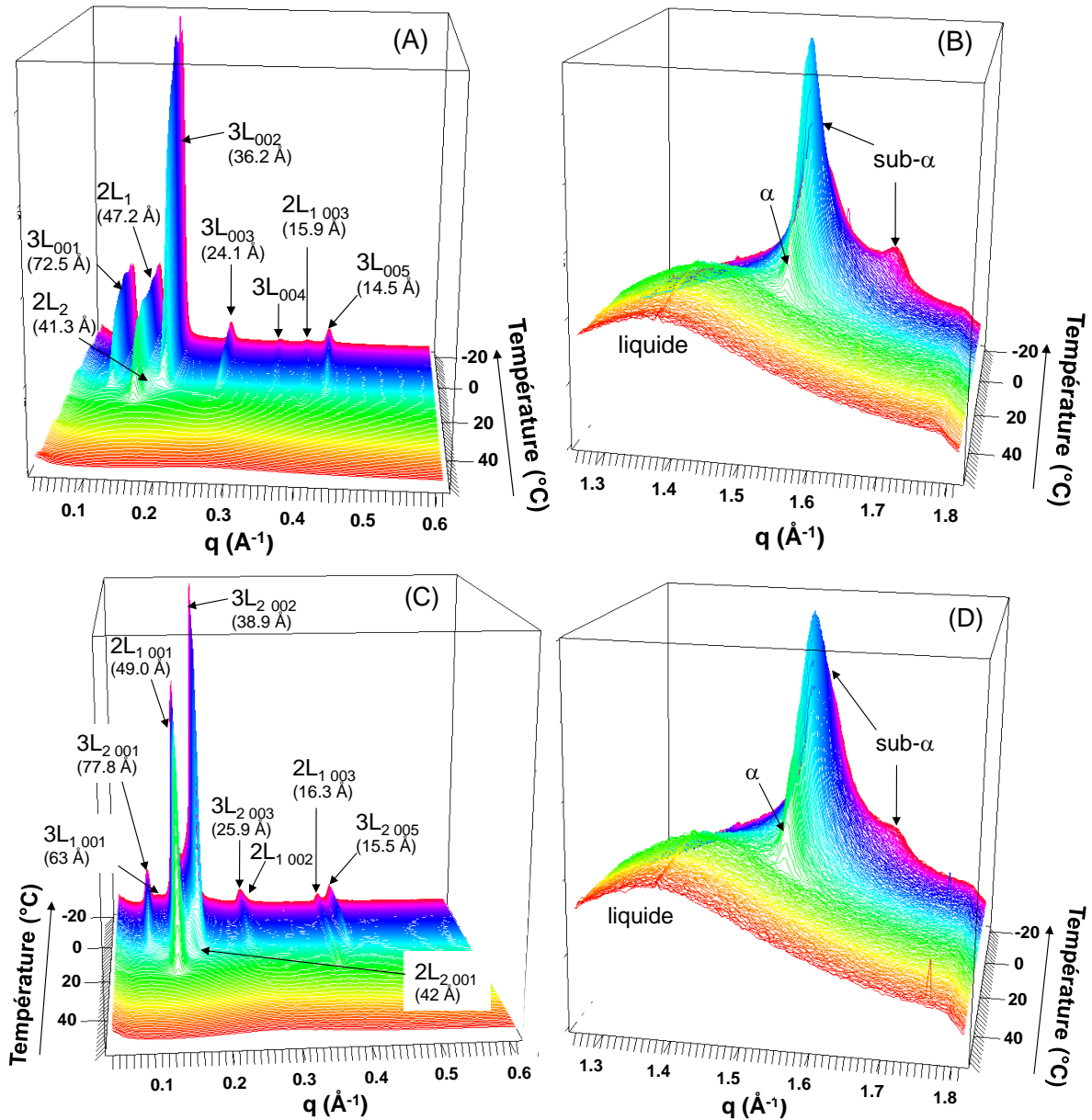


Figure CIII-8 : diagrammes de diffraction des rayons X enregistrés aux petits (A, C) et grands angles (B, D) au cours du refroidissement de 60°C à -20°C à 3°C/min des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 (A, B) et B10 (C, D).

Avant 23°C pour la fraction solide à 4°C de B8 et 25°C pour la fraction solide à 4°C de B10, les triacylglycérols sont dans l'état liquide (fondu) et donnent lieu à un signal large de diffusion vers 0,28 Å⁻¹ aux petits angles de DRX et 1,38 Å⁻¹ aux grands angles de DRX. A partir de 23°C / 25°C, les premiers triacylglycérols commencent à cristalliser dans les

Chapitre III

fractions solides à 4°C des matières grasses B8 / B10, respectivement. Les diagrammes de DRX présentent alors 2 pics de diffraction aux petits angles, situés à des vecteurs de diffusion de 0,133 Å⁻¹ et 0,395 Å⁻¹ pour la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8, et à 0,128 Å⁻¹ et 0,385 Å⁻¹ pour la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10. Ces pics présentent des rapports d'intensités relatifs et des positions en vecteurs de diffusion q permettant de les attribuer à une même organisation lamellaire de période correspondant à 2 longueurs de chaînes et notée ici $2L_1$ (47,2 Å pour B8 ou 49,0 Å pour B10). Aux grands angles de diffraction, un pic unique situé à un vecteur de diffusion de 1,53 Å⁻¹ dénote la présence d'une structure transversale α dans les deux fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 à partir de 23°C / 25°C.

Dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8, un pic peu intense situé à un vecteur de diffusion de 0,152 Å⁻¹ apparaît à 18,5°C et est attribué à une structure longitudinale $2L_2$ (41,3 Å). Enfin, 5 pics apparaissent de manière simultanée à 15°C dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8 à des vecteurs de diffusion de 0,087 Å⁻¹, 0,173 Å⁻¹, 0,261 Å⁻¹, 0,348 Å⁻¹ environ et 0,434 Å⁻¹ qui présentent des intensités relatives typiques d'une signature de structure 3L d'épaisseur 72,5 Å avec ses 5 premiers ordres de diffraction.

Dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10, 2 pics faibles en intensité situés à des vecteurs de diffusion de 0,100 Å⁻¹ et 0,150 Å⁻¹ apparaissent à 15°C. Ces pics sont attribués aux premiers ordres de diffraction de structures longitudinales 3L (63 Å) et 2L (42 Å) respectivement. Enfin, 5 pics apparaissent de manière simultanée à 11°C dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10 à des vecteurs de diffusion de 0,081 Å⁻¹, 0,162 Å⁻¹, 0,242 Å⁻¹, 0,323 Å⁻¹ environ et 0,406 Å⁻¹ qui présentent des intensités relatives typiques d'une signature de structure 3L d'épaisseur 77,8 Å avec ses 5 premiers ordres de diffraction.

Aux grands angles, la réflexion caractéristique de la sous-cellule hexagonale (phase α) située à 1,53 Å⁻¹ (4,10 Å) s'atténue au profit de deux réflexions à 1,51 Å⁻¹ (4,16 Å) et 1,67 Å⁻¹ (3,76 Å) lorsque la température atteint -8°C et en dessous. Ces changements sont attribués à une transition réversible $\alpha \rightarrow$ sub- α , déjà mis en évidence lors de refroidissements rapides et à basses températures par ten Grotenhuis *et al.* (1999), Lopez *et al.* (2002a) et Lopez *et al.* (2005a) dans des matières grasses laitières.

La **Figure CIII-9** présente l'évolution des grandes distances des pics majoritaires identifiés aux petits angles de diffraction multipliées par l'ordre de diffraction des pics, leur

intensité exprimée en % de l'intensité maximale atteinte au cours du refroidissement, ainsi que le signal calorimétrique enregistré en même temps que les diagrammes de DRXT.

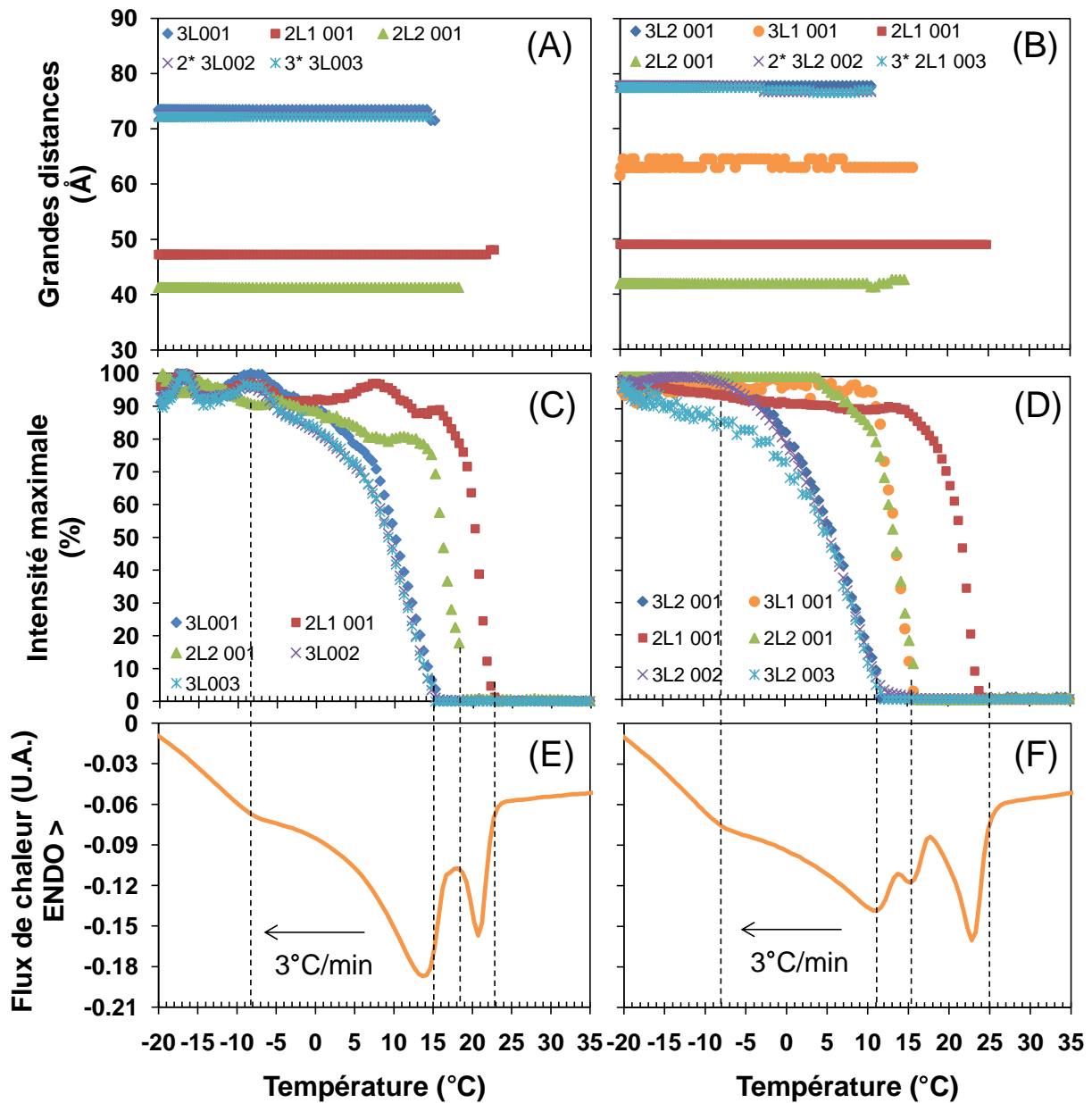


Figure CIII-9 : évolution des grandes distances (A, B) et des intensités maximales (C, D) des pics identifiés aux petits angles de diffraction des rayons X et thermogrammes (E, F) enregistrés de manière simultanée lors du refroidissement des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement.

La structure $2L_1$ de la fraction solide de la matière grasse B8 présente une légère diminution d'épaisseur au cours du refroidissement : de 48,1 Å à 47,2 Å entre le début de sa cristallisation à 23°C et 18,5°C. La structure $2L_2$ de la fraction solide de la matière grasse B10 montre également une légère diminution de son épaisseur de 42,7 Å à 42,0 Å entre le début de sa cristallisation à 15°C et 10°C. Ces diminutions générales d'épaisseur pourraient être dues à

Chapitre III

la ségrégation des triacylglycérols les plus longs dans les autres structures qui se forment conjointement comme la 3L (72,5 Å) et 3L₂ (77,8 Å).

Dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8, le pic assimilé à l'ordre 001 de la structure 2L₁ (47,2 Å) présente une évolution en intensité pouvant être décrite en trois phases. De 23°C à 18,5°C, le pic de 2L₁ 001 augmente fortement en intensité à raison de 24%/°C environ. A partir de 18,5°C, température à laquelle cristallise la structure 2L₂, le pic de 2L₁ 001 augmente plus lentement en intensité, à raison de 0,5%/°C environ. Dans la plage de température 13°C-4°C, le pic de 2L₁ 001 augmente légèrement de 15% puis diminue à nouveau de 10%. Le pic assimilé à l'ordre 001 de la structure 2L₂ (41,3 Å) présente une évolution en intensité pouvant être décrite en deux phases. Entre 18,5°C et 15°C, ce pic augmente fortement en intensité à raison de 18%/°C environ. A partir de 15°C, température à laquelle cristallise la structure 3L, le pic de 2L₂ 001 augmente plus lentement en intensité, à raison de 0,5%/°C environ. Enfin, les pics assimilés aux ordres 001, 002 et 003 de la structure 3L (72,5 Å) présentent une évolution en intensité similaire pouvant être également décrite en deux phases. Entre 15°C et 7°C, ces pics augmentent fortement en intensité à raison de 9%/°C environ. A partir de 7°C, les pics associés aux premiers ordres de diffraction de la 3L augmentent plus lentement en intensité, à raison de 1%/°C environ. A partir de -12°C, les différents pics identifiés aux petits angles de diffraction présentent de faibles fluctuations d'intensité pouvant être reliées à des changements structuraux induits par la transition $\alpha \rightarrow$ sub- α .

Le thermogramme enregistré au cours du refroidissement de la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8 montre 3 exothermes, débutant à 23°C, 18,5°C et 15°C. Le premier exotherme, très énergétique, est clairement relié à la cristallisation de la structure α 2L₁ (47,2 Å). Le deuxième exotherme est relié principalement à la cristallisation de la structure α 2L₂ (41,3 Å) et en partie à la cristallisation de la structure α 2L₁ (47,2 Å), puisque nous avons vu que la vitesse d'augmentation de l'intensité des pics de diffraction associés à cette structure était très faible à partir de 18,5°C. L'enthalpie associée à ce deuxième exotherme est faible, ce qui va également dans le sens d'une association de cet événement avec la cristallisation de la structure α 2L₂ (41,3 Å), puisque le pic de diffraction aux petits angles associé à cette structure est très peu intense, dénotant sa faible présence par rapport aux autres structures. Enfin, le troisième exotherme, fortement énergétique, est relié essentiellement à la cristallisation de la structure α 3L (72,5 Å), et dans une plus faible mesure à la cristallisation des 2 structures 2L, dont la vitesse d'augmentation des pics de diffraction est alors très faible.

Chapitre III

Dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10, le pic assimilé à l'ordre 001 de la structure $2L_1$ (49,0 Å) présente une évolution en intensité pouvant être décrite en trois phases. De 25°C à 20°C, le pic de $2L_1 001$ augmente fortement en intensité à raison de 21%/°C environ. A partir de 20°C, la vitesse d'augmentation de l'intensité du pic de $2L_1 001$ diminue légèrement et atteint un minimum d'environ 0,3%/°C à 15°C, température à partir de laquelle débute la cristallisation de la $2L_2$ (42 Å) et de la $3L_1$ (63 Å). Les pics assimilés aux ordres 001 des structures $2L_2$ (42 Å) et $3L_1$ (63 Å) présentent une évolution en intensité similaires. Entre 15°C et 11°C, ces pics augmentent fortement en intensité à raison de 19%/°C environ. A partir de 11°C, température à laquelle cristallise la structure $3L_2$, les pics de $3L_1 001$ et de $2L_2 001$ ont atteint leur maximum et n'augmentent plus en intensité. Enfin, les pics assimilés aux ordres 001 , 002 et 003 de la structure $3L_2$ (75,6 Å) présentent une évolution en intensité similaire pouvant être également décrite en deux phases. Entre 11°C et 0°C, ces pics augmentent fortement en intensité à raison de 8%/°C environ. A partir de 0°C, les pics associés aux premiers ordres de diffraction de la $3L_2$ augmentent moins rapidement, à raison de 4%/°C environ.

Le thermogramme enregistré au cours du refroidissement de la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10 montre 3 exothermes bien distincts, débutant à 25°C, 16°C et 12°C. Le premier exotherme, très énergétique, est clairement relié à la cristallisation de la structure $\alpha 2L_1$ (49,0 Å). Le deuxième exotherme est relié essentiellement à la cristallisation des structures $\alpha 2L_2$ (42 Å) et $\alpha 3L_1$ (63 Å). L'enthalpie associée à ce deuxième exotherme est relativement faible, ce qui va dans le sens d'une association de cet événement avec la cristallisation des structures $\alpha 2L_2$ (42 Å) et $\alpha 3L_1$ (63 Å), puisque les pics de diffraction aux petits angles associés à ces structures sont peu intenses, dénotant leur faible présence par rapport à la structure $2L_1$ (49,0 Å) déjà formée. Enfin, le troisième exotherme, fortement énergétique, est relié essentiellement à la cristallisation de la structure $\alpha 3L$ (75,6 Å), et dans une plus faible mesure à la cristallisation des autres structures déjà formées, dont la vitesse d'augmentation des pics de diffraction est alors très faible.

Le comportement structural des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 est donc différent au cours du refroidissement appliqué. Ces deux matières grasses commencent à cristalliser à 23 / 25°C majoritairement en une structure $\alpha 2L$ de 47,2 et 49,0 Å d'épaisseur, respectivement. La deuxième structure qui cristallise dans la fraction solide à 4°C

de la matière grasse B8 est une structure α 2L₂ (41,3 Å), alors qu'il s'agit d'une coexistence de α 2L₂ (42 Å) et α 3L₁ (63 Å) dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10. La température de cristallisation de la α 2L₂ est plus faible dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10 : 15°C au lieu de 18,5°C. Enfin, la troisième et dernière variété cristalline qui se forme est une structure lamellaire de type α 3L de période 72,5 Å ou 75,6 Å selon la matière grasse d'origine B8 ou B10. Là encore, cette structure cristallise à plus basse température dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10 : 11°C au lieu de 15°C. Les vitesses d'augmentation de l'intensité des pics de diffraction des différentes structures sont très comparables d'une matière grasse à l'autre. Le comportement structural des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours du refroidissement peut donc être résumé dans les diagrammes suivants :

- B8 sol4 : liquide (liq.)
 - (23°C) → α 2L (47,2 Å) + liq.
 - (18,5°C) → α 2L (47,2 Å) + α 2L (41,3 Å) + liq.
 - (15°C) → α 2L (47,2 Å) + α 2L (41,3 Å) + α 3L (72,5 Å) liq.
 - (8°C) → sub- α 2L (47,2 Å) + sub- α 2L (41,3 Å) + sub- α 3L (72,5 Å) liq.

- B10 sol4 : liquide (liq.)
 - (25°C) → α 2L (49,0 Å) + liq.
 - (15°C) → α 2L (49,0 Å) + α 2L (42 Å) + α 3L (63 Å) + liq.
 - (11°C) → α 2L (49,0 Å) + α 2L (42 Å) + α 3L (63 Å) + α 3L (75,6 Å) liq.
 - (8°C) → sub- α 2L (49,0 Å) + sub- α 2L (42 Å) + sub- α 3L (63 Å) + sub- α 3L (75,6 Å) liq.

5. Discussion

Plusieurs conclusions peuvent d'ores et déjà être tirées des observations réalisées au cours du refroidissement de ces matières grasses grâce à l'apport des techniques complémentaires que sont la calorimétrie et la diffraction des rayons X. L'analyse thermique nous laissait suggérer que le dernier pic exothermique majeur enregistré au cours du refroidissement des différentes matières grasses provenait de la cristallisation des mêmes triacylglycérols. Cependant, la diffraction des rayons X nous a montré que les structures cristallines formées par ces triacylglycérols présentaient des périodes lamellaires différentes entre les fractions liquides et solides à 4°C, suggérant que les lipides les constituant portent des chaînes hydrocarbonées de longueurs distinctes.

Les différences de distances interlamellaires des structures observées entre les fractions liquides à 4°C sont relativement faciles à interpréter. Une structure majoritaire α 3L a été identifiée, avec une épaisseur supérieure dans la fraction liquide de la matière grasse

Chapitre III

enrichie en acides gras insaturés. Cette différence d'épaisseur est due à des triacylglycérols à plus longue chaînes d'acide gras, la cristallisation ayant lieu en α , c'est-à-dire les triacylglycérols étant perpendiculaires au plan formé par les empilements longitudinaux (Small, 1986). Les triacylglycérols qui cristallisent dans ces structures α 3L sont composés d'acides gras à longues chaînes, dont au moins un contient une ou plusieurs insaturation, permettant d'expliquer la structure 3L (Larsson, 1994). La variation de grande distance réticulaire d en fonction du nombre d'atomes de carbones des chaînes d'acides gras n est connue pour des triacylglycérols saturés monoacides cristallisant sous forme α et obéit à l'équation $d = 2,59 n + 4,10$ (Small, 1986, Ollivon, 1992). Bien que cette équation ne soit valable en théorie que pour des triacylglycérols trisaturés monoacides, Lopez *et al.* (2006b) l'ont utilisé pour déterminer la longueur moyenne des chaînes d'acides gras des triacylglycérols qui cristallisent dans la fraction stéarique de la matière grasse laitière. Cette équation correspond à des cristaux de type 2L, compte tenu des acides gras considérés. La valeur 4,10 correspond alors à la contribution du glycérol alors que la valeur 2,59 correspond environ au double de la distance 1,27 Å entre 2 carbones adjacents d'une chaîne d'acides gras dans sa configuration zig-zag plan (Small, 1986). Il est donc possible d'approcher le nombre moyen d'atomes de carbone composant les chaînes hydrocarbonées de triglycérides monoacides saturés qui conduiraient à la même période d'empilement smectique : $d = 2,59 * 3/2 n + 4,10 * 2 = 3,89 n + 8,2$, compte tenu du fait qu'il y aurait 3 longueurs de chaînes et non plus 2 et 2 glycérols impliqués dans cette structure théorique. A l'aide de cette équation, nous obtenons des nombre d'atomes de carbones moyens de 16,3 et 17,3 pour les structures α 3L (71,5 Å) et α 3L (75,6 Å) identifiées, soit une différence d'environ 1 carbone entre les structures identifiées dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement. Nous avons comparé ces chiffres obtenus par les observations de DRXT avec le nombre d'atomes de carbones moyen déterminé à partir des données de composition en acides gras des fractions liquides à 4°C des deux matières grasses : 15,3 et 16,3 carbones pour B8 et B10, respectivement. Nous faisons donc l'hypothèse que la composition en acides gras de chacune des fractions liquides à 4°C est représentative de la composition en acides gras de ces structures α 3L, ces structures étant les structures majoritaires qui se forment au cours du refroidissement. Par les données de compositions en acides gras des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, nous obtenons des nombre d'atomes de carbones moyens de 15,4 et 16,4, respectivement. Il y a donc une différence de 1 carbone environ entre les chiffres obtenus par le calcul issu des données de DRXT et les données de

composition, pouvant provenir des approximations et hypothèses posées sur le modèle d'estimation du nombre de carbone à partir des données de DRXT, ainsi que l'hypothèse selon laquelle la composition globale des fractions liquides est représentative de la composition en acides gras des structures α 3L. Dans tous les cas, la différence estimée d'environ 1 carbone entre les structures α 3L des deux fractions liquides à 4°C est conservée quelle que soit la méthode de calcul, ce qui tendrait à confirmer la valeur de la différence en nombre de carbone qu'il peut exister entre les acides gras moyens qui composent les triacylglycérols formant ces structures α 3L.

La deuxième structure qui cristallise à plus basse température et en plus faible proportion, a déjà été identifiée dans la fraction liquide à 21°C de la matière grasse laitière et interprétée comme une 2L par Lopez *et al.* (2009b). En fait, cette structure pourrait être composée de triacylglycérols comprenant un acide gras court et un ou deux acides gras insaturés, du type BuPO ou POO. Ces triacylglycérols seraient cependant arrangés en une structure 3L comme dans le modèle proposé par Small (1986) pour SOC, d'environ 50,8 Å d'épaisseur comme étayé par les observations en DRX de Lavigne (1995) sur BuPO (**Figure CIII-10**). Cette épaisseur correspondrait bien avec la distance que nous avons mesurée par DRX pour cette structure. La température de cristallisation de BuPO lors d'un refroidissement à 2°C/min a été évaluée à -10°C environ par Lavigne (1995). En considérant que la présence de la structure 3L (71,5-75,6 Å) à partir de 4,5°C dans les fractions liquides à 4°C pourrait jouer le rôle de site de nucléation hétérogène pour cette structure, il semble plausible que la cristallisation d'une structure comprenant des triacylglycérols de type BuPO dans ces fractions complexes ait lieu à plus haute température, soit entre -5°C et 0°C comme observé ici. Ainsi, nous attribuerons à présent les pics de DRXT observés à 48,1 Å et 49,0 Å dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement, à des structures 3L₂.

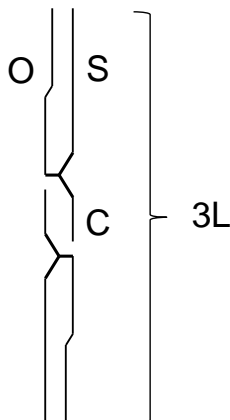


Figure CIII-10 : modèle d'arrangement cristallin probable pour la forme α du sn-1-stearoyl-2-oleoyl-3-caproyl-glycérol (SOC) proposé par Small (1986) et utilisé par extension par

Chapitre III

Lavigne (1995) pour expliquer les diagrammes de diffraction des rayons X observés pour le BuPO.

Les proportions relatives des structures $3L_1$ et $3L_2$ en présence en fin de refroidissement sont très proches, les rapports d'intensité des pics de diffraction associés à ces deux structures étant très proches. La variation d'enthalpie déterminée sur l'ensemble du refroidissement montre cependant des valeurs plus faibles dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses enrichies en acides gras insaturés. A -40°C, le signal calorimétrique enregistré rejoint la ligne de base définie par le liquide, nous permettant raisonnablement de faire l'hypothèse que l'ensemble de cette matière grasse est cristallisée à cette température. La différence de variation d'enthalpie de cristallisation entre les deux matières grasses proviendrait donc uniquement des types de cristaux formés et/ou de la composition des triacylglycérols en acides gras. Cette dernière hypothèse est en accord avec les observations de Couvreur *et al.* (2006) et Lavigne (1995) qui montrent que la cristallisation se passe à moindre coût énergétique lorsque la structure des triacylglycérols intègre plus de défauts tels des acides gras courts ou insaturés. C'est bien le cas ici où la composition globale de la fraction liquide à 4°C de B10 montre un enrichissement en acides gras insaturés, par exemple le C18:1 *c9*, par rapport à la fraction liquide à 4°C de B8.

Les fractions solides à 4°C des matières grasses étudiées présentent les comportements thermique et structural les plus compliqués au cours du refroidissement. Dans ces matières grasses, les cristaux se forment successivement les uns après les autres : dès qu'une nouvelle structure commence à se former, la précédente arrête de cristalliser et d'intégrer en son sein des triacylglycérols supplémentaires. Les phases solides qui se forment au cours du refroidissement présentent des structures caractérisant des variétés polymorphes dont l'arrangement transversal des chaînes est de type hexagonal (α) ou pseudo-hexagonal (sub- α). De plus, la dernière structure α 3L formée lors du refroidissement commence à cristalliser entre 11°C et 14°C dans les fractions solides à 4°C et continue jusque vers -8°C, à partir de laquelle l'intensité des réflexions devient constante. La température de fin de cristallisation observée en MCD, c'est-à-dire lorsque le signal enregistré rejoint la ligne de base du liquide est plutôt de -30°C, mais la proportion de variation d'enthalpie entre -8°C et -30°C est mineure par rapport au dernier exotherme, associé à la cristallisation des cristaux de type sub- α 3L, ce qui pourrait expliquer que nous n'avons plus guère observé d'augmentation des pics de diffraction en DRXT. La cristallisation de matière grasse dans ces fractions solides

continue donc en dessous de 4°C, température du fractionnement, probablement jusqu'à -30°C. Cela peut être expliquée par : i) la présence de fraction liquide à 4°C issue du fractionnement et ii) la surfusion nécessaire pour cristalliser les triacylglycérols à plus bas point de fusion contenus dans cette matière grasse. Le chauffage devrait nous permettre de vérifier si de la matière fond entre -40°C et 4°C, auquel cas nous pourrions conclure quant à la présence de fraction liquide dans ces fractions solides à 4°C.

Les différences d'épaisseur des structures longitudinales formées entre les fractions solides à 4°C des matières grasses témoin et enrichie en acides gras insaturés sont dues là aussi à des triacylglycérols à longueurs de chaînes d'acides gras différents, la cristallisation ayant lieu en α , les triacylglycérols étant donc perpendiculaires au plans formés par les empilements longitudinaux (Small, 1986). Les équations utilisées pour estimer le nombre d'atomes de carbones moyen des acides gras saturés pour des triacylglycérols monoacides équivalents à ceux qui composent les différentes structures longitudinales identifiées dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 peuvent être réutilisées pour les fractions solides à 4°C. Les résultats sont présentés dans le **Tableau CIII-7**.

Tableau CIII-7 : longueurs moyennes des chaînes d'acides gras composant les triacylglycérols des structures cristallines formées lors du refroidissement des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10, déterminées à partir de les équations dérivées de l'équation définie par Small (1986) : $d = 3,89 n + 8,20$ pour les structures 3L et $d = 2,59 n + 4,10$ pour les structures 2L, où d = épaisseur des structures (Å) mesurée par DRXT et n = nombre d'atomes de carbones moyen.

Structure	B8 sol4		B10 sol4		Différence de longueur de chaîne (carbones)
	Epaisseur de Structure (Å)	Nombre de carbones	Epaisseur de Structure (Å)	Nombre de carbones	
3L ₁	72,5	16,5	77,8	17,9	1,4
3L ₂	-	-	63	14,1	-
2L ₁	47,2	16,6	49,0	17,3	0,7
2L ₂	41,3	14,4	42	14,6	0,2

La structure 2L₁, qui est la première structure à cristalliser dans les deux matières grasses, a une épaisseur comprise entre 16 et 18 atomes de carbones. Cette structure est composée des triacylglycérols les plus saturés et à plus grande longueur de chaînes, soit les PPP, SSS et les combinaisons de S et P (Lavigne, 1995). Les analyses de compositions en acides gras des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 montrent un ratio P/S de 2,70 pour B8 et 0,97 pour B10. Autrement dit, la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10 est enrichie en C18:0 au détriment du C16:0, ce qui irait bien dans le même sens que les

Chapitre III

observations de DRXT. La structure $2L_2$, dont les pics de diffraction sont plus faibles en intensité, ce qui dénote une plus faible proportion de cristaux, montre une différence en nombre d'atomes de carbones moyen de 0,2 entre les fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement. Cette différence est très faible, nous laissant penser que des triacylglycérols très similaires cristallisent dans ces deux structures, c'est-à-dire des triacylglycérols saturés avec 3 acides gras à longueurs de chaînes moyennes, aux alentours de 14 carbones. La structure $3L_1$, majoritaire à -20°C, comprendrait des triacylglycérols avec des acides gras à nombre d'atomes de carbones compris entre 16,5 et 17,9. Cette structure doit être composée de triacylglycérols longs, comprenant au moins un acide gras insaturé contraignant à la formation de 3L, mais pas d'acide gras court. Dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10, les acides gras qui composent cette structure 3L doivent être majoritairement à 18 carbones, compte tenu du nombre théorique de carbones estimé à partir des observations de DRXT.

Cependant, pour ces matières grasses, les proportions des différentes structures cristallines en présence sont modifiées, notamment les deux structures principales α $2L_1$ et α $3L_1$. La fraction solide à 4°C de la matière grasse B10 enrichie en acides gras insaturés présente en proportion plus de structures α 2L formées en début de cristallisation, comprenant les triacylglycérols à plus haut point de fusion, c'est-à-dire avec des acides gras longs et saturés. Cependant cette augmentation de la proportion des structures α 2L dans la fraction solide à 4°C ne tient pas compte de la proportion relative de fraction solide à 4°C dans chacune des deux matières grasses considérées. La **Figure CIII-11** représente le bilan des structures formées au cours du refroidissement des fractions liquides et solides à 4°C des matières grasses B8 et B10.

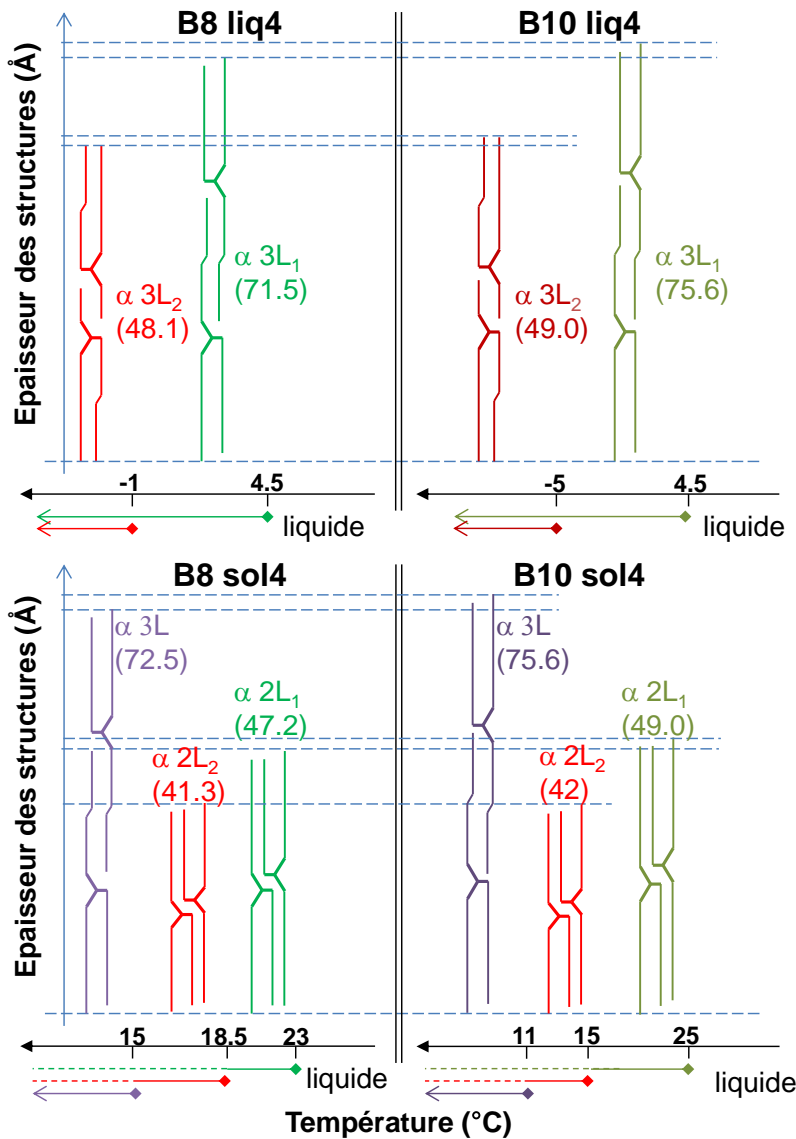


Figure CIII-11 : représentation schématique des types de triacylglycérols formant les structures cristallines observées au cours du refroidissement des fractions liquides et solides à 4°C des matières grasses B8 et B10. Des bilans sont représentés en dessous des structures : trait continu = structure en formation, trait pointillé = structure formée dont la cristallisation est arrêtée.

C. Propriétés de fusion des triacylglycérols fractionnés à 4°C au cours d'un chauffage à vitesse rapide

1. Propriétés thermiques étudiées au cours d'un chauffage à 2°C/min

Les propriétés thermiques des matières grasses anhydres et des fractions solide et liquide séparées à 4°C ont été étudiées par MCD au cours d'un chauffage à 2°C/min de -50°C à 60°C après un refroidissement à même vitesse depuis 60°C. La **Figure CIII-12** présente les

thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des matières grasses anhydres et de leurs fractions séparées à 4°C.

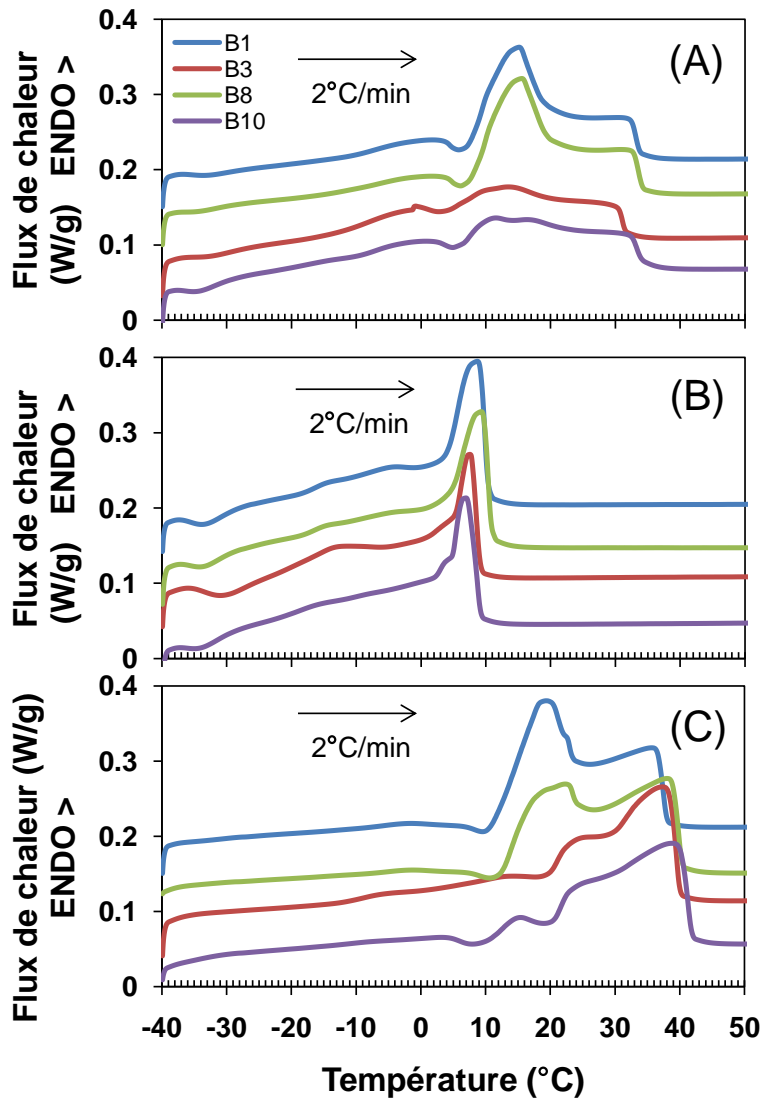


Figure CIII-12 : thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des matières grasses B1, B3, B8 et B10 à 2°C/min de -50°C à 60°C après un refroidissement de 60°C à -50°C à 2°C/min(A), ainsi que leurs fractions liquides à 4°C (B) et solides à 4°C (C).

Les thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des matières grasses anhydres d'origine présentent trois événements endothermiques principaux. Les matières grasses B1 et B8, les plus riches en acides gras saturés, présentent des profils en refroidissement très similaires, tout comme les matières grasses B3 et B10. Dès -40°C, les triacylglycérols commencent à fondre et génèrent un endotherme faiblement intense jusque vers 7°C dans toutes les matières grasses. A partir de 7°C, un petit exotherme est enregistré en transition avant un second endotherme, intense uniquement dans les matières grasses témoins B1 et B8,

Chapitre III

qui s'étend de 9°C à 22°C environ. Enfin, un troisième endotherme moyennement intense est enregistré à partir de 22°C jusqu'à la fusion finale vers 35°C.

Les fractions liquides à 4°C des différentes matières grasses présentent des profils en chauffage très proches. Un premier petit endotherme est enregistré dès -40°C, quasi immédiatement suivi d'un petit exotherme vers -35°C. Un second endotherme relativement peu intense mais s'étendant de -35°C à 2°C environ est ensuite enregistré, avant qu'un troisième endotherme très intense mais n'allant que de 2°C à 9-11°C environ ait lieu. A partir de 11°C, toutes les fractions liquides à 4°C sont fondues et présentent un signal calorimétrique de ligne de base. Les endothermes enregistrés jusqu'à 2°C correspondent à la fusion des triacylglycérols à bas point de fusion, alors que l'endotherme le plus intense entre 2°C et 9-11°C correspond à la fusion de triacylglycérols à moyen point de fusion.

Les fractions solides à 4°C des différentes matières grasses présentent des profils en chauffage relativement différents comparativement aux autres matières grasses, avec trois à quatre événements endothermiques enregistrés. Entre -40°C et 5-8°C environ, un premier endotherme très peu intense est enregistré, correspondant à la présence de triacylglycérols à bas point de fusion de la fraction liquide à 4°C n'ayant pu être éliminés lors du fractionnement. Vers 10°C, un petit exotherme est enregistré dans les fractions solides à 4°C des matières grasses B1, B8 et B10, en transition avant un nouvel endotherme intense dans les fractions solides à 4°C de B1 et B8, allant jusqu'à 25°C mais peu intense dans la fraction solide à 4°C de B10 et ne s'étendant que jusque vers 20°C. La fraction solide à 4°C de B3 ne présente pas de phase transitoire avant 20°C, et un seul endotherme est enregistré depuis -40°C. Dans les fractions solides à 4°C des matières grasses témoins B1 et B8, un dernier endotherme est enregistré entre 25°C et la température de fusion finale vers 40°C, relativement intense comparé au dernier endotherme enregistré dans les matières grasses d'origine correspondant. Dans les fractions solides à 4°C des matières grasses enrichies en acides gras insaturés B3 et B10, le dernier endotherme enregistré entre 20°C et 40-42°C est précédé d'un léger exotherme. Ce dernier endotherme montre une petite baisse d'intensité vers 30°C.

Afin de décrire au mieux ces thermogrammes et pouvoir les comparer, nous avons extrait plusieurs paramètres explicités en **Figure CIII-13** et compilés dans le **Tableau CIII-8**, tels la variation d'enthalpie déterminée entre -40°C et la fusion finale de chaque matière grasse (ΔH), les proportions de variation d'enthalpie associées aux pics à bas, moyen et haut

point de fusion (ΔH_{PBPF} , ΔH_{PMPF} et ΔH_{PHPF} , respectivement) et la température de fusion finale (T_{offset}).

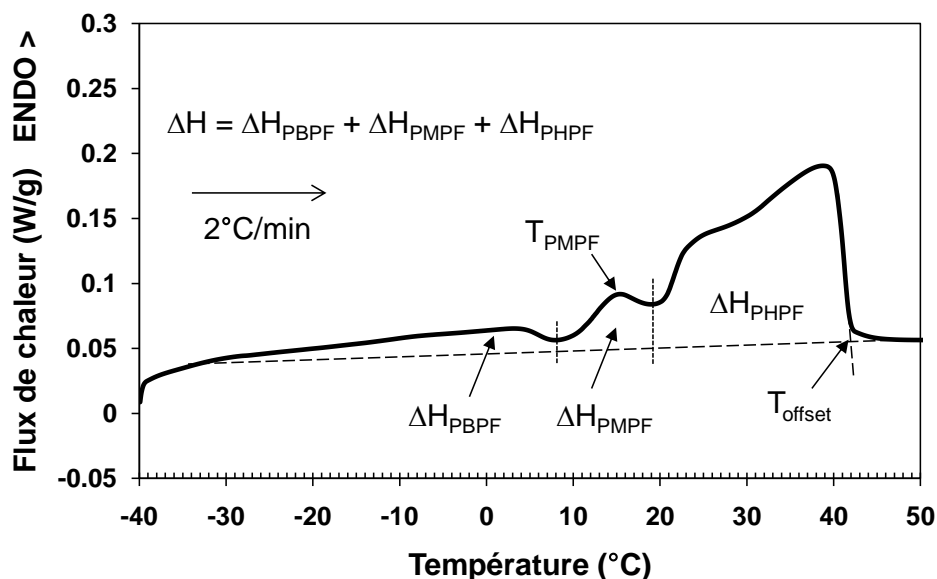


Figure CIII-13 : paramètres extraits des thermogrammes enregistrés au cours du chauffage de -50°C à 60°C à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ des matières grasses B8, B10 et de leurs fractions séparées à 4°C . Exemple de paramètres extraits sur B10 sol4.

Tableau CIII-8 : paramètres extraits des thermogrammes enregistrés au cours du chauffage de -50°C à 60°C à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ des matières grasses anhydres B1, B3, B8 et B10 et de leurs fractions solides (sol) et liquides (liq) séparées à 4°C .

	ΔH (J/g)	ΔH_{PBPF} (%)	ΔH_{PMPF} (%)	ΔH_{PHPF} (%)	T_{PMPF} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{offset} ($^{\circ}\text{C}$)
B1	$89,38 \pm 1,70$	$26,1 \pm 0,1$	$58,0 \pm 0,1$	$15,9 \pm 0,1$	$15,14 \pm 0,01$	$33,83 \pm 0,05$
B3	$82,08 \pm 1,63$	$34,0 \pm 1,0$	$52,9 \pm 0,3$	$13,2 \pm 0,8$	$11,06 \pm 0,10$	$35,83 \pm 0,75$
B8	$86,96 \pm 0,56$	$25,2 \pm 0,3$	$56,8 \pm 0,6$	$18,0 \pm 0,3$	$15,51 \pm 0,08$	$34,52 \pm 0,47$
B10	$79,86 \pm 0,64$	$40,3 \pm 0,4$	$43,7 \pm 0,1$	$16,1 \pm 0,4$	$11,64 \pm 0,15$	$36,00 \pm 2,31$
B1 liq4	$75,37 \pm 0,80$	$56,7 \pm 1,5$	$43,4 \pm 1,5$	0 ± 0	-	$10,43 \pm 0,05$
B3 liq4	$64,19 \pm 3,11$	$68,3 \pm 1,5$	$31,8 \pm 1,5$	0 ± 0	-	$9,05 \pm 0,15$
B8 liq4	$72,87 \pm 1,99$	$55,8 \pm 1,6$	$44,2 \pm 1,6$	0 ± 0	-	$10,90 \pm 0,12$
B10 liq4	$70,52 \pm 1,89$	$68,2 \pm 0,7$	$31,8 \pm 0,7$	0 ± 0	-	$9,25 \pm 0,03$
B1 sol4	$99,34 \pm 0,68$	$13,7 \pm 0,2$	$48,3 \pm 0,4$	$38,0 \pm 0,2$	$19,36 \pm 0,10$	$38,08 \pm 0,05$
B3 sol4	$94,50 \pm 0,73$	$19,4 \pm 0,2$	$13,7 \pm 0,1$	$66,9 \pm 0,2$	$14,24 \pm 0,02$	$42,45 \pm 4,11$
B8 sol4	$89,81 \pm 0,72$	$11,6 \pm 0,3$	$36,8 \pm 0,1$	$51,6 \pm 0,4$	$22,24 \pm 0,12$	$40,36 \pm 0,06$
B10 sol4	$87,19 \pm 0,42$	$22,1 \pm 0,1$	$11,4 \pm 0,1$	$66,5 \pm 0,1$	$15,38 \pm 0,02$	$41,88 \pm 0,05$

Les paramètres extraits des thermogrammes enregistrés sur les matières grasses anhydres d'origine ont déjà été discutés dans le **Chapitre I** et serviront ici comme base de référence pour comparer avec les fractions extraites à 4°C .

Chapitre III

Les températures de fin de fusion T_{offset} , comme les températures de début de cristallisation T_{onset} déterminées au cours du refroidissement, sont relativement homogènes entre les fractions liquides à 4°C, entre les fractions solides à 4°C et entre les matières grasses anhydres d'origine. Cette température de fin de fusion est le reflet de la température de début de cristallisation, à la surfusion près. En conséquence, la T_{offset} est largement inférieure dans les fractions liquides à 4°C par rapport aux matières grasses anhydres d'origine correspondantes : 9-11°C contre 33,8-36°C respectivement, et largement supérieure dans les fractions solides à 4°C par rapport aux matières grasses anhydres d'origine correspondantes : 38-42,5°C contre 33,8-36°C respectivement. Là encore, l'augmentation de la température de fin de fusion dans les fractions solides à 4°C par rapport aux matières grasses anhydres d'origine correspondant est due à la dissolution des triacylglycérols à plus haut point de fusion dans la phase liquide à plus haute température (Marangoni et Lencki, 1998).

Les températures du maximum du pic à moyen point de fusion T_{PMPF} sont inférieures dans les matières grasses anhydres d'origines et les fractions solides à 4°C enrichies en acides gras insaturés par rapport à ces deux matières grasses issues de régimes témoins. Une différence d'environ 4°C est observée dans les matières grasses anhydres d'origine, alors que dans les fractions solides à 4°C, la différence est de 5 à 7°C. Comme déjà discuté dans le **Chapitre I**, cette augmentation semble directement liée à la proportion d'acides gras insaturés dans les matières grasses. La T_{PMPF} est également augmentée dans les fractions solides à 4°C par rapport aux matières grasses anhydres d'origine, d'environ 4°C, excepté la fraction solide à 4°C de la matière grasses B8 qui présente une augmentation de la T_{PMPF} de près de 7°C.

Les variations d'enthalpie déterminées entre -40°C et la fusion finale des matières grasses montrent des valeurs systématiquement inférieures dans les matières grasses issues des régimes enrichis en acides gras insaturés B3 et B10 : 92% dans les matières grasses anhydres d'origine, 85-97% dans les fractions liquides à 4°C et 95-97% dans les fractions solides à 4°C. L'enrichissement en acides gras insaturé conduit donc à une diminution globale de la variation d'enthalpie, ainsi que pour les fractions liquides et solides à 4°C. Dans toutes les fractions étudiées, l'enrichissement en acides gras insaturés conduit à une augmentation de la proportion de variation d'enthalpie associée au pic à bas point de fusion, au détriment du pic à moyen point de fusion. Dans les fractions solides à 4°C, une faible proportion de la variation d'enthalpie totale est associée au pic à bas point de fusion, dont la plage de fusion s'étend de -40°C à 5°C environ. Autrement dit, une partie de fraction liquide à 4°C est bien présente comme nous l'avions suspecté dans la fraction solide à 4°C, à hauteur de 22% maximum selon les variations d'enthalpie relatives. Le pic à haut point de fusion n'existe pas

dans les fractions liquides à 4°C. Ce pic diminue relativement aux autres pics dans les matières grasses anhydres d'origine, mais il augmente fortement dans les fractions solides à 4°C après enrichissement en acides gras insaturés.

Les variations d'enthalpies en chauffage des fractions liquides à 4°C représentent 84% de la variation d'enthalpie des matières grasses d'origine pour les régimes témoins B8 et B10, et 78-88% pour les régimes enrichis en acides gras insaturés B3 et B10. De la même façon, les variations d'enthalpie en chauffage des fractions solides à 4°C représentent 103-111% de la variation d'enthalpie des matières grasses d'origine pour les régimes témoins B8 et B10, et 109-115% pour les régimes enrichis en acides gras insaturés B3 et B10. Ces différences de variation d'enthalpie sont donc très proches entre les régimes témoins et les régimes enrichis en acides gras insaturés. Le fractionnement a donc le même effet sur la variation d'enthalpie entre les matières grasses témoins et les matières grasses enrichies en acides gras insaturés.

2. Comportement structural des matières grasses anhydres B8 et B10 au cours d'un chauffage à 3°C/min

Les structures cristallines formées dans les matières grasses anhydres B8 et B10 ont été identifiées par DRXT-MCD au cours d'un chauffage à 3°C/min de -20°C à 60°C suivant un refroidissement à la même vitesse depuis 60°C. La **Figure CIII-14** présente les diagrammes de DRXT des matières grasses B8 et B10 enregistrés au cours du chauffage.

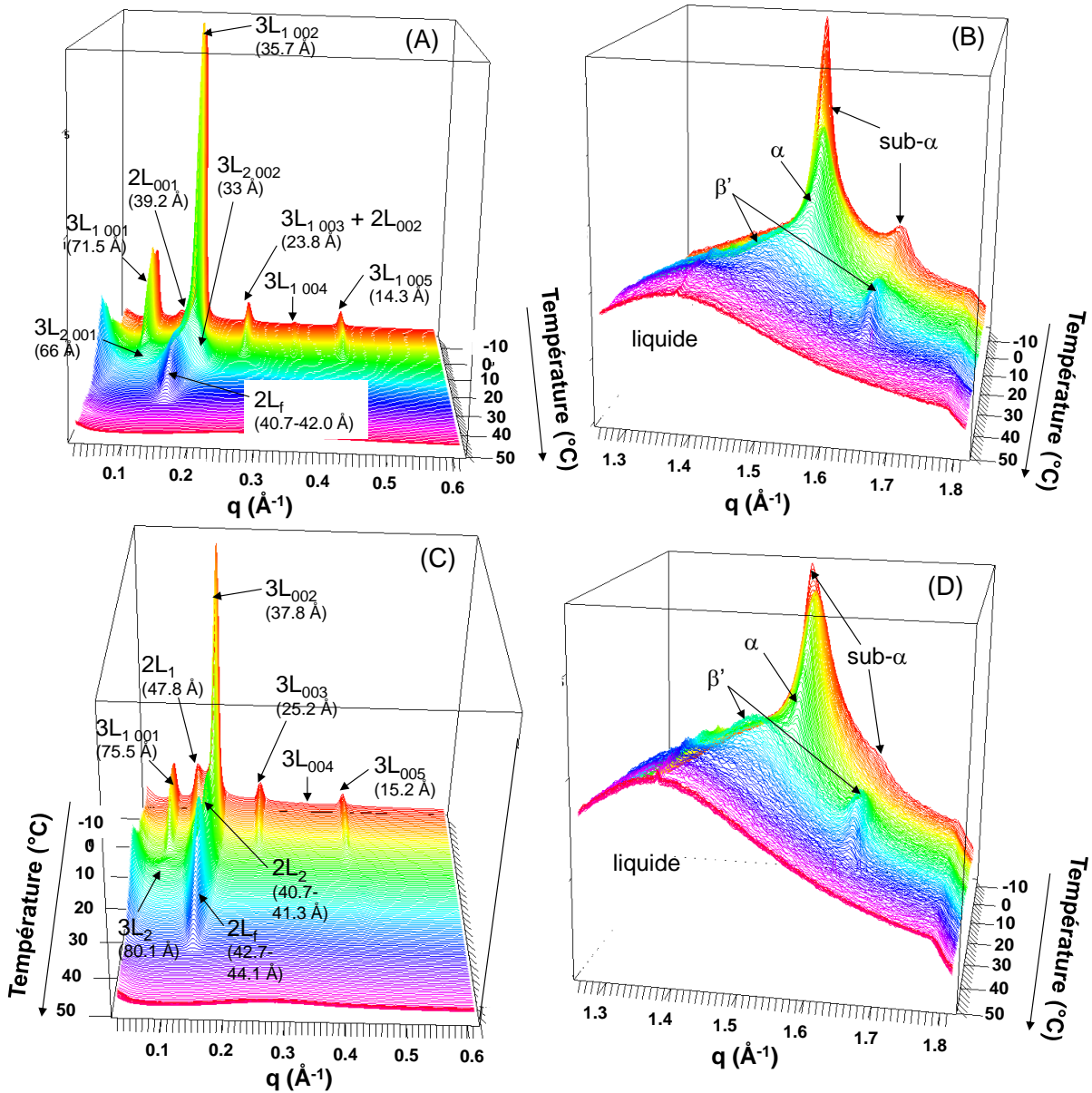


Figure CIII-14 : diagrammes de diffraction des rayons X enregistrés aux petits (A, C) et grands angles (B, D) au cours du chauffage de -20°C à 60°C à $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ des matières grasses B8 (A, B) et B10 (C, D).

Le comportement structural des matières grasses B8 et B10 enregistré au cours du chauffage de -20°C à 60°C à $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ après un refroidissement à la même vitesse depuis 60°C est très similaire à celui déjà mis en évidence lors d'un chauffage à même vitesse depuis -5°C (**Chapitre I**). Dans la matière grasse B8, la fusion de la structure α $3L_1$ ($71,5 \text{ \AA}$) a lieu dès le début du chauffage jusqu'à $7,5^{\circ}\text{C}$ environ, température à laquelle elle se réorganise en β' $3L_2$ (66 \AA) qui elle, fond vers 18°C . La structure α $2L_1$ ($39,2 \text{ \AA}$) croit lors de la fin de fusion de la α $3L_1$ ($71,5 \text{ \AA}$) avant de fondre de 9°C jusqu'à 18°C environ. Les structures β' $3L_2$ (66 \AA) et

α $2L_1$ (39,2 Å) se réorganisent ensuite vers 18°C pour donner naissance à la dernière structure cristalline β' $2L_f$ (40,7-42,0 Å) avant la fusion finale de la matière grasse vers 35°C. Cette structure β' $2L_f$ (40,7-42,0 Å) augmente légèrement en épaisseur en fin de chauffage.

Dans la matière grasse B10, le comportement structural au cours du chauffage est bien différent. La fusion de la structure α $3L_1$ (75,5 Å) a lieu dès le début du chauffage jusqu'à 7°C environ, température à laquelle elle se réorganise en β' $2L_2$ (40,7-41,3 Å) majoritairement et $3L_2$ (80,1 Å) en faible proportion, avec un pic de diffraction du premier ordre très faible en intensité et qui disparaît très rapidement vers 9-10°C. Les deux structures α $2L_1$ (47,8 Å) et β' $2L_2$ (40,7-41,3 Å) croissent lors de la fin de fusion de la α $3L_1$ (75,5 Å) avant de fondre de 9°C jusqu'à 15°C environ. Les structures α $2L_1$ (47,8 Å) et β' $2L_2$ (40,7-41,3 Å) se réorganisent alors pour donner naissance à la dernière structure cristalline β' $2L_f$ (42,7-44,1 Å) avant la fusion finale de la matière grasse vers 35°C. Cette structure β' $2L_f$ (42,7-44,1 Å) augmente légèrement en épaisseur en fin de chauffage. Les thermogrammes enregistrés en même temps que les diagrammes de diffraction des rayons X à l'aide du calorimètre Microcalix® au cours du chauffage des matières grasses B8 et B10 peuvent ainsi être indexés comme sur la **Figure CIII-15** et ainsi permettre de comprendre l'origine des événements calorimétriques enregistrés.

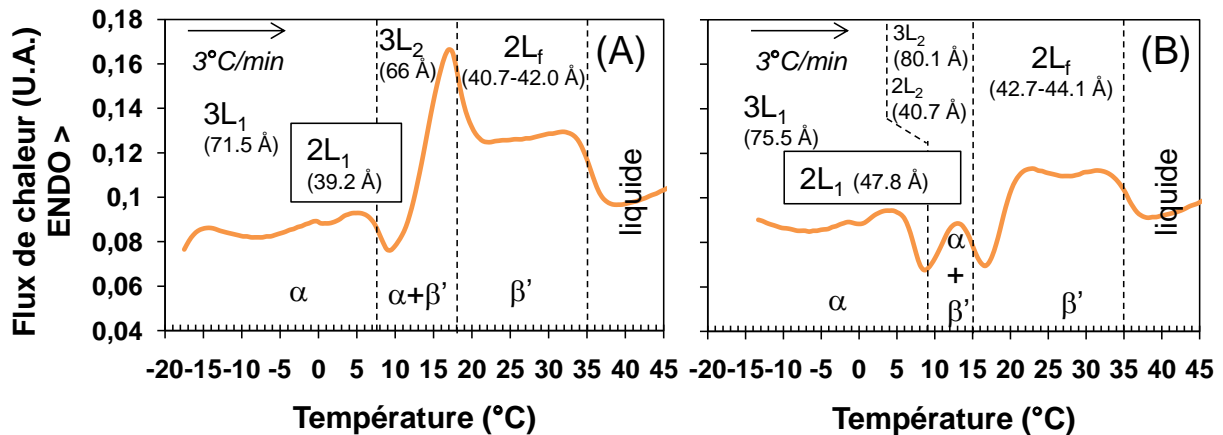


Figure CIII-15 : thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des matières grasses anhydres B8 et B10 en même temps que les diagrammes de DRXT.

Nous ne détaillerons pas ici le comportement structural de ces matières grasses, mais les diagrammes suivants permettent de le résumer :

- **B8 :** α $3L_1$ (71,5 Å) + α $2L_1$ (39,2 Å) + liquide (liq.)
 -(7,5°C)-> β' $3L_2$ (66 Å) + α $2L_1$ (39,2 Å) + liq.
 -(18°C)-> β' $2L_2$ (40,7-42,0 Å) + liq.
 -(35°C)-> liq.

Chapitre III

- **B10** : α 3L₁ (75,5 Å) + α 2L₁ (47,8 Å) + α 2L₂ (40,7 Å) + liquide (liq.)
-(-7°C)-> (3L₂ (80,1 Å)) + α 2L₁ (47,8 Å) + β' 2L₂ (40,7-41,3 Å) + liq.
-(-15°C)-> β' 2L₂ (42,7-44,1 Å) + liq.
-(-35°C)-> liq.

3. Comportement structural des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours d'un chauffage à 3°C/min

Les structures cristallines formées dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses anhydres B8 et B10 ont été identifiées par DRXT-MCD au cours d'un chauffage à 3°C/min de -20°C à 60°C suivant un refroidissement à la même vitesse depuis 60°C. La **Figure CIII-16** présente les diagrammes de DRXT des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 enregistrés au cours du chauffage.

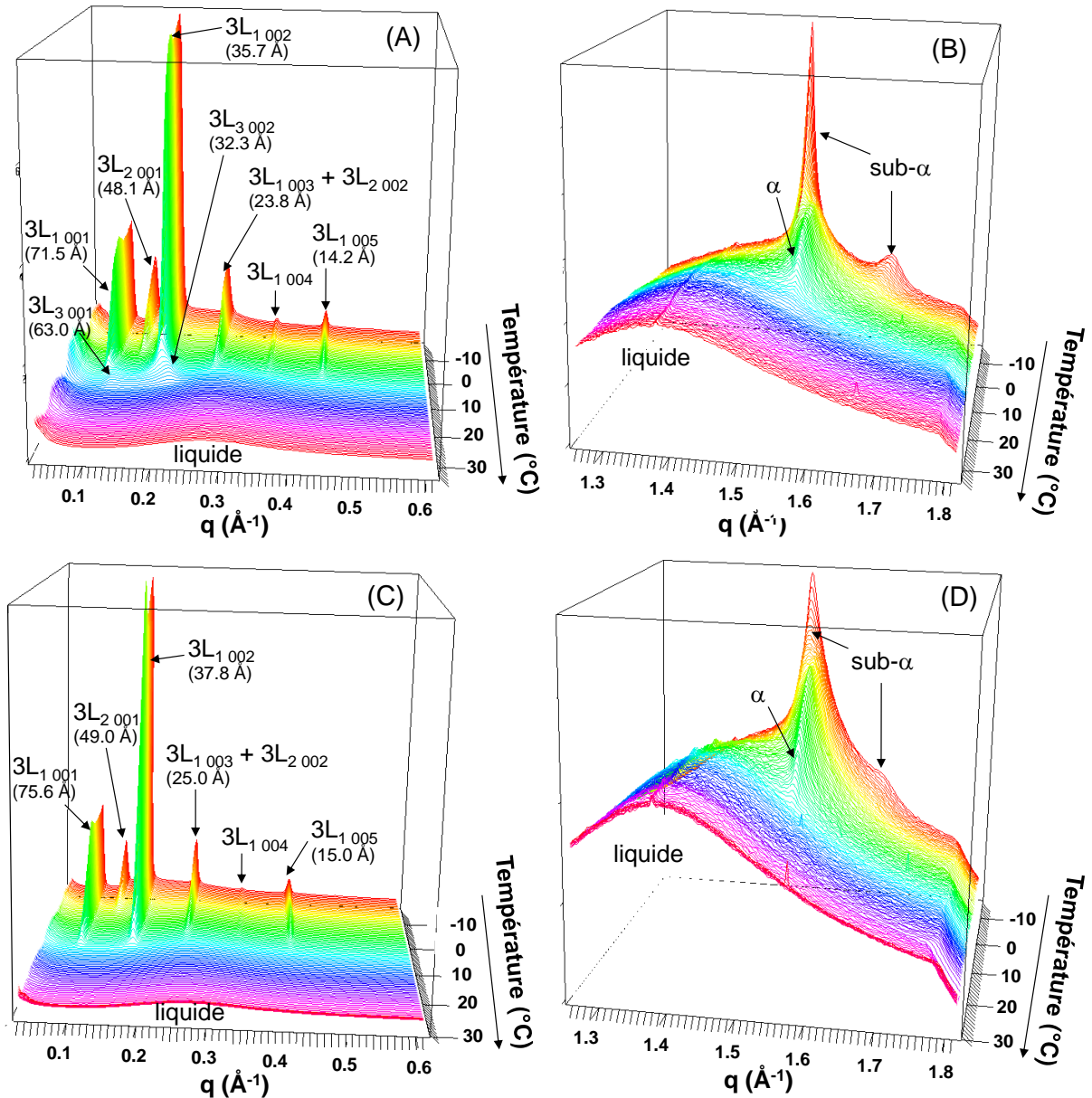


Figure CIII-16 : diagrammes de diffraction des rayons X enregistrés aux petits (A, C) et grands angles (B, D) au cours du chauffage de -20°C à 60°C à $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 (A, B) et B10 (C, D).

Au début du chauffage à -20°C , six pics de diffraction majoritaires ont été mis en évidence aux petits angles dans les deux matières grasses correspondant à une coexistence d'une structure 2L et d'une structure 3L, et deux pics aux grands angles correspondant à la forme sub- α . La forme sub- α se réorganise au cours du chauffage en α aux alentours de -1°C et -5°C dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement, puis cette structure fond totalement à 12°C dans la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B8 et 8.5°C dans la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B10, températures à partir desquelles seul le signal large de diffusion du liquide vers $1,38 \text{ \AA}^{-1}$ est enregistré aux grands angles de

Chapitre III

diffraction. Aux petits angles de diffraction, les pics associés à la structure 2L (48,1 Å et 49,0 Å) disparaissent en premier, dénotant la fusion de ces structures à -1°C et -4°C dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement. A partir de cette température, seuls les pics associés aux différents ordres de diffraction de la 3L (71,5 Å et 75,6 Å) subsistent jusqu'à 8,5°C dans les deux matières grasses. A 8,5°C, deux nouveaux pics apparaissent aux petits angles pour la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B8, situés à 0,100 Å⁻¹ et 0,195 Å⁻¹. Ces pics ont été associés aux premier et deuxième ordres de diffraction d'une structure 3L₂ (63 Å), issue de la réorganisation de la 3L (71,5 Å) initialement présente. Cette structure 3L₂ (63 Å) perdure ensuite jusqu'à 12°C. Pour la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B10, seul le signal large de diffusion des triacylglycérols liquides situé à 0,28 Å⁻¹ est enregistré à partir de 8,5°C.

La **Figure CIII-17** présente l'évolution des grandes distances des pics identifiés aux petits angles de diffraction multipliées par l'ordre de diffraction des pics, leur intensité exprimée en % de l'intensité maximale atteinte au cours du chauffage, ainsi que le signal calorimétrique enregistré de manière simultanée aux diagrammes de DRXT.

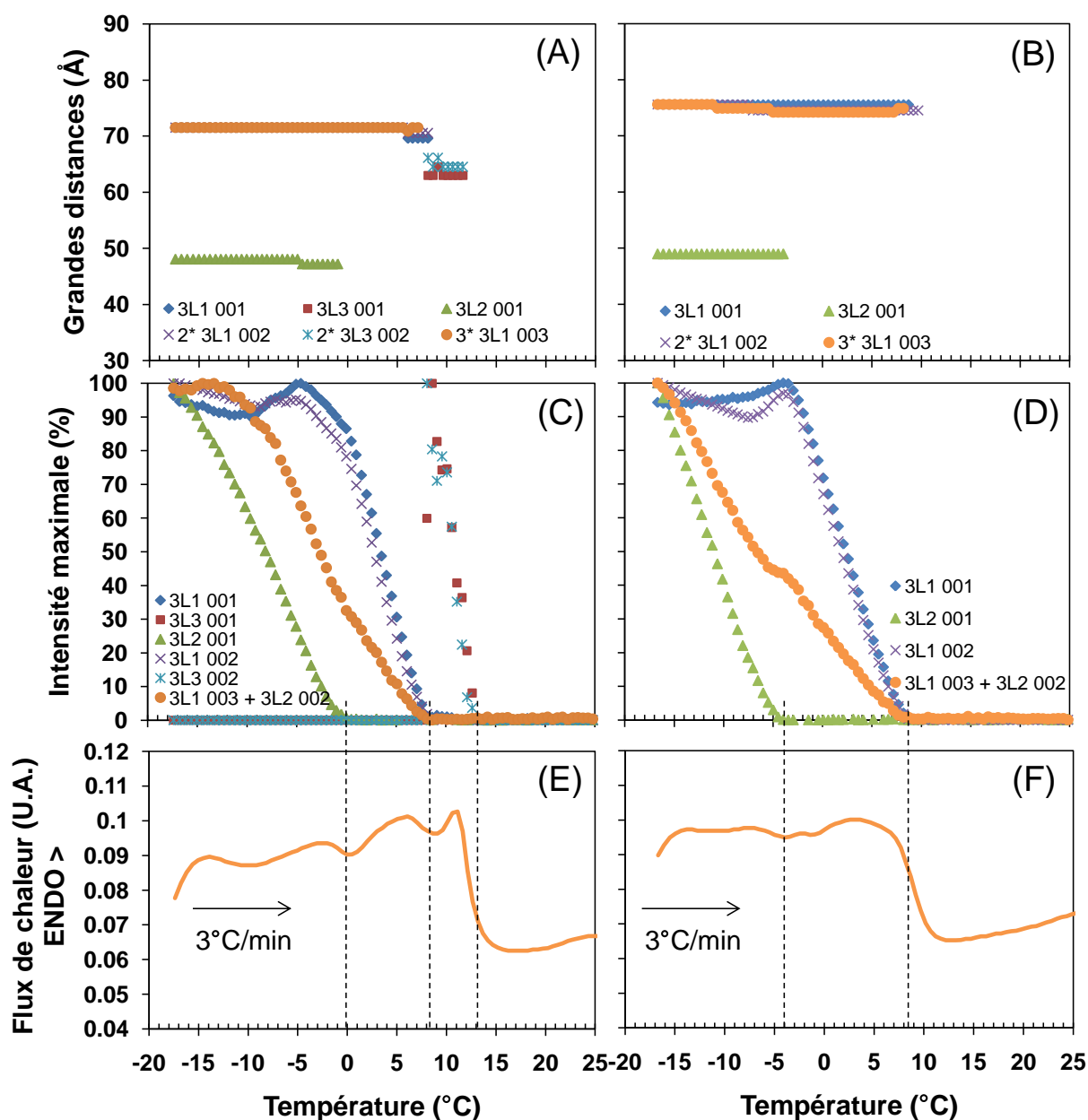


Figure CIII-17 : évolution des grandes distances (A, B) et des intensités maximales (C, D) des pics identifiés aux petits angles de diffraction des rayons X et thermogrammes (E, F) enregistrés de manière simultanée lors du chauffage des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement.

Les pics attribués aux différentes structures dans chacune des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 ne montrent pas d'évolution de distance au cours du refroidissement. Les pics assimilés aux ordres 001 et 002 des structures 3L présentent des évolutions en intensité très similaires entre -20°C et 8,5°C, température à laquelle cette structure fond totalement. Le pic de 2L₀₀₁ voit son intensité diminuer dès le début du chauffage, jusqu'à la température de fusion de la 2L (48,1 Å / 49,0 Å) de manière linéaire à

Chapitre III

raison de 5%/°C et 6%/°C dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement. Dans la plage de température où cette 2L existe, les pics associés à la structure 3L (71,5 Å / 75,6 Å) évoluent peu en intensité. En fait, une variation de l'ordre de 10% est observée dans les deux matières grasses, jusqu'à la température de fusion de la 2L (48,1 Å / 49,0 Å), puis les pics de 3L₀₀₁ et 3L₀₀₂ diminuent fortement en intensité de façon quasi linéaire à raison de 10%/°C et 8%/°C dans les fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement. Les pics attribués à la combinaison des ordres 003 des structures 3L et des ordres 002 des structures 2L présentent des évolutions en intensité intermédiaires entre celles observées pour les 2L₀₀₁ et les 3L₀₀₁ ou 3L₀₀₂, ce qui conforte notre hypothèse concernant la nature de ce pic. Enfin, les intensités des pics associés aux ordres 001 et 002 de la 3L₂ (63 Å) dans la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B8 présentent bien la même évolution en intensité au cours du chauffage. Ces deux pics apparaissent vers 8°C, augmentent brusquement en intensité jusqu'à 8,5°C, température à laquelle la 3L (71,5 Å) fond totalement, puis diminuent en intensité jusqu'à 12°C.

Le comportement structural des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 est donc différent au cours du chauffage appliqué. Hormis les différences d'épaisseurs caractéristiques des structures sub- α 2L et sub- α 3L initialement présentes au début du chauffage, la température de fusion de la α 2L (48,1 Å / 49,0 Å) est inférieure dans la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B10 : -4°C contre 0°C dans la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B8. La structure α 3L (71,5 Å / 75,6 Å) qui commence à fondre vers -4°C dans les deux matières grasses, présente sa vitesse de fusion maximale qu'à partir du moment où la α 2L (48,1 Å / 49,0 Å) est totalement fondue, mais disparaît entièrement à la même température : 8,5°C. Enfin, la structure α 3L (71,5 Å) se réorganise en 3L₂ (63 Å) dans la matière grasse issue de B8 lors de sa fusion, mais pas de B10. Cette structure 3L₂ (63 Å) subsiste jusqu'à 12°C où elle fond totalement. Compte tenu de sa relativement faible épaisseur, cette 3L₂ (63 Å) pourrait avoir une structure transversale β' , mais aucun pic caractéristique de cette forme polymorphique n'a été mis en évidence aux grands angles de diffraction. Le comportement structural des fractions liquides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours du chauffage peut donc être résumé dans les diagrammes suivants :

- B8 liq4 : sub- α 2L (48,1 Å) + sub- α 3L₁ (71,5 Å) + liquide (liq.)
 - (-1°C)-> α 2L (48,1 Å) + α 3L₁ (71,5 Å) + liq.
 - (0°C)-> α 3L₁ (71,5 Å) + liq.
 - (8,5°C)-> α 3L₂ (63 Å) + liq.
 - (12°C)-> liquide.

Chapitre III

- **B10 liq4** : sub- α 2L (49,0 Å) + sub- α 3L₁ (75,6 Å) + liquide (liq.)
 - (-1°C)-> α 2L (49,0 Å) + α 3L₁ (75,6 Å) + liq.
 - (0°C)-> α 3L₁ (75,6 Å) + liq.
 - (8,5°C)-> liquide.

4. Comportement structural des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours d'un chauffage à 3°C/min

Les structures cristallines formées dans les fractions solides à 4°C des matières grasses anhydres B8 et B10 ont été identifiées par DRXT-MCD au cours d'un chauffage à 3°C/min de -20°C à 60°C suivant un refroidissement à la même vitesse depuis 60°C. La **Figure CIII-18** présente les diagrammes de DRXT des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 enregistrés au cours du chauffage.

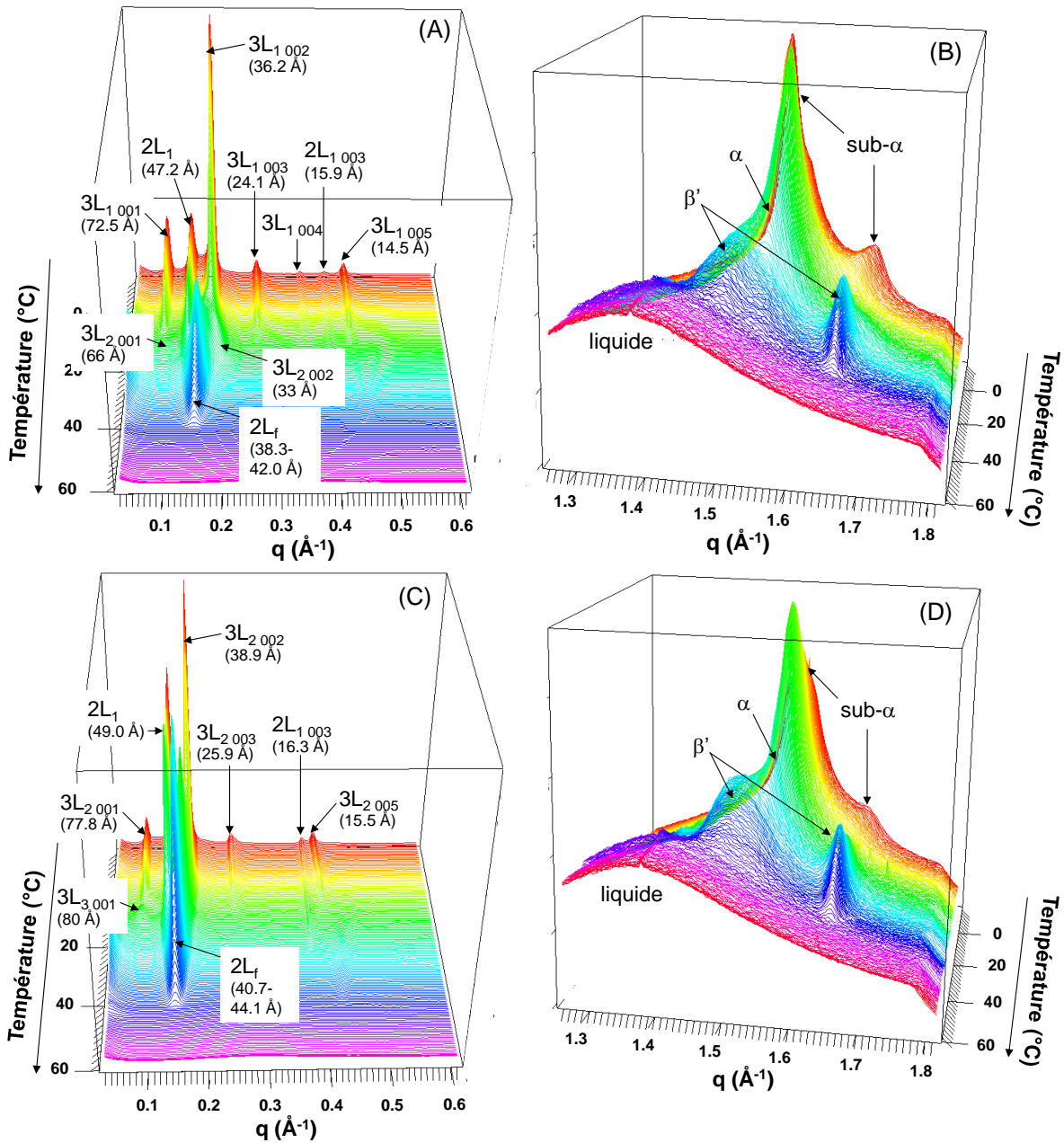


Figure CIII-18 : diagrammes de diffraction des rayons X enregistrés aux petits (A, C) et grands angles (B, D) au cours du chauffage de -20°C à 60°C à $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 (A, B) et B10 (C, D).

Au début du chauffage à -20°C , l'ensemble des pics de diffraction mis en évidence aux petits angles dans les deux matières grasses correspondent à une coexistence de structures $2L_1$ (47,2 Å), $2L_2$ (41,3 Å) et $3L$ (72,5 Å) dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8, et de structures $2L_1$ (49,0 Å), $2L_2$ (42 Å), $3L_1$ (63 Å) et $3L_2$ (77,8 Å) dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10. Aux grands angles de diffraction, seule la forme polymorphique sub- α a été mise en évidence dans les deux matières grasses. Les structures $2L_2$ (41,3 Å) de la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8, $2L_2$ (42 Å) et $3L_2$ (63 Å) de

Chapitre III

la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10 présentent des pics de diffraction très peu intenses et dont le comportement au cours du chauffage est difficile à mettre en évidence. Cependant, leur faible intensité dénote la faible présence de ces structures dans les systèmes étudiés, et donc leur faible contribution aux propriétés physiques des matières grasses, telles les propriétés thermiques notamment.

Au cours du chauffage, les structures 3L majoritaires dans les deux matières grasses sont celles qui fondent les premières, à 13°C et 9°C dans les fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement. A partir de 9°C dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8 deux pics apparaissent à $0,164 \text{ \AA}^{-1}$ et $0,492 \text{ \AA}^{-1}$, associés aux ordres 001 et 003 d'une structure 2L (38,3 Å), puis rapidement deux pics situés à $0,095 \text{ \AA}^{-1}$ et $0,190 \text{ \AA}^{-1}$ apparaissent également à 13°C, associés respectivement aux ordres 001 et 002 d'une $3L_2$ (66 Å). Ces pics de $3L_2$ (66 Å) disparaissent vers 20°C, alors que les pics associés à la $2L_1$ (47,2 Å) disparaissent vers 24°C, température à laquelle ne subsistent que les pics de la 2L nouvellement formée, appelée $2L_f$, qui évolue en épaisseur de 38,3 Å à 42,0 Å à sa fusion finale à 42°C. A partir de 42°C, seul le signal de diffusion des triacylglycérols fondus est enregistré.

A partir de 9°C également, les enregistrements de diffraction des rayons X de la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10 montrent l'apparition de plusieurs pics situés à $0,078 \text{ \AA}^{-1}$, $0,150 \text{ \AA}^{-1}$ et $0,463 \text{ \AA}^{-1}$ assimilés à l'ordre 001 d'une 3L (80 Å) et aux ordres 001 et 003 d'une 2L (40,7 Å), respectivement. Le pic de $3L_2$ (80 Å) disparaît rapidement vers 16,5°C, dénotant la fusion de cette structure. La structure 2L (49,0 Å) quant à elle, fond à 25°C, température à laquelle ne subsistent alors plus que les pics associés aux ordres 001 et 003 de la 2L nouvellement formée. Cette structure 2L (40,7 Å), appelée $2L_f$, évolue en épaisseur de 40,7 Å à 44,1 Å au cours du chauffage jusqu'à sa fusion finale à 43°C. A partir de 43°C, seul le signal de diffusion des triacylglycérols fondus est enregistré.

Aux grands angles de diffraction, la structure sub- α mise en évidence à -20°C au début du chauffage se réorganise rapidement en α vers -5°C dans les deux matières grasses. A partir de 9°C dans les deux matières grasses, les pics caractéristiques de la forme polymorphique β' apparaissent à $1,5 \text{ \AA}^{-1}$ et $1,63 \text{ \AA}^{-1}$ en coexistence avec le pic de α . Le pic caractéristique de la forme α disparaît à 24°C et 25°C dans les fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement. Les pics caractéristiques de la forme β' subsistent alors seuls jusqu'à 42-43°C, température de fusion de la structure $2L_f$ dans les deux matières grasses.

La **Figure CIII-19** présente l'évolution des grandes distances des pics identifiés aux petits angles de diffraction multipliées par l'ordre de diffraction des pics, leur intensité exprimée en % de l'intensité maximale atteinte au cours du chauffage, ainsi que le signal calorimétrique enregistré en même temps que les diagrammes de DRXT.

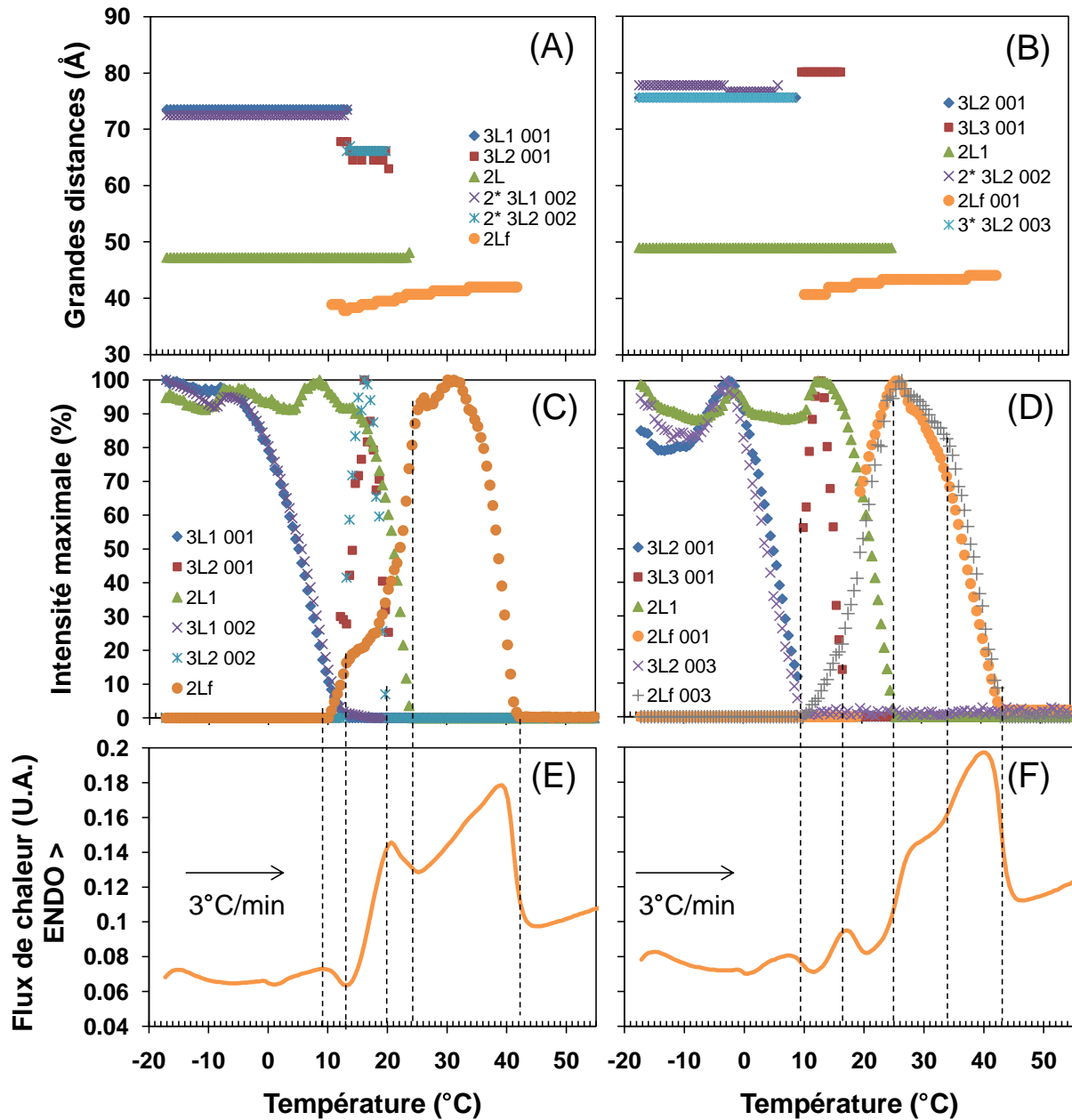


Figure CIII-19 : évolution des grandes distances (A, B) et des intensités maximales (C, D) des pics identifiés aux petits angles de diffraction des rayons X et thermogrammes (E, F) enregistrés de manière simultanée lors du chauffage des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10, respectivement.

Les pics de diffraction des rayons X associés aux structures 3L₁ (72,5 Å), 3L₂ (66 Å) et 2L₁ (47,2 Å) identifiés dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8 n'évoluent pas

Chapitre III

en distance au cours du chauffage. En revanche, les pics associés à la $2L_f$ montrent une augmentation de l'épaisseur de la structure de 38,3 Å à 42,0 Å au cours du chauffage, en particulier dans la gamme de température 9-24°C. De façon similaire, les pics de diffraction des rayons X associés aux structures $3L_2$ (77,8 Å), $3L_3$ (80 Å) et $2L_1$ (49,0 Å) identifiés dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10 n'évoluent pas en distance au cours du chauffage. En revanche, les pics associés à la $2L_f$ montrent une augmentation de l'épaisseur de la structure de 40,7 Å à 44,1 Å au cours du chauffage, en particulier dans la gamme de température 9-25°C.

Dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8, les pics assimilés aux ordres 001 et 002 de la structure $3L_1$ (72,5 Å) présentent des évolutions en intensité très similaires : entre -20°C et -5°C, ces pics conservent une intensité constante, la $3L_1$ (72,5 Å) ne fond pas. A partir de -5°C et jusqu'à 13°C, l'intensité des pics de $3L_{1\ 001}$ et $3L_{1\ 002}$ diminue linéairement en fonction de la température à raison de 6%/°C. Le pic de $2L_{1\ 001}$ présente une intensité quasi constante entre -20°C et 15°C, température à partir de laquelle il chute linéairement à raison de 11%/°C environ jusqu'à sa disparition totale à 24°C. Les pics associés à la structure $3L_2$ (66 Å) présentent une évolution en intensité à deux étapes : la première est une augmentation brutale de 0% à 100% entre 13°C et 15°C, puis une chute jusqu'à leur disparition à 20°C. Enfin, les pics associés aux ordres 001 et 003 de la $2L_f$ (38,3-42,0 Å) présentent une première augmentation brutale de 0% à 17% entre 9°C et 13°C, due à la réorganisation des derniers triacylglycérols formant la $3L_1$ (72,5 Å). Les pics de $2L_{f\ 001}$ et $2L_{f\ 003}$ augmentent ensuite de façon exponentielle jusqu'à atteindre leur maximum à 24°C. Cette seconde augmentation est donc due à la réorganisation des triacylglycérols qui forment la $2L_1$ (47,2 Å) et la $3L_2$ (66 Å). Les pics de $2L_{f\ 001}$ et $2L_{f\ 003}$ ne diminuent réellement en intensité qu'à partir de 34°C, de façon quasi linéaire à raison de 12%/°C jusqu'à leur disparition complète à 42°C.

Dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B10, les pics assimilés aux ordres 001 et 002 de la structure $3L_2$ (77,8 Å) présentent des évolutions en intensité très similaires : entre -20°C et -2°C, ces pics augmentent d'environ 20%. Cette augmentation pourrait être due à l'intégration de triacylglycérols impliqués dans la structure $2L_2$ (42 Å) identifiée au refroidissement et dont nous n'avons pu extraire les paramètres d'intensité. A partir de -2°C, les pics de $3L_{2\ 001}$ et $3L_{2\ 002}$ diminuent en intensité de façon linéaire à raison de 9%/°C environ jusqu'à leur disparition complète à 9°C. Le pic associé à la $2L_1$ (49,0 Å) montre des augmentations d'intensité de l'ordre de 10% entre -20°C et 17°C, pouvant être liées à l'intégration de triacylglycérols issues de la $2L_2$ (42 Å) qui est estimée fondre vers -2°C et de la $3L_2$ (77,8 Å) à 9°C. Ce pic de $2L_{1\ 001}$ diminue en intensité de 100% jusqu'à sa disparition

Chapitre III

entre 17°C et 24°C. La structure 3L3 (80 Å) existe dans une gamme de température très restreinte, son pic de premier ordre augmente en intensité jusqu'à son maximum entre 9°C et 12°C, puis chute de 12°C à 15°C jusqu'à sa disparition complète. L'augmentation des pics associés à la structure 2L_f (40,7-44,1 Å) débute à partir de 9°C et se termine à 24°C, où les pics associés à cette structure 2L_f trouvent leur maximum. La formation de cette structure 2L_f serait donc issue de la réorganisation de triacylglycérols provenant de la structure 3L₁ (77,8 Å) et 2L₁ (49,0 Å). Enfin, les pics associés à cette structure 2L_f diminuent quasi linéairement en intensité depuis leur maximum jusqu'à leur disparition complète entre 24°C et 43°C, prouvant la fusion de cette structure dans cette gamme de température.

Le comportement structural des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 est donc différent au cours du chauffage appliqué. Hormis les différences d'épaisseurs caractéristiques des structures sub-α 2L et sub-α 3L principales initialement présentes au début du chauffage, la réorganisation de la structure α 3L est totalement différente suivant l'origine de la matière grasse de départ. La structure α 3L (71,5 Å / 75,6 Å) commence à fondre vers -4°C dans les deux matières grasses et se réorganise rapidement vers 12°C / 9°C dans les fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 respectivement. Dans la matière grasse issue de B8, une nouvelle structure β' 3L (66 Å) apparaît, ainsi qu'une structure β' 2L_f (38,3 Å), alors que dans la matière grasse issue de B10, la α 3L (75,6 Å) se réorganise presque uniquement en β' 2L d'une épaisseur de 40,7 Å. Les structures α 2L initialement présentes au début du chauffage montrent des caractéristiques physiques proches : une faible différence d'épaisseur due uniquement à la longueur des chaînes d'acides gras des triacylglycérols qui les composent et une température de fusion similaire. De ce fait, il semblerait que la structure 3L (66 Å) nouvellement formée dans la matière grasse issue de B8 contribue le plus fortement à la variation d'enthalpie associée au pic à moyen point de fusion. En effet, ce massif correspond à la fusion des structure α 2L (47,2 Å) + β' 3L (66 Å) dans la matière grasse issue de B8, alors qu'il ne correspond qu'à la fusion de la α 2L (49,0 Å) dans la matière grasse issue de B10. Le comportement structural des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 au cours du chauffage peut donc être résumé dans les diagrammes suivants :

- **B8 sol4** : sub-α 2L₁ (47,2 Å) + sub-α 3L₁ (72,5 Å) (+ sub-α 2L₂ (41,3 Å)) + liquide (liq.)
 - (-5°C)-> α 2L₁ (47,2 Å) + α 3L₁ (72,5 Å) + liq.
 - (-9°C)-> α 2L₁ (47,2 Å) + β' 3L₂ (66 Å) + β' 2L_f (38,3-40,7 Å) + liq.
 - (-20°C)-> α 2L₁ (47,2 Å) + β' 2L_f (40,7 Å) + liq.
 - (-24°C)-> β' 2L_f (40,7-42,0 Å) + liq.
 - (-42°C)-> liq.

- B10 sol4 : sub- α 2L₁ (49,0 Å) + sub- α 3L₂ (77,8 Å) (+ sub- α 2L₂ (42 Å) + sub- α 3L₁ (63 Å)) + liq.
 - (-5°C)→ α 2L₁ (49,0 Å) + α 3L₂ (77,8 Å) + liq.
 - (-9°C)→ α 2L₁ (49,0 Å) + 3L₃ (80 Å) + β' 2L_f (40,7-43,4 Å) + liq.
 - (-17°C)→ α 2L₁ (49,0 Å) + β' 2L_f (43,4 Å) + liq.
 - (-25°C)→ β' 2L_f (43,4-44,1 Å) + liq.
 - (-43°C)→ liq.

5. Discussion

Nous avons discuté de la différence d'épaisseur des structures cristallines longitudinales formées dans les fractions liquides à 4°C à l'issue du refroidissement, aussi nous ne nous reviendrons pas dessus ici. Dans ces matières grasses, nous avons pu observer en MCD à 2°C/min au cours du chauffage la présence de deux endothermes : un premier relativement peu intense mais étendu en température et un second intense mais relativement peu étendu en température. En DRXT-MCD à 3°C/min, l'endotherme le plus intense n'a pas été observé, sans pour autant que la température de fin de fusion soit diminuée. Dans la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B10, il y a fusion successive des structures cristallines qui s'étaient formées au cours du chauffage, avec une surfusion relativement faible : 1°C environ pour la structure α 3L (49,0 Å) et 4°C environ pour la structure α 3L (75,6 Å). Aucune réorganisation n'a été enregistrée par DRXT au cours du chauffage de cette matière grasse. Cela pourrait signifier que les structures formées par les triacylglycérols au cours du refroidissement sont stables thermodynamiquement, bien que en forme polymorphique α . En revanche, dans la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B8, la structure α 3L (71,5 Å) montre une réorganisation en 3L (63 Å) ; aucune réorganisation $\alpha \rightarrow \beta'$ n'a été mise en évidence, mais il est probable que la faible proportion de matière grasse solide juste avant fusion finale soit trop faible pour détecter les pics caractéristiques de la forme β' aux grands angles de diffraction. Ce comportement structural de la fraction liquide à 4°C de matière grasse témoin correspond bien au comportement structural observé dans la fraction oléique de matière grasse laitière. En effet, Lopez *et al.* (2009b) ont montré la fusion successive de α 2L (47,7 Å) + α 3L (72,1 Å), laquelle se réorganisait partiellement en β' 3L (66 Å) au cours du chauffage de la fraction oléine de matière grasse laitière. Nous avons montré que la structure de 47-50 Å d'épaisseur pourrait être plutôt une structure 3L compte tenu de l'intensité relative de ses pics de diffraction et de la structure adoptée par des triacylglycérols de type BuPO comme proposé par Lavigne (1995). Pour la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B10, il est probable que la vitesse de chauffage soit trop importante

Chapitre III

pour qu'une réorganisation s'effectue, ce qui permettrait d'expliquer l'endotherme intense enregistré à 2°C/min mais pas à 3°C/min. Autrement dit, il est probable que la cinétique de réorganisation de la structure 3L (75,6 Å) qui fond en dernier soit plus lente que dans la fraction liquide à 4°C de la matière grasse B8 où nous avons pu observé une structure 3L (63 Å). Cela serait en accord avec les résultats de Smet et al. (2010) qui ont observé une diminution de la cinétique de cristallisation de matière grasse laitière enrichie en acides gras insaturés traduite par une vitesse de nucléation plus faible et un temps d'induction de cristallisation plus long en conditions isothermes.

Dans les fractions solides à 4°C, nous avons vu par MCD qu'il subsistait une partie de fraction liquide à 4°C due à la méthode de séparation des fractions lors du fractionnement. La différence majeure des comportements thermique et structural entre les fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 se situe dans la gamme de température du pic à moyen point de fusion, comme déjà mis en évidence sur les matières grasses anhydres d'origine. Dans cette zone de température, les structures cristallines formées par les triacylglycérols à bas et moyen point de fusion se réorganisent essentiellement de α 3L (72,5 Å) en β' 3L (66 Å) pour B8 et de α 3L (77,8 Å) en une autre 3L (80 Å) très faible en proportion. Les triacylglycérols formant les structures α 2L (47,2-49,0 Å) se réorganisent également dans la gamme de température du pic à moyen point de fusion pour donner naissance à des structures β' 2L (38,3-40,7 Å). Les structures β' 2L nouvellement formées sont les dernières à fondre et sont constituées des triacylglycérols à plus haut point de fusion de type trisaturés à longue chaîne. La structure ou la proportion des triacylglycérols à moyen point de fusion pourrait être largement modifiée par l'alimentation enrichie en acides gras insaturés mise en place ici.

Ainsi, les triacylglycérols à bas et moyen point de fusion cristalliseraient en une seule structure mixte α 3L, qui se réorganise au chauffage pour donner une β' 3L très différente selon la composition en acides gras de la matière grasse, et constituée des triacylglycérols à moyen point de fusion. Cela montre la solubilité à l'état solide des triacylglycérols des pics à moyen et bas point de fusion, comme déjà mis en évidence par calorimétrie par Marangoni et Lencki (1998). Selon ces auteurs, la formation de solution solide partielle entre les triacylglycérols des fractions à bas et moyen point de fusion dénote la grande complémentarité de structure des triacylglycérols de ces deux fractions, comme nous avons pu le voir.

Les triacylglycérols à haut point de fusion cristalliseraient en α 2L, se réorganisant au chauffage en β' 2L_f, dont la structure globale de ces triacylglycérols serait proche, compte

Chapitre III

tenu de la différence d'épaisseur des structures β' 2L_f. La différence d'épaisseur observée entre les deux matières grasses proviendrait de la différence de longueur de chaîne des acides gras comme discuté pour le refroidissement. Il est possible d'évaluer la longueur de chaîne moyenne des acides gras des triacylglycérols qui composent ces structures en prenant en compte l'équation proposée par Small (1986) mettant en relation l'épaisseur d de structures β' 2L mesurée par DRX pour des triacylglycérols trisaturés monoacides avec le nombre d'atomes de carbones n des acides gras qui composent ces triacylglycérols : $d = 2,32*n + 4,43$ (**Tableau CIII-9**). Cette équation a été utilisée par Lopez *et al.* (2006b) pour déterminer la longueur de chaîne moyenne des acides gras des triacylglycérols qui cristallisent dans la fraction stéarique de la matière grasse laitière.

Tableau CIII-9 : longueurs moyennes des chaînes d'acides gras composant les triacylglycérols des structures cristallines β' 2L_f formées au cours du chauffage des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10, déterminées à partir de l'équation définie par Small (1986) $d = 2,32*n + 4,43$.

Structure	B8 sol4		B10 sol4		Différence de longueur de chaîne (carbones)
	Epaisseur de structure (Å)	Nombre de carbones	Epaisseur de structure (Å)	Nombre de carbones	
β' 2L _f (état initial)	38,3	14,6	40,7	15,6	1,0
β' 2L _f (état final)	42,0	16,2	44,1	17,1	0,9

D'après les valeurs de longueurs de chaînes que nous avons obtenues, une différence d'environ 0,9-1,0 carbone existe entre les acides gras des triacylglycérols qui forment les structures β' 2L des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 sur l'ensemble de la plage de fusion de ces structures. Comme discuté pour le refroidissement, cette différence pourrait être due principalement à la composition en acides gras des triacylglycérols formant ces structures. En effet, l'ajout de suppléments lipidiques à l'alimentation en vue d'enrichir la matière grasse laitière en acides gras insaturés augmente les acides gras à plus longues chaînes dans les fractions solides à 4°C, notamment le C18:0 au détriment des acides gras à moyennes et courtes chaînes, notamment C14:0 et C16:0. De plus, l'épaisseur des structures β' 2L augmente lors de leur fusion d'un équivalent de 1,4-1,5 carbones d'après nos calculs. Cette augmentation de 1,5-1,6 carbones pourrait être due à la fusion progressive des triacylglycérols avec des longueurs de chaînes d'acides gras croissantes, comme postulé par Lavigne (1995). Ces triacylglycérols correspondant au pic à haut point de fusion, c'est-à-dire

Chapitre III

étant majoritairement trisaturés à longues chaînes, cette hypothèse est en accord avec les variations de températures de fusion en fonction de la longueur de chaîne (Sato et Gardi, 1988 ; Wesdorp, 1990 ; Ollivon, 1992). Cette augmentation de la longueur des chaînes d'acides gras peut également être expliquée par un autre phénomène. Dans la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8 en particulier, nous avons observé une première augmentation d'intensité du pic de diffraction $2L_f$ 001 en fin de fusion de la structure α $3L_1$, ce qui suggèrerait que la $2L_f$ est constituée dans son état initial de triacylglycérols issus de la α $3L_1$ et en partie issus de la α $2L_1$. En fin de fusion des α $2L_1$, les structures β' $2L_f$ des fractions solides à 4°C des matières grasses B8 et B10 ont quasiment atteint leur épaisseur maximale, correspondant alors à des longueurs de chaînes proches de celles déterminées pour les α $2L_1$: 16,2 contre 16,6 carbones pour B8 et 17,1 contre 17,3 carbones pour B10. La structure β' $2L$ serait donc formée dans son état initial de triacylglycérols issus de la α $3L_1$ puis majoritairement de triacylglycérols plus longs issus de la α $2L_1$.

La différence de profil thermique au niveau du pic à moyen point de fusion entre les deux matières grasses serait essentiellement due à la présence et l'abondance des cristaux $3L$ formés au cours du chauffage. En effet, nous avons vu que les structures α $2L$ (48,1 Å) et α $2L$ (49,0 Å) ne différaient que par la longueur des acides gras estérifiés sur les triacylglycérols qui les composent, mais peu en termes de propriétés thermiques au refroidissement. En fait, la proportion de structure α $3L$ présente au début du chauffage pourrait expliquer le comportement structural et thermique dans le pic à moyen point de fusion. Nous avons vu que la fraction solide à 4°C de la matière grasse B8 comprenait plus de structure α $3L$ (72,5 Å) à l'issue du refroidissement. Cette plus grande proportion de α $3L$ (72,5 Å) que la α $3L$ (77,8 Å) de la fraction solide à 4°C de B10 se solde pourtant par une enthalpie plus faible associée au pic à bas point de fusion. Cela n'est possible que parce qu'une partie seulement de cette structure se réorganise en β' $3L$ (66 Å) pour B8 et aucun équivalent pour B10. La faible proportion de $3L$ (77,8 Å) dans B10 ne suffirait pas à permettre la formation d'une nouvelle $3L$ du fait que les triacylglycérols qui fondent issus de la $3L$ (77,8 Å) et qui pourraient se réorganiser en une nouvelle $3L$ se dissolvent dans la phase liquide. La **Figure CIII-20** représente le bilan des structures formées au cours du chauffage des fractions liquides et solides à 4°C des matières grasses B8 et B10.

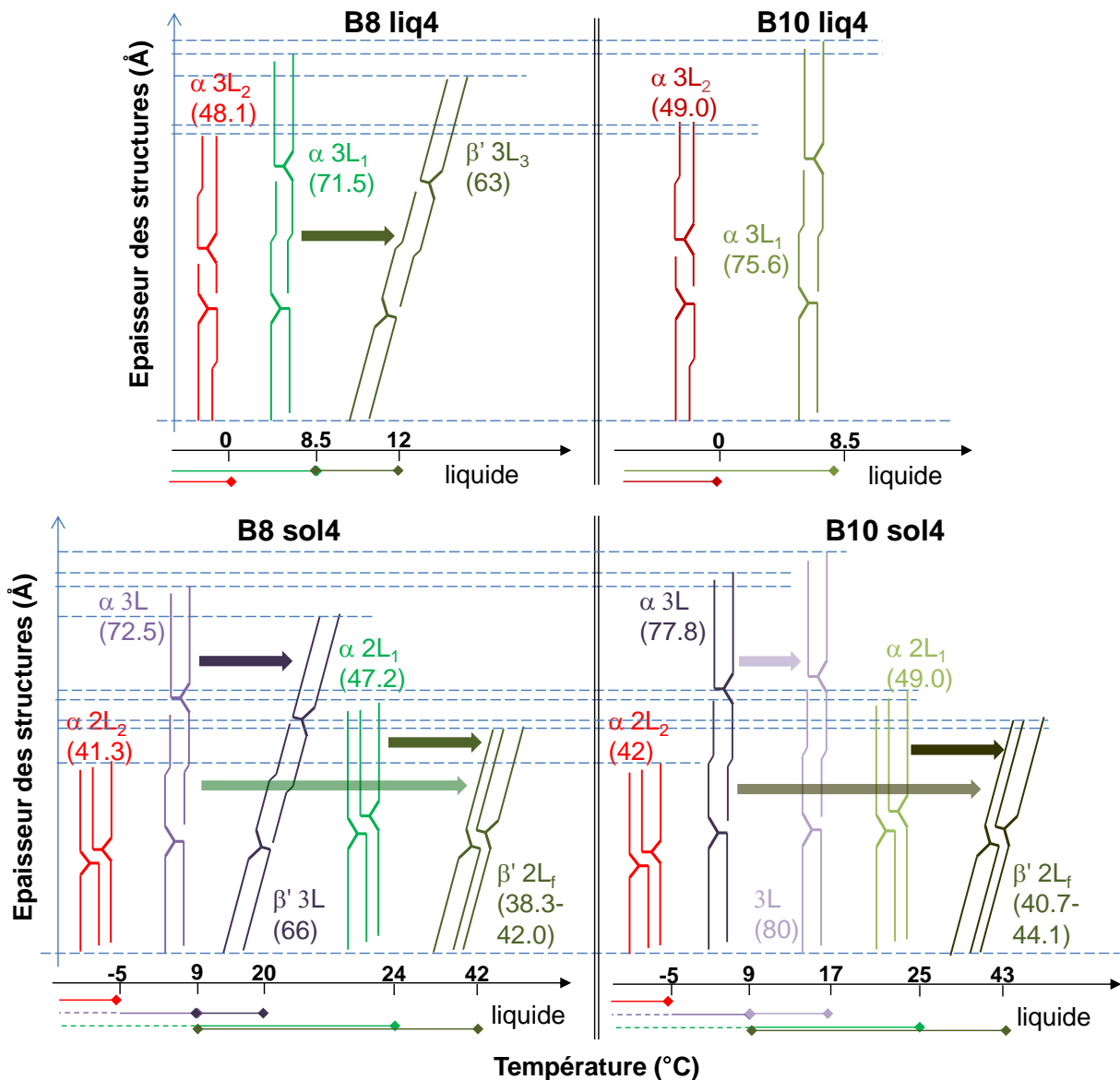


Figure CIII-20 : représentation schématique des types de triacylglycérols formant les structures cristallines observées au cours du chauffage des fractions liquides et solides à 4°C des matières grasses B8 et B10. Des bilans sont représentés en dessous des structures : trait continu = structure en fusion, trait pointillé = structure dont la fusion n'a pas encore débuté. Les flèches de couleur représentent les réorganisations cristallines.

IV. CONCLUSION

La variabilité de composition, évaluée par ACP, a montré que la source de variabilité principale permettait de distinguer l'ensemble des matières grasses issues des régimes témoins par rapport à celles issues des régimes enrichis en acides gras insaturés. La variabilité de composition en acides gras entre les différentes fractions issues d'une même matière grasse n'intervient qu'en second lieu.

Chapitre III

En revanche, il est clair que les propriétés thermiques et cristallographiques se sont montrées bien plus éloignées entre différentes fractions issues d'une même matière grasse d'origine (par exemple entre B8 liq4 et B8 sol4) qu'entre deux mêmes fractions issues de deux matières grasses différentes (par exemple entre B8 liq4 et B10 liq4). Les différences de composition entre les matières grasses issues des régimes B8 et B10 ont une origine naturelle, alors que les différences de composition observées entre les différentes fractions d'une matière grasse donnée ont une origine technologique. Les différences de composition observées entre les matières grasses issues de régimes différents proviennent de la disponibilité en acides gras pour la synthèse *in vivo* ayant lieu dans l'organisme des vaches laitières. Du fait du métabolisme bovin qui intervient pour synthétiser les triacylglycérols à partir de « briques élémentaires » que sont les acides gras, la modification d'alimentation étudiée n'a que peu affecté la structure générale des triacylglycérols laitiers. En revanche, les différences de composition observées entre différentes fractions issues d'une même matière grasse résultent ici du fractionnement physique réalisé, qui ne modifie pas la structure des triacylglycérols déjà produits par la vache. Cela conduit par contre à une séparation drastique des triacylglycérols selon leurs propriétés physiques, donc selon leur structure propre en acides gras.

Ainsi, outre la différence de composition en acides gras entre deux matières grasses, c'est aussi essentiellement la structure des triacylglycérols, c'est-à-dire le type et la position des acides gras sur le glycérol, qui détermine leurs propriétés thermiques et cristallographiques en mélanges complexes.

CHAPITRE IV :
PROPRIETES DE CRISTALLISATION DES TRIACYLGLYCEROLS
DANS DES PRODUITS TRANSFORMES, RELATION AVEC LEURS
PROPRIETES FONCTIONNELLES

Chapitre IV

I. INTRODUCTION

Les propriétés fonctionnelles de la matière grasse laitière et ses propriétés de textures dans les produits transformés riches en matière grasse proviennent largement de ses propriétés physiques, et notamment de ses propriétés de cristallisation (Wright *et al.*, 2001 ; Rousseau et Maragoni, 1999). En effet, les triacylglycérols, composant 97-98% de la matière grasse laitière, possèdent des propriétés de cristallisation uniques dépendant largement de leur composition en acides gras.

Avec l'objectif de mieux appréhender et améliorer la qualité des produits transformés laitiers riches en matière grasse, nous nous sommes intéressés à identifier le lien existant entre la composition en acides gras de la matière grasse laitière et ses propriétés physiques dans deux produits transformés complexes : le beurre et le fromage de type raclette, ainsi qu'à relier ces propriétés à des caractéristiques de texture. Ces deux produits ont en effet été choisis car ils contiennent une part non négligeable de matière grasse laitière, soit entre 30 et 85%, qui doit ainsi contribuer à la structure et texture générale de ces produits.

Le but de ce chapitre est de fournir des réponses plus appliquées à la problématique de la cristallisation des matières grasses laitières issues de régimes riches en acides gras. Pour cela, nous avons procédé à une étude globale des propriétés de cristallisation des triacylglycérols laitiers dans des matrices fabriquées à partir de laits expérimentaux : des beurres et des fromages de type raclette.

II. ECHANTILLONS ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Les propriétés physiques et texturales de beurres et de fromages de type raclette à compositions en acides gras contrôlées ont été caractérisées après un stockage long à 4°C. En particulier, le comportement thermique de ces produits au chauffage, leurs propriétés structurales à 4°C et au cours du chauffage ainsi qu'un indice de leur dureté en sortie de réfrigérateur ont été étudiés.

En ce qui concerne les beurres, 5 beurres ont été utilisés, fabriqués à partir des laits expérimentaux issus des régimes « Blé », « Colza », « Herbe-Blé », « Herbe-colza » et d'un lait de grand mélange de région Normandie appelé « Industriel ». Les beurres expérimentaux ont été fabriqués à 2 reprises pour des arrivées de laits à 2 dates espacées d'une semaine afin d'assurer la reproductibilité des résultats. En ce qui concerne les fromages, 3 fromages de type raclette ont été utilisés, fabriqués à partir des laits expérimentaux issus des régimes « B5 », « B6 » et « B7 ».

La matière grasse des beurres a été extraite des crèmes fabriquées à partir des laits par extraction par solvants (cf **Matériels et méthodes**) sauf pour le beurre « Industriel » reçu en tant que tel et dont nous avons extrait la matière grasse par barattage-chauffage sans l'étape de barattage puisque les beurres nous ont été fournis directement. La matière grasse des fromages a été extraite par la méthode d'extraction par solvants détaillée dans la partie **Matériels et méthodes**. La composition en acides gras des matières grasses extraites des beurres et des fromages a été déterminée en triple analyse pour chaque date de fabrication d'échantillon ; la moyenne des analyses par date a été prise en compte.

Le **Tableau CIV-1** présente les cinétiques en température utilisées lors de l'étude de l'effet de la composition sur les propriétés physiques des beurres et des fromages stabilisés 6-30 jours à 4°C.

Tableau CIV-1 : cinétiques en température utilisées lors de l'étude de l'effet de la composition sur les propriétés physiques des beurres et des fromages stabilisés pendant 6-62 jours à 4°C, caractérisé par MCD et DRXT-MCD respectivement.

	MCD (DSC Q1000)	DRXT-MCD
Conditionnement	6-54 jours à 4°C	14-62 jours à 4°C
Refroidissement	4°C → -5°C à 2°C/min	-
Chauffage	-5°C → 60°C à 2°C/min	4°C → 60°C à 0,5°C/min

L'étape de refroidissement de 4°C à -5°C à 2°C/min pour les analyses thermiques permet d'éviter l'interférence du signal des triacylglycérols avec la mise en régime du calorimètre au début de l'étape de chauffage jusqu'à 60°C.

L'ensemble des diagrammes de DRXT enregistrés d'une part sur les beurres et d'autre part sur les fromages de type raclette ont été lissés par la méthode de lissage par ACP décrite dans la partie matériels et méthodes afin d'en améliorer le rapport signal sur bruit.

III. RESULTATS

A. Approche multi-échelle des propriétés de cristallisation des triacylglycérols dans les beurres en lien avec leur dureté

1. Composition en acides gras des beurres étudiés

La composition pour un beurre issu d'un régime donné à différentes dates de fabrication étant peu variable devant la variabilité de composition entre des beurres issus de différents régimes, nous avons choisi de prendre en compte des compositions moyennées par

beurre. La composition en acides gras des 5 beurres étudiés est détaillée dans le **Tableau CIV-2**.

Tableau CIV-2 : composition en acides gras des beurres par régime (moyenne \pm écart-type). Seuls les acides gras à teneur supérieure à 0,5% sont représentés. Les résultats par ligne dont les exposants (^a, ^b, ^c, ^d, ^e) sont différents sont significativement différents au Tukey's Honest Significant Difference test avec un seuil $P < 0,001$.

	Industriel	Blé	Colza	Herbe-blé	Herbe-colza
C4:0	2,87 \pm 0,07 ^b	3,10 \pm 0,21 ^c	3,31 \pm 0,19 ^d	2,14 \pm 0,07 ^a	2,14 \pm 0,14 ^a
C6:0	1,64 \pm 0,03 ^a	1,76 \pm 0,04 ^b	1,72 \pm 0,07 ^b	1,65 \pm 0,03 ^a	1,64 \pm 0,03 ^a
C8:0	0,89 \pm 0,01 ^b	0,90 \pm 0,02 ^b	0,84 \pm 0,02 ^a	1,04 \pm 0,01 ^d	1,00 \pm 0,01 ^c
C10:0	2,17 \pm 0,03 ^c	2,01 \pm 0,02 ^b	1,78 \pm 0,03 ^a	2,54 \pm 0,02 ^e	2,39 \pm 0,02 ^d
C12:0	3,11 \pm 0,03 ^c	2,73 \pm 0,03 ^b	2,38 \pm 0,03 ^a	3,42 \pm 0,03 ^e	3,16 \pm 0,03 ^d
C14:0	11,61 \pm 0,05 ^c	10,46 \pm 0,06 ^b	9,78 \pm 0,15 ^a	11,38 \pm 0,08 ^d	11,02 \pm 0,09 ^c
C14:1 <i>c9</i>	0,92 \pm 0,01 ^a	1,09 \pm 0,02 ^c	0,99 \pm 0,05 ^b	1,06 \pm 0,01 ^c	0,99 \pm 0,01 ^b
C15:0	1,19 \pm 0,01 ^c	1,10 \pm 0,01 ^b	0,94 \pm 0,01 ^a	1,41 \pm 0,01 ^e	1,24 \pm 0,02 ^d
C16:0	36,53 \pm 0,07 ^d	30,21 \pm 0,29 ^c	25,65 \pm 0,42 ^a	28,92 \pm 0,63 ^b	26,15 \pm 0,56 ^a
C16:1 <i>c9</i>	1,54 \pm 0,03 ^b	1,98 \pm 0,04 ^d	1,75 \pm 0,04 ^c	1,50 \pm 0,02 ^b	1,36 \pm 0,01 ^a
C17:0	0,61 \pm 0,01 ^c	0,59 \pm 0,01 ^b	0,53 \pm 0,02 ^a	0,69 \pm 0,01 ^e	0,65 \pm 0,01 ^d
C18:0	11,41 \pm 0,11 ^b	11,65 \pm 0,13 ^b	12,76 \pm 0,34 ^c	10,72 \pm 0,14 ^a	11,73 \pm 0,13 ^b
C18:1 <i>t6-9</i>	0,48 \pm 0,02 ^a	1,10 \pm 0,01 ^c	1,74 \pm 0,10 ^e	0,88 \pm 0,01 ^b	1,27 \pm 0,04 ^d
C18:1 <i>t10</i>	0,35 \pm 0,06 ^a	0,97 \pm 0,06 ^b	1,48 \pm 0,35 ^c	0,57 \pm 0,19 ^a	1,02 \pm 0,48 ^b
C18:1 <i>t11</i>	0,99 \pm 0,05 ^a	1,31 \pm 0,06 ^a	2,27 \pm 0,29 ^b	2,40 \pm 0,29 ^b	2,40 \pm 0,46 ^b
C18:1 <i>c9</i>	20,12 \pm 0,11 ^a	24,24 \pm 0,09 ^b	26,77 \pm 0,47 ^d	23,88 \pm 0,47 ^b	25,78 \pm 0,65 ^c
C18:2 <i>t9,12</i>	0,30 \pm 0,02 ^a	0,38 \pm 0,01 ^b	0,45 \pm 0,02 ^c	0,56 \pm 0,04 ^d	0,61 \pm 0,02 ^e
C18:2 <i>c9,12</i>	1,29 \pm 0,05 ^a	1,70 \pm 0,03 ^b	1,71 \pm 0,01 ^b	1,72 \pm 0,05 ^{bc}	1,78 \pm 0,06 ^c
C18:3 <i>c9,12,15</i>	0,23 \pm 0,01 ^a	0,35 \pm 0,01 ^b	0,38 \pm 0,01 ^c	0,68 \pm 0,04 ^d	0,68 \pm 0,03 ^d
C18:2 <i>c9,t11</i>	0,57 \pm 0,03 ^a	0,75 \pm 0,02 ^b	1,22 \pm 0,03 ^d	1,13 \pm 0,03 ^c	1,29 \pm 0,05 ^e
Σ AG saturés	72,27 \pm 0,11 ^e	65,02 \pm 0,10 ^d	60,18 \pm 0,27 ^a	64,53 \pm 0,64 ^c	61,67 \pm 0,54 ^b
sat C4-C8	5,39 \pm 0,12 ^b	5,77 \pm 0,24 ^c	5,87 \pm 0,28 ^c	4,83 \pm 0,09 ^a	4,78 \pm 0,15 ^a
sat C10-C15	18,23 \pm 0,11 ^d	16,45 \pm 0,11 ^b	14,99 \pm 0,21 ^a	18,99 \pm 0,12 ^e	18,00 \pm 0,12 ^c
sat C16-C20	47,97 \pm 0,16 ^e	42,06 \pm 0,21 ^d	38,62 \pm 0,17 ^b	39,80 \pm 0,50 ^c	38,03 \pm 0,64 ^a
sat >C22	0,06 \pm 0,02 ^a	0,13 \pm 0,01 ^b	0,14 \pm 0,01 ^b	0,19 \pm 0,01 ^c	0,18 \pm 0,02 ^c
Σ AG ins.	27,73 \pm 0,11 ^a	34,98 \pm 0,10 ^b	39,82 \pm 0,27 ^e	35,47 \pm 0,64 ^c	38,33 \pm 0,54 ^d
Σ monoins.	25,00 \pm 0,05 ^a	31,41 \pm 0,08 ^c	35,74 \pm 0,23 ^e	30,90 \pm 0,63 ^b	33,42 \pm 0,47 ^d
Σ C18:1 <i>t</i>	2,06 \pm 0,05 ^a	3,38 \pm 0,02 ^b	5,49 \pm 0,21 ^e	3,85 \pm 0,16 ^c	5,15 \pm 0,31 ^d
Σ polyins.	2,73 \pm 0,10 ^a	3,57 \pm 0,07 ^b	4,09 \pm 0,05 ^c	4,56 \pm 0,04 ^d	4,90 \pm 0,08 ^e
Σ <i>trans</i> tot	2,93 \pm 0,04 ^a	4,50 \pm 0,03 ^b	7,16 \pm 0,25 ^d	5,54 \pm 0,16 ^c	7,06 \pm 0,35 ^d
Σ sat.+C18:1 <i>t</i>	74,33 \pm 0,11 ^d	68,40 \pm 0,09 ^c	65,67 \pm 0,41 ^a	68,64 \pm 0,43 ^c	66,83 \pm 0,24 ^b
Σ ins.-C18:1 <i>t</i>	25,67 \pm 0,11 ^a	31,60 \pm 0,09 ^b	34,33 \pm 0,41 ^d	31,36 \pm 0,43 ^b	33,17 \pm 0,24 ^c

D'une manière générale, la composition en acides gras des 5 beurres est différente. Malgré tout, les beurres « Blé » et « Herbe-Blé », ainsi que « Colza » et « Herbe-colza » présentent des compositions relativement proches comparées au beurre témoin « Industriel ».

Chapitre IV

Les acides gras à courtes chaînes C4:0 à C8:0 montrent des teneurs plus faibles dans les beurres issus des régimes « Colza » et « Blé » par rapport au beurre témoin : ratio de 1,1, mais plus fortes dans les beurres « Herbe » : ratio de 0,7. Les acides gras saturés à chaînes moyennes C10:0 à C15:0 présentent des teneurs en acides gras assez proches entre tous les beurres étudiés, quoique plus faibles dans les beurres « Blé » et « Colza » par rapport aux autres beurres. Les acides gras saturés à longue chaîne, essentiellement C16:0 et C18:0, présentent des tendances différentes lors de l'enrichissement en acides gras insaturés des régimes utilisés. Le C16:0 montre une teneur diminuée dans les beurres issus des régimes riches en acides gras insaturés par rapport au beurre témoin « Industriel ». Cette diminution est plus prononcée dans les régimes intégrant du colza par rapport aux régimes intégrant du blé : ratios de 0,8 et 0,9 respectivement. En revanche, le C18:0 montre une teneur relativement proche entre tous les beurres, aux alentours de 11,7, avec une dispersion d'environ 1. Cette teneur en C18:0 relativement conservée s'explique par les réactions de biohydrogénation des acides gras insaturés provenant du régime alimentaire des vaches dans le rumen (Chilliard *et al.*, 2000 ; Glasser *et al.*, 2008). Les acides gras monoinsaturés voient tous leur teneur augmenter dans les beurres issus des régimes riches en acides gras insaturés par rapport au beurre témoin. Cette augmentation est encore plus forte pour le C18:1 *n-7* et tous les acides gras polyinsaturés dans les régimes « Herbe » par rapport aux autres régimes issus des régimes riches en acides gras insaturés. D'une manière générale, les acides gras insaturés et monoinsaturés sont ainsi augmentés de 1,3 dans les beurres issus des régimes intégrant du blé et de 1,4 dans les beurres issus des régimes intégrant du colza. Les acides gras monoinsaturés sont augmentés de 1,3 à 1,7, suivant que le régime intègre du blé ou du colza, et de l'herbe ou non.

Afin d'évaluer les sources de variabilité entre les échantillons et mettre en évidence les acides gras à l'origine de cette variabilité, nous avons réalisé une analyse en composante principale (ACP) sur la base des compositions en acides gras des beurres. Toutes les analyses de composition des beurres à différentes dates ont été prises en compte pour donner plus de poids à l'analyse. La composition moyenne en acides gras de l'ensemble des beurres étudiés est donnée en **Figure CIV-1**. Cette composition moyenne représente le centre de l'ACP, et sert de référence pour comparer les coordonnées des beurres sur les différents axes de l'ACP (**Figure CIV-2**).

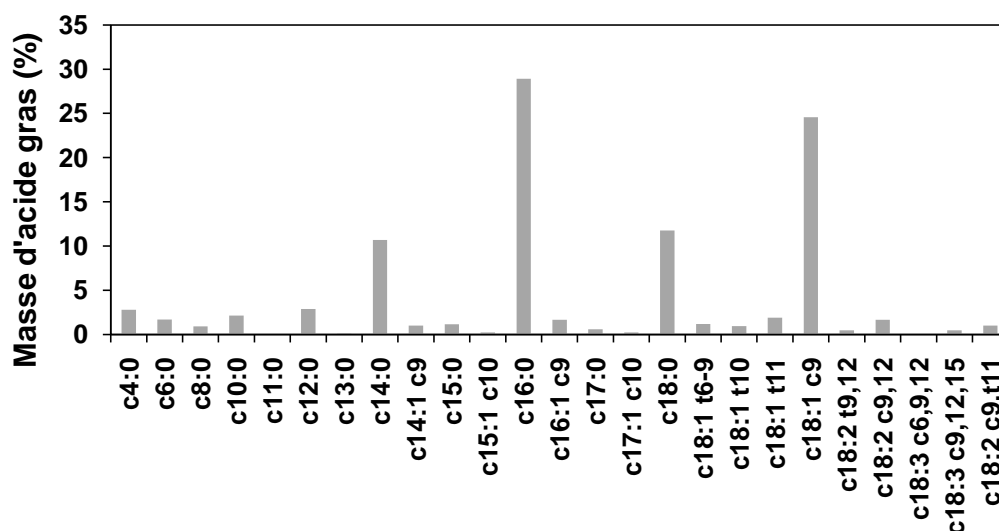


Figure CIV-1 : composition moyenne en acides gras de l'ensemble des beurres de l'étude.

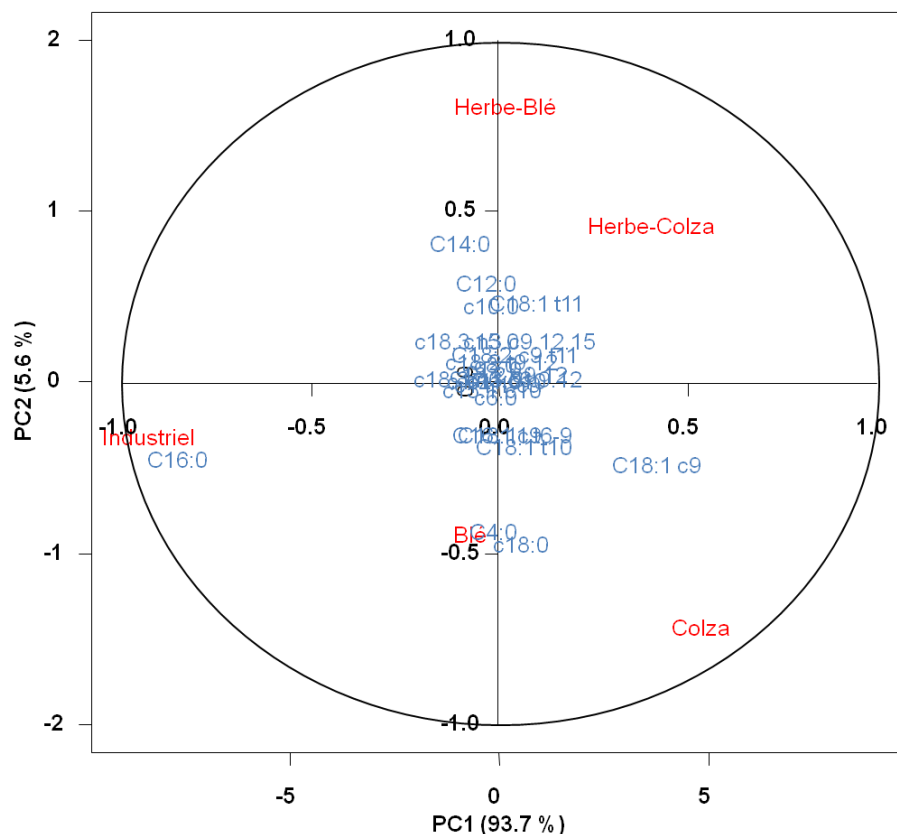


Figure CIV-2 : Résultat de l'analyse en composantes principales sur les données de composition en acides gras des beurres. Les acides gras contribuant le plus à la variabilité de composition entre les beurres (en bleu) sont représentés sur le cercle des corrélations ; les coordonnées moyennes des beurres dans le plan PC1 – PC2 (en rouge) sont représentées sur les axes vertical et horizontal.

Chapitre IV

Une très grande part de la variabilité (93,7%) de composition des beurres est expliquée par le premier axe de l'ACP, permettant de séparer 3 types de beurres suivant leur composition en acides gras sur la base de 2 acides gras principaux, C16:0 et C18:1 *c9* :

- le beurre « Industriel » riche en C16:0 et pauvre en C18:1 *c9*.
- les beurres « Herbe-Blé » et « Blé », de composition moyenne vis-à-vis de l'axe 1.
- les beurres « Herbe-Colza » et « Colza » riches en C18:1 *c9* et pauvres en C16:0.

L'axe 1 de l'ACP représente ainsi la proportion acides gras saturés / acides gras insaturés, avec les deux acides gras majoritaires antagonistes C16:0 et C18:1. De plus, une part de variabilité plus faible (5,6%) est expliquée par le deuxième axe de l'ACP, représenté par les teneurs en C14:0, C12:0, C18:0, C18:1 *c9* et C4:0, qui discriminent :

- d'une part les beurres « Herbe-Blé » et « Herbe-Colza », riches en C14:0 et C12:0 mais plus pauvres en C18:0, C18:1 *c9* et C4:0.
- le beurre « Industriel », moyen vis-à-vis de l'axe 2.
- d'autre part les beurres « Blé » et « Colza », riches en C18:0, C18:1 *c9* et C4:0 mais plus pauvres en C14:0 et C12:0.

Ainsi, 6 acides gras principaux se dégagent de cette ACP, dont la teneur dans les beurres permet d'expliquer une grande part de la variabilité de composition globale en acides gras (plus de 98%) : C16:0, C18:1 *c9*, C14:0, C12:0, C4:0 et C18:0.

2. Propriétés thermiques des beurres

L'objectif ici est de caractériser les propriétés thermiques des triacylglycérols des beurres au cours d'un chauffage après un stockage long à 4°C en fonction de leur composition en acides gras, puis de déterminer l'effet de cette composition sur le taux de matière grasse solide à 4°C et au cours du chauffage.

2.1. Caractérisation thermique des beurres au cours du chauffage

Les propriétés thermiques des beurres ont été étudiées par MCD au cours d'un chauffage -5°C à 60°C à 2°C/min après stockage de 35-54 jours à 4°C et refroidissement de 4°C à -5°C à 2°C/min. Trois enregistrements aient été réalisés par beurre et par date, mais seul un thermogramme représentatif de chaque beurre est présenté en **Figure CIV-3-A**. Un exemple des paramètres extraits des thermogrammes est représenté en **Figure CIV-3-B**. Le signal de MCD avant 4°C, correspondant à la mise en régime du calorimètre, est tronqué dans la **Figure CIV-3**.

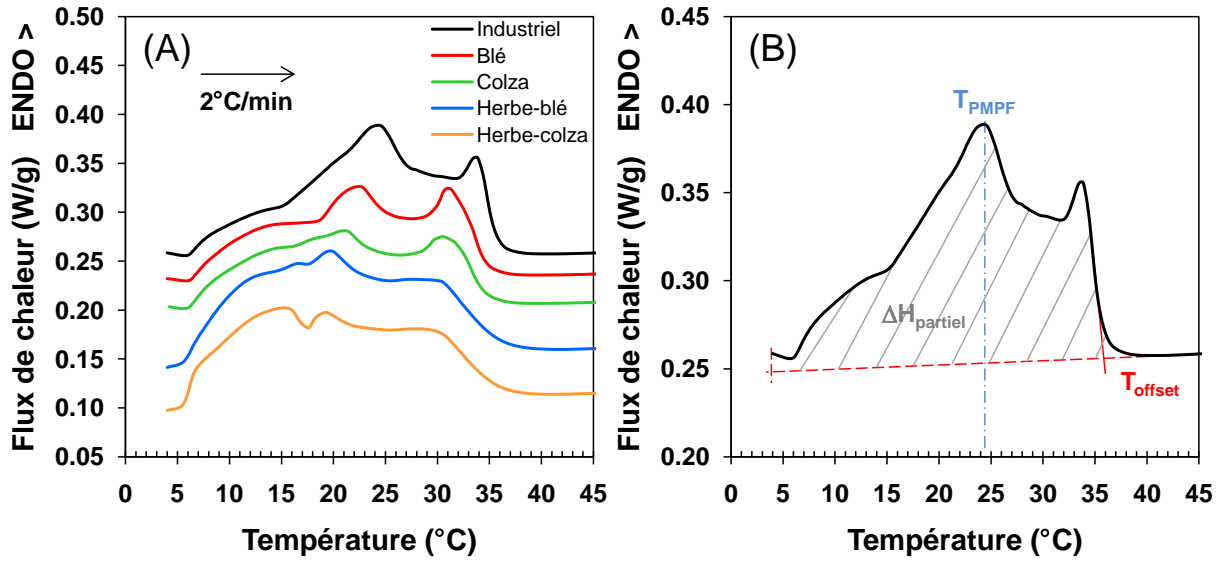


Figure CIV-3 : (A) thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des beurres de 4°C à 60°C à 2°C/min après stabilisation pendant 35-54 jours à 4°C. (B) paramètres extraits d'un thermogramme.

Les thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des beurres montrent des signaux endothermiques correspondant à la fusion des triacylglycérols des beurres entre 4°C et 37°C. Après 37°C, tous les triacylglycérols sont fondus, ce qui explique l'absence de signal autre qu'une ligne de base enregistrée en MCD. Deux populations de triacylglycérols se séparent : une première population fondant entre 4°C et 20-25°C et une deuxième population fondant entre 20-25°C et 37°C. Ces deux populations correspondent aux triacylglycérols des fractions à moyen et haut point de fusion respectivement (Marangoni et Lencki, 1998). Le beurre « Industriel » montre un pic des triacylglycérols à moyen point de fusion plus intense que les autres beurres ; le beurre « Herbe-colza » montre une quasi-absence du pic des triacylglycérols à moyen point de fusion. Le pic à haut point de fusion présente un signal endothermique plus intense en fin de fusion, entre 30°C et 37°C dans les beurres « Industriel », « Blé » et « Colza », mais pas dans les beurres « Herbe-blé » et « Herbe-colza ». Cette augmentation de l'intensité du pic à haut point de fusion en fin de fusion a déjà été observée par Lopez et Briard-Bion (2007a) qui l'ont relié au pic à haut point de fusion.

Plusieurs paramètres peuvent être extraits des thermogrammes enregistrés afin de les caractériser. Nous avons choisi d'exploiter 3 paramètres principaux : la température au maximum du pic à moyen point de fusion T_{PMPF} permettant de caractériser la position de ce pic, la température de fin de fusion T_{offset} , et la variation d'enthalpie partielle de fusion des beurres $\Delta H_{partiel}$ déterminée par intégration entre 4°C et 43°C, température où le signal atteint

la ligne de base. L'ensemble des paramètres extraits des thermogrammes enregistrés au chauffage des beurres de -5°C à 60°C à 2°C/min est présenté dans le **Tableau CIV-3**.

Tableau CIV-3 : paramètres thermiques extraits des thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des beurres de -5°C à 60°C à 2°C/min (moyennes ± écart-types par beurre).

Echantillon	$\Delta H_{\text{partiel}}$ (J/g MG)	T_{PMPF} (°C)	T_{offset} (°C)
Industriel	68,9 ± 1,3 ^c	24,4 ± 0,3 ^c	35,9 ± 0,1 ^b
Blé	56,4 ± 1,3 ^b	22,2 ± 0,4 ^b	34,8 ± 0,2 ^a
Colza	49,8 ± 3,0 ^a	19,6 ± 1,6 ^a	34,9 ± 0,3 ^a
Herbe-blé	64,0 ± 1,1 ^d	19,9 ± 0,2 ^a	36,3 ± 0,4 ^b
Herbe-colza	60,1 ± 1,9 ^c	19,2 ± 1,7 ^a	36,2 ± 0,2 ^b

Les valeurs de $\Delta H_{\text{partiel}}$ déterminées entre tous les beurres entre 4°C et 43°C sont significativement différentes. Le beurre « Industriel » présente la $\Delta H_{\text{partiel}}$ la plus élevée, le beurre « Colza » la plus faible. Les beurres « Herbe-blé » et « Herbe-colza » présentent des $\Delta H_{\text{partiel}}$ élevés comparé aux beurres « Colza » et « Blé » dont la composition en acide gras est proche par rapport à celle du beurre « Industriel ». La différence de DH entre les beurres « Herbe-colza » et « Herbe-blé » par rapport aux beurres « Colza » et « Blé » pourrait provenir de la différence de composition, en particulier vis-à-vis des teneurs en acides gras définissant l'axe 2 de l'ACP réalisée sur la composition, c'est-à-dire C12:0, C14:0 d'un côté et C18:0 et C4:0 de l'autre côté. En bref, plus il y aurait de C12:0 et C14:0 en balance avec le C18:0 et C4:0, plus le $\Delta H_{\text{partiel}}$ serait élevé à taux en acides gras saturé constant, c'est-à-dire pour des coordonnées selon l'axe 1 égales.

La T_{PMPF} montre des valeurs significativement différentes entre les beurres issus des régimes « Industriel », « Blé » et le groupe contenant l'ensemble des autres beurres. Le beurre « Industriel » a la T_{PMPF} la plus élevée : 2,1 à 5,2°C supérieure aux autres beurres. Le beurre « Blé » présente ensuite la valeurs la plus élevée des beurres restant, puis se positionnent les beurres « Herbe-blé », « Herbe-colza » et « Colza » à un niveau comparable. En recoupant ces observations avec les résultats de l'ACP sur la composition en acides gras des beurres en **Figure CIV-2**, nous en déduisons que la T_{PMPF} est liée à plusieurs acides gras : les acides gras définissant l'axe 1 (C16:0 et C18:1 *c9*), mais également des acides gras de l'axe 2 qui séparent le beurre « Blé » des autres beurres issus des régimes riches en acides gras insaturés. Compte tenu du fait que la T_{PMPF} est plus élevée dans le beurre « Blé » par rapport aux autres beurres issus des régimes riches en acides gras insaturés, l'acide gras associé à l'axe 2 de l'ACP pourrait être le C18:0. En effet, nous savons que les triacylglycérols ayant les acides gras les plus longs et saturés ont également le point de fusion le plus élevé (Ollivon,

1992). Ainsi, quand la teneur en C18:0 augmente, la T_{PMPF} augmenterait, comme observé pour le beurre « Blé », le plus riche en C18:0.

En ce qui concerne la T_{offset} , deux grands groupes de beurres se distinguent : d'une part les beurres « Blé » et « Colza » ayant les valeurs les plus faibles aux alentours de 34,9°C et d'autre part les beurres « Industriel », « Herbe-blé » et « Herbe-colza » ayant des valeurs plus fortes vers 36,2°C. En recoupant ces observations avec les résultats de l'ACP sur la composition en acides gras des beurres en **Figure CIV-2**, nous en déduisons que les acides gras C16:0, C12:0 et C14:0 pourraient être responsables d'une plus forte T_{offset} dans les beurres.

Afin de clarifier l'effet de la composition en acides gras sur les propriétés thermiques des triacylglycérols dans les beurres, les coefficients de corrélation entre les paramètres extraits des thermogrammes de MCD enregistrés sur les beurres en chauffage et la composition en acides gras des matières grasses extraites des beurres ont été calculés. Nous avons choisi de prendre en compte préférentiellement les acides gras contribuant le plus à la variabilité de composition entre les échantillons mis en évidence dans la partie **Composition en acides gras des beurres étudiés**. Ces corrélations sont calculées en prenant en compte la maximum de valeurs pour chaque paramètres ; nous avons donc pris en compte les moyennes par date de chaque paramètre, soit 9 valeurs par paramètres.

Tableau CIV-4 : table des corrélations entre les paramètres extraits des thermogrammes de MCD enregistrés au chauffage des beurres et les acides gras contribuant le plus à la variabilité de composition entre les beurres.

	$\Delta H_{\text{partiel}}$ (J/g MG)	T_{PMPF} (°C)	T_{offset} (°C)
C4:0	-0,8160	0,2866	-0,9143
C12:0	0,9580	0,0170	0,8914
C14:0	0,9930	0,3221	0,8145
C16:0	0,4871	0,8826	0,0688
C18:0	-0,8793	-0,2453	-0,6409
C18:1 <i>t6-9</i>	-0,8102	-0,5770	-0,4878
C18:1 <i>t10</i>	-0,8023	-0,4160	-0,5837
C18:1 <i>t11</i>	-0,0125	-0,9111	0,3704
C18:1 <i>c9</i>	-0,6679	-0,8010	-0,2718

La variation d'enthalpie de fusion est corrélée fortement aux acides gras C4:0, C18:0 et C18:1 *t6-9* et C18:1 *t10* (négativement) et à C12:0 et surtout C14:0 (postivement). Autrement dit, plus la teneur en acides gras saturés à chaînes moyennes augmente, plus le $\Delta H_{\text{partiel}}$ augmente. La corrélation négative observée avec le C18:0 vient du fait que la teneur

Chapitre IV

en C18:0 augmente dans les régimes enrichis en acides gras insaturés, au contraire des autres acides gras saturés, dû au métabolisme des vaches laitières et notamment aux voies de synthèses du C18:0 (Lock et Bauman, 2004 ; Palmquist, 2006).

La température du maximum du pic à moyen point de fusion montre des corrélations fortes et opposées avec C16:0 d'une part et C18:1 *t11* et C18:1 *c9* d'autre part. Plus le C16:0 augmente, plus T_{PMPF} augmente, et inversement avec C18:1 *t11* et C18:1 *c9*.

En ce qui concerne la température de fusion finale, elle est corrélée avec le C4:0 négativement, et les C12:0 et C14:0 positivement. Les acides gras saturés à longues chaînes C16:0 et C18:0 semblent moins corrélés avec la T_{offset} . Le mécanisme d'estérification des acides gras courts sur la position *sn*-3 du glycérol au niveau de la cellule épithéliale mammaire des vaches laitières pourrait être impliqué dans le contrôle de la température de fusion de la matière grasse laitière en général (Timmen et Patton, 1988). Cela pourrait expliquer la forte corrélation négative entre la teneur en C4:0 et la T_{offset} , une teneur élevée en acides gras courts abaissant la T_{offset} , le C4:0 étant systématiquement estérifié en position *sn*-3 du glycérol et en tant que dernier acide gras estérifié dans l'ordre chronologique (Parodi, 1982 ; Palmquist, 2006 ; Hawke et Taylor, 1995). Ainsi, s'il existe effectivement une régulation de la température de fusion de la matière grasse laitière en général par le mécanisme de synthèse des triacylglycérols dans la glande mammaire bovine, il est probable qu'elle intervienne à l'étape finale de la synthèse des triacylglycérols, c'est-à-dire lors de l'estérification du 3^{ème} acide gras en position *sn*-3 (Hawke et Taylor, 1995). Cela pourrait expliquer la corrélation observée entre la teneur en C4:0 et la T_{offset} dans ces beurres.

Sachant que les triacylglycérols fondant en dernier au cours du chauffage sont constitués d'acides gras saturés à longue chaîne (Lavigne, 1995), il est étonnant que le C4:0, acide gras court, soit associé à la T_{offset} . En fait, les triacylglycérols à plus haut point de fusion se dissolvent dans la phase liquide en fin de fusion de la matière grasse, ce qui explique que la température de fusion de la matière grasse laitière soit inférieure à la température de fusion des triacylglycérols à plus haut point de fusion qu'elle contient (par exemple la tristéarine SSS). Les triacylglycérols qui composent cette phase liquide sont les triacylglycérols des pics à moyen et bas point de fusion, comprenant un ou deux acides gras irréguliers, c'est-à-dire court ou insaturé (Lavigne, 1995). Cela pourrait expliquer la corrélation observée entre le C4:0 et la T_{offset} .

2.2. Détermination du taux de matière grasse solide dans les beurres à 4°C et son évolution au cours du chauffage

La matière grasse des beurres étant partiellement cristallisée à 4°C, nous avons souhaité mettre en évidence son comportement thermique sur l'ensemble de sa plage de fusion à la suite d'une stabilisation des triacylglycérols dans leur forme la plus stable possible. Pour cela, nous avons extrait la matière grasse correspondant aux beurres, l'avons stabilisé à 4°C pendant $t > 72$ h pour cristalliser les triacylglycérols dans leur forme la plus stable avant de la refroidir à 2°C/min jusqu'à -50°C pour lui permettre de cristalliser entièrement. Enfin, nous avons étudié les propriétés de fusion de cette matière grasse au cours d'un chauffage de -50°C à 60°C à 2°C/min pour en déduire la variation d'enthalpie totale de fusion, calculée entre -40°C, température estimée de début de fusion des triacylglycérols laitiers (Timms, 1980 ; Lopez *et al.*, 2001c), et 43°C, température à laquelle le signal de MCD revient à la ligne de base (**Figure CIV-4**).

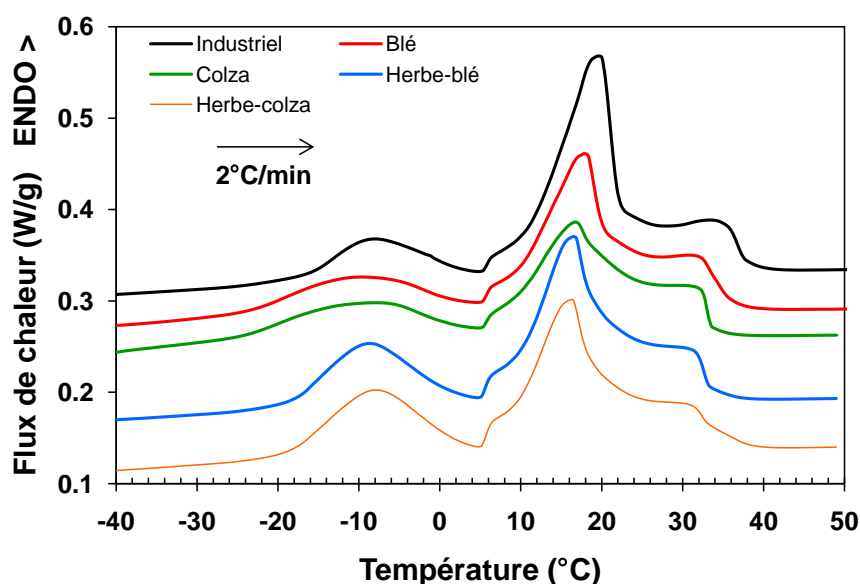


Figure CIV-4 : thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des matières grasses extraites des beurres de -50°C à 60°C à 2°C/min après stabilisation pendant $t > 72$ h 4°C puis refroidissement de 4°C à -50°C à 2°C/min.

Les thermogrammes en **Figure CIV-4** présentent 3 massifs endothermiques correspondant à la fusion des triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion (Marangoni et Lencki, 1998). Les triacylglycérols à bas point de fusion fondent à partir de -25°C jusque vers 5°C, qui correspond à la température de stabilisation de la matière grasse avant son refroidissement jusqu'à -50°C. A partir de 5°C environ débute le pic à moyen point de fusion, qui est le plus intense des trois massifs identifiés. Les triacylglycérols à moyen point de fusion

Chapitre IV

fondent jusqu'à 20-22°C, température estimée à laquelle débute le pic à haut point de fusion. Enfin, les triacylglycérols du pic à haut point de fusion fondent à partir de 20-22°C, jusqu'à la fusion finale de la matière grasse vers 40°C.

Le taux de matière grasse solide à 4°C dans les beurres est estimé par calcul selon une méthode adaptée de celle proposée par Lopez *et al.* (2006a), à partir de la formule :

$$\text{SFC}_{4^{\circ}\text{C}} (\%) = \Delta H_{\text{partiel}} / \Delta H_{\text{total}} * 100 \quad \text{Équation 15}$$

où $\Delta H_{\text{partiel}}$ est la variation d'enthalpie de fusion de la matière grasse déterminée entre 4°C et 43°C pour un beurre stabilisé longtemps à 4°C et ΔH_{total} est la variation d'enthalpie de fusion de la matière grasse extraite des beurres déterminée sur la plage de température -40 – 43°C.

Le calcul du taux de solide est basé sur l'approximation que les variations d'enthalpie de fusion des triacylglycérols qui composent la matière grasse laitière ne sont pas différentes.

A l'aide de cette méthode, nous avons pu estimer le taux de matière grasse solide à 4°C dans les beurres stabilisés longtemps à cette température (**Tableau CIV-5**). La valeur de $\text{SFC}_{4^{\circ}\text{C}}$ a ensuite servi à déterminer l'évolution du taux de matière grasse solide en fonction de la température au cours du chauffage de 4°C à 60°C à 2°C/min (**Figure CIV-5**). Pour cela, la variation d'enthalpie est intégrée de manière cumulative de 4°C à 43°C, prenant la valeur $\text{SFC}_{4^{\circ}\text{C}}$ à 4°C et la valeur 0% à 43°C. De cette manière, il est également possible d'extraire des valeurs estimées des taux de matière grasse solide à des températures intermédiaires à 4°C et 43°C. Nous avons choisi d'extraire les $\text{SFC}_{12^{\circ}\text{C}}$, $\text{SFC}_{20^{\circ}\text{C}}$ et $\text{SFC}_{25^{\circ}\text{C}}$, correspondant à la température de barattage de la crème pour fabriquer du beurre utilisée classiquement en industrie (12°C), et des températures représentatives de la température ambiante (20 et 25°C).

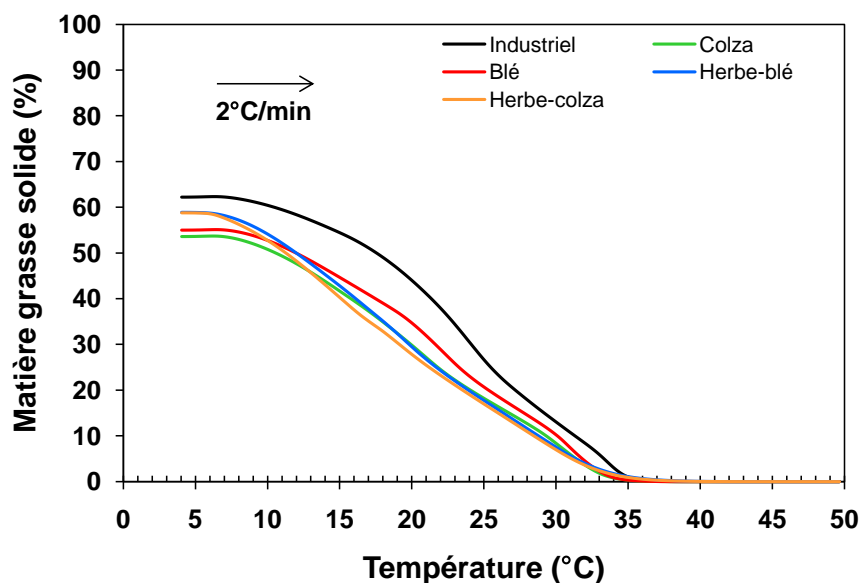


Figure CIV-5 : évolution du taux de matière grasse solide dans les beurres en fonction de la température.

Tableau CIV-5 : taux de matière grasse solide dans les beurres à 4°C, 12°C, 20°C et 25°C déterminés par MCD.

Echantillon	SFC _{4°C} (%)	SFC _{12°C} (%)	SFC _{20°C} (%)	SFC _{25°C} (%)
Industriel	62,2 ± 1,6 ^{cd}	58,3 ± 0,4 ^d	43,8 ± 1,0 ^d	26,5 ± 1,6 ^c
Blé	54,1 ± 1,8 ^b	49,1 ± 0,5 ^{bc}	33,6 ± 0,9 ^c	19,8 ± 1,0 ^b
Colza	47,9 ± 2,9 ^a	45,6 ± 2,1 ^a	27,2 ± 2,8 ^a	17,4 ± 0,9 ^a
Herbe-blé	59,8 ± 1,2 ^d	50,8 ± 1,0 ^c	30,5 ± 1,2 ^b	18,1 ± 0,7 ^a
Herbe-colza	57,3 ± 3,4 ^c	47,4 ± 1,2 ^{ab}	27,3 ± 0,5 ^a	16,8 ± 0,2 ^a

Le taux de matière grasse solide diminue sur l'ensemble de la plage de température 4-35°C dans tous les beurres. La diminution est quasi linéaire à partir de 10°C (**Figure CIV-5**). Cependant, sur l'ensemble de la plage de fusion balayée, le taux de matière grasse solide du beurre « Industriel » est clairement supérieur à celui des autres beurres (**Tableau CIV-5**). Là aussi, nous avons tenté de déterminer les corrélations existant entre les acides gras qui contribuent le plus à expliquer la variabilité de composition globale de la matière grasse des beurres et les taux de matière grasse solide aux températures d'intérêt choisis. Le **Tableau CIV-6** présente les corrélations entre ces taux de matière grasse solide et les acides gras déterminant le plus la variabilité de composition entre les beurres.

Tableau CIV-6 : table des corrélations entre les taux de matière grasse solide dans les beurres à différentes températures et les acides gras déterminant le plus la variabilité de composition entre les beurres.

	SFC _{4°C}	SFC _{12°C}	SFC _{20°C}	SFC _{25°C}
C4:0	-0,669	-0,159	0,170	0,253
C12:0	0,857	0,497	0,192	0,099
C14:0	0,949	0,739	0,492	0,417
C16:0	0,586	0,917	0,975	0,954
C18:0	-0,839	-0,617	-0,388	-0,245
C18:1 <i>t6-9</i>	-0,798	-0,852	-0,746	-0,689
C18:1 <i>t10</i>	-0,706	-0,696	-0,568	-0,527
C18:1 <i>t11</i>	-0,114	-0,580	-0,838	-0,827
C18:1 <i>c9</i>	-0,758	-0,975	-0,941	-0,904

Le taux de matière grasse solide en particulier est très lié aux acides gras C14:0 et C16:0 suivant la température à laquelle il est déterminé. A 4°C, le C14:0, dont la température de fusion est le plus faible entre les deux, semble déterminer le SFC, alors qu'à 12°C, 20°C et 25°C, ce serait plutôt le C16:0. Le SFC_{4°C} serait donc lié à un acide gras saturé légèrement plus court que les autres SFC. Cela pourrait se traduire par le fait que le pic à bas point de fusion contient plus de triacylglycérols avec des acides gras à moyenne longueur de chaîne par rapport aux pics à moyen et haut point de fusion. En effet, nous avons montré dans le **Chapitre III** que le pic à moyen point de fusion, représenté majoritairement par la fraction liquide à 0°C de matières grasses laitières étudiées, présenterait un ratio C14:0 / C16:0 plus important que dans les fractions à moyen et haut point de fusion. Le C14:0 montrant un point de fusion plus faible que le C16:0, il est raisonnable de l'attribuer à une fraction à plus bas point de fusion que celle contenant le C16:0, bien que la matière grasse laitière soit constituée essentiellement de triacylglycérols et non d'acides gras. Entre 4°C et 12°C, la corrélation maximale entre le SFC et les acides gras change du C14:0 au C16:0, ce qui laisserait suggérer que dans cette plage de température, des triacylglycérols du pic à bas point de fusion sont en train de fondre. A 12°C, seuls les triacylglycérols des pics à moyen et haut point de fusion subsisteraient à l'état solide. Les relations entre ces deux acides gras et les quatre SFC extraits sont représentées dans la **Figure CIV-6**.

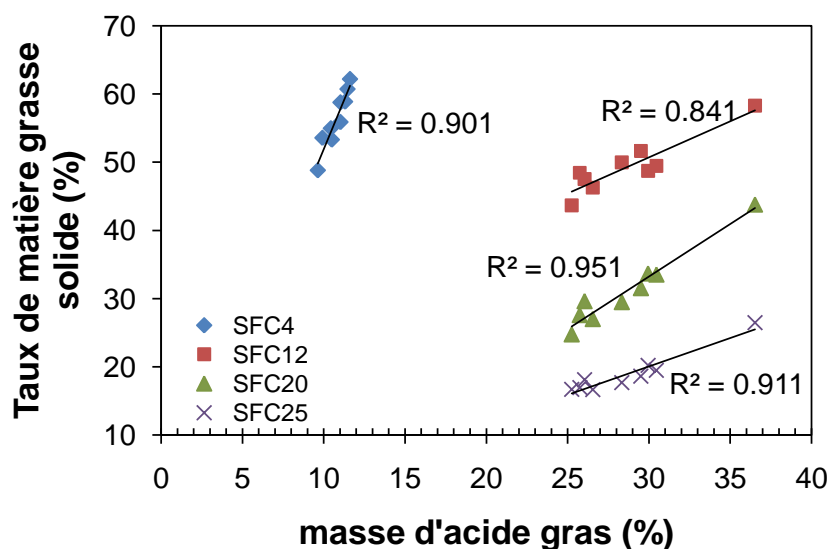


Figure CIV-6 : droites de régression linéaires entre les taux de matière grasse solide des beurres à 4°C, 12°C, 20°C et 25°C en fonction de leur teneur en C14:0, C16:0, C16:0 et C16:0 respectivement.

Nous avons donc identifié que le pic à moyen point de fusion des beurres est très affecté par une modification de la composition en acides gras des beurres. Nous pouvons nous interroger sur les types de cristaux de triacylglycérols qui sont présents à 4°C dans ces beurres et qui permettraient d'expliquer les différences de variation d'enthalpie et de quantité de matière grasse solide à cette température, ainsi que les types de cristaux qui fondent au cours d'un chauffage après stabilisation longtemps à 4°C.

3. Caractérisation cristallographique des beurres

Les propriétés structurales des triacylglycérols dans les beurres stockés longtemps à 4°C ont été caractérisées par DRX à 4°C, puis la stabilité des cristaux formés a été évaluée par DRXT-MCD au cours d'un chauffage de 4°C à 60°C. Les structures cristallines identifiées à 4°C dans les beurres étant peu différentes entre les beurres étudiés, nous avons décidé de n'étudier les propriétés structurales des triacylglycérols au cours du chauffage uniquement sur 2 beurres extrêmes en termes de composition. Ainsi, un échantillon de chaque type de beurre a été analysé par DRX à 4°C, et un échantillon des beurres « Industriel » et « Herbe-colza » ont été analysés par DRXT-MCD.

3.1. Identification des structures cristallines formées par les triacylglycérols dans les beurres à 4°C après 54-62 jours de stockage à 4°C

Dans le but d'identifier les structures cristallines des variétés stabilisées pendant longtemps à 4°C, 10 diagrammes de diffraction des rayons X aux petits et grands angles ont été enregistrés sur les beurres pendant 2 minutes chacun après 54-62 jours de stockage à 4°C. Les 10 diagrammes par beurre ont été sommés et lissés afin d'améliorer le rapport signal sur bruit et sont représentés en **Figure CIV-7**.

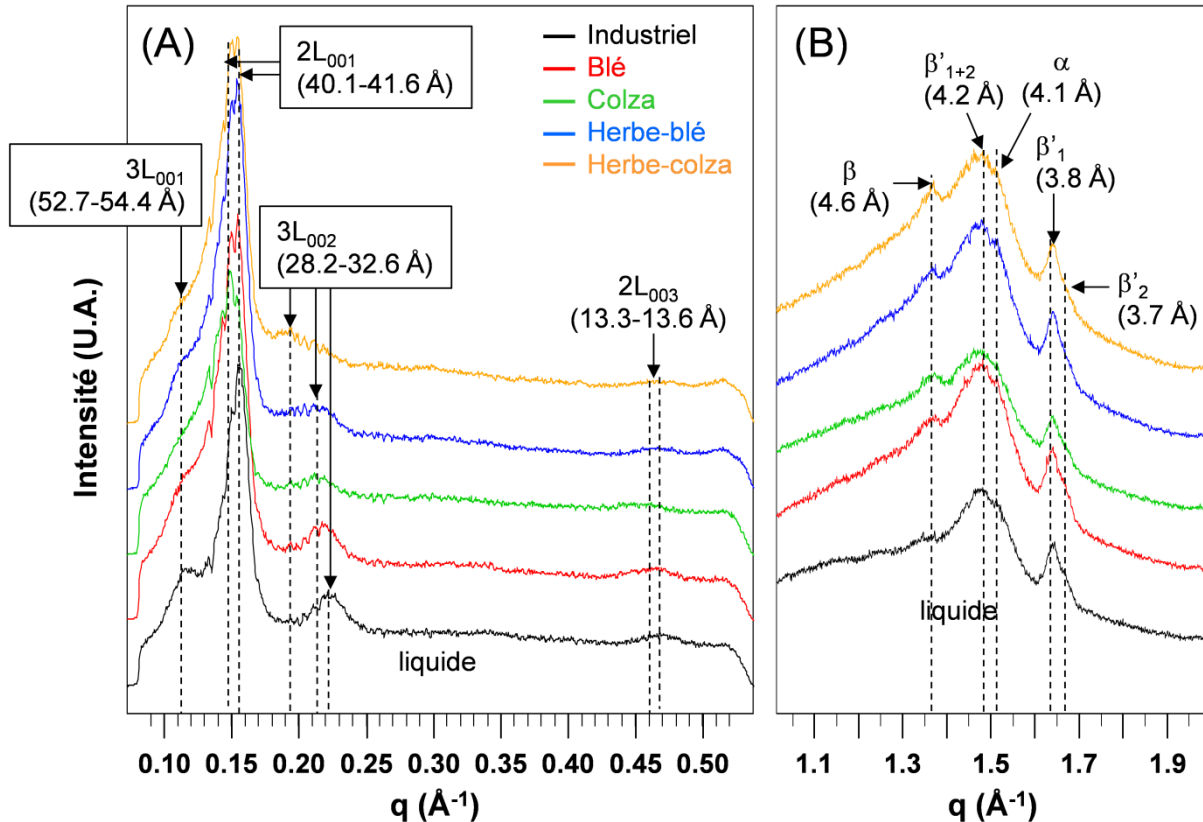


Figure CIV-7 : diagrammes de DRX lissés enregistrés pendant un équivalent de 20 minutes aux petits (A) et grands angles (B) à 4°C dans les beurres après 54-62 jours de stockage à 4°C. Les structures cristallines identifiées sont annotées sur la figure (3L = 3 longueurs de chaînes, 2L = 2 longueurs de chaînes).

Dans tous les beurres analysés, la coexistence de structures longitudinales 2L (40,1-41,6 Å), caractérisée par un pic intense de premier ordre vers $0,151\text{-}0,157 \text{\AA}^{-1}$, et 3L (52,7-54,4 Å) en faible proportion, caractérisée par ses pics de diffraction de premier et deuxième ordre vers $0,115\text{-}0,119 \text{\AA}^{-1}$ et $0,230\text{-}0,238 \text{\AA}^{-1}$, a été identifiée aux petits angles de diffraction. Les formes polymorphiques α , β , β'_1 et β'_2 ont été identifiées dans tous les échantillons aux grands angles de diffraction (**Figure CIV-7**). Ayant réalisé 10 acquisitions de DRX pour chaque beurre, nous avons déconvolué les pics identifiés aux petits angles à l'aide du logiciel

PeakFit® pour extraire différents paramètres cristallographiques présentés dans le **Tableau CIV-7**.

Tableau CIV-7 : distances caractéristiques et annotation des pics identifiés en DRX sur les beurres à 4°C après stabilisation pendant 54-62 jours (moyenne ± écart-type, n=5 diagrammes par beurre).

Echantillon	Distance	Pic annoté
Industriel	53,4 ± 0,3 Å (faible)	3L ₀₀₁
	40,1 ± 0,1 Å (fort)	2L ₀₀₁
	28,2 ± 0,1 Å (faible)	3L ₀₀₂
	13,3 ± 0,1 Å (très faible)	2L ₀₀₃
Blé	52,7 ± 1,2 Å (faible)	3L ₀₀₁
	40,7 ± 0,1 Å (fort)	2L ₀₀₁
	28,8 ± 0,1 Å (faible)	3L ₀₀₂
	13,6 ± 0,1 Å (très faible)	2L ₀₀₃
Colza	54,4 ± 0,8 Å (très faible)	3L ₀₀₁
	41,6 ± 0,2 Å (fort)	2L ₀₀₁
	29,5 ± 0,1 Å (très faible)	3L ₀₀₂
Herbe-blé	53,6 ± 0,7 Å (très faible)	3L ₀₀₁
	40,6 ± 0,1 Å (fort)	2L ₀₀₁
	30,1 ± 0,3 Å (très faible)	3L ₀₀₂
Herbe-colza	53,7 ± 1,3 Å (très faible)	3L ₀₀₁
	41,0 ± 0,2 Å (fort)	2L ₀₀₁
	32,6 ± 0,8 Å (très faible)	3L ₀₀₂

La structure majoritaire 2L est significativement plus épaisse dans les beurres des régimes expérimentaux par rapport au beurre « Industriel ». Cette différence d'épaisseur pourrait provenir i) de la longueur des chaînes d'acides gras des triacylglycérols qui composent cette structure, ii) de l'angle induit par la structure transversale correspondant à cette structure 2L, iii) des deux phénomènes. Plusieurs formes polymorphiques ont été identifiées aux grands angles de diffraction dans les beurres, il est donc difficile d'attribuer chaque structure longitudinale identifiée à la forme polymorphique qui lui correspond sur la base de ces observations. De plus, nous avons identifié uniquement 2 formes cristallines longitudinales mais 4 formes polymorphiques dans chacun des beurres analysés, ce qui suggère qu'il existe en réalité au moins une structure cristalline longitudinale de plus comme suggéré dans Lopez *et al.* (2002b).

Afin de mieux comprendre les associations entre les structures longitudinales et transversales identifiées en statique à 4°C dans les beurres, nous avons réalisé un chauffage à 0,5°C/min de 4°C à 60°C et enregistré des diagrammes de DRXT au cours de ce chauffage.

3.2. Identification des structures cristallines formées par les triacylglycérols dans les beurres au cours du chauffage de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après 54-62 jours de stockage à 4°C

Nous avons réalisé des enregistrements de DRXT couplés à la MCD à raison d'un enregistrement par degré au cours du chauffage à 0,5°C/min des beurres « Industriel » (**Figure CIV-8**) et « Herbe-colza » (**Figure CIV-9**). Les diagrammes de DRXT représentés dans les **Figure CIV-8** et **Figure CIV-9** ont été lissés ensemble selon la méthode détaillée dans la partie **Matériels et méthodes**.

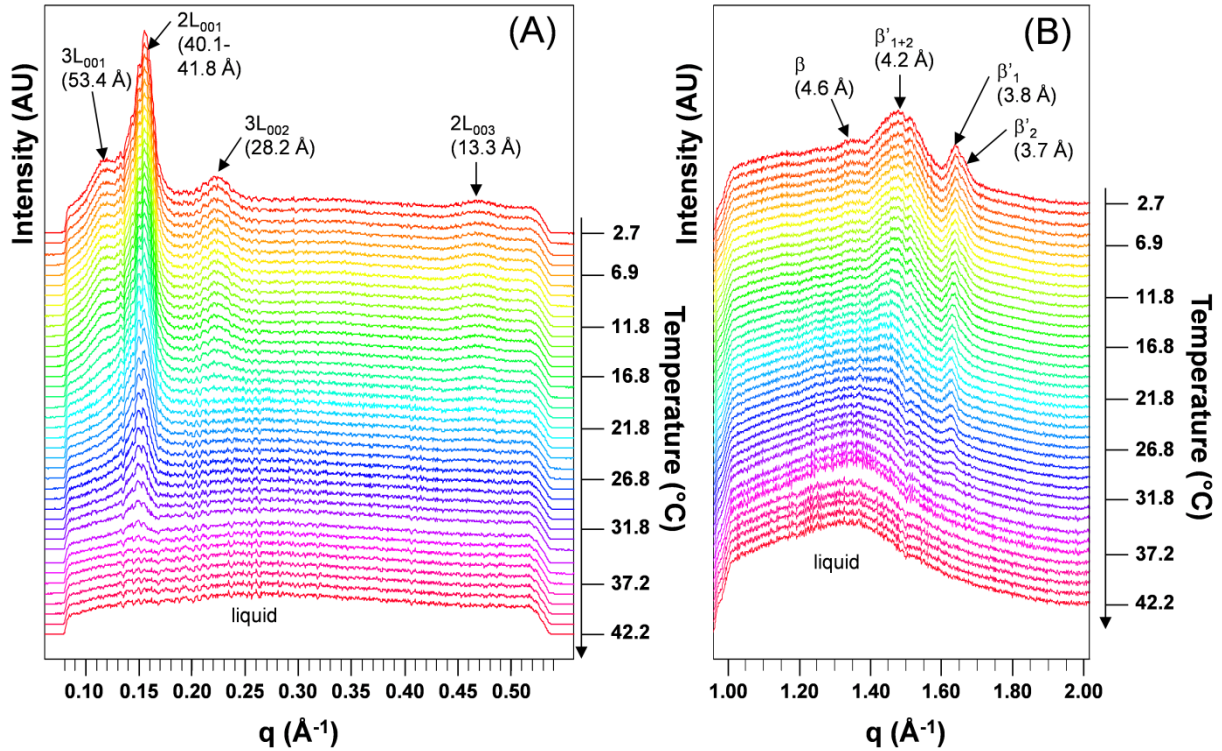


Figure CIV-8 : diagrammes de DRX lissés enregistrés aux petits (A) et grands angles (B) au cours du chauffage du beurre « Industriel » de 4°C à 60°C après 54 jours de stockage à 4°C. Les structures cristallines identifiées sont annotées sur la figure (3L = 3 longueurs de chaînes, 2L = 2 longueurs de chaînes).

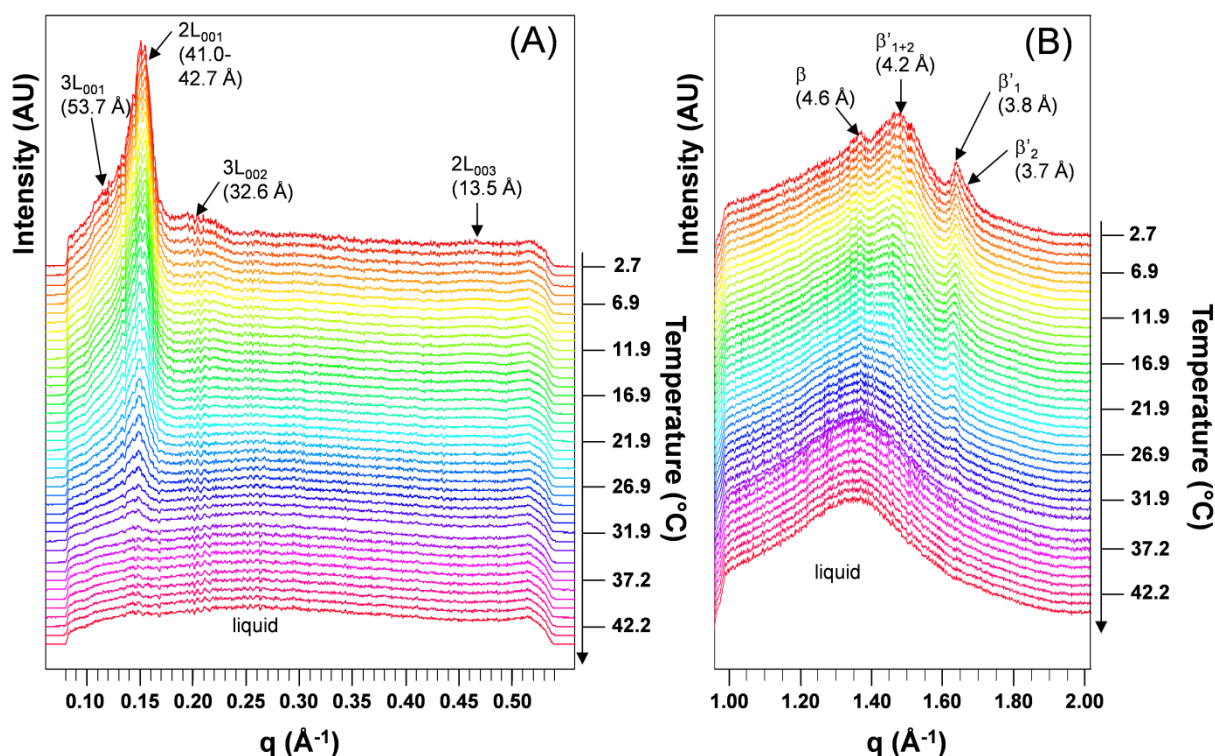


Figure CIV-9 : diagrammes de DRX lissés enregistrés aux petits (A) et grands angles (B) au cours du chauffage du beurre « Herbe-colza » de 4°C à 60°C après 55 jours de stockage à 4°C. Les structures cristallines identifiées sont annotées sur la figure (3L = 3 longueurs de chaînes, 2L = 2 longueurs de chaînes).

L'identification des structures cristallines au cours du chauffage du beurre « Industriel » montre la fusion finale de la 3L vers 23°C, associée à la structure β'_2 (**Figure CIV-8**). La structure β'_1 2L fondent totalement à plus haute température, vers 37°C, température de fusion finale de la matière grasse déterminée par MCD. Pour le beurre « Herbe-colza » la fusion de la structure 3L a lieu plus tôt, vers 19°C en même temps que la structure β'_2 . La structure β semble fondre avec la β'_1 2L pour le beurre « Herbe-colza » où le pic de β est le plus intense. Pour le beurre « Industriel », le pic de β est très faible en intensité à 4°C, ce qui rend la détermination de sa température de fusion plus compliquée, mais nous l'avons estimé à environ 17°C. La forme polymorphique α présente un pic vers $1,51 \text{ \AA}^{-1}$ difficile à séparer des pics vers $1,5 \text{ \AA}^{-1}$ associés aux formes β'_1 et β'_2 , c'est pourquoi nous n'avons pas réussi à déterminer sa température de fusion.

L'intensité et la position en vecteur de diffusion q de chaque pic de diffraction identifié aux petits angles de diffraction ont été déterminées à l'aide d'une procédure écrite au laboratoire pour le logiciel R et sont tracées en fonction de la température dans la **Figure**

CIV-10. Ainsi, il est possible de délimiter des zones sur les thermogrammes de MCD couplée où sont indiquées les structures qui fondent en fonction de la température (**Figure CIV-10-E** et **F**). Le signal de MCD couplée enregistré pour le beurre « Herbe-colza » étant inexploitable, nous avons représenté dans la **Figure CIV-10-F** le signal de MCD enregistré lors du chauffage à 2°C/min.

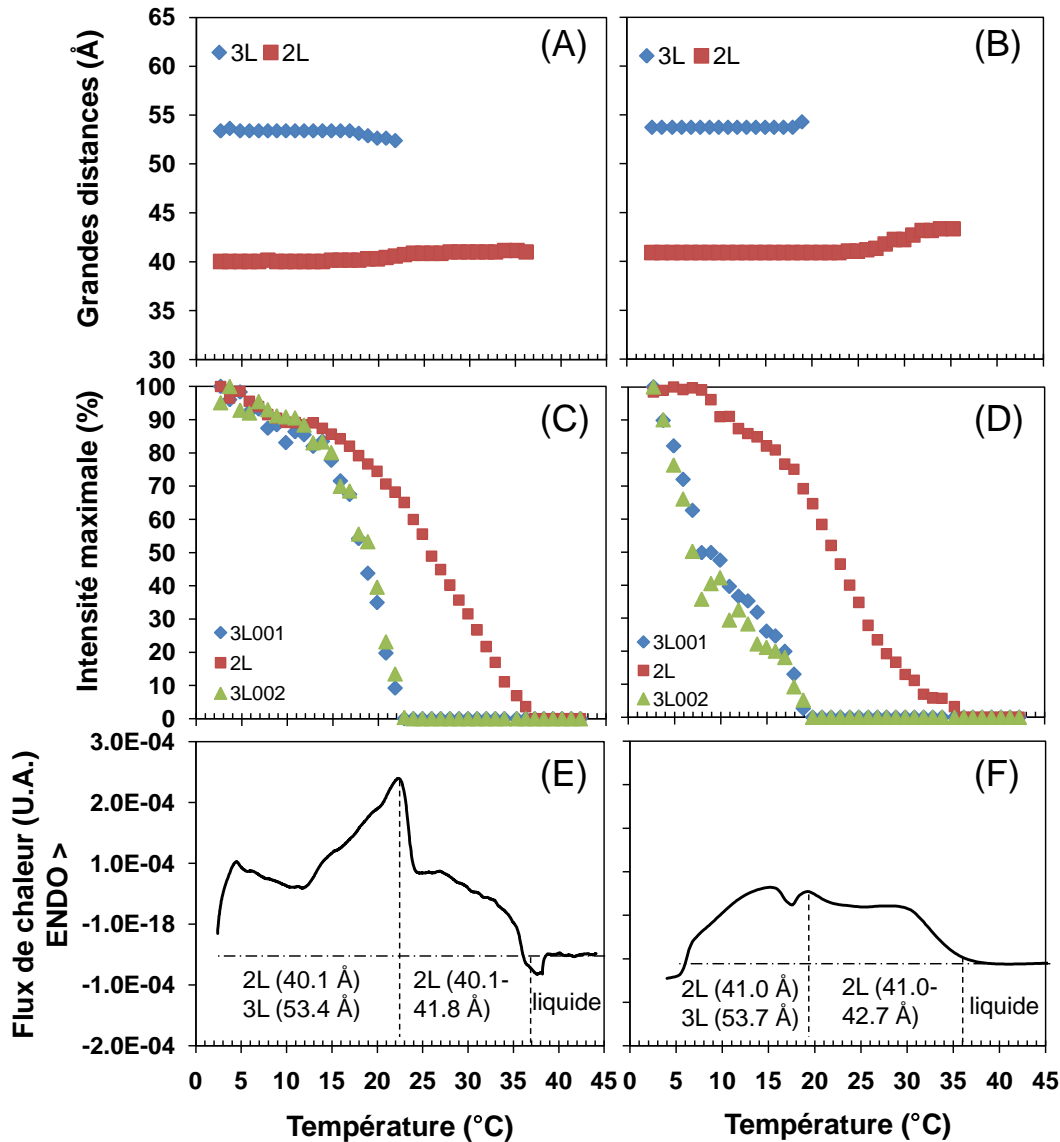


Figure CIV-10 : évolution des épaisseurs des structures longitudinales identifiées au chauffage des beurres « Industriel » (**A**) et « Herbe-colza » (**B**). Evolution de l'intensité maximale des pics de DRX enregistrés au chauffage des beurres « Industriel » (**C**) et « Herbe-colza » (**D**) en fonction de la température. Thermogrammes de MCD enregistrés en chauffage des beurres « Industriel » (**E**) et « Herbe-colza » (**F**) de 4°C à 60°C. Le thermogramme E correspond à la MCD couplée à la DRX enregistrée à 0,5°C/min, le thermogramme F correspond à la MCD enregistrée à 2°C/min sur DSC Q1000.

Chapitre IV

Au cours du début de la fusion lorsque la structure 3L est encore présente dans les 2 échantillons, la structure 2L fond également car l'intensité de son premier ordre de diffraction diminue lorsque la température augmente. Pour les deux beurres étudiés, le pic à moyen point de fusion enregistré en MCD entre 4°C et 20-25°C correspond à la fusion des variétés 2L (40,1 / 41,0 Å) et 3L (53,4 / 53,7 Å) ; il va de 4 à 23°C pour le beurre « Industriel » et de 4 à 20°C pour le beurre « Herbe-colza ». Dans le beurre « Industriel », les deux structures cristallines longitudinales identifiées fondent lentement à une vitesse d'environ 2%/°C jusqu'à 14°C, puis la 3L (53,4 Å) fond rapidement à une vitesse d'environ 9%/°C jusqu'à 23°C. Entre 14°C et 37°C, gamme de température du pic à haut point de fusion seule la structure 2L (40,1 Å) persiste, et fond quasi linéairement à raison de 3,5%/°C environ. L'épaisseur de la structure 3L ne change pas lors de sa fusion, en revanche, celle de la 2L augmente légèrement de 40,1 Å à 41,8 Å entre 14°C et 23°C, gamme de température où nous avons estimé la fusion de la forme polymorphique β .

Dans le beurre « Herbe-colza », les structures cristallines 2L et 3L ont un comportement de fusion différent de celui observé pour le beurre « Industriel ». La structure 3L (53,7 Å) fond rapidement dès le début du chauffage à une vitesse d'environ 14%/°C jusqu'à 8°C, puis plus lentement à une vitesse d'environ 4%/°C jusqu'à 20°C où elle est complètement fondue. La structure 2L (41,0 Å) fond d'abord lentement à environ 2%/°C entre 4°C et 20°C, puis fond plus rapidement à environ 7%/°C entre 20°C et 27°C et enfin plus lentement à environ 2,5%/°C jusqu'à 37°C. L'épaisseur de la structure 3L ne change pas lors de sa fusion, en revanche, celle de la 2L augmente légèrement de 41,0 Å à 42,7 Å entre 25°C et 32°C, gamme de température où nous avons estimé la fusion de la forme polymorphique β .

Ainsi, la structure 3L identifiée dans les deux beurres fond plus rapidement dans le beurre « Herbe-colza », notamment au début du chauffage et fond à plus basse température. La structure 3L est associée à la forme polymorphique β'_2 , alors que la structure 2L serait plutôt associée aux formes polymorphiques β et β'_1 . En fait, l'augmentation d'épaisseur de la 2L pourrait être due à la fusion de la forme polymorphique β ayant lieu à plus basse température dans le beurre « Industriel » par rapport au beurre « Herbe-colza ». La cinétique de fusion de la 2L est peu différente entre les deux beurres, excepté pour la fin de fusion entre 25 et 37°C où la 2L (42,7 Å) présente dans le beurre « Herbe-colza » semble fondre un peu moins rapidement que la 2L (41,8 Å) dans le beurre « Industriel ». Le comportement cristallographique des triacylglycérols dans les beurres « Industriel » et « Herbe-colza » en

fonction de la température au cours du chauffage peut être résumé dans les diagrammes suivants :

« Industriel » : β'_2 3L (53,4 Å) + (β + β'_1) 2L (40,1-41,8 Å) + liquide₄₋₁₇
 -(17°C)-> β'_2 3L (53,4 Å) + β'_1 2L (41,8 Å) + liquide₁₇₋₂₃
 -(23°C)-> β'_1 2L (41,8 Å) + liquide₂₃₋₃₇
 -(37°C)-> liquide

« Herbe-colza » : β'_2 3L (53,7 Å) + (β + β'_1) 2L (41,0 Å) + liquide₄₋₂₀
 -(20°C)-> (β + β'_1) 2L (41,0-42,7 Å) + liquide₂₀₋₂₇
 -(27°C)-> β'_1 2L (42,7 Å) + liquide₂₇₋₃₇
 -(37°C)-> liquide

4. Caractérisation rhéologique des beurres étudiés

La résistance à l'enfoncement de cubes de beurres, reflétant leur dureté et leur tartinabilité a été caractérisée par pénétrométrie. Pour cela, le travail nécessaire pour écraser les cubes de beurre de 2 cm d'arête stockés à 4°C pendant 45-60 jours sur 10 mm a été déterminé au cours de 10 mesures par beurre. Les valeurs de travail pour l'écrasement sont données dans la **Figure CIV-11**.

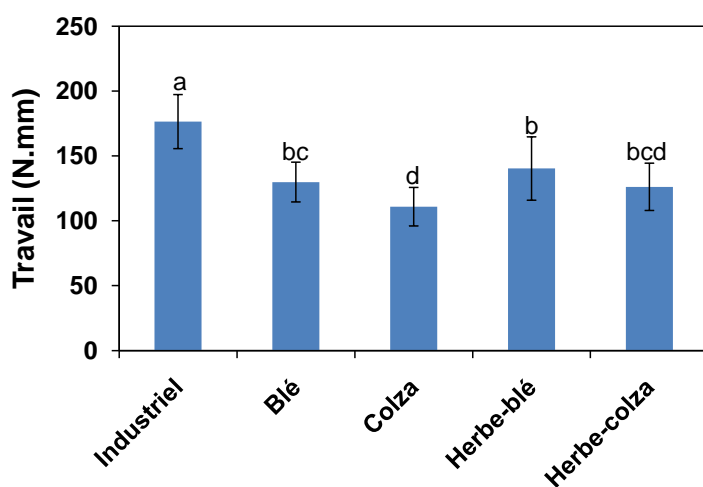


Figure CIV-11 : travail mesuré à 4°C à 10 mm d'enfoncement de cubes de beurres de 2 cm d'arête stockés 45-60 jours à 4°C (moyenne par beurre ± écart-type).

Le beurre « Colza » montre la valeur de travail à 10 mm la plus faible. Le beurre « Industriel » a la valeur la plus forte. Les beurres « Blé », « Herbe-blé » et « Herbe-colza » ne sont pas différents entre eux et se placent à un niveau intermédiaire. Les beurres « Herbe-blé » et « Herbe-colza » montrent des valeurs de travail à 10 mm légèrement supérieures à leurs homologues sans herbe, sans pour autant être significativement différents.

Chapitre IV

Les corrélations entre les teneurs en acides gras contribuant fortement à la variabilité de composition de la matière grasse extraite des beurres et les valeurs de travail pour 10 mm d'enfoncement ont été déterminées et sont données dans le **Tableau CIV-8**.

Tableau CIV-8 : table des corrélations entre les valeurs de travail pour 10 mm d'enfoncement des beurres stockés longtemps à 4°C et les acides gras déterminant la majeure partie de la variabilité de composition entre les beurres.

	C4:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1 <i>t6-9</i>	C18:1 <i>t10</i>	C18:1 <i>t11</i>	C18:1 <i>c9</i>
Travail (N.mm)	-0,223	0,553	0,752	0,873	-0,579	-0,913	-0,805	-0,523	-0,926

Le travail pour l'enfoncement de cubes de beurres sur 10 mm est corrélé positivement à C14:0 et C16:0, et négativement à C18:1 *t6-9*, C18:1 *t10* et C18:1 *c9*. La dureté des beurres est donc plus importante quand la teneur en acides gras saturés à chaînes moyennes et longues est grande et quand les teneurs en acides gras insaturés sont faibles. La dureté pourrait être reliée à la composition en acides gras par l'intermédiaire de la quantité de matière grasse solide à 4°C. Les relations linéaires entre les valeurs de travail pour 10 mm d'enfoncement et les acides gras C16:0, C18:1 *c9*, les acides gras saturés et les acides gras insaturés sont représentées en **Figure CIV-12**.

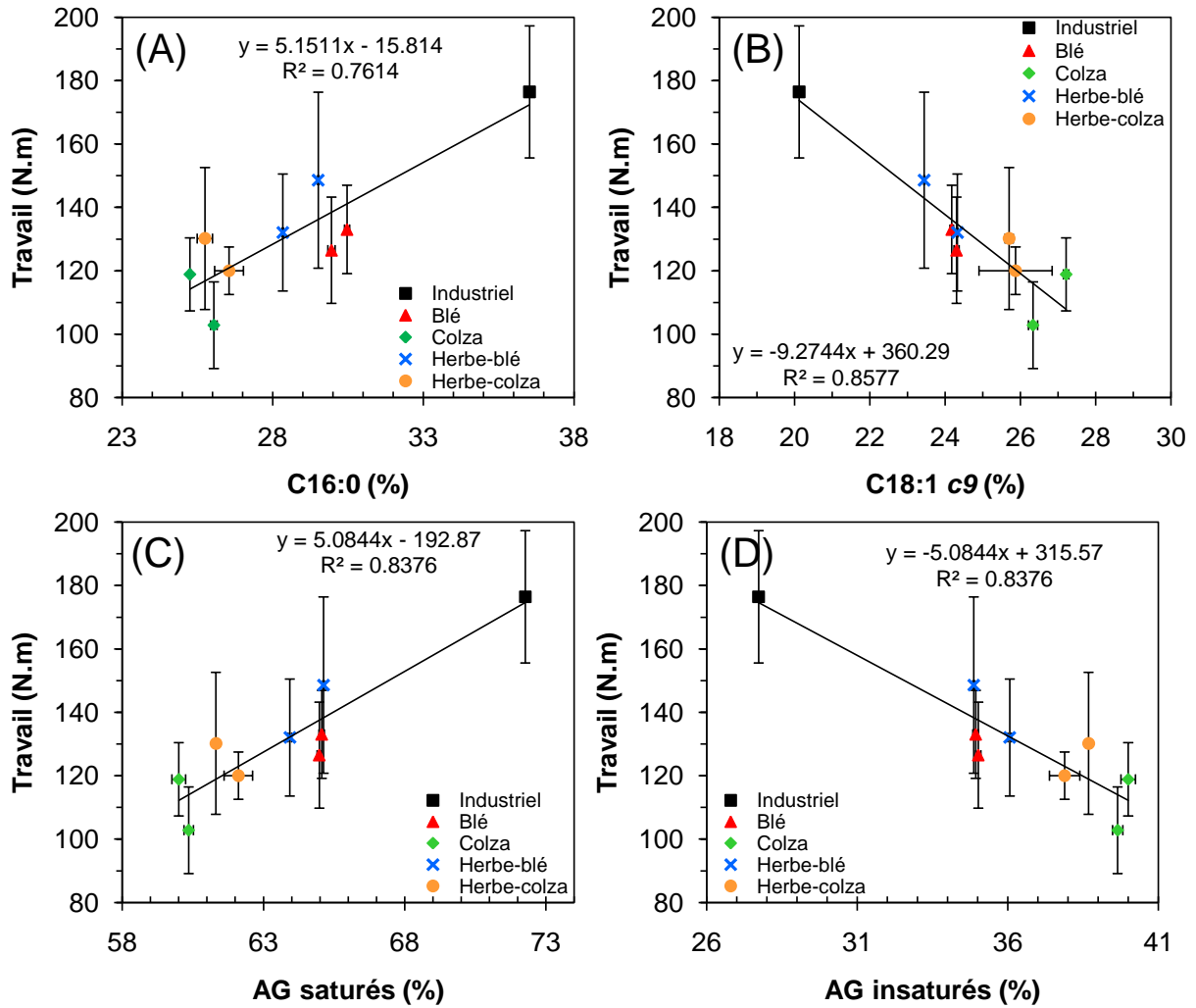


Figure CIV-12 : droites de régression linéaires entre la teneur en C16:0 (A), en C18:1 c9 (B), en acides gras saturés totaux (C) et acides gras insaturés totaux (D) et le travail de la force d'enfoncement à 10 mm pour des cubes de beurre de 2 cm d'arête.

La relation entre la composition en acides gras des beurres et leurs propriétés mécaniques à 4°C a déjà été mise en avant par Couvreur *et al.* (2006) de manière implicite. Ils avaient alors proposé le ratio C16:0 / C18:1 comme indicateur de la dureté d'un beurre, montrant un coefficient de corrélation entre ces deux paramètres de 0,75. Cependant nous avons montré que les teneurs en C16:0 ou en C18:1 c9 seules, voire les taux en acides gras saturés ou insaturés, permettent de prédire la dureté d'un beurre à 4°C avec des coefficients de corrélation encore meilleurs (de l'ordre de 0,76 et 0,86).

B. Fromage type raclette

1. Composition en acides gras des fromages étudiés

La composition en acides gras des matières grasses extraites des 3 fromages étudiés a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse en triple analyse par fromage. Cette composition est détaillée dans le **Tableau CIV-9**.

Tableau CIV-9 : composition en acides gras des fromages par régime (moyenne \pm écart-type). Seuls les acides gras à teneur supérieure à 0,5 % sont représentés. Les résultats par ligne dont les exposants (^a, ^b, ^c) sont différents sont significativement différents au Tukey's Honest Significant Difference test avec un seuil $P < 0,05$.

	Fromage B5	Fromage B6	Fromage B7
C4:0	1,42 \pm 0,10 ^a	1,35 \pm 0,02 ^a	1,29 \pm 0,12 ^a
C6:0	1,29 \pm 0,02 ^c	0,94 \pm 0,01 ^b	0,87 \pm 0,01 ^a
C8:0	1,00 \pm 0,01 ^c	0,62 \pm 0,01 ^b	0,59 \pm 0,01 ^a
C10:0	2,76 \pm 0,01 ^c	1,43 \pm 0,01 ^b	1,36 \pm 0,01 ^a
C12:0	3,99 \pm 0,01 ^c	1,97 \pm 0,01 ^b	1,91 \pm 0,01 ^a
C14:0	14,10 \pm 0,02 ^b	8,94 \pm 0,01 ^a	8,96 \pm 0,06 ^a
C14:1 <i>c9</i>	1,06 \pm 0,01 ^c	0,56 \pm 0,01 ^a	0,62 \pm 0,01 ^b
C15:0	1,33 \pm 0,01 ^c	0,86 \pm 0,01 ^b	0,82 \pm 0,01 ^a
C16:0	39,00 \pm 0,05 ^c	24,14 \pm 0,09 ^b	23,26 \pm 0,19 ^a
C16:1 <i>c9</i>	1,47 \pm 0,05 ^a	0,88 \pm 0,01 ^a	0,69 \pm 0,57 ^a
C17:0	0,51 \pm 0,01 ^c	0,44 \pm 0,01 ^a	0,45 \pm 0,01 ^b
C18:0	8,50 \pm 0,11 ^a	17,11 \pm 0,08 ^c	15,17 \pm 0,04 ^b
C18:1 <i>t6-9</i>	0,58 \pm 0,02 ^a	1,52 \pm 0,04 ^c	1,30 \pm 0,05 ^b
C18:1 <i>t10</i>	0,31 \pm 0,09 ^a	1,32 \pm 0,04 ^b	1,27 \pm 0,05 ^b
C18:1 <i>t11</i>	0,95 \pm 0,09 ^a	2,46 \pm 0,06 ^b	5,20 \pm 0,09 ^c
C18:1 <i>c9</i>	18,98 \pm 0,05 ^a	31,08 \pm 0,07 ^b	31,15 \pm 0,23 ^b
C18:2 <i>t9,12</i>	0,18 \pm 0,01 ^a	0,41 \pm 0,01 ^b	0,89 \pm 0,01 ^c
C18:2 <i>c9,12</i>	1,24 \pm 0,02 ^c	1,12 \pm 0,01 ^b	1,09 \pm 0,01 ^a
C18:3 <i>c9,12,15</i>	0,17 \pm 0,01 ^a	0,18 \pm 0,01 ^b	0,28 \pm 0,01 ^c
C18:2 <i>c9,t11</i>	0,36 \pm 0,03 ^a	1,40 \pm 0,06 ^b	2,09 \pm 0,08 ^c
Σ AG saturés	74,11 \pm 0,09 ^c	58,22 \pm 0,04 ^b	54,77 \pm 0,36 ^a
sat C4-C8	3,71 \pm 0,11 ^b	2,92 \pm 0,02 ^a	2,75 \pm 0,12 ^a
sat C10-C15	22,38 \pm 0,03 ^c	13,30 \pm 0,02 ^b	13,13 \pm 0,08 ^a
sat C16-C20	48,01 \pm 0,07 ^c	41,97 \pm 0,05 ^b	38,89 \pm 0,18 ^a
sat >C22	0,00 \pm 0,00 ^a	0,03 \pm 0,05 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a
Σ AG ins.	25,89 \pm 0,09 ^a	41,78 \pm 0,04 ^b	45,23 \pm 0,36 ^c
Σ monoins.	23,95 \pm 0,06 ^a	38,38 \pm 0,06 ^b	40,82 \pm 0,28 ^c
Σ C18:1 <i>t</i>	1,84 \pm 0,03 ^a	5,30 \pm 0,05 ^b	7,76 \pm 0,06 ^c
Σ polyins.	1,94 \pm 0,06 ^a	3,41 \pm 0,07 ^b	4,41 \pm 0,12 ^c
Σ trans tot	2,39 \pm 0,02 ^a	7,10 \pm 0,10 ^b	10,75 \pm 0,05 ^c

D'une manière générale, la composition en acides gras des 3 fromages est différente. Malgré tout, les fromages B6 et B7 présentent des compositions relativement proches

comparées au fromage issu du régime témoin B5. Les acides gras à courtes chaînes C4:0 à C8:0 montrent une diminution de leur teneur dans les fromages issus des régimes riches en acides gras insaturés B6 et B7. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les fromages B6 et B7 pour leur teneur en acides gras courts C4:0-C8:0. Les acides gras saturés à chaînes moyennes C10:0 à C15:0 présentent des teneurs en acides gras très peu différentes entre les fromages B6 et B7, et même non significativement différentes pour le C14:0, mais largement diminuées par rapport au fromage B5, d'un rapport 0,59 en globalité. Les acides gras saturés à longue chaîne, essentiellement C16:0 et C18:0, présentent des tendances différentes lors de l'enrichissement en acides gras insaturés des régimes utilisés. Le C16:0 montre une teneur diminuée dans les fromages issus des régimes riches en acides gras insaturés par rapport au fromage témoin, d'environ 0,60, alors que le C18:0 est augmenté dans les fromages issus des régimes riches en acides gras insaturés, d'un rapport 1,9 environ. Cette augmentation de la teneur en C18:0 s'explique par les réactions de biohydrogénation des acides gras insaturés provenant du régime alimentaire des vaches dans le rumen (Chilliard *et al.*, 2000 ; Glasser *et al.*, 2008). Les acides gras monoinsaturés voient tous leur teneur augmenter dans les fromages B6 et B7 par rapport au fromage B5, d'un facteur 1,6 pour le C18:1 *c9*, qui est l'acide gras insaturé majoritaire. Le C18:1 *t11*, acide gras monoinsaturé *trans* majoritaire, présente des teneurs bien différentes suivant le fromage considéré. Le fromage témoin B5 montre la teneur la plus basse, le B7 la plus haute (5,5 fois le B5), alors que le B6 est médian (2,6 fois le B5). Les acides gras polyinsaturés montrent également une augmentation de leur concentration dans les fromages issus des régimes riches en acides gras insaturés, avec le C18:2 *c9,t11* qui présente, comme le C18:1 *t11*, une teneur intermédiaire pour le fromage B6, pouvant s'expliquer par le mécanisme de synthèse du C18:2 *c9,t11* à partir du C18:1 *t11* à l'aide de la Δ^9 -désaturase (Corl *et al.*, 2001 ; Lock *et al.*, 2005).

2. Propriétés thermiques des fromages

L'objectif est de caractériser les propriétés thermiques en chauffage des triacylglycérols des fromages de type raclette après un stockage long à 4°C en fonction de leur composition en acides gras, puis de déterminer l'effet de cette composition sur le taux de matière grasse solide à 4°C et au cours du chauffage.

2.1. Caractérisation thermique des fromages au chauffage

Les propriétés thermiques des fromages de type raclette ont été étudiées par MCD au cours d'un chauffage -5°C à 60°C à 2°C/min après stockage de 6-30 jours à 4°C et

refroidissement de 4°C à -5°C à 2°C/min. Bien que trois enregistrements aient été réalisés par fromage et par date, seul un thermogramme représentatif par fromage est présenté en **Figure CIV-13-A**. Un exemple des paramètres extraits des thermogrammes est représenté en **Figure CIV-13-B**. Le signal de MCD avant 4°C correspondant à la mise en régime du calorimètre est tronqué dans la **Figure CIV-13-A**.

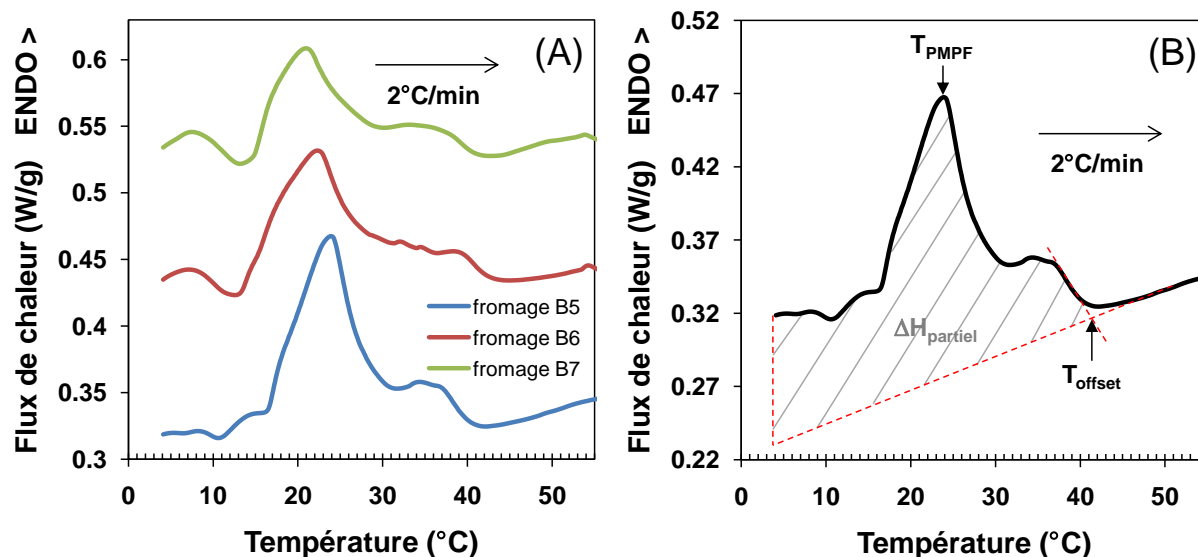


Figure CIV-13 : (A) thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des fromages de type raclette de 4°C à 60°C à 2°C/min après stabilisation pendant 6-30 jours à 4°C. (B) paramètres extraits d'un thermogramme.

Les thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des fromages montrent des signaux endothermiques correspondant à la fusion des triacylglycérols des fromages entre 4°C et 40-43°C. Après 43°C, tous les triacylglycérols sont fondus, ce qui explique l'absence de signal autre qu'une ligne de base enregistrée en MCD. Deux populations de triacylglycérols se séparent : une première population fondant entre 4°C et 30°C et une deuxième population fondant entre 30°C et 43°C. Ces deux populations correspondent aux triacylglycérols des fractions à moyen et haut point de fusion respectivement (Marangoni et Lencki, 1998). Le fromage B5 montre le pic des triacylglycérols à moyen point de fusion le plus intense ; le fromage B7 montre le pic des triacylglycérols à moyen point de fusion le moins intense. Le pic à haut point de fusion présente un signal endothermique qui semble d'intensité équivalente entre les 3 fromages. Le maximum du pic à moyen point de fusion est décalé vers des températures plus faibles dans les fromages B6 et surtout B7 par rapport au fromage témoin B5.

Plusieurs paramètres peuvent être extraits des thermogrammes enregistrés afin de les caractériser. Nous avons choisi d'exploiter 3 paramètres principaux : la température au

maximum du pic à moyen point de fusion T_{PMPF} permettant de caractériser la position de ce pic, la température de fin de fusion T_{offset} , et la variation d'enthalpie partielle de fusion des beurres $\Delta H_{partiel}$ déterminée par intégration entre 4°C et 45°C ou le signal atteint la ligne de base. L'ensemble des paramètres extraits des thermogrammes enregistrés au chauffage des beurres de -5°C à 60°C à 2°C/min est présenté dans le **Tableau CIV-10**.

Tableau CIV-10 : paramètres thermiques extraits des thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des fromages de type raclette de -5°C à 60°C à 2°C/min (moyennes \pm écarts-types par fromage).

Echantillon	$\Delta H_{partiel}$ (J/g MG)	T_{PMPF} (°C)	T_{offset} (°C)
Fromage B5	74,2 \pm 0,9 ^c	23,9 \pm 0,3 ^c	40,5 \pm 0,4 ^a
Fromage B6	49,1 \pm 1,7 ^b	22,5 \pm 0,3 ^b	43,0 \pm 0,3 ^c
Fromage B7	42,3 \pm 3,7 ^a	21,0 \pm 0,1 ^a	41,5 \pm 0,2 ^b

Toutes les valeurs de $\Delta H_{partiel}$ déterminées par fromage entre 4°C et 45°C sont significativement différentes. Le fromage B5 présente la $\Delta H_{partiel}$ la plus élevée, le fromage B7 la plus faible. Comme dans les beurres, les $\Delta H_{partiel}$ sont liés à la proportion en acides gras saturés de la matière grasse des fromages de manière linéaire, bien que seulement 3 régimes soient considérés ici ($R^2 = 0,999$). Les différences de $\Delta H_{partiel}$ pourraient provenir de triacylglycérols différents fondant à partir de 4°C, de structures cristallines ayant des variations d'enthalpies de fusion différentes ou d'une quantité de matière grasse solide à 4°C différente. D'après les thermogrammes en **Figure CIV-13**, le pic à moyen point de fusion contribuerait le plus à la différence de variation d'enthalpie déterminée entre les 3 fromages étudiés. En effet, le pic situé entre 4°C et 30°C, correspondant au triacylglycérols à moyen point de fusion, est plus intense dans le fromage B5 et le moins intense dans le fromage B7. Les triacylglycérols qui constituent ce massif enthalpique i) seraient de composition en acides gras différente entre les fromages, ii) formeraient des structures cristallines différentes, avec des propriétés thermiques différentes, iii) seraient de même composition en acides gras, mais en proportion moindre dans les fromages issus des régimes riches en acides gras.

La T_{PMPF} montre des valeurs significativement différentes entre tous les fromages étudiés. Le fromage B5 a la T_{PMPF} la plus élevée : 1,4-2,9°C supérieure aux fromages issus des régimes enrichis en acides gras insaturés. Le fromage B6 présente une valeur intermédiaire entre les fromages B5 et B7. Comme déjà identifié dans l'ensemble des systèmes laitiers étudiés dans cette thèse, la T_{PMPF} est donc liée à la proportion en acides gras saturés de la matière grasse des fromages. En gardant à l'esprit que dans cet exemple sur les fromages,

Chapitre IV

nous ne considérons que 3 échantillons différents selon leur composition, le coefficient de corrélation linéaire entre la T_{PMPP} et le taux en acides gras saturé est de 0,930.

En ce qui concerne la T_{offset} , le fromage B6 présente la valeur la plus élevée significativement, alors que le fromage B5 présente la plus faible. La T_{offset} n'est pas donc pas reliée directement à la proportion en acides gras saturés de la matière grasse des fromages, mais peut-être avec certains acides gras particuliers. Les acides gras dont la teneur montre le coefficient de corrélation le plus fort avec les valeurs de T_{offset} sont le C18:0 et C18:1 *t6-9*, avec des coefficients de 0,912 et 0,916 respectivement. La T_{offset} pourrait donc être reliée à ces acides gras. Dans les beurres, la T_{offset} montrait le coefficient de corrélation le plus fort avec le C4:0. De plus, la corrélation avec le C18:0 était de -0,64, soit de signe opposé à celle obtenue pour les fromages. Dans les crèmes, la T_{offset} était également corrélée au mieux avec le C18:0, avec un coefficient de corrélation de 0,63. Il est donc possible que dans les beurres et les fromages, trop peu de valeurs soient considérées pour permettre de conclure quant à un ou des acides gras particuliers réellement corrélés à la T_{offset} . Dans tous les cas, le C18:0 semblait être le mieux corrélé avec la T_{offset} dans les crèmes, ce qui est également le cas pour les fromages.

2.2. Détermination du taux de matière grasse solide dans les fromages à 4°C et son évolution au cours du chauffage

La matière grasse des fromages étant partiellement cristallisée à 4°C, nous avons souhaité mettre en évidence son comportement thermique sur l'ensemble de sa plage de fusion à la suite d'une stabilisation des triacylglycérols dans leur forme la plus stable possible. Pour cela, nous avons extrait la matière grasse correspondant aux fromages, l'avons stabilisé à 4°C pendant $t > 72$ h pour cristalliser les triacylglycérols dans leur forme la plus stable à cette température, avant de la refroidir à 2°C/min jusqu'à -50°C pour lui permettre de cristalliser entièrement. Enfin, nous avons étudié les propriétés de fusion de cette matière grasse au cours d'un chauffage de -50°C à 60°C à 2°C/min pour en déduire la variation d'enthalpie totale de fusion, calculée entre -40°C, température estimée de début de fusion des triacylglycérols laitiers (Timms, 1980 ; Lopez *et al.*, 2001c), et 43°C, température à laquelle le signal de MCD revient à la ligne de base (**Figure CIV-14**).

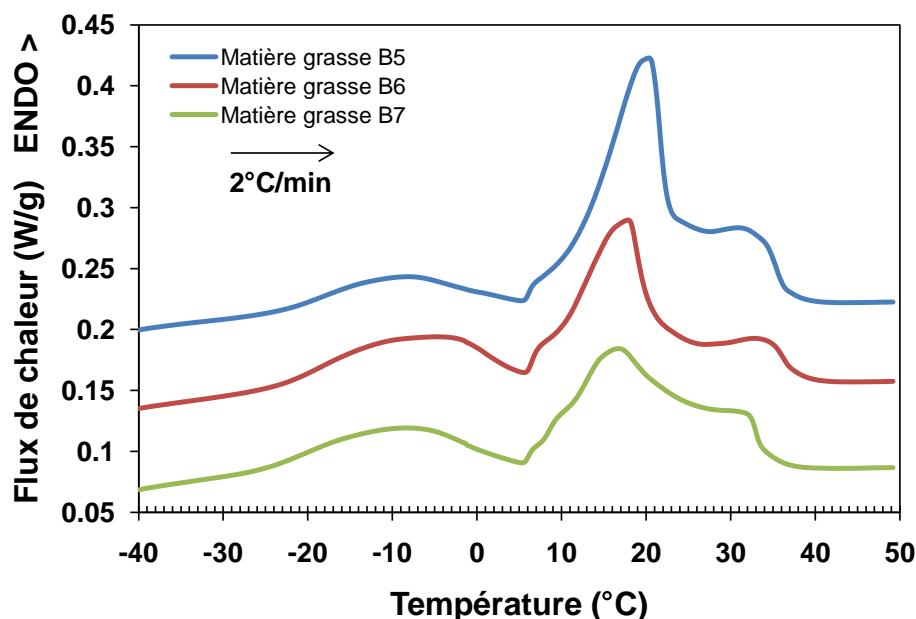


Figure CIV-14 : thermogrammes enregistrés au cours du chauffage des matières grasses extraites des fromages de -50°C à 60°C à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ après stabilisation pendant $t > 72$ h 4°C puis refroidissement de 4°C à -50°C à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Les thermogrammes présentent 3 massifs endothermiques correspondant à la fusion des triacylglycérols à bas, moyen et haut point de fusion (Marangoni et Lencki, 1998). Les triacylglycérols à bas point de fusion fondent à partir de -25°C jusque vers 5°C , qui correspond à la température de stabilisation de la matière grasse avant son refroidissement jusqu'à -50°C . A partir de 5°C environ débute le pic à moyen point de fusion, qui est le plus intense des trois massifs identifiés. Les triacylglycérols à moyen point de fusion fondent jusqu'à $20-22^{\circ}\text{C}$, température estimée à laquelle débute le pic à haut point de fusion.

Le taux de matière grasse solide à 4°C dans les fromages est estimé par calcul selon une méthode adaptée de celle proposée par Lopez *et al.* (2006a), à partir de l'équation 15 définie en plus haut (pour rappel : $\text{SFC}_{4^{\circ}\text{C}} (\%) = \Delta H_{\text{partiel}} / \Delta H_{\text{total}} * 100$).

A l'aide de cette méthode, nous avons pu approcher le taux de matière grasse solide à 4°C dans les fromages stabilisés longtemps à cette température (**Tableau CIV-11**). La valeur de $\text{SFC}_{4^{\circ}\text{C}}$ a ensuite servi à déterminer l'évolution du taux de matière grasse solide en fonction de la température au cours du chauffage de 4°C à 60°C à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Pour cela, la variation d'enthalpie est intégrée de manière cumulative de 4°C à 45°C , prenant la valeur $\text{SFC}_{4^{\circ}\text{C}}$ à 4°C et la valeur 0% à 45°C . De cette manière, il est également possible d'extraire des valeurs estimées des taux de matière grasse solide à des températures intermédiaires à 4°C et 45°C . Nous avons choisi d'extraire les $\text{SFC}_{12^{\circ}\text{C}}$, $\text{SFC}_{20^{\circ}\text{C}}$, $\text{SFC}_{25^{\circ}\text{C}}$ et $\text{SFC}_{30^{\circ}\text{C}}$, qui correspondent aux

températures auxquelles nous avons déjà déterminé le taux de matière grasse solide dans les beurres, auxquelles nous avons ajouté la température 30°C où ne persistent à l'état solide que les triacylglycérols du pic à haut point de fusion. La **Figure CIV-15** présente l'évolution du taux de matière grasse solide en fonction de la température à partir de 4°C dans les fromages et dans les matières grasses correspondantes, déterminé au **Chapitre I**.

Tableau CIV-11 : taux de matière grasse solide dans les fromages à 4°C, 12°C, 20°C, 25°C et 30°C déterminés par MCD.

Echantillon	SFC _{4°C} (%)	SFC _{12°C} (%)	SFC _{20°C} (%)	SFC _{25°C} (%)	SFC _{30°C} (%)
Fromage B5	70,1 ± 1,8 ^c	61,1 ± 3,5 ^c	47,0 ± 3,3 ^c	24,2 ± 1,1 ^c	11,1 ± 1,1 ^c
Fromage B6	51,4 ± 2,1 ^b	44,5 ± 3,2 ^b	30,6 ± 5,8 ^b	15,7 ± 3,5 ^b	8,1 ± 2,6 ^b
Fromage B7	47,7 ± 4,5 ^a	39,5 ± 2,9 ^a	26,8 ± 3,4 ^a	12,6 ± 1,6 ^a	6,1 ± 1,1 ^{ab}

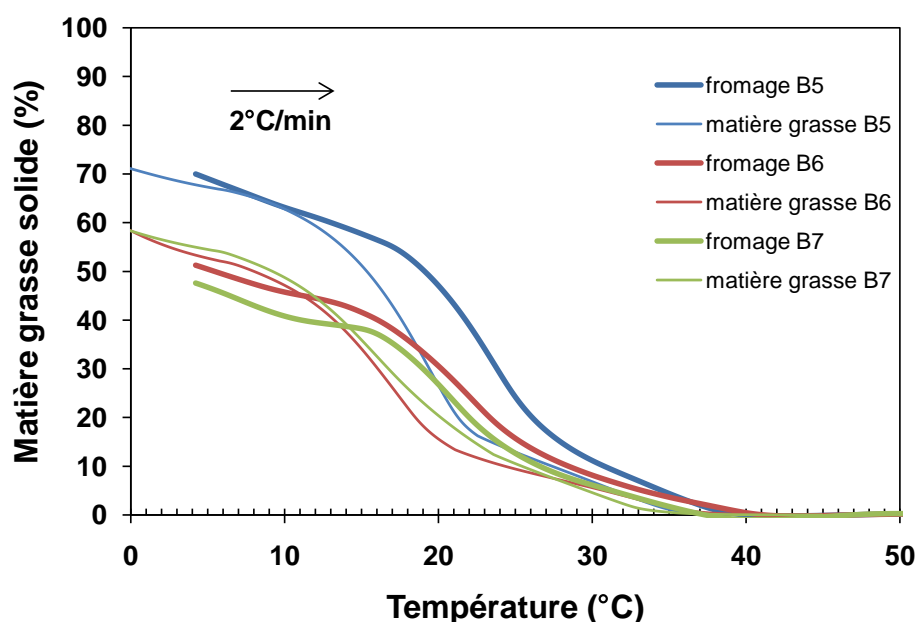


Figure CIV-15 : évolution du taux de matière grasse solide dans les fromages et dans les matières grasses extraites correspondantes en fonction de la température.

Le taux de matière grasse solide dans les fromages diminue sur l'ensemble de la plage de température 4-40°C dans tous les fromages. La diminution présente trois régimes quasi-linéaires : un premier régime de 4°C à 16,5°C où le taux de matière grasse solide diminue lentement à raison d'environ 1%/°C dans tous les fromages, un deuxième régime de 16,5°C à 27°C environ où le taux de matière grasse solide diminue fortement à raison d'environ 4%/°C dans le fromage B5 et environ 3%/°C dans les fromages B6 et B7, et enfin un troisième régime de 27°C à 40°C où le taux de matière grasse solide diminue à nouveau plus lentement à raison d'environ 1%/°C (**Figure CIV-15**). Sur l'ensemble de la plage de

fusion balayée, le taux de matière grasse solide du fromage témoin B5 est clairement supérieur à celui des autres fromages, plus proches en taux de solide (**Tableau CIV-11**). Pour des températures comprises entre 4°C et 30°C, le taux de matière grasse solide dans le fromage B6 est significativement supérieur à celui dans le fromage B7. En revanche, au-dessus de 30°C, les taux de matière grasse solide dans les fromages B6 et B7 ne sont plus significativement différents (**Tableau CIV-11**).

En comparaison avec les fromages, le taux de matière grasse solide déterminé dans les matières grasses anhydres extraites au **Chapitre I** à 4°C est peu différent, avec une valeur significativement supérieure dans la matière grasse témoin B5 par rapport aux matières grasses issues des régimes riches en acides gras insaturés B6 et B7. Par contre, à partir de 10°C environ et jusqu'à la fusion finale, le taux de matière grasse solide déterminé dans les fromages présente des valeurs nettement supérieures à celles obtenues dans les matières grasses anhydres correspondantes. Cela pourrait provenir i) de la correction en variations d'enthalpies effectuée sur le calcul du taux de matière grasse solide dans les matières grasses qui n'a pas pu être appliquée dans les fromages, ou ii) d'une vitesse de transmission de chaleur plus faible dans les fromages par rapport aux matières grasses anhydres, due à la présence de la phase continue protéique dans les fromages qui induirait un retard artificiel de la fusion de la matière grasse.

Le pic à moyen point de fusion des fromages est donc très affecté par la modification de composition en acides gras de ces fromages. Nous pouvons nous interroger sur les types de cristaux de triacylglycérols qui sont présents à 4°C dans ces fromages qui permettraient d'expliquer les différences de variation d'enthalpie et de quantité de matière grasse solide à cette température, ainsi que les types de cristaux qui fondent au cours d'un chauffage après stabilisation longtemps à 4°C.

3. Caractérisation cristallographique des fromages

3.1. Identification des structures cristallines formées par les triacylglycérols dans les fromages à 4°C après 14-21 jours de stockage à 4°C

Dans le but d'identifier les structures cristallines des variétés stabilisées longtemps à 4°C, 10 diagrammes de diffraction des rayons X aux petits et grands angles ont été enregistrés sur les fromages pendant 2 minutes chacun après 14-21 jours de stockage à 4°C. Les 10 diagrammes enregistrés par fromages ont été sommés et lissés afin d'améliorer le rapport signal sur bruit et sont représentés en **Figure CIV-16**.

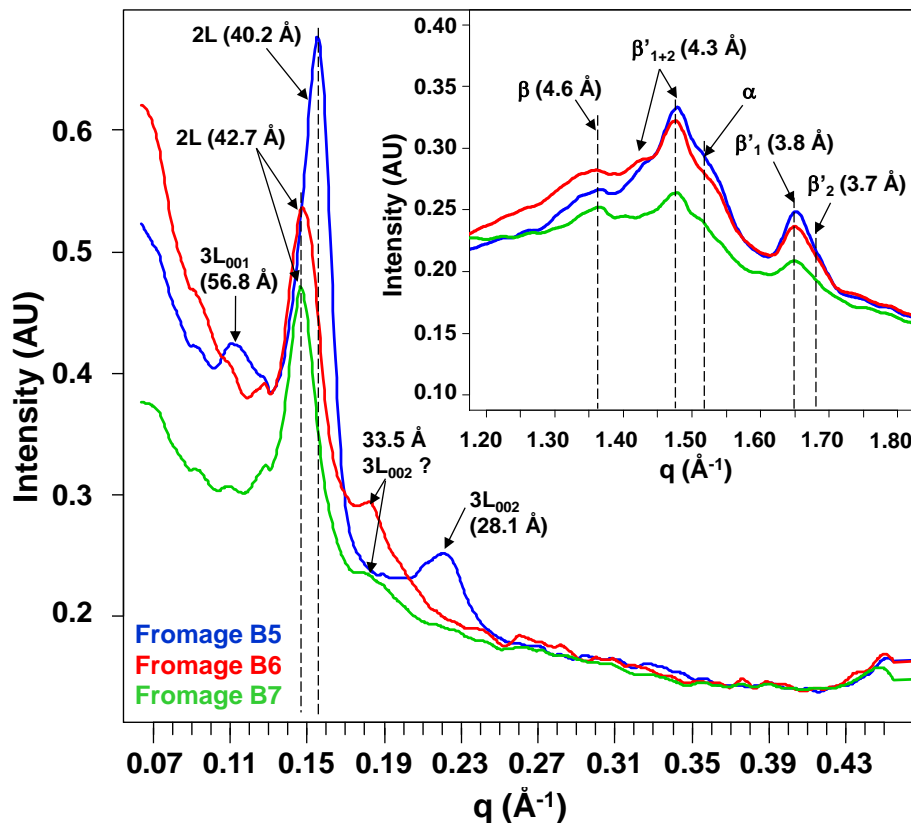


Figure CIV-16 : diagrammes de DRX lissés enregistrés pendant un équivalent de 20 minutes aux petits (**figure principale**) et grands angles (**insert**) à 4°C dans les fromages après 14-21 jours de stockage à 4°C. Les structures cristallines identifiées sont annotées sur la figure (3L = 3 longueurs de chaînes, 2L = 2 longueurs de chaînes).

Dans le fromage témoin B5, la coexistence de structures longitudinales 2L (40,2 \AA), caractérisée par son pic de diffraction du premier ordre très intense vers $0,156 \text{\AA}^{-1}$ et 3L (56,8 \AA), caractérisée par ses deux premiers pics ordres de diffraction vers $0,111$ et $0,224 \text{\AA}^{-1}$, a été identifiée. La structure 2L (40,2 \AA) est la structure majoritaire compte tenu des intensités relatives des pics de diffractions associés à la 2L et à la 3L. Dans les fromages issus des régimes riches en acides gras insaturés B6 et B7, une structure 2L de plus grande épaisseur (42,7 \AA) est identifiée aux petits angles. Une structure 3L d'environ 66 \AA d'épaisseur pourrait également être présente dans ces deux fromages, compte tenu du pic de diffraction vers $0,188 \text{\AA}^{-1}$ pouvant être assimilé à un ordre 00_2 . Ce pic étant cependant très peu intense, nous considérerons qu'il n'existe pas de 3L dans ces échantillons. La différence d'épaisseur de la structure 2L est due à une différence de longueur de chaîne des acides gras des triacylglycérols qui forment cette structure, comme nous l'avons déjà discuté à plusieurs reprises. Aux grands angles de diffraction, des formes polymorphiques α , β , β'_1 et β'_2 ont été identifiées dans tous les échantillons.

Dans ces fromages, les structures cristallines formées à 4°C par les triacylglycérols sont donc très proches de celles formées dans les globules gras natifs issus des régimes correspondant. Afin d'associer les structures longitudinales identifiées aux petits angles de diffraction avec les structures transversales identifiées aux grands angles de diffraction, un chauffage est effectué, ayant pour vocation de fondre les cristaux séquentiellement par ordre de stabilité à la température croissante.

3.2. Identification des structures cristallines formées par les triacylglycérols dans les fromages au cours du chauffage de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après 14 jours de stockage à 4°C

Nous avons réalisé des enregistrements de DRXT couplés à la MCD à raison d'un enregistrement par degré au cours du chauffage à 0,5°C/min des fromages B5 (**Figure CIV-17**) et B7 (**Figure CIV-18**). Les fromages B6 et B7 ayant des profils cristallographiques à 4°C très similaires, nous n'avons pas effectué de chauffage du fromage B6 en DRXT-MCD. Les diagrammes de DRXT représentés dans les **Figure CIV-17** et **Figure CIV-18** ont été lissés ensemble selon la méthode détaillée dans la partie **Matériels et méthodes**.

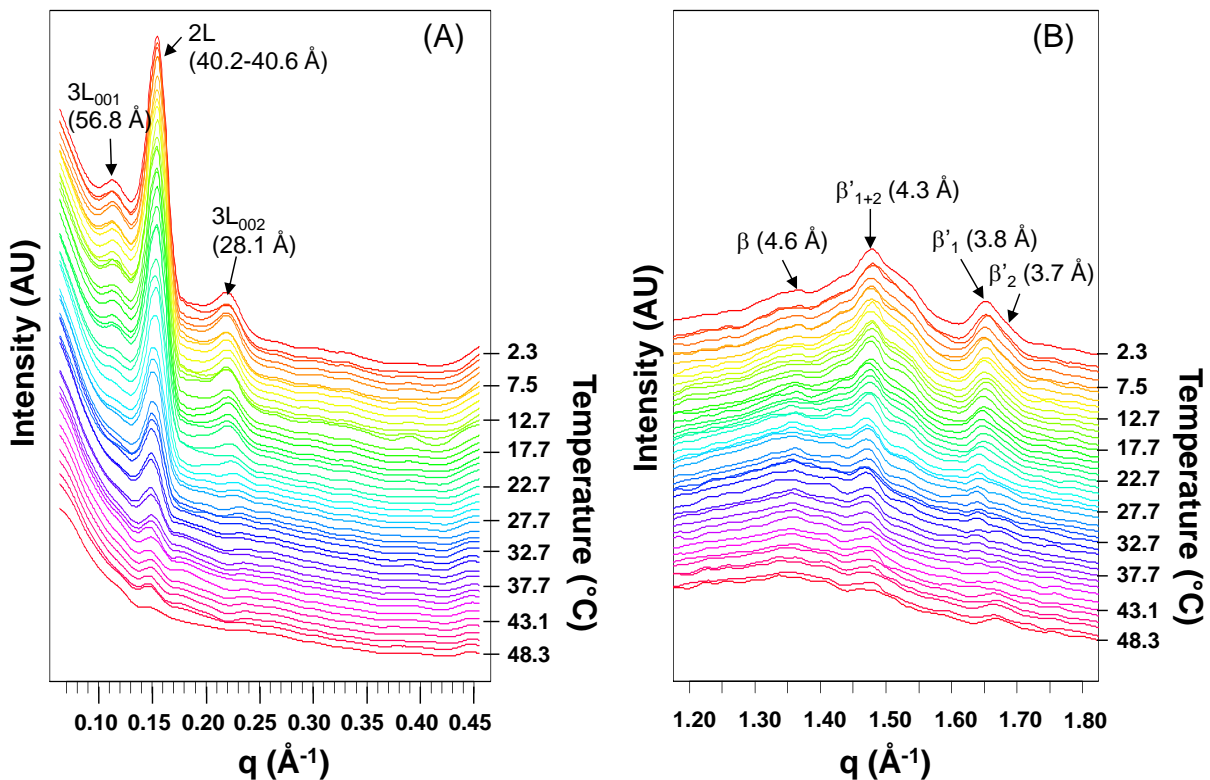


Figure CIV-17 : diagrammes de DRX enregistrés aux petits (A) et grands angles (B) au cours du chauffage du fromage témoin B5 de 4°C à 60°C après 14 jours de stockage à 4°C. Les structures cristallines identifiées sont annotées sur la figure (3L = 3 longueurs de chaînes, 2L = 2 longueurs de chaînes).

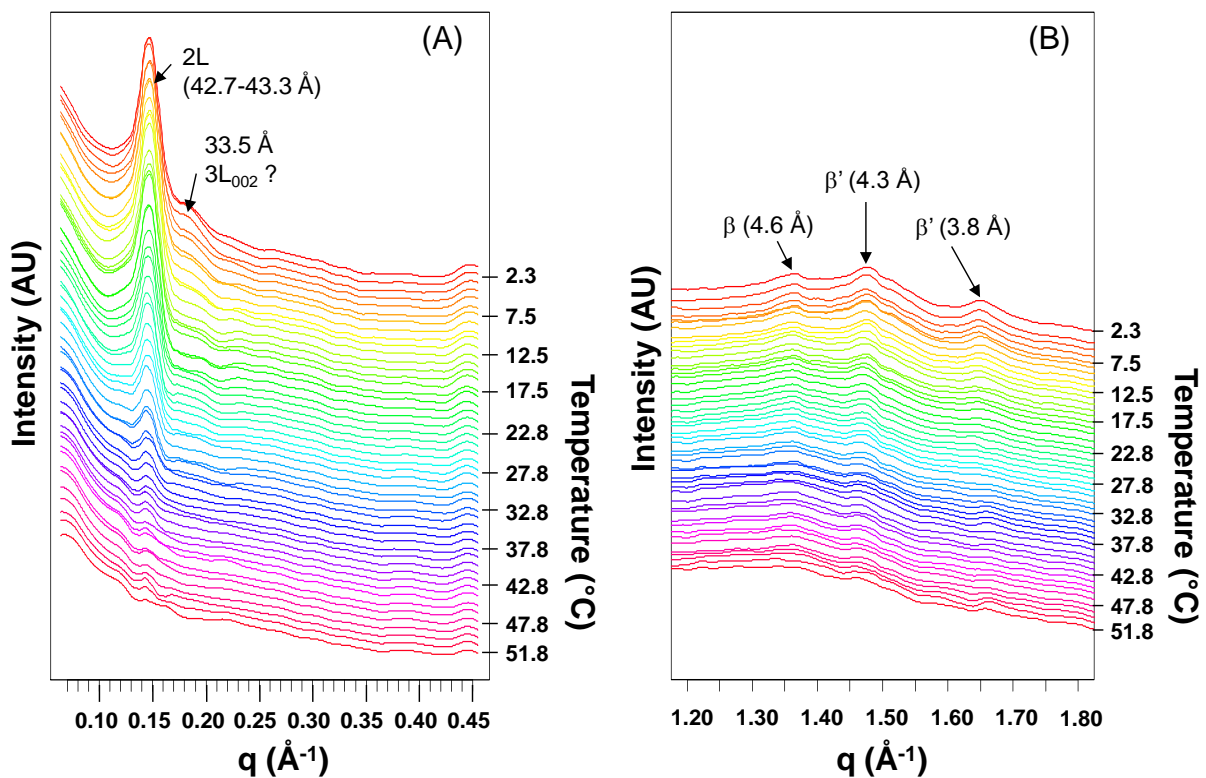


Figure CIV-18 : diagrammes de DRX enregistrés aux petits (A) et grands angles (B) au cours du chauffage du fromage enrichi en acides gras insaturé B7 de 4°C à 60°C après 14 jours de stockage à 4°C. Les structures cristallines identifiées sont annotées sur la figure (3L = 3 longueurs de chaînes, 2L = 2 longueurs de chaînes).

L'identification des structures cristallines au cours du chauffage du fromage B5 montre la fusion finale de la 3L vers 27°C (**Figure CIV-17**). La structure 2L fond totalement à plus haute température, vers 40°C, correspondant à la température de fusion finale de la matière grasse déterminée par MCD. Pour le fromage B7, seule une structure 2L existe, qui fond tout au long du chauffage jusqu'à 41°C environ. Aux grands angles, la faible intensité des pics de diffraction associés aux différentes formes polymorphiques rend la détermination des plages de fusion de ces différentes structures difficile. Néanmoins, les structures β'_1 pour B5 et β' pour B7 fondent en dernier, à la température de fusion finale de la matière grasse. L'absence de structure 3L dans le fromage B7, associée à l'absence de structure β'_2 nous pousse à associer ces deux structures dans le fromage B5. En revanche, la température de fusion de la structure β est difficile à déterminer, mais cette structure serait associée à une forme 2L aux petits angles.

L'intensité et la position en vecteur de diffusion q de chaque pic de diffraction identifié aux petits angles de diffraction ont été déterminées à l'aide d'une procédure écrite au

laboratoire pour le logiciel R et sont tracées en fonction de la température dans la **Figure CIV-19**. Ainsi, il est possible de délimiter des zones sur les thermogrammes de MCD couplée où sont indiquées les structures qui fondent en fonction de la température (**Figure CIV-19-C** et **D**).

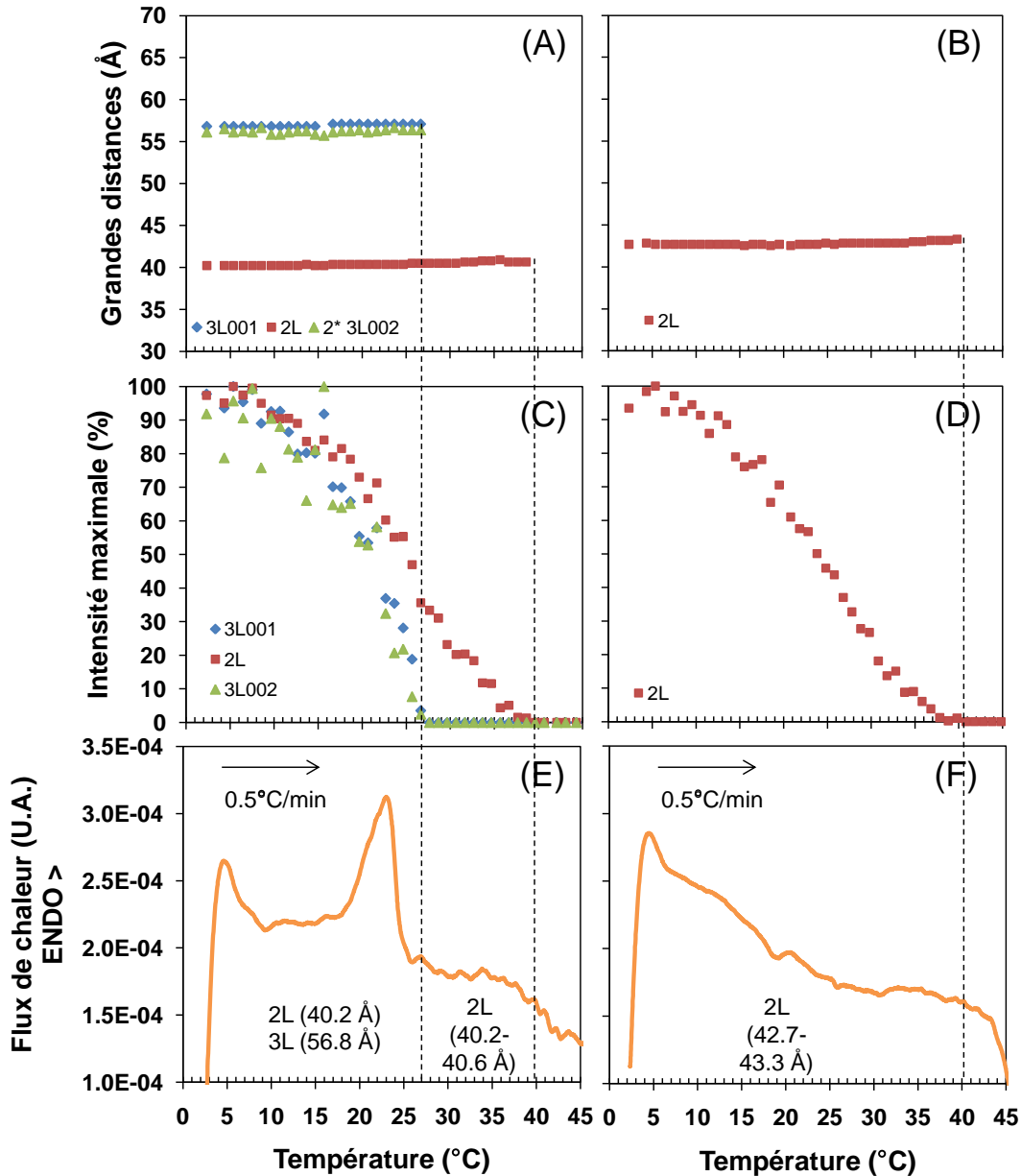


Figure CIV-19 : évolution des épaisseurs des structures longitudinales identifiées au chauffage des fromages témoin B5 (A) et enrichi en acides gras insaturés B7 (B). Evolution de l'intensité maximale des pics de DRX enregistrés au chauffage des fromages témoin B5 (C) et enrichi en acides gras insaturés B7 (D) en fonction de la température. Thermogrammes de MCD enregistrés en chauffage des fromages témoin B5 (E) et enrichi en acides gras insaturés B7 (F) de 4°C à 60°C.

Dans les deux fromages étudiés, l'épaisseur des structures longitudinales identifiées ne change quasiment pas au cours du chauffage. La 3L (56,8 Å) n'évolue pas en épaisseur

dans le fromage B5 et les structures 2L n'augmentent que très légèrement en épaisseur : de 40,2 à 40,6 Å pour le fromage B5 et de 42,7 à 43,3 Å pour le fromage B7. Cette augmentation pourrait être due à la fusion des triacylglycérols les plus courts en premier, comme suggéré par Lavigne (1995), ou à la fusion de β 2L en premier.

Au cours du début de la fusion lorsque la structure 3L est encore présente dans le fromage B5, la structure 2L fond également car l'intensité de son premier ordre de diffraction diminue lorsque la température augmente (**Figure CIV-19-C**). Pour le fromage B5, le pic à moyen point de fusion enregistré en MCD entre 4°C et 27°C correspond donc à la fusion des cristaux 2L (40,2 Å) et 3L (56,8 Å). Dans le fromage B5, la structure 3L (56,8 Å) fond relativement lentement de 4°C à 18°C, avec une vitesse de diminution des pics de diffraction d'environ 2%/°C, puis sa vitesse de fusion augmente jusqu'à 27°C, caractérisée par une vitesse de diminution des pics de diffraction d'environ 8%/°C. La plage de température 18-27°C, où la structure 3L fond le plus vite correspond également à la plage de température durant laquelle le pic à moyen point de fusion enregistré en MCD est le plus intense (**Figure CIV-19-E**). La structure 2L (40,2-40,6 Å) fond quasi-linéairement sur l'ensemble de sa plage de fusion, c'est-à-dire de 4°C à 40°C. Entre 27°C et 40°C, gamme de température du pic à haut point de fusion seule la structure 2L (40,2-40,6 Å) persiste. Dans le fromage B7, seule une structure cristalline longitudinale 2L (42,7-43,3 Å) existe dans la plage de température balayée. Cette structure fond de manière quasi-linéaire au cours du chauffage.

IV. DISCUSSION :

Les mesures rhéologiques sur les beurres ont montré que la dureté était fortement corrélée à certains acides gras : la teneur en C16:0 est un indicateur du caractère dur, alors que la teneur en C18:1 *c9* est indicateur du caractère tendre. Le rapport de concentration entre ces deux acides gras a déjà été mis en évidence par Couvreur *et al.* (2006) comme pouvant expliquer les propriétés rhéologiques de beurres produits à partir de régimes à proportion en herbe fraîche contrôlée. D'une manière générale, une diminution de dureté des beurres s'accompagne alors également d'une diminution de l'indice d'athérogénicité (Bobe *et al.*, 2003), les deux étant reliés par la composition en acides gras du beurre. La dureté du beurre est liée à la quantité de matière grasse solide (Bayourthe *et al.*, 1999), expliquées par le rapport C16:0 / C18:1 *c9*, indicateur de la proportion d'acides gras saturés / acides gras insaturés.

Chapitre IV

Dans les produits transformés étudiés, nous avons identifié que la teneur globale en acides gras insaturés est corrélée à la variation d'enthalpie de fusion de la matière grasse de ces produits depuis 4°C. Les acides gras majeurs C16:0 et C18:1 *c9* montrent également des corrélations fortes avec le taux de matière grasse solide pour des températures comprises entre 4°C et la fusion finale de la matière grasse dans les produits. Shukla et Rizvi (1995) montrent que la dureté et la tartinabilité des beurres est principalement expliquée par le taux de matière grasse solide en fonction de la température. De plus, Rousseau et Marangoni (1999) ont montré que des tests empiriques permettaient de rendre compte de ces propriétés sensorielles et fonctionnelles. Ainsi, les propriétés de dureté et tartinabilité des beurres peuvent être approchées par la mesure du taux de matière grasse solide (Wright *et al.*, 2001). Plusieurs auteurs ont donc déterminé le taux de matière grasse solide dans des beurres ou des matières grasses extraites de beurres à des températures proches de 4°C. Bayourthe *et al.* (2000) présente des valeurs de taux de matière grasse solide gras à 6°C comprises entre 73 et 76% dans des beurres de composition classique en acides gras. Ces valeurs, déterminées sur la base d'une mesure en MCD, sont supérieures à celles obtenues pour le beurre témoin de notre étude à 4°C : 62,2%. Cependant, dans leur étude Bayourthe *et al.* (2000) refroidissent les beurres en MCD depuis 70°C à 5°C jusqu'à -50°C avant de les réchauffer pour déterminer le taux de matière grasse solide en fonction de la température. Avec cette méthode, il est certain que les structures cristallines formées par les triacylglycérols au cours du refroidissement sont instables et se réorganisent au cours du chauffage, comme montré par Lopez *et al.*, (2005a). Ainsi, la variation d'enthalpie déterminée au cours du chauffage dépend de la quantité de matière grasse solide qui fond, et des réorganisations cristallines. Cela pourrait expliquer la différence de taux de matière grasse solide à 4-6°C entre notre résultat et ceux obtenus par Bayourthe *et al.* (2000), malgré le fait que leurs beurres témoins et notre beurre « Industriel » ont une composition en acides gras peu différente. Dans cette étude, ils montrent cependant que l'enrichissement en acides gras insaturés des beurres conduit à une diminution linéaire de la quantité de matière grasse solide à 6°C comme nous l'avons également montré.

Plusieurs auteurs utilisent la matière grasse extraite des beurres pour rendre compte du taux de matière grasse solide de ces produits en fonction de la température, en général pour s'affranchir du signal propre à l'eau contenue dans les beurres qui peut gêner la mesure du taux de matière grasse solide dans certains cas. Ainsi, Smet *et al.* (2010) montrent par RMN qu'une matière grasse témoin contient environ 60% de matière grasse solide à 5°C, ce qui est en accord avec notre résultat sur le beurre « Industriel ». En revanche, les résultats de Couvreur *et al.* (2006), Chouinard *et al.* (1998) et Lopez et Briard-Bion (2007), montrent des

Chapitre IV

valeurs plus élevées, de l'ordre de 80-85% entre 0 et 4°C. Dans ces études, la détermination du taux de matière grasse solide est réalisée par MCD selon une méthode proche de celle utilisée par Bayourthe *et al.* (2000), pouvant expliquer la différence obtenue avec nos valeurs. Dans tous les cas, l'enrichissement en acides gras insaturés conduit à une diminution du taux de matière grasse solide à la température de réfrigération des produits laitiers, jusqu'à 47% environ selon Smet *et al.* (2010), ce qui semble en accord avec la valeur d'environ 50% obtenue dans notre étude pour le beurre « Colza », dont la teneur en acides gras insaturés est très proche de celle de la matière grasse enrichie en acides gras insaturés de l'étude de Smet *et al.* (2010).

Dans les fromages de type raclette, nous avons déterminé un taux de matière grasse à 4°C d'environ 70% pour le fromage témoin B5. Cette valeur est en accord avec les valeurs de taux de matière grasse solide dans des fromages de type Emmental (Lopez *et al.*, 2008b). Dans ces produits également, nous avons montré que l'enrichissement en acides gras insaturés diminuait le taux de matière grasse solide à 4°C, jusqu'à des valeurs de moins de 50%, comme identifié par Smet *et al.* (2010) dans les matières grasses anhydres.

Dans les conditions de stockage étudiées dans ce chapitre, nous avons identifié une structure cristalline longitudinale majoritaire à 2 longueurs de chaînes dans les produits transformés étudiés, dont l'épaisseur dépend de la composition en acides gras des produits : plus il y a d'acides gras saturés à longues chaînes, plus cette structure est de grande épaisseur. Cette structure 2L pourrait être constituée en réalité d'au moins 2 types de cristaux 2L, avec des formes polymorphiques β et β' . Nous avons identifié en coexistence avec ces cristaux 2L, une structure β' 3L relativement peu épaisse, de l'ordre de 53-55 Å, en proportion plus faible. La proportion de cette structure semble d'autant plus faible que la teneur en acides gras insaturés est importante. Lopez *et al.* (2008b) a identifié des structures cristallines longitudinales similaires dans des fromages de type Emmental, et une coexistence de β , β'_1 , β'_2 et α en termes de structures transversales, tout comme pour notre fromage témoin B5. En revanche, les produits enrichis en acides gras insaturés, notamment les fromages B6 et B7 qui présentent des taux en acides gras insaturés jusqu'à 45%, montrent une diminution, voire une absence de structure cristalline longitudinale 3L.

Les structures β' 3L présentes à 4°C dans tous les beurres et le fromage témoin B5 montrent des épaisseurs peu différentes. Connaissant la droite de régression donnant l'épaisseur mesurée par DRX d'une structure β' 2L d pour un triacylglycérol trisaturé

Chapitre IV

monoacide en fonction du nombre de carbone des acides gras n (Small, 1986 ; Ollivon, 1992) : $d = 2,32n + 4,43$, nous avons essayé de déterminer le type d'acides gras qui pourraient être impliqués dans les structures β' 3L identifiées dans ces échantillons. L'équation donnant d en fonction de n pour un triacylglycérol trisaturé monoacide hypothétique qui donnerait une structure β' 3L pourrait donc être : $d = 3/2*2,32n + 2*4,43$, la valeur 4,43 étant reliée au glycérol alors que la valeur 2,32 est reliée à la chaîne hydrocarbonée. Ce calcul conduit à une longueur de chaîne moyenne des acides gras impliqués dans ces β' 3L de 12,7-13,3 carbones. Ces structures β' 3L fondent dans le pic à moyen point de fusion, elles sont donc constituées de triacylglycérols associés à ce pic, c'est-à-dire comprenant un acide gras court ou insaturé et deux acides gras saturés à longue chaîne (Lavigne, 1995). Compte tenu de la composition en acides gras des échantillons étudiés et de la longueur moyenne des acides gras des triacylglycérols formant ces structures β' 3L sur la base des observations de DRX, cela semblerait réaliste d'imaginer que ces β' 3L sont constituées de triacylglycérols contenant un acide gras court.

Les structures majoritaires 2L identifiées à 4°C dans tous les produits étudiés combinent en réalité au moins deux structures 2L, de formes polymorphiques β et β' . Nous avons identifié que l'épaisseur de ces structures dépend de la composition en acides gras des produits. Cependant, il est difficile, compte tenu de la multiplicité de formes polymorphiques associées à ces structures longitudinales, d'évaluer le nombre de carbone moyen des acides gras des triacylglycérols pouvant composer ces structures. Néanmoins, nous avons identifié dans tous les produits, que la dernière structure à fondre lors d'un chauffage de 4°C à 60°C est une structure β' 2L, dont l'épaisseur varie entre 40,6 Å et 43,3 Å suivant la composition en acides gras des produits étudiés. Nous pouvons essayer de déterminer la longueur moyenne des acides gras qui composent les triacylglycérols impliqués dans ces structures β' 2L en fin de fusion à l'aide de l'équation définie par Small (1986) : $d = 2,32n + 4,43$. Selon cette équation, les acides gras des triacylglycérols qui forment la β' 2L identifiée en fin de chauffage auraient une longueur moyenne de 15,6 à 16,8 carbones. Ces triacylglycérols seraient donc plutôt composés d'acides gras à moyenne et longues chaînes, saturés d'après Lavigne (1995) compte tenu de leur point de fusion. Ainsi, il est possible de modéliser les types de triacylglycérols impliqués dans les structures cristallines identifiées par DRX dans les produits après un stockage long à 4°C (**Figure CIV-20**).

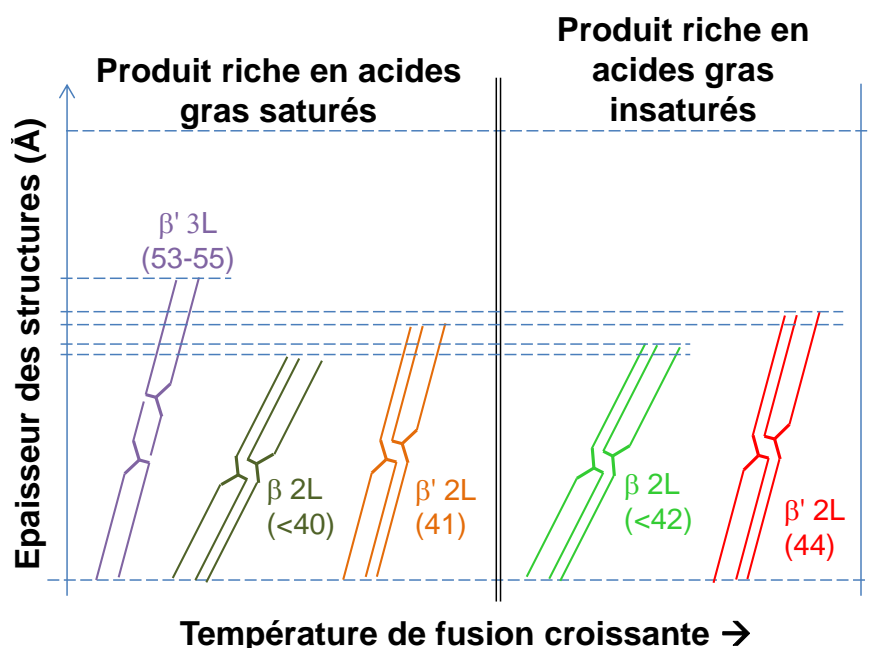


Figure CIV-20 : représentation schématique des types de triacylglycérols formant les structures cristallines observées à 4°C dans les produits transformés après un stockage long à 4°C.

V. CONCLUSION :

Dans ce quatrième chapitre, nous avons montré qu'il était possible de fabriquer des produits transformés riches en matière grasse (30 à 80%) fabriqués à partir de laits issus de régimes riches en acides gras insaturés. Le taux en acides gras insaturés de ces produits pouvait atteindre raisonnablement 40% avec des contraintes de production réalistes et réalisables.

En termes de résultats, nous avons montré que les triacylglycérols des beurres et des fromages étudiés avaient des propriétés de cristallisation bien différentes selon leur composition en acides gras. En particulier, les beurres et raclettes enrichis en acides gras insaturés montraient moins de cristaux de type 3L à la température habituelle de stockage que les mêmes produits transformés mais de composition classique. Cette différence d'état cristallin à 4°C pourrait provenir d'une plus faible quantité de matière grasse cristallisée à cette température, qui expliquerait également une dureté plus faible des beurres enrichis en acides gras insaturés pouvant atteindre 70% par rapport aux beurres classiques. Là encore, les acides gras estérifiés sur les triacylglycérols seraient responsables de ces différences de propriétés physiques dans les produits transformés. Cependant, à plus haute température, les différences de propriétés physiques ont tendance à se réduire si bien que la température de fusion finale de la matière grasse dans les produits transformés étudiés n'était quasiment pas

Chapitre IV

modifiée. Sur la plage de fusion étudiée au cours du chauffage des produits (de 4°C à 60°C), 2 événements endothermiques ont pu être enregistrés, dont l'amplitude du premier semblait très reliée au taux en acide gras saturés / insaturés. Cet endotherme est lié à la fusion des cristaux 3L et pourrait en fin de compte être un indicateur du type de régime alimentaire donné aux vaches.

Les propriétés physiques étudiées sur les beurres et les fromages dans ce chapitre pourraient au final présager de fonctionnalités affectées par les modifications de composition en acides gras que nous avons choisi d'étudier. Cela pourrait être confirmé par des tests d'évaluation sensoriels de produits de composition témoin et enrichis en acides gras insaturés sur des panels de consommateurs entraînés ou encore par des tests culinaires.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Conclusion générale

Le travail réalisé lors de cette thèse a permis de mieux comprendre les propriétés de cristallisation de triacylglycérols complexes en mélange tel qu'ils existent dans la matière grasse laitière. Pour cela, nous avons utilisé une approche systémique mettant en comparaison des échantillons issus de régimes témoins offerts aux vaches et des échantillons issus de régimes riches en acides gras insaturés pour enrichir la matière grasse laitière en acides gras insaturés. Ces échantillons ont ensuite été caractérisés par des techniques physiques dans le but de déterminer les propriétés de cristallisation des triacylglycérols dans différentes matrices (anhydres, émulsions modèles ou réelles, produits transformés complexes) et sous différentes conditions de passé thermique. Le schéma en **Figure C-1** dresse une synthèse des différents résultats obtenus lors de cette thèse. Brièvement, cette thèse a permis essentiellement i) d'approfondir les connaissances sur le rôle de la composition en acides gras sur les propriétés de cristallisation de triacylglycérols complexes en mélange, ii) des avancées sur l'approche multi-échelles de la cristallisation et iii) d'évaluer l'impact de l'alimentation des animaux sur les propriétés physiques de la matière grasse laitière.

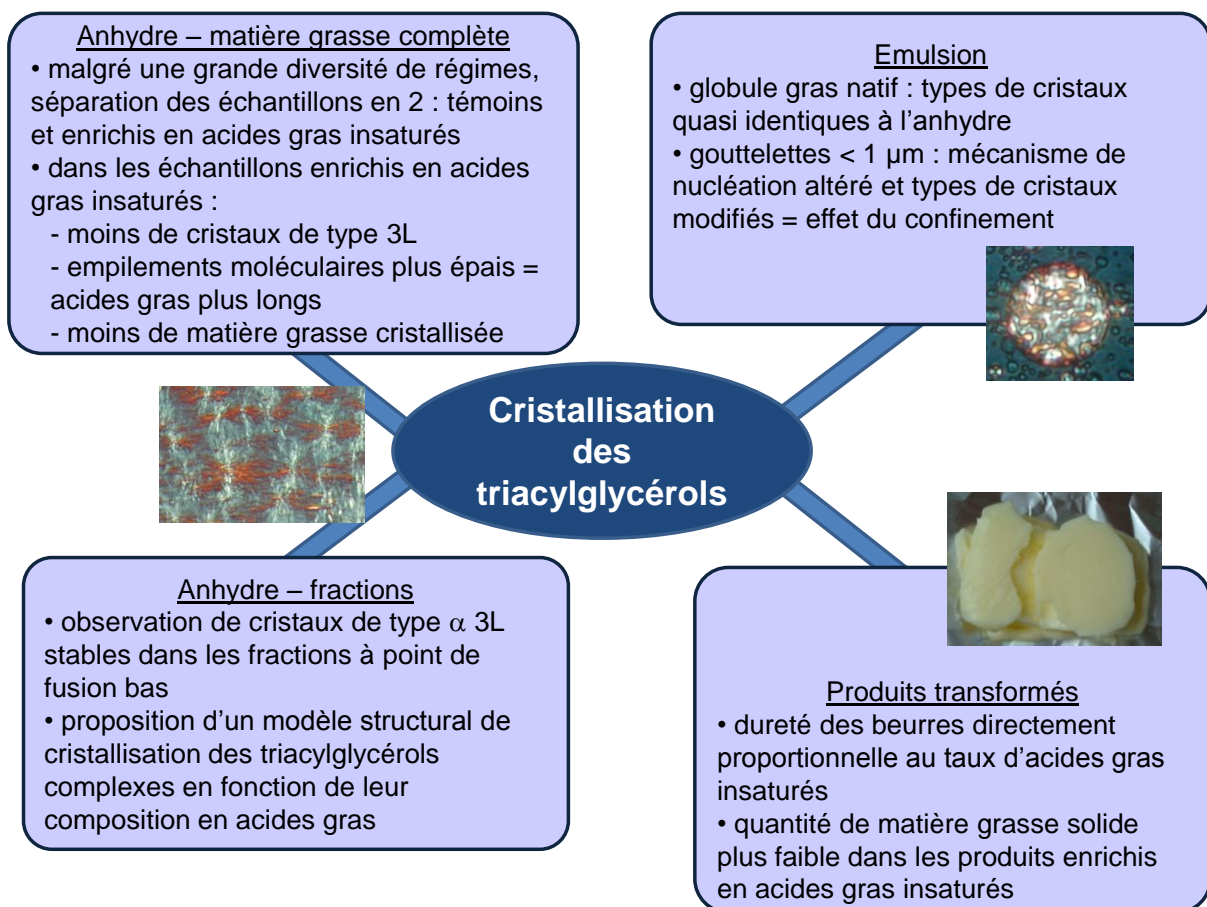


Figure C-1 : principales avancées de la thèse.

Conclusion générale

Nous avons mis en évidence le rôle des acides gras insaturés sur le comportement de cristallisation des triacylglycérols laitiers à l'échelle moléculaire, microscopique et même macroscopique, la finalité de ces travaux étant d'expliquer les propriétés fonctionnelles des produits par les propriétés physiques.

De manière synthétique, ce travail a permis d'acquérir des connaissances sur le mécanisme de cristallisation et le polymorphisme des triacylglycérols laitiers en fonction de leur composition en acides gras sous forme anhydre et en émulsion. Nous avons montré que pour des gouttelettes de taille supérieure au micromètre, le comportement de cristallisation et de fusion de ces triacylglycérols est sensiblement le même qu'en milieu anhydre. Pour des gouttelettes d'émulsion de taille inférieure au micromètre, le mécanisme de cristallisation des triacylglycérols est altéré et est probablement régi par le confinement de la matière grasse dans les gouttelettes. Ce confinement induit une surfusion plus importante bien sûr, mais également un mécanisme de nucléation probablement homogène au coeur des gouttelettes et des structures cristallines différentes de celles observées en milieu anhydre ou en émulsion de plus grande taille. Des expérimentations complémentaires de calorimétrie en cinétique de refroidissement sur des émulsions à taille variable permettraient d'approfondir les connaissances sur l'effet de la taille des gouttelettes sur le mécanisme de cristallisation de triacylglycérols complexes en émulsion.

La comparaison systématique des phénomènes de « cristallisation – fusion » observés pour des triacylglycérols laitiers de composition classique en acides gras par rapport aux triacylglycérols enrichis en acides gras insaturés obtenus dans ce travail, nous a également permis de préciser le rôle de ces acides gras insaturés sur la cristallisation des triacylglycérols. Nous avons observé qu'un enrichissement en acides gras insaturés de 30% à 50% avait tendance à réduire le taux de matière grasse cristallisée en fonction de la température sur l'ensemble de la plage de fusion des triacylglycérols laitiers. Cette réduction pouvait atteindre jusqu'à 20% dans la plage 0-20°C, ce qui peut constituer un réel intérêt pour améliorer la fonctionnalité. A un niveau d'échelle inférieur (échelle moléculaire), les taux d'enrichissement en acides gras insaturés que nous avons étudiés ici ont eu des conséquences sur les types de cristaux formés : d'une manière générale, quel que soit le passé thermique appliqué aux échantillons, nous avons observé une plus faible proportion, voire même une absence de structures longitudinales de type 3L par rapport aux structures observées pour des triacylglycérols de composition classique. Nous avons expliqué ce phénomène par la plus faible proportion de matière grasse cristallisée et par la plus faible température de cristallisation des triacylglycérols insaturés susceptibles de former ces structures 3L.

Conclusion générale

Nous avons également observé une cinétique de cristallisation plus lente des triacylglycérols enrichis en acides gras insaturés par rapport aux triacylglycérols de composition classique. Ceci s'est traduit par des plages de températures de début de cristallisation des différents types de cristaux plus étalées lors de refroidissements en dynamique, ainsi que par des vitesses de croissance de cristaux plus lentes, que ce soit à l'échelle moléculaire, microscopique ou même macroscopique. D'un point de vue mécanistique, la présence d'acides gras insaturés ayant un groupement acyl plus volumineux du fait de l'insaturation modifie la structure moléculaire des triacylglycérols laitiers et serait donc responsable de ces effets de retard cinétique.

Au cours des chauffages, les échantillons de matières grasses enrichies en acides gras insaturés ont présenté des pics calorimétriques à moyen point de fusion relativement peu intenses, que nous avons attribué à une quasi-absence de réorganisation polymorphique des cristaux de triacylglycérols fondant dans cette plage de température, c'est-à-dire vers 0-25°C. Les résultats de caractérisation rhéologiques ont également montré une rigidité amoindrie dans cette gamme de température. Ceci pourrait être dû à l'incompatibilité de structure des triacylglycérols enrichis en acides gras insaturés avec les triacylglycérols de composition classique.

De plus, nous avons montré que la structure globale des triacylglycérols enrichis en acides gras insaturés produits à partir du moyen « alimentation des vaches », est relativement proche de celle des triacylglycérols de plus classique. En effet, les matières grasses produites par fractionnement physique dans ce chapitre présentaient des comportements de cristallisation – fusion bien plus différents entre elles qu'entre des fractions identiques mais issues de régimes expérimentaux différents. Autrement dit, la voie de l'alimentation animale permettrait de modifier la structure moléculaire des triacylglycérols de façon moins puissante que le fractionnement physique. Cela montre bien le pouvoir « tampon » ou compensatoire du système vache entre l'aliment fourni et le lait produit. L'ensemble des résultats obtenus permet de mieux appréhender les liens qui existent entre les différents niveaux d'échelles de la cristallisation des triacylglycérols.

En outre, les résultats sur les applications agroalimentaires ont montré que l'enrichissement en acides gras insaturés avait des conséquences sur les propriétés de cristallisation des triacylglycérols dans les produits transformés que sont le beurre et le fromage. Nos résultats sur ces systèmes transformés représentatifs d'un aliment réel confirment les résultats obtenus sur les systèmes modèles (matières grasses anhydres et émulsions) en ce qui concernent les propriétés de cristallisation des triacylglycérols à l'échelle

Conclusion générale

moléculaire notamment. Du point de vue des propriétés rhéologiques, nous avons montré que les beurres enrichis en acides gras insaturés présentaient une résistance à l'écrasement plus faible que les beurres de composition classique. Les concentrations globales en acides gras saturés ou insaturés pourraient être prises comme indicateurs de la dureté des beurres puisqu'elles présentent des fortes corrélations avec ce paramètre. Autrement dit, les beurres enrichis en acides gras insaturés, fabriqués à partir de laits issus de régimes adaptés, seraient plus facilement tartinables, caractéristique recherchée par les consommateurs. Des beurres tels que ceux fabriqués dans le projet AGILAIT pourraient permettre aux industriels de ne plus avoir recours au fractionnement pour produire des beurres frigo-tartinables, et donc de réduire les coûts de fabrication, simplement en utilisant des laits produits à partir de régimes adaptés.

Pour finir, ce travail a plusieurs perspectives. D'un point de vue général, un complément d'étude sensoriel pourrait être envisagé pour savoir si les produits fabriqués selon les exigences de production laitière définies dans le projet AGILAIT apportent satisfaction au consommateur. L'investigation des effets sur la santé des produits fabriqués dans le cadre du projet AGILAIT serait également un complément d'étude intéressant à cette thèse, bien que difficilement envisageable pratiquement sans avoir recours à des études cliniques. A un niveau plus technique, il serait intéressant de réaliser des fractionnements successifs sur des matières grasses de composition classique et enrichie en acides gras insaturés afin d'affiner le modèle de détermination du taux de matière grasse solide en fonction de la température à partir de données calorimétriques. De cette manière, il serait possible d'obtenir des mesures de ce paramètre important pour les industriels notamment à l'aide d'une mesure calorimétrique rapide plutôt que par des mesures classiques de résonance magnétique nucléaire fastidieuses. Le fractionnement fin de matières grasses de composition contrôlée en acides gras pourrait également permettre d'avoir des informations plus précises sur la composition en acides gras, voire en triacylglycérols, de ces fractions en fonction de leurs propriétés thermiques et cristallographiques. L'étude de la cristallisation des triacylglycérols complexes en émulsion mériterait également d'être approfondie au regard des données de la littérature existant plutôt pour des systèmes modèles, en réalisant des cinétiques en température sur des émulsions de triacylglycérols laitiers à tailles de gouttelettes contrôlées par exemple. Enfin, le travail réalisé au cours de cette thèse pourrait être complété en prenant en compte non plus la composition en acides gras des matières grasses, mais la composition triglycéridique de celles-ci, afin de la mettre en regard des propriétés physiques que nous avons étudiées ; cependant les méthodes analytiques pour la déterminer sont lourdes et ne fournissent pas encore de résultats suffisamment détaillés pour cela.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam-Berret, M. (2009) Etude de la cristallisation des lipides : approche multi-échelle par la relaxation et la diffusion par RMN. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, Rennes.
- Alais, C., Linden, G. (1997) In: Abrégé de biochimie alimentaire. (4ème ed.) Masson, Paris.
- Ascheiro, A., Hennekens, C.H., Buring, J.E., Master, C., Stampfer, M.J., Willett, W.C. (1994) Trans-fatty acids intake and risk of myocardial infarction. *Circulation*, 89, 94-101.
- Ascheiro, A., Katan, M.B., Zock, P.L., Stampfer, M.J., Willett, W.C. (1999) Trans fatty acids and coronary heart disease. *J. Am. Diet. Assoc.*, 53, 143-157.
- Ashes, J.R., Gulati, S.K., Scott, T.W. (1997) Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *J. Dairy Sci.*, 80, 2204-2212.
- Augustin, M.A., Versteeg, C. (2006) Milk fat: Physical, chemical and enzymatic modification. In: Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids (3rd ed.) (P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, ed.) Springer, New York.
- Auldish, M.J., Walsh, B.J., Thomson, N.A. (1998) Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *J. Dairy Res.*, 65, 401-411.
- Avrami, M. (1941) Kinetics of phase change. III. Granulation, phase change and microstructure. *J. Chem. Phys.*, 9, 177-184.
- Awad, T., Hamada, Y., Sato, K. (2001a) Effects of addition of diacylglycerols on fat crystallization in oil-in-water emulsion. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103, 735-741.
- Awad, T., Sato, K. (2001b) Effects of hydrophobic emulsifier additives on crystallization behavior of palm mid fraction in oil-in-water emulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, 837-842.
- Awad, T., Sato, K. (2002) Acceleration of crystallization of palm kernel oil in oil-in-water emulsion by hydrophobic emulsifier additives. *Coll. Surf. B: Biointerf.*, 25, 45-53.
- Barber, M.C., Clegg, R.A., Travers, M.T., Vernon, R.G. (1997) Review. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta*, 1347, 101-126.
- Bauman, D.E., Grinari, J.M. (2001) Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.*, 70, 15-29.
- Bayourthe, C., Enjalbert, F., Moncoulon, R. (2000) Effect of different forms of canola oil fatty acids plus canola meal on milk composition and physical properties of butter. *J. Dairy Sci.*, 83, 690-696.

Références bibliographiques

- Bazmi, A., Duquenoy, A., Relkin, P. (2007) Aeration of low fat dairy emulsions: Effects of saturated-unsaturated triglycerides. *Int. Dairy J.*, 17, 1021-1027.
- Bazmi, A., Launay, B., Cuvelier, G., Relkin, P. (2008) Impact of crystalline milk fat on rheological properties of ice cream mix emulsions during aging at 4°C. *J. Text. Studies*, 39, 309-325.
- Belury, M.A. (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.*, 22, 505-531.
- Ben Amara-Dali, W., Karray, N., Lesieur, P., Ollivon, M. (2005) Anhydrous goat's milk fat: Thermal and structural behavior. 1. Crystalline forms obtained by slow cooling. *J. Agri. Food Chem.*, 53, 10018-10025.
- Ben Amara-Dali, W., Lesieur, P., Artzner, F., Karray, N., Attia, H., Ollivon, M. (2007) Anhydrous goat's milk fat: Thermal and structural behaviors studied by coupled differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. 2. Influence of cooling rate. *J. Agri. Food Chem.*, 55, 4741-4751.
- Ben Amara-Dali, W., Lopez, C., Lesieur, P., Ollivon, M. (2008) Crystallization properties and polymorphism of triacylglycerols in Goat's milk fat globules. *J. Agri. Food Chem.*, 56, 4511-4522.
- Bickerstaffe, R., Annison, E.R. (1971) Triglyceride synthesis in goat and sow mammary tissue. *Int. J. Biochem.*, 2, 153-162.
- Bobé, G., Hammond, E.G., Freeman, A.E., Lindberg, G.L., Beitz, D.C. (2003) Texture of butter from cows with different milk fatty acid compositions. *J. Dairy Sci.*, 86, 3122-3127.
- Bobé, G., Zimmerman, S., Hammond, E.G., Freeman, A.E., Porter, P.A., Luhman, C.M., Beitz, D.C. (2006) Butter composition and texture from cows with different milk fatty acid compositions fed fish oil or roasted soybeans. *J. Dairy Sci.*, 90, 2596-2603.
- Bociek, S.M., Ablett, S., Norton I.T. (1985) A ¹³C-NMR study of the crystal polymorphism and internal mobilities of the triglycerides, tripalmitin and tristearin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62, 1261-1266.
- Boistelle, R. (1988) Fundamentals of nucleation and crystal growth. In: Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids. (N. Garti & K. Sato, ed.) Marcel Dekker, New York.
- Boistelle, R., Astier, J.P. (1988) Crystallization mechanism in solution. *J. Cryst. Growth*, 90, 14-30.

Références bibliographiques

- Bolliger, S., Goff, H.D., Tharp, B.W. (2000) Correlation between colloidal properties of ice cream mix and ice cream. *Int. Dairy J.*, 10, 303-309.
- Bolton-Smith, C., Woodward, M., Fenton, S., Brown, C.A. (1996) Does dietary trans fatty acid intake relate to the prevalence of coronary heart disease in Scotland? *Eur. Heart J.*, 17, 837-845.
- Boode, K., Walstra, P. (1993) Partial coalescence of oil-in-water emulsions. 1. Nature of the aggregation. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 81, 121-137.
- Boode, K., Walstra, P., Degrootmostert, A.E.A. (1993) Partial coalescence of oil-in-water emulsions. 2. Influence of the properties of the fat. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 81, 139-151.
- Bornaz, S., Novak, G., Parmentier, M. (1992) Seasonal and regional variation in triglyceride composition of french butterfat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 1131-1135.
- Bornaz, S., Jacques, F., Parmentier, M. (1993) Butter texture: The prevalent triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 1075-1079.
- Breitschuh, B., Windhab, E.J. (1998) Parameters influencing cocrystallization and polymorphism in milk fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 897-904.
- Briard-Bion, V., Juaneda, P., Richoux, R., Guichard, E., Lopez, C. (2008) trans-C18:1 isomers in cheeses enriched in unsaturated fatty acids and manufactured with different milk fat globule sizes. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 9374-9382.
- Brodin, D. (1989) La tartinabilité du beurre : méthodes d'appréciation. Amélioration par cristallisation fractionnée. Thèse de doctorat, Université de Caen, Caen.
- Buchheim, W., Precht, D. (1979) Electron-microscopic study on the crystallization processes in fat globules during the ripening of cream. *Milchwissenschaft*, 34, 657-662.
- Bunjes, H., Koch, M.H.J., Westesen, K. (2000) Effect of particle size on colloidal solid triglycerides. *Langmuir*, 16, 5234-5241.
- Bunjes, H., Unruh, T. (2007) Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59, 379-402.
- Campbell, S.D., Goff, H.D., Rousseau, D. (2002) Comparison of crystallization properties of a palm stearin/canola oil blend and lard in bulk and emulsified form. *Food Res. Int.*, 35, 935-944.
- Campos, R., Narine, S.S., Marangoni, A.G. (2002) Effect of cooling rate on the structure and mechanical properties of milk fat and lard. *Food Res. Int.*, 35, 971-981.
- Cayot, P., Lorient, D. (1998) In: Structures et technofonctions des protéines du lait. Tec & Doc Lavoisier, Paris.

Références bibliographiques

- Cebula, D.J., McClements, D.J., Povey, M.J.W., Smith, P.R. (1992) Neutron diffraction studies of liquid and crystalline trilaurin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, pp. 130-136.
- Chapman, D. (1962) The polymorphism of glycerides. *Chem. Rev.*, 62, 433.
- Chen, S., Bobe, G., Zimmerman, S., Hammond, E.G., Luhman, C.M., Boylston, T.D., Freeman, A.E., Beitz, D.C. (2004) Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3422-3428.
- Chilliard, Y., Frelay, A., Mansbridge, R.M., Doreau, M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Ann. Zootechnol.*, 49, 181-205.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M. (2001a) Contrôle de la qualité nutritionnelle des latières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières : acides gras trans, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. *INRA Prod. Anim.*, 14, 323-335.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M. (2001b) Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.*, 70, 31-48.
- Chouinard, P.Y., Girard, V., Brisson, G.J. (1998) Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. *J. Dairy Sci.*, 81, 471-481.
- Christie, W.W. (1995). Composition and structure of milk lipids. In: Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids (2nd ed.) (P.F. Fox, ed.) Chapman and Hall. London.
- Cisneros, A., Mazzanti, G., Campos, R., Marangoni, A.G. (2006) Polymorphic transformation in mixtures of high- and low-melting fractions of milk fat. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6030-6033.
- Clegg, R.A., Barber, M.C., Pooley, L., Ernens, I., Larondelle, Y., Travers, M.T. (2001) Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. *Livest. Prod. Sci.*, 70, 3-14.
- Clegg, W. (2001) In: Crystal structure analysis. Principles and practice. Oxford University Press, Oxford.
- Coleman, R.A., Lewin, T.M., Muoio, D.M. (2000) Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Ann. Rev. Nutr.*, 20, 77-103.
- Coleman, R.A., Lee, D.P. (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.*, 43, 134-176.
- Corkery, R.W., Rousseau, D., Smith, P., Pink, D.A., Hanna, C.B. (2007) A Case for Discotic Liquid Crystals in Molten Triglycerides. *Langmuir*, 23, pp. 7241-7246.

Références bibliographiques

- Corl, B.A., Baumgard, L.H., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Phillips, B.S., Bauman, D.E. (2001). The role of delta 9 desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. *J. Nutr. Biochem.*, 12, 622-630.
- Corl, B.A., Barbano, D.M., Bauman, D.E. Ip, C. (2003) *Cis*-9, *trans*-11 CLA derived endogenously from *trans*-11 18:1 reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.*, 133, 2893-2900.
- Coupland, J.N. (2002) Crystallization in emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 7, 445-450.
- Couvreur, S., Hurtaud, C., Lopez, C., Delaby, L., Peyraud, J.L. (2006) The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *J. Dairy Sci.*, 89, 1956-1969.
- Couvreur, S., Hurtaud, C. (2007) Le globule gras du lait : sécrétion, composition, fonctions et facteurs de variation. *INRA Prod. Anim.*, 20, 369-382.
- D'Souza, V., DeMan, J.M., DeMan, L. (1990) Short spacings and polymorphic forms of natural and commercial solid fats: A review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67, 835-843.
- Da Silva, R., Rousseau, D. (2008) Molecular order and thermodynamics of the solid-liquid transition in triglycerides via Raman spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10, 4606-4613.
- Danthine, S., Blecker, C., Paquot, M., Innocente, N., Deroanne, C. (2000) Evolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : synthèse bibliographique. *Lait*, 80, 209-222.
- Das, K.P., Kinsella, J.E. (1990) Effect of heat denaturation on the adsorption of β -lactoglobulin at the oil/water interface and on coalescence stability of emulsions. *J. Colloid Interf. Sci.*, 139, 551-560.
- Davies, E., Dickinson, E., Bee, R.D. (2001) Orthokinetic destabilization of emulsions by saturated and unsaturated monoglycerides. *Int. Dairy J.*, 11, 827-836.
- De Graef, V., Dewettinck, K., Verbeke, D., Foubert, I. (2006) Rheological behaviour of crystallising palm oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108, 864-870.
- Deeth, H.C. (1997) The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. *Aust. J. Dairy Technol.*, 52, 44-46.
- DeMan, J.M. (1961) Physical properties of milk fat. *J. Dairy Res.*, 28, 117-122.
- DeMan, J.M. (1992) X-ray diffraction spectroscopy in the study of fat polymorphism. *Food Res. Int.*, 25, 471-476.
- DePeters, E.J., Medrano, J.F., Reed, B.A. (1995) Fatty acid composition of milk fat from three breeds of dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 75, 267-269.

Références bibliographiques

- Deroanne, C. (1977) L'analyse calorimétrique différentielle, son intérêt pratique pour le fractionnement de l'huile de palme et la détermination de la teneur en phase solide. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 10, 251-255.
- Dewhurst, R.J., Shingfield, K.J., Lee, M.R.F., Scollan, N.D. (2006) Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131, 168-206.
- Dhiman ,T.R., Anand, G.R., Satter, L.D., Pariza, M.W. (1999) Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.*, 82, 2146-2156.
- Dickinson, E. (1987) The structure and stability of emulsions. In: Food structure: It's creation and evaluation. (J. Blanchard, ed.) Faculty Agric. Sci., U.K.
- Dickinson, E., McClements, D.J., Povey, M.J.W. (1991) Ultrasonic investigation of the particle size dependence of crystallization in n-hexadecane-in-water emulsions. *J. Coll. Inter. Sci.*, 142, 103-110.
- Dickinson, E., McClements, D.J. (1995) In: Advances in food colloids. Chapman and Hall, London.
- Dickinson, E., McClements, D.J. (1996) In: Advances in food colloids. (2nd ed.) Blackie Academic and Professional, London.
- Dickinson, E. (1997) Properties of emulsions stabilized with milk proteins: Overview of some recent developments. *J. Dairy Sci.*, 80, 2607-2619.
- Donhowe, D.P., Hartel, R.W. (1996) Recrystallization of ice in ice cream during controlled accelerated storage. *Int. Dairy J.*, 6, 1191-1208.
- Duan, R.D. (1998) Shingomyelin hydrolysis in the gut and clinical implications in colorectal tumorigenesis and other gastrointestinal disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 33, 673-678.
- Elgersma, A., Tamminga, S., Ellen, G. (2006) Modifying milk composition through forage. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131, 207-225.
- Fauquant, C., Briard, V., Leconte, N., Michalski, M.C. (2005) Differently sized native milk fat globules separated by microfiltration: fatty acid composition of the milk fat globule membrane and triglyceride core. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107, 80-86.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, H. S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol., Chem.*, 226, 497-509.
- Fong, B.Y., Norris, C.S., MacGibbon, A.K.H. (2007) Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *Int. Dairy J.*, 17, 275-288.
- Foubert, I., Dewettinck, K., Vanrolleghem, P.A. (2003) Modelling of the crystallization kinetics of fats. *Trends Food Sci. Technol.*, 14, 79-92.

Références bibliographiques

- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (2003) In: *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1 Proteins (3rd ed.). Plenum Publishers.
- Fredrick, E., Walstra, P., Dewettinck, K. (2010) Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. *Adv. Colloid Interf. Sci.*, 153, 30-42.
- Garti, N., Sato, K. (1988) In: *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids*. (N. Garti & K. Sato, ed.) Marcel Dekker, New York.
- Garti, N., Sato, K. (2001) In: *Crystallization processes in fats and lipid systems*. (N. Garti & K. Sato, ed.) Marcel Dekker, New York.
- German, J.B., Dillard, C.J. (2006) Composition, structure and absorption of milk lipids: A source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46, 57-92.
- Ghotra, B.S., Dyal, S.D., Narine, S.S. (2002) Lipid shortenings: a review. *Food Res. Int.*, 35, 1015-1048.
- Glasser, F. Ferlay, A., Chilliard, Y. (2008) Oilseed supplements ad fatty acid composition of cow milk: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.*, 91, 4687-4703.
- Goff, H.D., Jordan, W.K. (1989) Action of emulsifiers in promoting fat destabilization during the manufacture of ice cream. *J. Sci. Food Agric.*, 62, 283-289.
- Goff, H.D. (1997) Instability and partial coalescence in whippable dairy emulsions. *J. Dairy Sci.*, 80, 2620-2630.
- Goff, H.D., Verespej, E., Smith, A.K. (1999) A study of fat and air structures in ice cream. *Int. Dairy J.*, 9, 817-829.
- Goff, H.D. (2002) Formation and stabilisation of structure in ice-cream and related products. *Current Opin. Colloid Interf. Sci.*, 7, 432-437.
- Goff, H.D. (2006) Ice cream. In: *Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids* (3rd ed.) (P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, eds.) Springer, New York.
- Grabielle-Madelmont, C., Perron, R. (1983) Calorimetric studies on phospholipid-water systems. I. DL-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)-water system. *J. Colloid Interf. Sci.*, 95, 483-493.
- Granger, C., Schöppe, A., Leger, A., Barey, P., Cansell, M. (2005) Influence of formulation on the thermal behavior of mixes and ice creams. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 82, 427-431.
- Gülseren, I., Coupland, J.N. (2007a) The effect of emulsifier type and droplet size on phase transitions in emulsified even-numbered n-alkanes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 84, 621-629.
- Gülseren, I., Coupland, J.N. (2007b) Excess ultrasonic attenuation due to solid-solid and solid-liquid transitions in emulsified octadecane. *Cryst. Growth Des.*, 7, 912-918.

Références bibliographiques

- Hagemann, J.W. (1988) Thermal behavior and polymorphism of acylglycerides. In: Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids. (N. Garti & K. Sato, ed.) Marcel Dekker, New York.
- Hatakeyama, T., Quinn, F.X. (1994) In: Thermal analysis fundamentals and applications to polymer science. Wiley, Chichester.
- Hawke, J.C., Taylor, M.W. (1995) Influences of nutritional factors on the yield, composition, and physical properties of milk fat. In: Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids (2nd ed.) (P.F. Fox, ed.) Chapman and Hall, London.
- Heid, H.W., Keenan, T.W. (2005) Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Eur. J. Cell. Biol.*, 84, 245-258.
- Hernqvist, L. (1984) On the Structure of Triglycerides in the Liquid State and Fat Crystallization. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 86, pp. 297-300.
- Hernqvist, L. (1988) Crystal structures of fats and fatty acids. In: Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids. (N. Garti & K. Sato, ed.) Marcel Dekker, New York.
- Hillgartner, F.B., Salati, L.M., Goodridge, A.G. (1995) Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.*, 75, 47-76.
- Himawan, C., Starov, V.M., Stapley, A.G.F. (2006) Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization. *Adv. Colloid Interf. Sci.*, 122, 3-33.
- Holt, C. (1992) Structure stability of bovine casein micelles. In: Advances in protein chemistry – 43. (C.B. Anfisen, J.T. Edsall, F.M. Richards & D.S. Eisenberg, eds.) Academic Press, London.
- Horne, D.S. (1998) Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.*, 8, 171-177.
- Horne, D.S. (2006) Casein micelle structure: Models and muddles. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.*, 11, 148-153.
- Hu, F.B., Willett, W.E. (2000) Protein, fat, and ischemic heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 848-849.
- Huppertz, T., Kelly, A.L. (2006) Physical chemistry of milk fat globules. In: Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids (3rd ed.) (P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, ed.) Springer, New York.

Références bibliographiques

- Hurtaud, C., Faucon, F., Couvreur, S., Peyraud, J.L. (2010) Linear relationship between increasing amounts of extruded linseed in dairy cow diet and milk fatty acid composition and butter properties. *J. Dairy Sci.*, 93, 1429-1443.
- Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thomsson, H.J., Barbano, B., Bauman, D.E. (1999) Conjugated linoleic acid-enriched butterfat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.*, 129, 2135-2142.
- Janssen-van Rosmalen, R., Bennema, P., Garside, J. (1975) The influence of volume diffusion on crystal growth. *J. Cryst. Growth*, 29, 342-352.
- Jensen, R.G., Newberg, D.S. (1995) Bovine milk lipids. In: Handbook of milk composition. (R.G. Jensen, ed.) Academic Press, San Diego.
- Jensen, R.G. (2000) Fatty acids in milk and dairy products. In: Fatty acids in foods and their health implications. (2nd ed.) (C.K. Chow, ed.) Marcel Dekker, New York.
- Jensen, R.G. (2002) Invited review: The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.*, 85, 295-350.
- Jolliffe, I.T. (1986) Principal component analysis. Springer Verlag, New York.
- Kaneko, N., Horie, T., Ueno, S., Yano, J., Katsuragi, T., Sato, K. (1999) Impurity effects on crystallization rates of n-hexadecane in oil-in-water emulsions. *J. Cryst. Growth*, 197, 263-270.
- Kanno, C., Kim, D.H. (1990) A simple procedure for the preparation of bovine milk fat globule membrane and a comparison of its composition, enzymatic activities, and electrophoretic properties with those prepared by other methods. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2845-2854.
- Karray N, Lopez C, Lesieur P, Ollivon, M. (2004) Dromedary milk fat: thermal and structural properties 1. Crystalline forms obtained by slow cooling. *Lait*, 84, 399-416.
- Karray N, Lopez C, Lesieur P, Ollivon, M. (2005) Dromedary milk fat: thermal and structural properties 2. Influence of cooling rate. *Lait*, 85, 433-451.
- Kaylegian, K.E., Lindsay, R.C. (1992) Performance of selected milk fat fractions in cold-spreadable butter. *J. Dairy Sci.*, 75, 3307-3317.
- Kaylegian, K.E., Lindsay, R.C. (1995) Milk fat usage and modification. In: Handbook of milk fat fractionation technology and application. Am. Oil Chem. Soc. Press, Champaign.
- Keenan, T.W., Moon, T., Dylewski, D.P. (1983) Lipid globules retain globule membrane material after homogenisation. *J. Dairy Sci.*, 66, 196-203.

Références bibliographiques

- Keenan, T.W., Dylewski, D.P. (1995) Intracellular origin of milk lipid globules and the nature and structure of the milk lipid globule membrane. In: Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids (2nd ed.) (P.F. Fox, ed.) Chapman and Hall, London.
- Keenan, T.W., Mather, I.H. (2006) Origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane. In: Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids (3rd ed.) (P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, ed.) Springer, New York.
- Kim, S.K., Nawar, W.W. (1992) Oxidative interactions of cholesterol in the milk fat globule membrane. *Lipids*, 27, 928-932.
- Knothe, G., Dunn, R.O. (2009) A comprehensive evaluation of the melting points of fatty acids and esters determined by differential scanning calorimetry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 86, 843-856.
- Koxholt, N.M.R., Eisenmann, B., Hinrichs, J. (2001) Effect of the fat globule sizes on the meltdown of ice cream. *J. Dairy Sci.*, 84, 31-37.
- Kritchevsky, D. (2003) Conjugated linoleic acid in experimental atherosclerosis. In: Advances in conjugated linoleic acid research, vol. 2 (J.L. Sebedio, W.W. Christie & R.O. Adlof, ed.) American Oil Chemists' Society Press, Champaign.
- Krog, N., Larsson, K. (1992) Crystallization at interfaces in food emulsions – a general phenomenon. *Fat Sci. Technol.*, 94, 55-57.
- Lambelet, P. (1983) Comparison of N.M.R. and D.S.C. methods for determining solid content of fats. Application to milk fat and its fractions. *Lebens.-Wiss. Technol.*, 16, 90-95.
- Larsson, K. (1966) Classification of glyceride crystal forms. *Acta Chemica Scandinavia*, 20, 2255-2260.
- Larsson, K. (1972) Molecular Arrangement in Glycerides. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 74, pp. 136-142.
- Larsson, K. (1992) On the structure of the liquid state of triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, pp. 835-836.
- Larsson, K. (1994) In: Lipids-molecular organization, physical functions and technical applications. The Oily Press Ltd., Sweden.
- Lavigne, F. (1995) Polymorphisme et transitions de phases des triacylglycérols. Applications aux propriétés thermiques et structurales de la matière grasse laitière anhydre et de ses fractions. Thèse de doctorat, ENSIA, Massy.
- Lavigne, F., Ollivon, M. (1997) La matière grasse laitière et ses fractions. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 4, 212-219.

Références bibliographiques

- Lawless, F., Murphy, J.J., Harrington, D., Devery, R., Stanton, C. (1998) Elevation of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. *J. Dairy Sci.*, 81, 3259-3267.
- Laye, P.G. (2002) Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry. In: Principles of thermal analysis and calorimetry. (P.J. Haines ed.) Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Legrand, P. (2008) Intérêt nutritionnel des principaux acides gras des lipides du lait. *Chole-doc* 105.
- Legrand, P. (2010) Les nouveaux ANC en acides gras - Une actualisation nécessaire. *Chole-doc* 118.
- Lemaitre, R.N., King, I.B., Raghunathan, T.E., Pearce, R.M., Weinman, S., Knopp, R.H., Copass, M.K., Cobb, L.A., Siscovick, D.S. (2002) Cell membrane trans-fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Circulation*, 105, 697-701.
- Lin, M.P., Sims, C.A., Staples, C.R., O'Keefe, S.F. (1996) Flavor quality and texture of modified fatty acid high monoene, low saturate butter. *Food Res. Int.*, 29, 367-371.
- Lock, A.L., Bauman, D.E. (2004) Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, 39, 1197-1206.
- Lock, A.L., Corl, B.A., Bauman, D.E., Ip, C. (2004) The anticarcinogenic effects of trans-11 18:1 is dependent on its conversion to cis-9 trans-11 conjugated linoleic acid via Δ -desaturase. *J. Nutr.*, 134, 2698-2704.
- Lock, A.L., Parodi, P.W., Bauman, D.E. (2005) The biology of trans fatty acid: Implications for human health and the dairy industry. *Aust. J. Dairy Technol.*, 60, 134-142.
- Loor, J.J., Ferlay, A., Ollier, A., Doreau, M., Chilliard, Y. (2005) Relationship among trans and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. *J. Dairy Sci.*, 88, 726-740.
- Lopez, C., Lesieur, P., Keller, G., Ollivon, M. (2000) Thermal and structural behavior of milk fat. I. Unstable species of cream. *J. Colloid Interf. Sci.*, 229, 62-71.
- Lopez, C. (2001a) Contribution à l'étude de la cristallisation des triacylglycérols : application aux émulsions laitières. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Lopez, C., Lesieur, P., Keller, G., Ollivon, M. (2001b) Thermal and structural behavior of milk fat. II. Crystalline forms obtained by slow cooling of cream. *J. Colloid Interf. Sci.*, 240, 150-161.

Références bibliographiques

- Lopez, C., Lavigne, F., Lesieur, P., Bourgaux, C., Ollivon, M. (2001c) Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. I. Unstable species of anhydrous milk fat. *J. Dairy Sci.*, 84, 756-766.
- Lopez, C., Lavigne, F., Lesieur, P., Keller, G., C., Ollivon, M. (2001d) Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. II. Crystalline forms obtained by slow cooling. *J. Dairy Sci.*, 84, 2402-2412.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Bernadou, S., Keller, G., Ollivon, M. (2002a) Thermal and structural behavior of milk fat. III. Influence of cooling rate and droplet size on cream crystallization. *J. Colloid Interf. Sci.*, 254, 64-78.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Ollivon, M. (2002b). Crystalline structures formed in cream and anhydrous milk fat at 4°C. *Lait*, 82, 317-335.
- Lopez, C., Lesieur, P., Bourgaux, C., Ollivon, M. (2005a) Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. III. Influence of cooling rate. *J. Dairy Sci.*, 88, 511-526.
- Lopez, C., Karray, N., Lesieur, P., Ollivon, M. (2005b) Crystallization and melting properties of dromedary milk fat globules studied by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry. Comparison with anhydrous dromedary milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107, 673-683.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Camier, B., Gassi, J.Y. (2006a) Milk fat thermal properties and solid fat content in emmental cheese: A differential scanning calorimetry study. *J. Dairy Sci.*, 89, 2894-2910.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Riaublanc, A., Ollivon, M. (2006b) Milk fat primary fractions obtained by dry-fractionation. 1. Chemical composition and crystallization properties. *Chem. Phys. Lipids*, 144, 17-33.
- Lopez, C., Briard-Bion, V. (2007a) The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products. *Lait*, 87, 317-336.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Ollivon, M. (2007b) Coupling of time-resolved synchrotron X-ray diffraction and DSC to elucidate the crystallization properties and polymorphism of triglycerides in milk fat globules. *Lait*, 87, 459-480.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., Besle, J.M. (2008a) Phospholipid, shingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 5526-5536.

Références bibliographiques

- Lopez, C., Briard-Bion, V., Beaucher, E., Ollivon, M. (2008b) Multiscale characterization of the organization of triglycerides and phospholipids in emmental cheese: From the microscopic to the molecular level. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2406-2414.
- Lopez, C., Ollivon, M. (2009a) Crystallisation of triacylglycerols in nanoparticles. Effect of dispersion and polar lipids. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 98, 29-37.
- Lopez, C., Ollivon, M. (2009b) Triglycerides obtained by dry-fractionation of milk fat. 2. Thermal properties and polymorphic evolutions on heating. *Chem. Phys. Lipids*, 159, 1-12.
- Lopez, C., Madec, M.N., Jimenes-Flores, R. (2010) Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chem.*, 120, 22-33.
- Marangoni, A.G. (1994) Candida and Pseudomonas lipase-catalyzed hydrolysis of butteroil in the absence of organic solvents. *J. Food Sci.*, 59, 1096-1099.
- Marangoni, A.G., Lencki, R.W. (1998) Ternary phase behavior of milk fat fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3879-3884.
- Marangoni, A.G. (2002) The nature of fractality in fat crystal networks. *Trends Food Sci. Technol.*, 13, 37-47.
- Marangoni, A.G., Narine, S.S. (2002) Identifying key structural indicators of mechanical strength in networks of fat crystals. *Food Res. Int.*, 35, 957-969.
- Marangoni, A.G., Tang, D. (2008) Modeling the rheological properties of fats: A perspective and recent advances. *Food biophysics*, 3, 113-119.
- Martini, S., Bertoli, C., Herrera, M.L., Neeson, I., Marangoni, A.G. (2005) Attenuation of ultrasonic waves: Influence of microstructure and solid fat content. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 82, 319-328.
- Mather, I.H., Keenan, T.W. (1998) Origin and secretion of milk lipids. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 3, 259-273.
- Mazzanti, G., Guthrie, S.E., Sirota, E.B., Marangoni, A.G., Idziak, S.H.J. (2003) Orientation and phase transitions of fat crystals under shear. *Cryst. Growth Des.*, 7, 1230-1241.
- Mazzanti, G. (2004) X-ray diffraction study on the crystallization of fats under shear. PhD. Thesis, University of Guelph, Guelph, ON, Canada.
- Mazzanti, G., Marangoni, A.G., Idziak, S.H.J. (2008) Modeling of a two-regime crystallization in a multicomponent lipid system under shear flow. *Eur. Phys. J. E*, 27, 135-144.

Références bibliographiques

- Mazzanti, G., Marangoni, A.G., Idziak, S.H.J. (2009) Synchrotron study on crystallization kinetics of milk fat under shear flow. *Food Res. Int.*, 42, 682-694.
- McCarthy, O.J. (2006) Physical characterization of milk fat and milk fat-based products. In: *Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids* (3rd ed.) (P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, ed.) Springer, New York.
- McClements, D.J., Dungan, S.R., German, J.B., Simoneau, C., Kinsella, J.E. (1993a) Droplet size and emulsifier type affect crystallization and melting of hydrocarbon-in-water emulsions. *J. Food Sci.*, 58, 1148-1178.
- McClements, D.J., Dickinson, E., Dungan, S.R., Kinsella, J.E., Ma, J.G., Povey, M.J.W. (1993b) Effect of emulsifier type on the crystallization kinetics of oil-in-water emulsions containing a mixture of solid and liquid droplets. *J. Coll. Interf. Sci.*, 160, 293-297.
- McClements, D.J. (1999) In: *Advances in food colloids*. Chapman and Hall, London.
- McGibbon, A.K.H., Taylor, M.W. (2006) Composition and structure of bovine milk lipids. In: *Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids* (3rd ed.) (P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, ed.) Springer, New York.
- McGuire M.A., Bauman, D.E. (2002) Milk biosynthesis and secretion. In: *Encyclopedia of dairy science*. (H. Roginski, J.W. Furquay & P.F. Fox eds.) Elsevier Sciences, London.
- McPherson, A.V., Kitchen, B.J. (1983) Reviews of the progress of dairy science: the bovine milk fat globule membrane – its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, 50, 107-133.
- Meagher, L.P., Holroyd, S.E., Illinworth, D., van de Ven, F., Lane, S. (2007) At-line near-infrared spectroscopy for prediction of the solid fat content of milk fat from New Zealand butter. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 2791-2796.
- Mekmene, O., Le Graët, Y., Gaucheron, F. (2010) Theoretical model for calculating ionic equilibria in milk as a function of pH: Comparison to experiment. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 4440-4447.
- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D.M., Katan, M.B. (2003) Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77, 1146-1155.
- Michalski, M.C., Michel, F., Sainmont, D., Briard, V. (2001) Apparent ζ potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane. *Colloids Surf. B: Biointer.*, 23, 23-30.

Références bibliographiques

- Michalski, M.C., Michel, F., Briard, V. (2002a). On the size distribution and zeta-potential of homogenized milk fat globules. In: Food Emulsions and Dispersions. (M. Anton, ed.) Research Signpost, Kerala, India.
- Michalski, M.C., Ollivon, M., Briard, V., Leconte, N., Lopez, C. (2004) Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior. *Chem. Phys. Lipids*, 132, 247-261.
- Montenegro, R., Landfester, K. (2003) Metastable and stable morphologies during crystallization of alkanes in miniemulsion droplets. *Langmuir*, 19, 5996-6003.
- Mulder, H. (1953) Melting and solidification of milk fat. *Neth. Milk Dairy J.*, 7, 149-174.
- Mulder, H., Walstra, P. (1974) The Milk Fat Globule. Commonwealth Agriculture Bureaux. Farnham Royal, Bucks.
- Mykhaylyk, O.O., Hamley, I.W. (2004) The packing of triacylglycerols from SAXS measurements: Application to the structure of 1,3-distearoyl-2-oleoyl-sn-glycerol crystal phases. *J. Phys. Chem. B*, 108, 8069-8083.
- Narine, S.S., Marangoni, A.G. (1999a) Fractal nature of fat crystal networks. *Phys. Rev. E*, 59, 1908-1920.
- Narine, S.S., Marangoni, A.G. (1999b) Relating structure of fat crystal networks to mechanical properties: A review. *Food Res. Int.*, 32, 227-248.
- Narine, S.S., Humphrey, K.L., Bouzidi, L. (2006) Modification of the Avrami model for application to the kinetics of the melt crystallization of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 83, 913-921.
- Noakes, M., Nestel, P.J., Clifton, P.M. (1996) Modifying the fatty profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 42-46.
- Norris, R., Taylor, M.W. (1977) Comparison of NMR and DSC methods for the estimation of solid fat content. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 12, 160-165.
- Norton, I.T., Lee Tufnell, C.D., Ablett, S., Bociek, S.M. (1985) A calorimetric, NMR and X-ray diffraction study of the melting behavior of tripalmitin and tristearin and their mixing behavior with triolein. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62, 1237-1244.
- Ollivier-Bousquet, M. (2002) Milk lipid and protein traffic in mammary epithelial cells: joint and independent pathways. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42, 49-162.
- Ollivon, M. (1992) In: Manuel des corps gras. Karliskind, A. Lavoisier, Tec & Doc, Paris.
- Ollivon, M., Perron, R. (1992) In: Manuel des corps gras. (A. Karliskind ed.) Lavoisier, Tec & Doc, Paris.

Références bibliographiques

- Ollivon, M. (2006) DSC and high resolution X-ray diffraction coupling. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 85, 219-224.
- Ozilgen, S., Simoneau, C., German, J.B., McCarthy, M.J., Reid, D.S. (1993) Crystallization kinetics of emulsified triglycerides. *J. Sci. Food Agric.*, 61, 101-108.
- Palanuwech, J., Coupland, J.N. (2003) Effect of surfactant type on the stability of oil-in-water emulsions to dispersed phase crystallization. *Coll. Surf. A*, 223, 251-262.
- Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D., Barbano, D.M. (1993) Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.*, 76, pp. 1753-1771.
- Palmquist, D.L. (2006) Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. In: *Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids* (3rd ed.) (P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, ed.) Springer, New York.
- Palmquist, D.L., Griinari, J.M. (2006) Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131, 358-369.
- Park, P. W., Goins, R. E. (1994) In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *J. Food Sci.*, 59, 1262-1266.
- Parodi, P.W. (1982) Positional distribution of fatty acids in the triglyceride classes of milk fat. *J. Dairy Res.*, 49, 73-81.
- Parodi, P.W. (2004) Milk fat in human nutrition. *Aust. J. Dairy Technol.*, 59, 3-58.
- Parodi, P.W. (2006) Nutritional significance of milk lipids. In: *Advanced dairy chemistry vol. 2: Lipids* (3rd ed.) (P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, ed.) Springer, New York.
- Patton, S. (1973) Origin of milk fat globule. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 50, 178-185.
- Patton, S. (1982) Release of remnant plasma membrane from milk fat globules by Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta*, 688, 727-734.
- Pietinen, P., Ascheiro, A., Korhonen, P., Hartman, A.M., Willett, W.C., Albanes, D., Virtamo, J. (1997) Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *Am. J. Epidemiol.*, 145, 876-887.
- Precht, D., Molkentin, J., Destailats, F., Wolff, R.L. (2001) Comparative studies on individual isomeric 18:1 acids in cow, goat, and ewe milk fats. *Lipids*, 36, 827-832.
- Precht, D., Peters, K.H. (1981) The consistency of butter. I. Electron-microscopic studies on the influence of different cream ripening temperatures on the frequency of definite fat globule types in cream. *Milchwissenschaft*, 36, 616-620.
- Prentice, J.H. (1972) Rheology and texture of dairy products. *J. Text. Stud.*, 3, 415-458.

Références bibliographiques

- Ramaswamy, N., Baer, R.J., Schingoethe, D.J., Hippen, A.R., Kasperson, K.M., Whitlock, L.A. (2001) Short communication: Consumer evaluation of milk high in conjugated linoleic acid. *J. Dairy Sci.*, 84, 1607-1609.
- Ribadeau-Dumas, B., Grappin, R. (1989) Milk protein analysis, *Lait*, 69, 357-416.
- Rombaut, R., Dewettinck, K. (2006) Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *Int. Dairy J.*, 16, 1362-1373.
- Rossel, B. (2003) In: Oils and fats, vol. 3. Dairy Fats. (B. Rossel, ed.) Leatherhead publishing, Leatherhead.
- Rousseau, D., Forestiere, K., Hill, A.R., Marangoni, A.G. (1996a) Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. I. Melting behavior and triacylglycerol modifications. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 963-972.
- Rousseau, D., Hill, A.R., Marangoni, A.G. (1996b) Restructuring butterfat through blending and interesterification. 3. Rheology. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 983-989.
- Rousseau, D., Marangoni, A.G. (1999) The effect of interesterification on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat-canola oil spreads. *Food Res. Int.*, 31, 381-388.
- Rousseau, D. (2000) Fat crystals and emulsion stability – a review. *Food Res. Int.*, 33, 3-14.
- Rousseau, D., Marangoni, A.G. (2002) The effect of interesterification on the physical properties of fats. In: Physical properties of lipids. (A.G. Marangoni & S.S. Narine, ed.) Marcel Dekker, New York.
- Rousset, P. (2002) In: Physical properties of lipids. Narine S.S. ed. Marcel Dekker, New York.
- Ryhänen, E.L., Tallavaara, K., Griinari, J.M., Jaakkola, S., Mantere-Alhonen, S., Shingfield, K.J. (2005) Production of conjugated linoleic acid enriched milk and dairy products from cows receiving grass silage supplemented with a cereal-based concentrate containing rapeseed oil. *Int. Dairy J.*, 15, 207-217.
- Saggin, R., Coupland, J.N. (2002) Measurement of solid fat content by ultrasonic reflectance in model systems and chocolate. *Food Res. Int.*, 35, 999-1005.
- Salmeron, J., Hu, F.B., Manson, J.E. (2001) Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 1019-1026.
- Sato, K. (1996) Advances in lipid research. Vol. 2 (F. Padley ed.) JAI Press Inc. Amsterdam.
- Sato, K. (2001) Crystallization behaviour of fats and lipids – a review. *Chem. Eng. Sci.*, 56, 2255-2265.

Références bibliographiques

- Sato, K., Ueno, S. (2001) In: Crystallization processes in fats and lipid systems. (N. Garti & K. Sato ed.) Marcel Dekker, New York.
- Shellhammer, T.H., Rumsey, T.R., Krochta, J.M. (1997) Viscoelastic properties of edible lipids. *J. Food Eng.*, 33, 305-320.
- Sherbon, J.W. (1974) Crystallization and fractionation of milk fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51, 22.
- Shingfield, K.J., Reynolds, C.K., Lupoli, B., Toivonen, V., Yurawecz, M.P., Delmonte, P., Griinari, J.M., Grandison, A.S., Beever, D.E. (2005) Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet of milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. *Anim. Sci.*, 80, 225-238.
- Shingfield, K.J., Griinari, J.M. (2007) Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109, 799-816.
- Shukla, A., Bhaskar, A.R., Rizvi, S.S.H., Mulvaney, S.J. (1994) Physicochemical and rheological properties of butter made from supercritically fractionated milk fat. *J. Dairy Sci.*, 77, 45-54.
- Shukla, A., Rizvi, S.S.H. (1995) Viscoelastic properties of butter. *J. Food Sci.*, 60, 902-905.
- Singh, A.P., McClements, D.J., Marangoni, A.G. (2002) Comparison of ultrasonic and pulsed NMR techniques for determination of solid fat content. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 431-437.
- Singh, A.P., McClements, D.J., Marangoni, A.G. (2004) Solid fat content determination by ultrasonic velocimetry. *Food Res. Int.*, 37, 545-555.
- Skoda, W., Van Den Tempel, M. (1963) Crystallization of emulsified triglycerides. *J. Colloid Interf. Sci.*, 18, 568-584.
- Small, D.M. (1986) In: Handbook of lipid research. The physical chemistry of lipids. From alkanes to phospholipids. Plenum Press, New York.
- Smet, K., Coudijzer, K., Fredrick, E., De Campeneere, S., De Block, J., Wouters, J., Raes, K., Dewettinck, K. (2009) Crystallization behavior of milk fat obtained from linseed-fed cows. *J. Dairy Sci.*, 93, 495-505.
- Smet, K., De Block, J., van der Meeren, P., Raes, K., Dewettinck, K., Coudijzer, K. (2010) Influence of milk fatty acid composition and process parameters on the quality of ice cream. *Dairy Sci. Technol.*, 90, 431-447.
- Smith, S., Witkowski, A., Joshi, A.K. (2003) Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog. Lipid Res.*, 42, 289-317.

Références bibliographiques

- Söderberg, I., Hernqvist, L., Buchheim, W. (1989) Milk fat crystallization in natural milk fat globules. *Milchwissenschaft*, 44, 403-406.
- Sonoda, T., Takata, Y., Ueno, S., Sato, K. (2006) Effects of emulsifiers on crystallization behavior of lipid crystals in nanometer-size oil-in-water emulsion droplets. *Cryst. Growth Des.*, 6, 306-612.
- Sourdet, S., Relkin, P., Fosseux, P.Y., Aubry, V. (2002) Composition of fat protein layer in complex food emulsions at various weight ratios of casein-to-whey proteins. *Lait*, 82, 567-578.
- Steijns, J.M. (2008) Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix? *Int. Dairy J.*, 18, 425-435.
- Takechi, C., Kawaguchi, T., Kaneko, F., Yamamuro, O., Akita, H., Ono, M., Suzuki, M. (2007) Incoherent quasielastic neutron scattering study on the polymorphism of tristearin: Dynamical properties of hydrocarbon chains. *J. Phys. Chem. B*, 111, 9706-9710.
- Tang, D., Marangoni, A.G. (2007) Modeling the rheological properties and structure of colloidal fat crystal network. *Trends Food Sci. Technol.*, 18, 474-483.
- Tang, D., Marangoni, A.G. (2008) Modified fractal model and rheological properties of colloidal networks. *J. Colloid Interf. Sci.*, 318, 202-209.
- ten Grotenhuis, E., van Aken, G.A., van Malssen, K.F., Schenk, H. (1999) Polymorphism of milk fat studied by differential scanning calorimetry and real-time X-ray powder diffraction. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 76, 1031-1039.
- Timmen, H., Patton, S. (1988) Milk fat globules: Fatty acid composition, size, and in vivo regulation of fat liquidity. *Lipids*, 23, 685-689.
- Timms, R.E. (1979) The physical properties of blends of milk fat with beef tallow and beef tallow fractions. *Aust. J. Dairy Technol.*, 34, 60-65.
- Timms, R.E. (1980) The phase behavior and polymorphism of milk fat, milk fat fractions and fully hardened milk fat. *Aust. J. Dairy Technol.*, 35, 47-53.
- Timms, R.E. (1984) Phase behavior of fats and their mixtures. *Progress Lipid Res.*, 23, 1-38.
- Toomey, S., Roche, H., Fitzgerald, D., Belton, O. (2003) Regression of pre-established atherosclerosis in the apoE^{-/-} mouse by conjugated linoleic acid. *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 1075-1079.
- Toro-Vazquez, J., Herrera-Coronado, V., Dibildox-Alvarado, E., Charo-Alonso, M., Gomez-Aldapa, C. (2002) Induction time of crystallization in vegetable oils, comparative measurements by differential scanning calorimetry and diffusive light scattering. *J. Food Sci.*, 67, 1057-1065.

Références bibliographiques

- Toro-Vazquez, J., Perez-Martinez, D., Dibildox-Alvarado, E., Charo-Alonso, M., Reyes-Hernandez, J. (2004) Rheometry and polymorphism of cocoa butter during crystallization under static and stirring conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81, 195-202.
- Uehara, H., Suganuma, T., Negishi, S., Uda, Y., Furukawa, Y., Ueno, S., Sato, K. (2008) Physical properties of two isomers of conjugated linoleic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85, 29-36.
- Ueno, S., Hamada, Y., Sato, K. (2003) Controlling polymorphic crystallization of n-alkane crystals in emulsion droplets through interfacial heterogeneous nucleation. *Cryst. Growth Des.*, 3, 935-939.
- Valivullah, H.M., Dylewski, D.P., Keenan, T.W. (1986) Distribution of terminal transferases of acylglycerol synthesis in cell fractions from lactating mammary gland. *Int. J. Biochem.*, 18, 799-806.
- van Beresteyn, E.C.H. (1962) Polymorphism in milk fat in relation to the solid/liquid ratio. *Neth. Milk Dairy J.*, 26, 117-130.
- van den Tempel, M. (1979) *J. Colloid Interf. Sci.*, 71, 18.
- van Duynhoven, J., Dubourg, I., Goudappel, G.J., Roijers, E. (2002) Determination of MG and TG phase composition by time-domain NMR. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 383-388.
- Vanapalli, S.A., Coupland, J.N. (2001) Emulsions under shear-the formation and properties of partially coalesced lipid structures. *Food hydrocolloids*, 15, 507-512.
- Vanhoutte, B., Foubert, I., Duplacie, F., Huyghebaert, A., Dewettinck, K. (2002) Effect of phospholipids on isothermal crystallization and fractionation of milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 738-744.
- Vesper, H. Schmelz, E.M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V., Merrill, A.H. (1999) Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J. Nutr.*, 129, 1239-1250.
- Walstra, P. (1967) On the crystallization habit in fat globules. *Neth. Milk Dairy J.*, 21, 166-191.
- Walstra, P. Van Beresteyn, E.C.H. (1975) Crystallization of milk fat in the emulsified state. *Neth. Milk Dairy J.*, 29, 35-65.
- Walstra, P., Jenness, R. (1984) In: Dairy Chemistry and physics. John Wiley and Sons ed.. New York.
- Walstra, P. (1995) Physical chemistry of milk fat globules. In: Advanced Dairy Chemistry Volume 2. Fox P.F. ed. Chapman and Hall, London.
- Walstra, P. (1999) Casein sub-micelles: do they exist? *Int. Dairy J.*, 9, 189-192.

Références bibliographiques

- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. (2006) In: Dairy science and technology. (2nd ed.) Taylor & Francis group, Floride, USA.
- Wesdorp L.H. (1990) Liquid Multiple Solid Phase Equilibrium in Fats, PhD Thesis, University of Delft, Delft, Netherlands.
- Wiking, L., De Graef, V., Rasmussen, M., Dewettinck, K. (2009) Relations between crystallisation mechanisms and microstructure of milk fat. *Int. Dairy J.*, 19, 424-430.
- Willett, C.W., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Rosner, B.A., Sampson, L.A., Hennekens, C.H. (1993) Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *Lancet*, 341, 581-585.
- Williams, C.M. (2000) Dietary fatty acids and human health. *Ann. Zootech.*, 49, 165-180.
- Wolff, R.L., Bayard, C.C., Fabien, R.J. (1995) Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat composition with emphasis on trans-18:1 acids: Application to the study of seasonal variations in French butters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 1471-1483.
- Woodrow, I.L., DeMan, J.M. (1968) Polymorphism in milk fat shown by X-ray diffraction and infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.*, 51, 996-1000.
- Wright, A.J., Hartel, R.W., Narine, S.S., Marangoni, A.G. (2000) The effect of minor components on milk fat crystallization. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 463-475.
- Wright, A.J., Scanlon, M.G., Hartel, R.W., Marangoni, A.G. (2001) Rheological properties of milkfat and butter. *J. Food Sci.*, 66, 1056-1071.
- Wright, A.J., Marangoni, A.G. (2002) The effect of minor components on milk fat crystallization, microstructure and rheological properties. In: Physical properties of lipids. (A.G. Marangoni & S.S. Narine, ed.) Marcel Dekker, New York.
- Wright, A.J., Batte, H.D., Marangoni, A.G. (2005) Effects of canola oil dilution on anhydrous milk fat crystallization and fractionation behavior. *J. Dairy Sci.*, 88, 1955-1965.
- Xu, W., Nikolov, A., Wasan, D.T. (2005) Shear-induced fat particle structure variation and the stability of food emulsions: I. Effects of shear history, shear rate and temperature. *J. Food Eng.*, 66, 97-105.
- Yano, J., Kaneko, F., Kobayashi, M., Sato, K. (1997a) Structural analysis of triacylglycerols polymorphs with FT-IR techniques. 1. Assignments of CH₂ progression bands of saturated monoacid triacylglycerols. *J. Phys. Chem. B*, 101, 8112-8119.
- Yano, J., Kaneko, F., Kobayashi, M., Sato, K. (1997b) Structural analysis of triacylglycerols polymorphs with FT-IR techniques. 2. β' -form of 1,2-dipalmitoyl-3-myristoyl-sn-glycerol. *J. Phys. Chem. B*, 101, 8112-8119.

Références bibliographiques

- Yano, J., Sato, K. (1999) FT-IR studies on polymorphism of fats: molecular structures and interactions. *Food Res. Int.*, 32, 249-259.
- Yu, Y., Correll, P.H., Vanden Heuvel, J.P. (2002) Conjugated linoleic acid decreases the production of pro-inflammatory products in macrophages: Evidence for a PPAR γ dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1581, 89-99.
- Zazcek, M., Keenan, T.W. (1990) Morphological evidence for an endoplasmic reticulum origin of milk lipid globules using lipid-selective staining procedures. *Protoplasma*, 159, 179-182.

ANNEXES

ANNEXE I : METHODES DE CARACTERISATION DU POLYMORPHISME DES TRIACYLGLYCEROLS

A. Calorimétrie différentielle

1. Principe général

La microcalorimétrie différentielle (MCD) est une technique physique qui consiste à étudier le comportement thermique d'une substance. Le flux de chaleur à fournir ou à retirer d'un échantillon par rapport à une référence est mesuré en fonction de la température ou du temps alors que l'échantillon et la référence sont soumis de manière simultanée à un même programme temps – température contrôlé (McCarthy, 2006).

Pratiquement, deux types d'appareils peuvent être utilisés pour réaliser des analyses thermiques : les appareils basés sur la méthode des flux de chaleur et les appareils basés sur la compensation (Laye, 2002). Le premier type d'appareil mesure une différence de température entre l'échantillon et la référence placés dans un même four, c'est-à-dire recevant la même quantité d'énergie, alors que le deuxième type mesure une différence de chaleur entre la référence et l'échantillon régulés à la même température (**Figure A-1**).

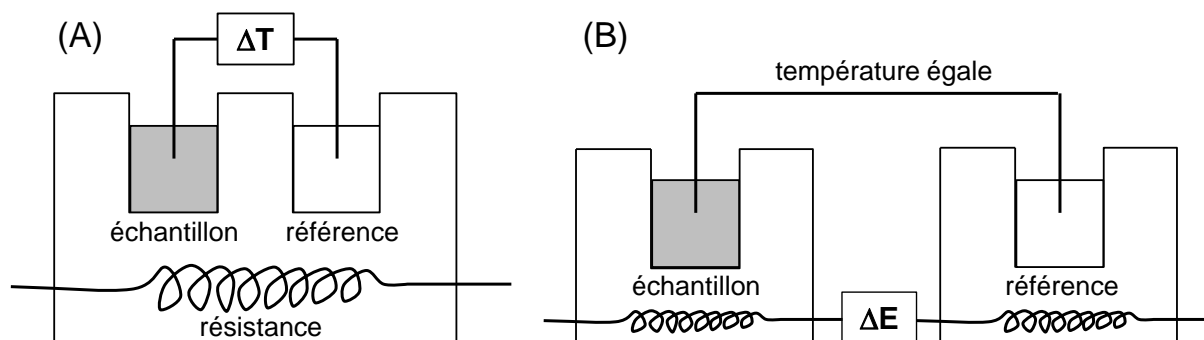


Figure A-1 : schématisation des deux types d'appareil d'analyse thermique. (A) l'appareil à flux de chaleur (une enceinte) mesure une différence de température entre la référence et l'échantillon (ΔT). (B) l'appareil à compensation (deux enceintes) mesure une différence d'énergie entre la référence et l'échantillon (ΔE) (adapté de Hatakeyama et Quinn, 1994).

Pour un appareil à compensation, en l'absence d'événement thermique, une différence d'énergie linéaire est enregistrée en fonction du temps entre la référence et l'échantillon, le signal enregistré dépend uniquement des capacités calorifiques de l'échantillon et de la référence. Lorsqu'un événement thermique se produit dans l'échantillon

(cristallisation, fusion, transition cristalline), la différence d'énergie à apporter ou retirer pour garder l'échantillon à la même température que la référence change et s'écarte de son évolution linéaire. Le signal alors enregistré par l'appareil est la différence d'énergie appliquée entre l'échantillon et la référence.

La mesure calorimétrique peut être effectuée lors d'une cinétique en température (refroidissement ou chauffage), ou lors d'une étape de statique en température. Le signal est alors représenté en fonction de la température ou du temps, respectivement, pour former un thermogramme (McCarthy, 2006). Des exemples de thermogrammes sont donnés en **Figure A-2**.

La microcalorimétrie différentielle est largement utilisée pour étudier le comportement thermique des matières grasses et de la matière grasse laitière en particulier, notamment pour déterminer des températures caractéristiques (température de début de cristallisation, de fin de fusion), mesurer des variations d'enthalpies de cristallisation, fusion, transition cristalline, étudier le polymorphisme, ou encore quantifier le taux de matière grasse solide en fonction de la température (McCarthy, 2006).

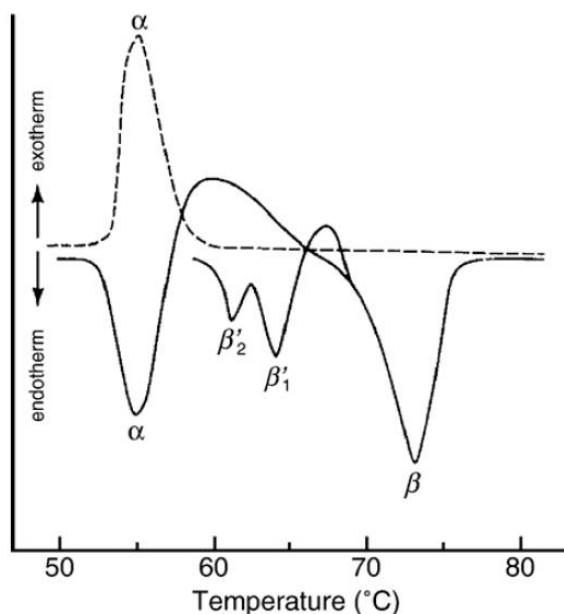


Figure A-2 : Thermogrammes typiques d'un triacylglycérol monoacide trisaturé, la tristéarine. Refroidissement à partir du fondu à 20°C/min de 80°C à 50°C (signal en trait pointillé), suivi d'un chauffage à 2,5°C/min de 50°C à 80°C (signal en trait continu). Les formes métastables intermédiaires β'_1 et β'_2 sont observées après stabilisation pendant 30 minutes légèrement au dessus du point de fusion de la forme α . (d'après Hagemann, 1988).

Cependant, il faut noter que même si certaines informations comme le domaine d'existence des formes polymorphiques des matières grasses, ou des vitesses de

cristallisation, peuvent être caractérisées par calorimétrie différentielle, les formes polymorphiques ne peuvent pas être identifiées de manière univoque à l'aide de la calorimétrie différentielle ; cela peut être fait par diffraction des rayons X ainsi que nous l'illustrerons peu après (Rossel, 2003 ; Lopez et Ollivon, 2009a).

2. Détermination du taux de matière grasse solide

Le taux de matière grasse solide est un des critères déterminant les propriétés de texture et fonctionnelles des produits (Wright *et al.*, 2001). Plusieurs techniques permettent d'estimer ce taux de matière grasse solide en fonction de la température.

La résonance magnétique nucléaire en champ pulsé (pRMN) est la technique actuelle la plus utilisée pour déterminer le taux de matière grasse solide pour des températures données. Cependant, la détermination du taux de matière grasse solide à différentes températures demande autant de mesures en pRMN que de points de températures, et s'avère donc très consommatrice en temps (Meagher *et al.*, 2007). En outre, cette technique permet d'avoir accès au taux de matière grasse solide en milieu anhydre, mais difficilement en présence d'eau à cause d'interférences de signaux.

Récemment, une méthode spectroscopique en proche infrarouge a montré des résultats prometteurs pour déterminer le taux de matière grasse solide dans la matière grasse laitière anhydre (Meagher *et al.*, 2007). Cette méthode rapide permettrait la mesure directement sur ligne de production de beurre. Là encore, cette méthode peut être utilisée dans le cadre d'échantillons de matière grasse anhydre, mais pas en milieu dilué ou complexe ou du moins demande des calibrations spécifiques pour ces milieux.

Des méthodes basées sur la mesure de l'atténuation de la vitesse du son ont été utilisées pour déterminer le taux de matière grasse solide en milieu anhydre (Singh *et al.*, 2002 ; Singh *et al.*, 2004) et dans des émulsions diluées (3% de matière grasse, Gülseren et Coupland, 2007b). Cependant, cette technique ne peut pas être utilisée lorsque le taux de solide est trop élevé car l'atténuation du signal devient trop importante (Saggin et Coupland, 2002 ; Martini *et al.*, 2005).

Enfin, la calorimétrie différentielle est une technique qui s'avère adaptée à la mesure du taux de matière grasse solide (Norris et Taylor, 1977 ; Lambelet, 1983). C'est une technique relativement rapide, permettant la mesure du taux de matière grasse solide à plusieurs températures à partir d'un seul thermogramme en fusion (Ozilgen *et al.*, 1993 ; Gülseren et Coupland, 2007b). Dans le cas de matières grasses complexes ayant des plages de

fusion larges, comme les triacylglycérols laitiers, il est nécessaire de corriger l'intégration du signal par les enthalpies de fusion des différentes familles de triacylglycérols afin de déterminer le taux de matière grasse solide en fonction de la température (Deroanne, 1977 ; Lambelet, 1983 ; Lavigne, 1995). Cette technique est suffisamment sensible pour être utilisée en milieu dilué (McClements *et al.*, 1993a) ainsi qu'en milieu complexe (Lopez *et al.*, 2006a).

B. Diffraction des rayons X

1. Principe général

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde λ est de l'ordre de l'Ångström (Å), soit 10^{-10} m. Cette longueur d'onde est du même ordre de grandeur que les distances caractéristiques entre les plans consécutifs des réseaux cristallins formés par les triacylglycérols (de 3 à 80 Å).

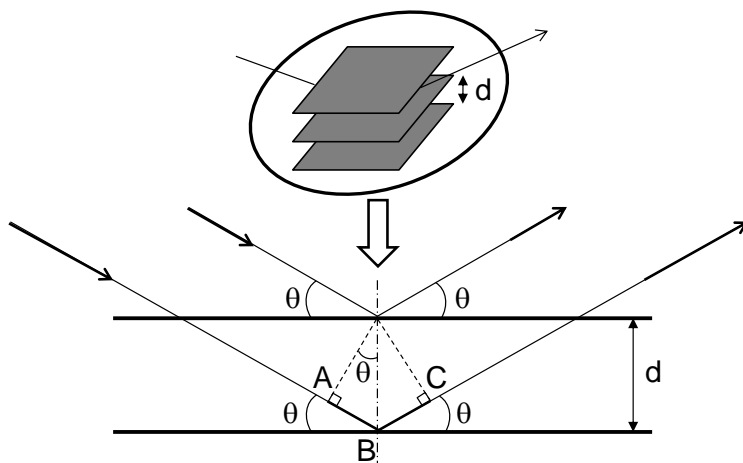


Figure A-3 : principe de la diffraction des rayons X par des plans cristallins ordonnés. Démonstration de la loi de Bragg.

La loi de Bragg stipule qu'il y a apparition d'interférences lors du bombardement d'un cristal par un rayonnement électromagnétique dont la longueur d'onde λ est proche de la distance inter-atomique du cristal étudié d . Les interférences sont constructives lorsque la différence de marche entre deux rayons parallèles issus de la même source est égale à un nombre entier de fois la longueur d'onde λ . Il en résulte l'apparition d'une figure de diffraction dans une direction particulière régie par la loi de Bragg. D'après la **Figure A-3**, la différence de chemin optique entre les deux rayons issus de la source est égale à : $AB + BC = 2 AB = 2 BC = 2d \sin\theta$. D'où la loi de Bragg : **$2d \sin\theta = n \lambda$ (Équation 16)**. Pratiquement,

l'intensité diffractée est représentée en fonction du vecteur de diffusion q exprimé en \AA^{-1} et relié à la loi de Bragg : $q = 4\pi \sin\theta / n\lambda = 2\pi / d$ (Équation 17).

La diffraction des rayons X permet d'avoir accès aux distances caractéristiques qui existent entre les plans atomiques des assemblages cristallins. En particulier pour les triacylglycérols, les distances réticulaires entre chaînes d'acides gras impliquées dans les organisations latérales (sub- α , α , β' , β) forment des pics de diffraction aux grands angles de diffraction ($16 - 25^\circ$). Les distances réticulaires associées aux empilements longitudinaux des chaînes d'acides gras ($2L$, $3L$) forment des signatures avec des pics de diffraction aux petits angles ($1 - 15^\circ$). Ainsi, la diffraction des rayons X permet d'accéder à l'organisation longitudinale et latérale des molécules de triacylglycérols (Figure A-4, Lopez *et al.*, 2007b).

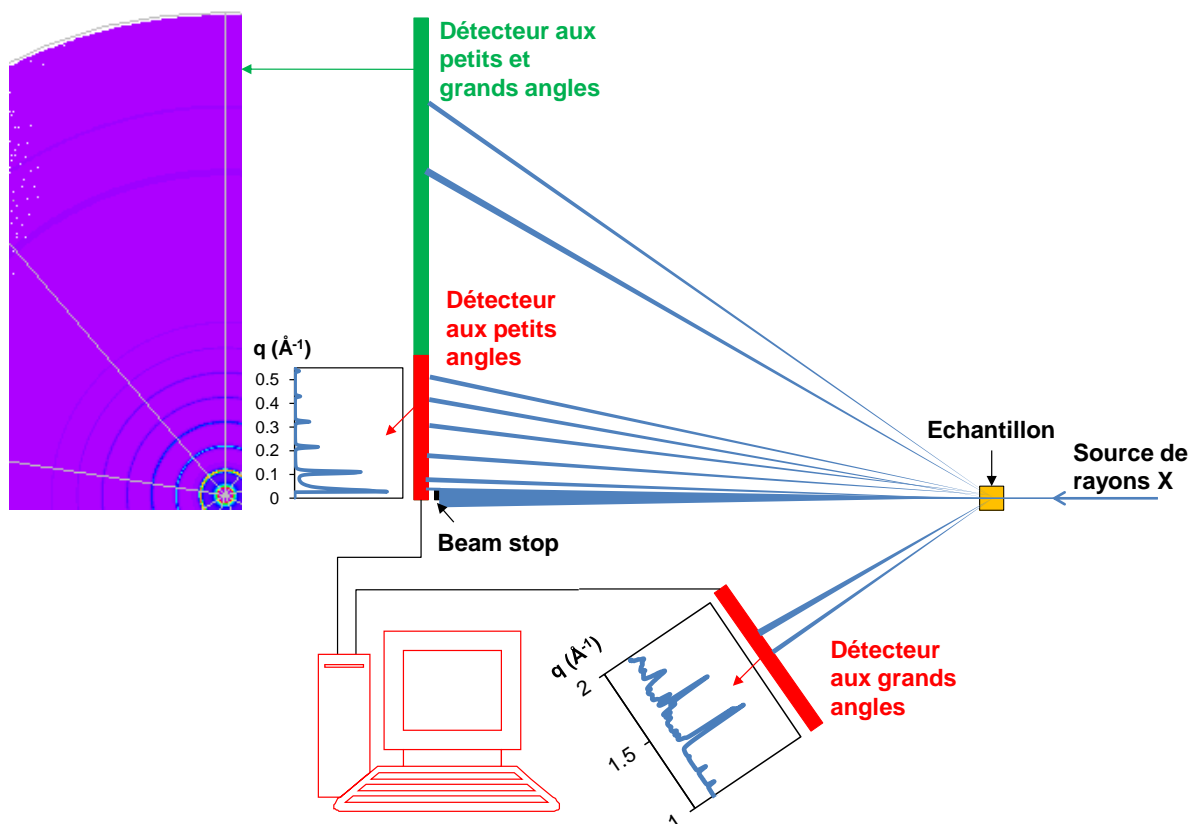


Figure A-4 : représentation schématique d'un diffractomètre de rayons X. Deux montages sont présentés : i) un montage avec un détecteur à deux dimensions (en vert) permettant l'acquisition de données aux petits et grands angles et ii) un montage avec deux détecteurs linéaires (en rouge) situés aux petits angles et aux grands angles. Le faisceau de rayons X incident et les pics de diffraction sont représentés en bleu (à partir de Ollivon *et al.*, 2006).

Les rayons X peuvent être générés par des sources conventionnelles ou des synchrotrons. Le principe général de l'utilisation des rayons X est le même entre les deux sources de génération. Cependant, les synchrotrons, qui sont des équipements de grande taille

(plusieurs dizaines ou centaines de mètres de diamètres), dans lesquels des électrons circulent dans une boucle de stockage à très grande vitesse, émettent un rayonnement continu de très forte intensité (**Figure A-5**). Ce rayonnement allant du proche infrarouge (3 mm) jusqu'aux rayons X durs (0,012 nm) au synchrotron SOLEIL situé en région parisienne, peut être contrôlé et dirigé vers des lignes de lumière tangentiellement orientée par rapport à la boucle de stockage afin d'utiliser une gamme de longueur d'onde d'intérêt, par exemple les rayons X. Le rayonnement synchrotron utilisé pour l'étude du polymorphisme des matières grasses est monochromatique, hautement collimaté et bénéficie d'une très forte brillance (Clegg, 2001) permettant l'acquisition rapide d'enregistrements, pour l'application de cinétiques résolues en temps (Sato, 2001 ; McCarthy, 2006).

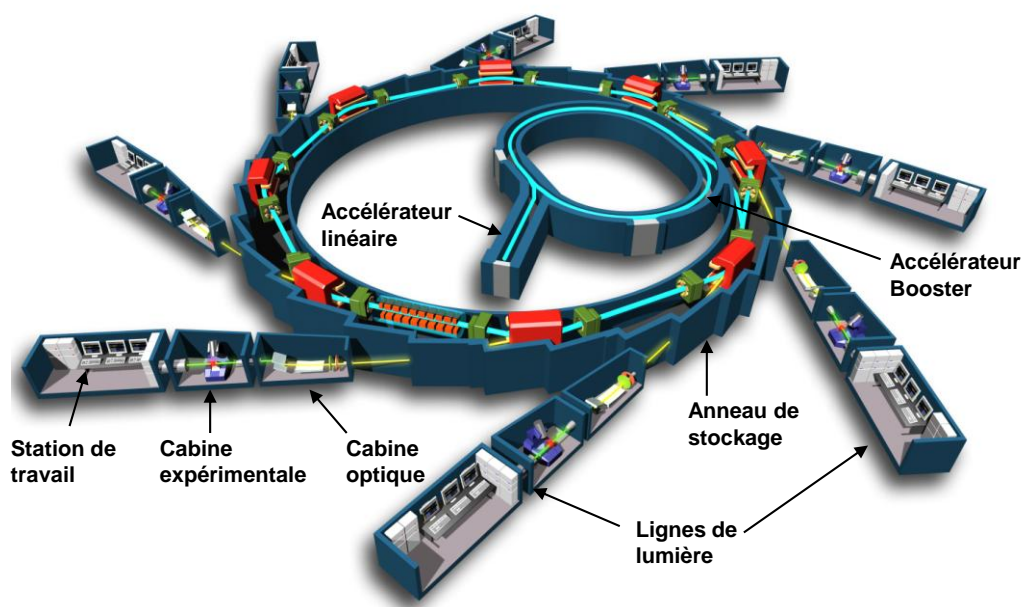


Figure A-5 : représentation schématique d'un synchrotron (d'après le site du synchrotron SOLEIL <http://www.synchrotron-soleil.fr>).

2. Signatures DRX des structures transversales adoptées par les triacylglycérols

Les critères de détermination des variétés polymorphiques à partir des données de diffraction des rayons X ont été définis par Larsson (1966). La forme α présente un pic unique de diffraction des rayons X vers 4,2 Å (Ghotra *et al.*, 2002). La forme sub- α présente un pic intense vers 4,15 Å et un signal large plus diffus vers 3,80 Å. La forme β' présente généralement deux pics à 4,2-4,3 et 3,7-4,0 Å (Ghotra *et al.*, 2002), le pic vers 3,80 Å étant intense, celui à 4,20 Å étant plus diffus (Lopez *et al.*, 2002a), ce qui permet de la différencier de la forme sub- α . La forme β est une forme ne présentant pas les critères des formes α et β' .

Elle doit cependant présenter un pic intense vers 4,60 Å, accompagné éventuellement d'un doublet vers 3,90 Å.

La **Figure A-6** présente un aperçu des signaux de DRX produits par les différentes formes polymorphiques adoptées par les triacylglycérols (ici, ce sont des triacylglycérols d'origine laitière).

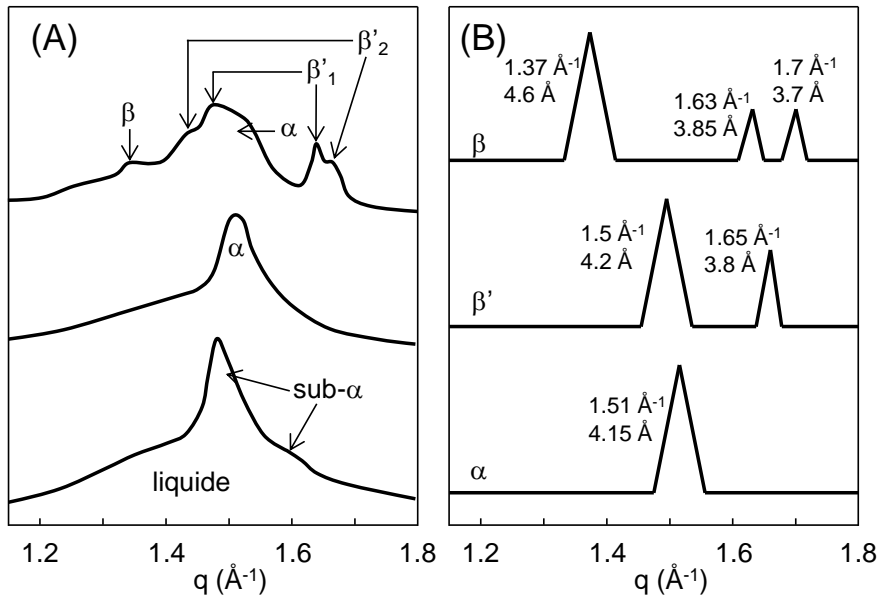


Figure A-6 : (A) signatures en diffraction des rayons X des différentes formes polymorphiques adoptées par les triacylglycérols laitiers suivant leur passé thermique (adapté de Lopez *et al.*, 2005a) (B) et leur représentation schématique (d'après Bunjes et Unruh, 2007). Les valeurs de q (\AA^{-1}) et d (\AA) au maximum de chaque pic sont indiquées sur la figure.

3. Signatures DRX des structures longitudinales adoptées par les triacylglycérols

Les signatures en DRX des structures longitudinales adoptées par les triacylglycérols sont la résultante de la longueur de répétition de la structure et d'un facteur de forme. La signature de diffraction des rayons X d'une structure longitudinale lamellaire est constituée de pics harmoniques dont le premier ordre se situera à un angle (ou vecteur de diffusion q) caractéristique de l'épaisseur de la structure, suivant la loi de Bragg. Les ordres supérieurs se situeront à des angles (ou vecteurs de diffusion q) multiples entiers de l'ordre 1.

Le facteur de forme conditionne les intensités relatives des différents ordres de diffraction et dépend de la répartition de la densité électronique au sein de la structure. De cette manière, les structures 2L présentent des signatures où l'intensité diffractée est très intense pour le 1^{er} ordre, très faible pour le 2^{ème} et faible pour le 3^{ème}, alors que les structures 3L présentent des signatures où l'intensité diffractée est intense pour le 1^{er} ordre, très intense

pour le 2^{ème} faible pour le 3^{ème}, très faible pour le 4^{ème} et faible pour le 5^{ème}. La **Figure A-7** présente ces signatures de façon schématique.

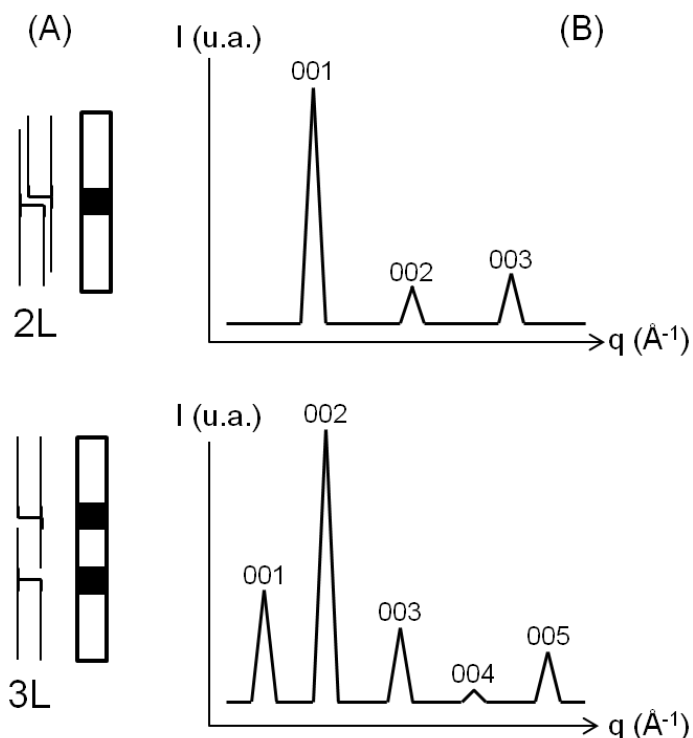


Figure A-7 : (A) répartition de la densité électronique dans les structures triglycéridiques 2L et 3L. **Partie gauche :** représentation schématique des structures longitudinales de triacylglycérols (glycérol en trait épais, chaînes alyphatiques en trait fin), **partie droite :** représentation de la densité électronique (noir : zones très électronégatives, blanc : zones peu électronégatives). (B) signatures en diffraction des rayons X des 2 principales structures longitudinales adoptées par les triacylglycérols (2L en haut, 3L en bas). (d'après Mykhaylyk et Hamley, 2004)

Le couplage entre la calorimétrie différentielle et la diffraction des rayons X (Ollivon *et al.*, 2006) est un outil d'étude du polymorphisme des triacylglycérols très complet. En effet, les transitions polymorphiques peuvent être étudiées en dynamique au cours de cinétiques en température ou lors de périodes transitoires à l'aide de cet outil. De plus, l'utilisation de sources de rayons X intenses telles que le rayonnement synchrotron permettent des enregistrements successifs rapides. En outre, le comportement thermique de cristallisation et de fusion peut être enregistré en même temps que l'acquisition de données sur la structure des cristaux formés, et ainsi être mieux compris.

Un couplage entre la diffraction des rayons X et une cellule de Couette a vu le jour ces dernières années avec les travaux de Mazzanti *et al.* (2003) et Mazzanti (2004). Ces travaux ont permis d'étudier le polymorphisme de matières grasses d'intérêt industriel

(matière grasse laitière, beurre de cacao, huile de palme) dans des conditions de cisaillement comparables à celles pouvant être rencontrées en industrie.

C. Autres techniques

1. Diffraction de neutrons

Elle a été utilisée en particulier par Cebula *et al.* (1992) pour apporter des éléments de caractérisation de l'organisation des triacylglycérols à l'état liquide. Elle a également servi de base d'étude pour déterminer les mouvements moléculaires des différentes formes polymorphiques de la tristéarine (Takechi *et al.*, 2007).

2. Spectroscopie infra-rouge

La spectroscopie infra-rouge a été peu utilisée dans le domaine des matières grasses malgré son usage courant dans l'industrie agroalimentaire. Chapman (1962) a utilisé la spectroscopie d'absorption infrarouge pour identifier les formes polymorphiques adoptées par les triacylglycérols. Il montre que la forme α est caractérisée par un pic à 720 cm^{-1} , la forme β' par un doublet à 728 et 718 cm^{-1} et la forme β par un pic à 717 cm^{-1} . Cette technique a également été utilisée par Yano *et al.* (1997a et 1997b) pour étudier le polymorphisme des triacylglycérols. En particulier, le développement récent des appareils à transformée de Fourier a permis de mesurer des spectres infrarouge à l'aide de méthodes plus informatives que les méthodes conventionnelles (Yano et Sato, 1999).

3. Résonance magnétique nucléaire

Bociek *et al.* (1985) mettent en évidence le polymorphisme des triacylglycerols par RMN pour la première fois en réalisant les spectres RMN du solide des trois formes polymorphiques principales de la tripalmitine (**Figure A-8**).

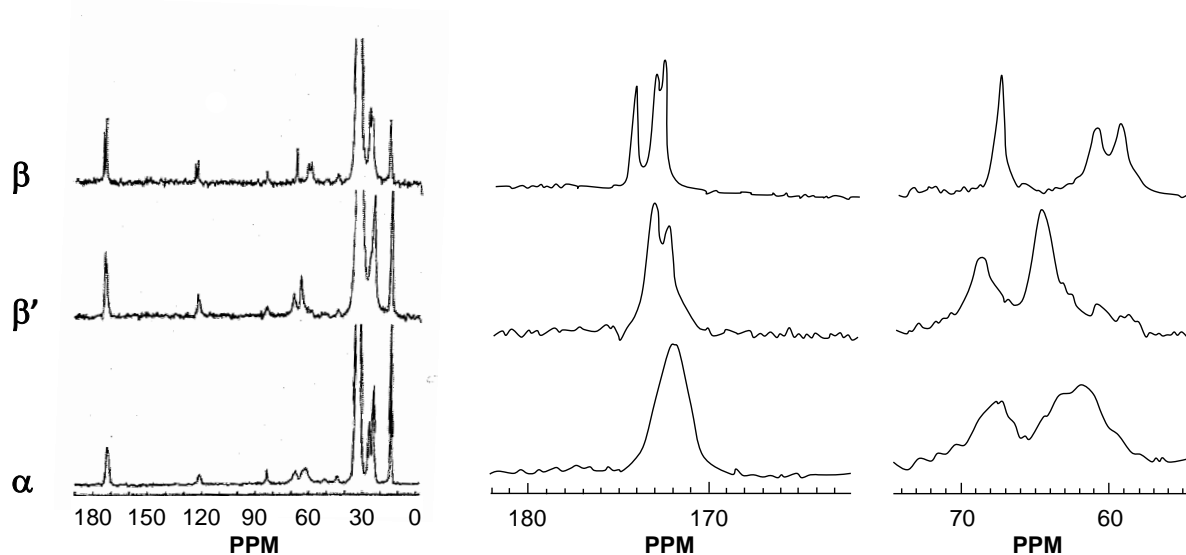


Figure A-8 : spectres RMN de ^{13}C (gauche) de la tripalmitine sous forme α (bas), β' (milieu) et β (haut). Les figures du centre et de droite sont des agrandissements des régions du carbonyle (170-180 ppm) et du glycérol (60-70 ppm), respectivement (d'après Bociek *et al.*, 1985).

Plus tard, des études sur les paramètres de relaxation que sont le temps de relaxation de la composante longitudinale (T_1) et le second moment dipolaire (M_2) permettent de montrer qu'il est possible de différencier les polymorphes a et b (Norton *et al.*, 1985 ; van Duynhoven *et al.*, 2002). Enfin, Adam-Berret (2009) étudie le polymorphisme de triacylglycérols par RMN en fonction de la température et de la longueur des chaînes d'acides gras.

ANNEXE II : COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES MATIERES GRASSES UTILISEES

Tableau A-1 : composition en acides gras des matières grasses B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, B9 et B10 (moyenne ± écart-type). Seuls les acides gras dont la teneur est supérieure à 0,5% sont représentés.

	B1	B2	B3	B5	B6	B7	B8	B9	B10
C4:0	1,77 ± 0,18	1,19 ± 0,20	1,43 ± 0,21	1,50 ± 0,11	1,29 ± 0,06	1,29 ± 0,09	1,60 ± 0,17	1,09 ± 0,18	1,11 ± 0,10
C6:0	1,43 ± 0,13	0,75 ± 0,10	0,92 ± 0,13	1,33 ± 0,04	0,90 ± 0,04	0,89 ± 0,04	1,25 ± 0,06	0,70 ± 0,09	0,72 ± 0,05
C8:0	1,00 ± 0,08	0,46 ± 0,04	0,56 ± 0,07	1,03 ± 0,02	0,61 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,89 ± 0,02	0,42 ± 0,03	0,43 ± 0,03
C10:0	2,39 ± 0,15	1,03 ± 0,06	1,22 ± 0,12	2,76 ± 0,04	1,43 ± 0,09	1,42 ± 0,06	2,18 ± 0,03	0,91 ± 0,01	0,91 ± 0,08
C12:0	3,17 ± 0,17	1,54 ± 0,06	1,67 ± 0,11	3,91 ± 0,12	1,99 ± 0,16	1,99 ± 0,10	3,00 ± 0,03	1,27 ± 0,04	1,22 ± 0,10
C14:0	12,33 ± 0,21	7,60 ± 0,18	7,79 ± 0,23	14,00 ± 0,26	9,12 ± 0,40	9,05 ± 0,28	11,85 ± 0,26	6,49 ± 0,39	6,2 ± 0,52
C14:1,c9	0,74 ± 0,03	0,59 ± 0,03	0,40 ± 0,01	0,99 ± 0,08	0,55 ± 0,14	0,64 ± 0,04	0,83 ± 0,01	0,47 ± 0,03	0,31 ± 0,03
C15:0	1,04 ± 0,02	0,83 ± 0,01	0,93 ± 0,01	1,20 ± 0,10	0,85 ± 0,05	0,81 ± 0,02	1,14 ± 0,04	1,01 ± 0,07	0,96 ± 0,06
C16:0	35,02 ± 0,27	21,61 ± 0,59	20,74 ± 0,32	37,51 ± 1,60	24,99 ± 1,34	23,24 ± 0,63	34,83 ± 1,05	18,98 ± 0,21	19,21 ± 0,08
C16:1,c9	1,17 ± 0,02	0,91 ± 0,07	0,65 ± 0,02	1,33 ± 0,14	0,92 ± 0,10	0,93 ± 0,34	1,29 ± 0,01	0,85 ± 0,04	0,77 ± 0,10
C17:0	0,57 ± 0,03	0,44 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,51 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,60 ± 0,04	0,52 ± 0,01	0,52 ± 0,04
C18:0	11,24 ± 0,19	11,22 ± 0,20	11,92 ± 0,67	9,52 ± 1,03	16,88 ± 1,34	14,86 ± 0,44	11,89 ± 0,50	16,65 ± 0,66	17,33 ± 0,54
C18:1,t6-9	0,68 ± 0,03	1,94 ± 0,52	1,80 ± 0,24	0,54 ± 0,06	1,54 ± 0,06	1,24 ± 0,10	0,38 ± 0,02	2,64 ± 0,31	1,34 ± 0,15
C18:1,t10	0,45 ± 0,08	3,28 ± 0,59	2,79 ± 0,32	0,31 ± 0,05	1,28 ± 0,13	1,51 ± 0,29	0,37 ± 0,07	2,28 ± 0,33	2,07 ± 0,12
C18:1,t11	1,79 ± 0,14	10,59 ± 0,94	13,53 ± 0,82	1,07 ± 0,18	2,60 ± 0,36	5,08 ± 0,19	1,58 ± 0,08	4,66 ± 0,82	9,20 ± 1,34
C18:1,c9	20,52 ± 0,56	27,18 ± 1,04	23,53 ± 0,95	19,31 ± 0,49	30,76 ± 0,42	30,42 ± 0,69	22,14 ± 1,18	35,21 ± 0,77	30,56 ± 1,86
C18:2,t9,12	0,47 ± 0,02	0,68 ± 0,11	1,59 ± 0,08	0,22 ± 0,04	0,39 ± 0,02	0,92 ± 0,03	0,45 ± 0,02	0,82 ± 0,03	1,49 ± 0,05
C18:2,c9,12	1,51 ± 0,05	1,55 ± 0,02	1,20 ± 0,06	1,26 ± 0,04	1,07 ± 0,05	1,17 ± 0,07	1,34 ± 0,04	1,06 ± 0,08	1,07 ± 0,09
C18:3,c9,12,15	0,55 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,44 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,76 ± 0,07	0,51 ± 0,01	0,52 ± 0,01
C18:2,c9,t11	0,78 ± 0,06	5,36 ± 0,57	5,45 ± 0,19	0,50 ± 0,14	1,31 ± 0,09	2,32 ± 0,27	0,77 ± 0,06	2,46 ± 0,25	3,34 ± 0,42

Annexes

Tableau A-2 : composition en acides gras des matières grasses Industriel, Blé, Colza, Herbe-blé et Herbe-colza (moyenne \pm écart-type). Seuls les acides gras dont la teneur est supérieure à 0,5% sont représentés.

	Industriel	Blé	Colza	Herbe-blé	Herbe-colza
C4:0	3,32 \pm 0,19	3,22 \pm 0,25	3,34 \pm 0,22	2,14 \pm 0,07	2,14 \pm 0,14
C6:0	1,91 \pm 0,09	1,80 \pm 0,07	1,73 \pm 0,08	1,65 \pm 0,03	1,64 \pm 0,03
C8:0	0,99 \pm 0,03	0,91 \pm 0,02	0,84 \pm 0,03	1,04 \pm 0,01	1,01 \pm 0,01
C10:0	2,27 \pm 0,04	2,01 \pm 0,03	1,79 \pm 0,03	2,54 \pm 0,02	2,39 \pm 0,02
C12:0	3,19 \pm 0,05	2,73 \pm 0,03	2,39 \pm 0,03	3,42 \pm 0,03	3,16 \pm 0,03
C14:0	11,43 \pm 0,08	10,44 \pm 0,06	9,77 \pm 0,13	11,38 \pm 0,08	11,02 \pm 0,09
C14:1,c9	1,00 \pm 0,01	1,08 \pm 0,02	0,99 \pm 0,04	1,06 \pm 0,01	0,99 \pm 0,01
C15:0	1,09 \pm 0,01	1,09 \pm 0,01	0,94 \pm 0,01	1,41 \pm 0,01	1,24 \pm 0,02
C16:0	35,62 \pm 0,22	30,07 \pm 0,31	25,92 \pm 0,54	28,92 \pm 0,63	26,15 \pm 0,56
C16:1,c9	1,99 \pm 0,03	1,96 \pm 0,04	1,76 \pm 0,03	1,50 \pm 0,02	1,36 \pm 0,01
C17:0	0,57 \pm 0,01	0,58 \pm 0,01	0,53 \pm 0,01	0,69 \pm 0,01	0,65 \pm 0,01
C18:0	10,32 \pm 0,20	11,61 \pm 0,14	12,65 \pm 0,33	10,72 \pm 0,14	11,73 \pm 0,13
C18:1,t6-9	0,54 \pm 0,02	1,11 \pm 0,03	1,73 \pm 0,09	0,88 \pm 0,01	1,27 \pm 0,04
C18:1,t10	0,50 \pm 0,12	1,03 \pm 0,12	1,46 \pm 0,31	0,57 \pm 0,19	1,02 \pm 0,48
C18:1,t11	0,87 \pm 0,09	1,29 \pm 0,08	2,21 \pm 0,28	2,40 \pm 0,29	2,40 \pm 0,46
C18:1,c9	20,28 \pm 0,23	24,25 \pm 0,08	26,58 \pm 0,5	23,88 \pm 0,47	25,78 \pm 0,65
C18:2,t9,12	0,26 \pm 0,02	0,38 \pm 0,02	0,44 \pm 0,02	0,56 \pm 0,04	0,61 \pm 0,02
C18:2,c9,12	1,63 \pm 0,06	1,70 \pm 0,03	1,70 \pm 0,02	1,72 \pm 0,05	1,78 \pm 0,06
C18:3,c9,12,15	0,24 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01	0,68 \pm 0,04	0,68 \pm 0,03
C18:2,c9,t11	0,44 \pm 0,01	0,76 \pm 0,03	1,20 \pm 0,04	1,13 \pm 0,03	1,29 \pm 0,05

ANNEXE III : DIAGRAMMES DE DIFFRACTION DES RAYONS X ENREGISTRÉS AU REFROIDISSEMENT DES CREMES AUTRES QUE B8 ET B10

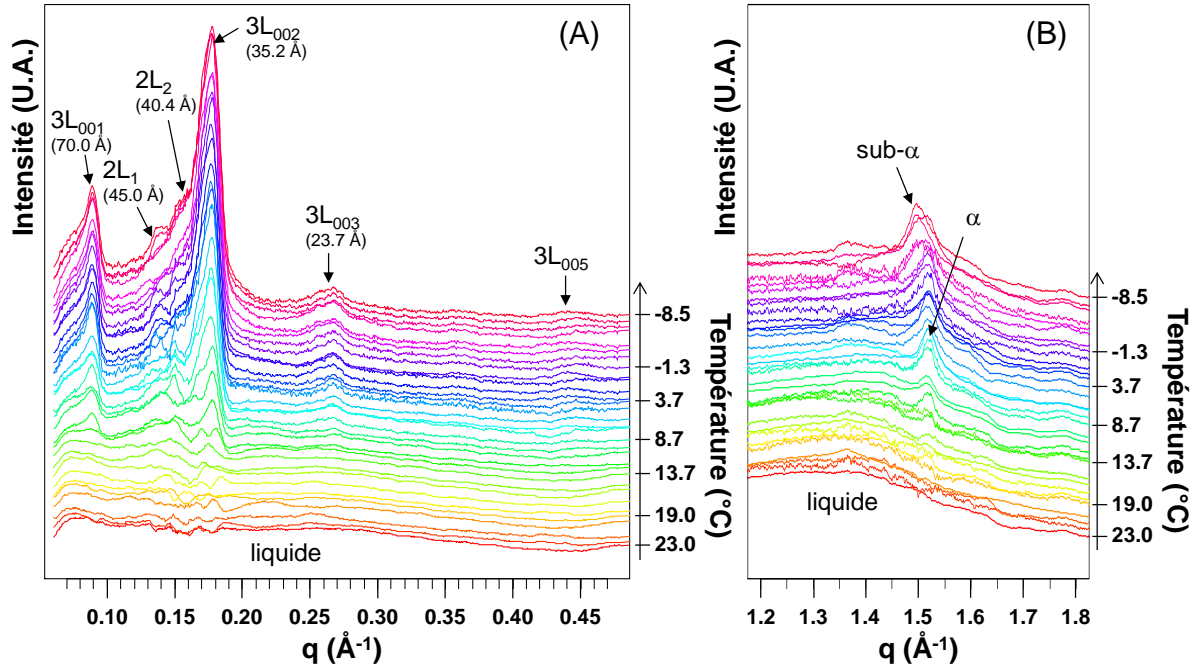


Figure A-9 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du refroidissement de la crème B1 de 60°C à -7°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

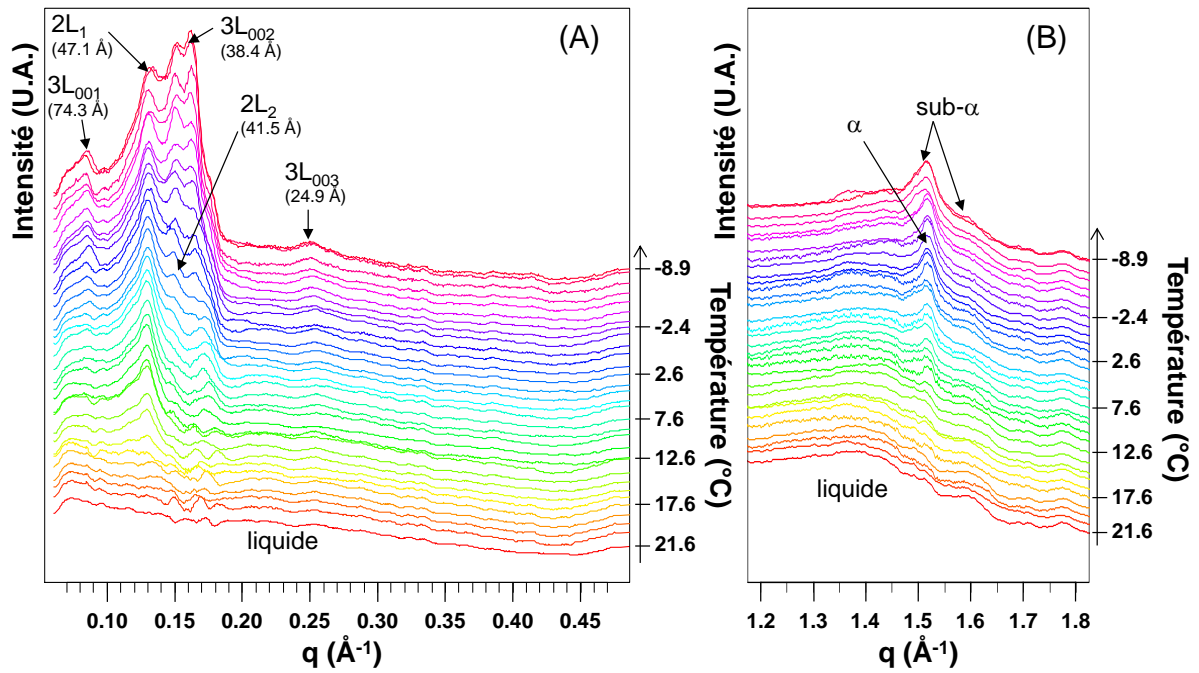


Figure A-10 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du refroidissement de la crème B2 de 60°C à -7°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

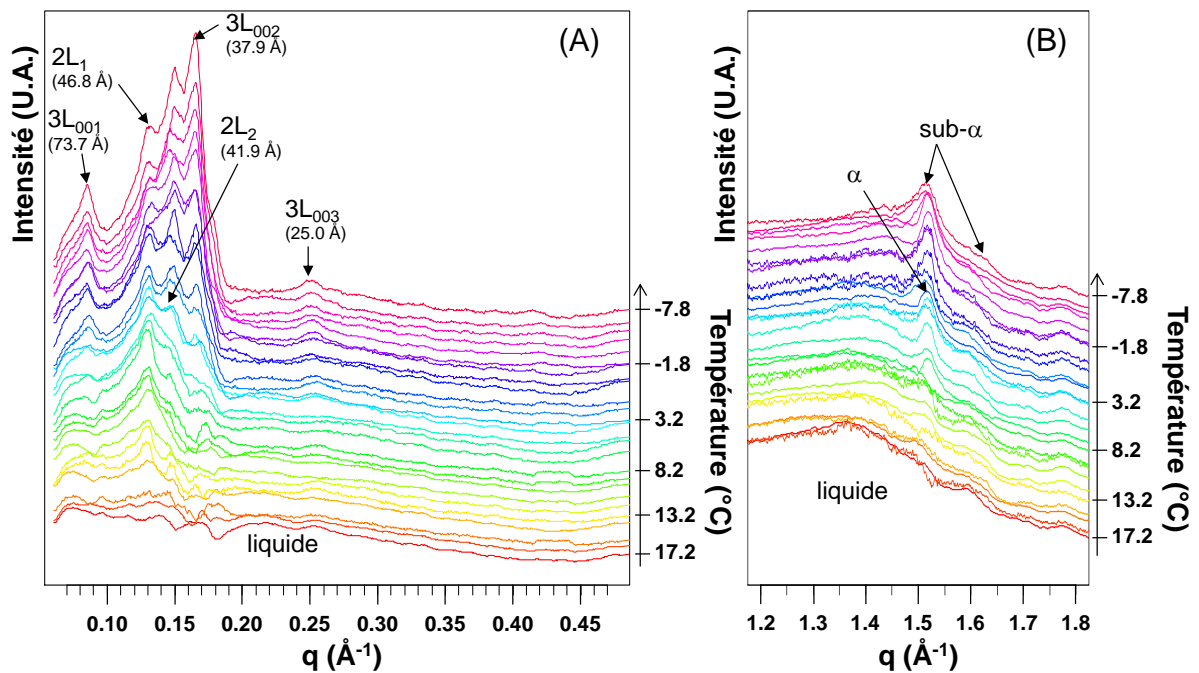


Figure A-11 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du refroidissement de la crème B3 de 60°C à -7°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

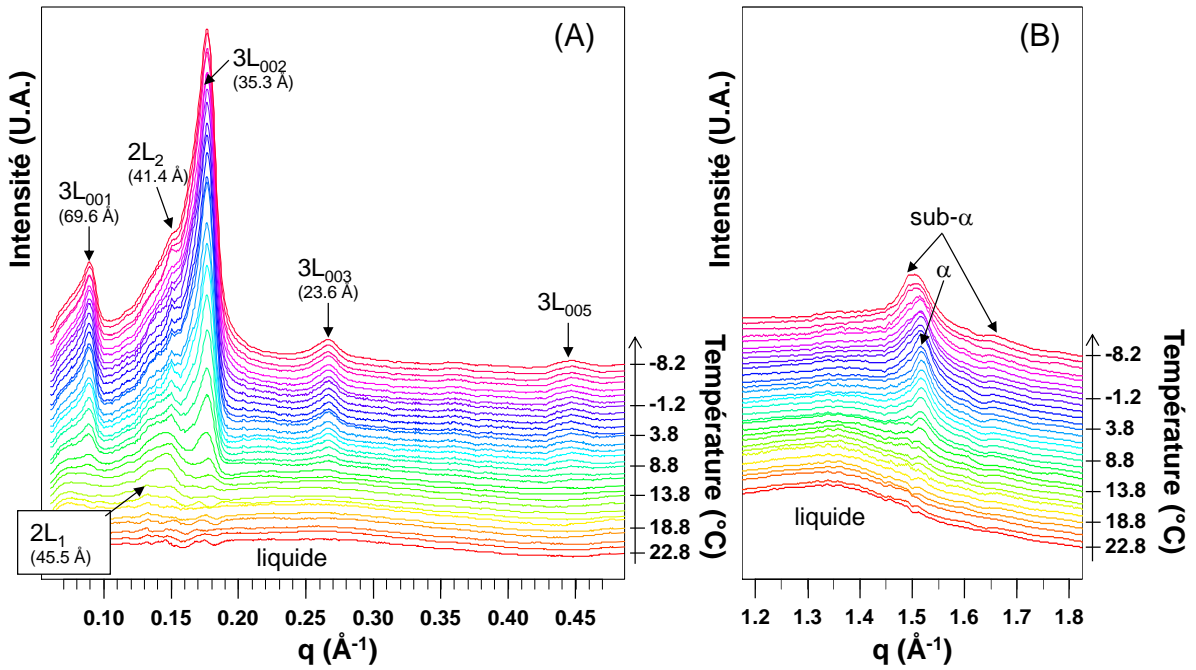


Figure A-12 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du refroidissement de la crème B5 de 60°C à -7°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

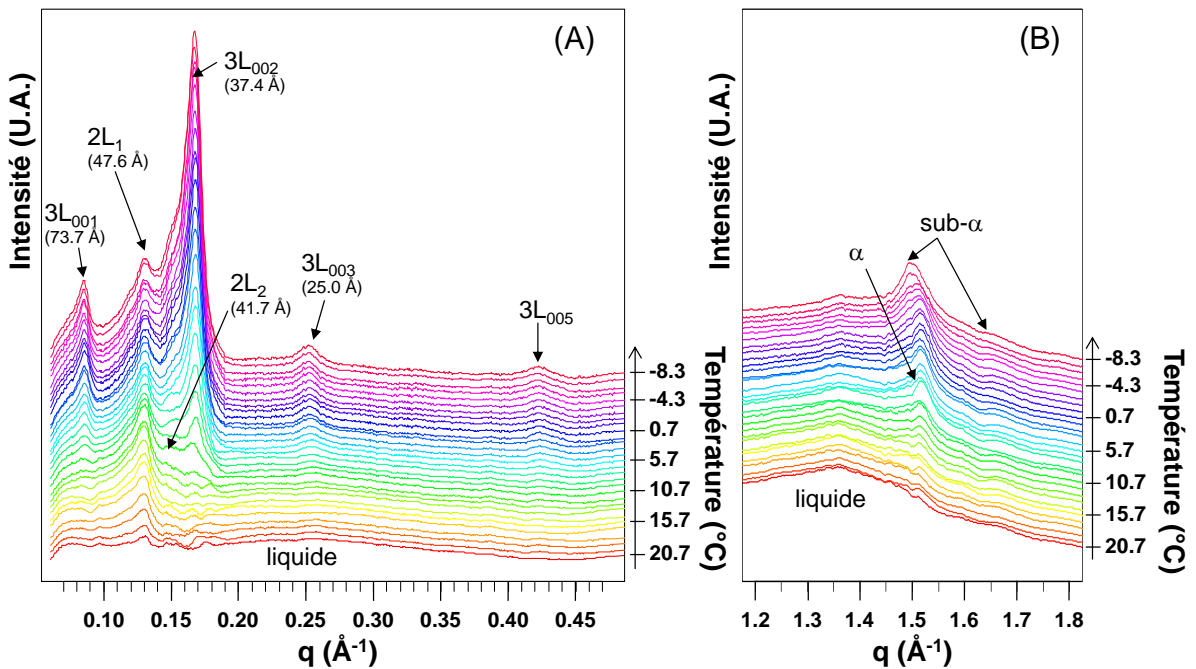


Figure A-13 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du refroidissement de la crème B6 de 60°C à -7°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

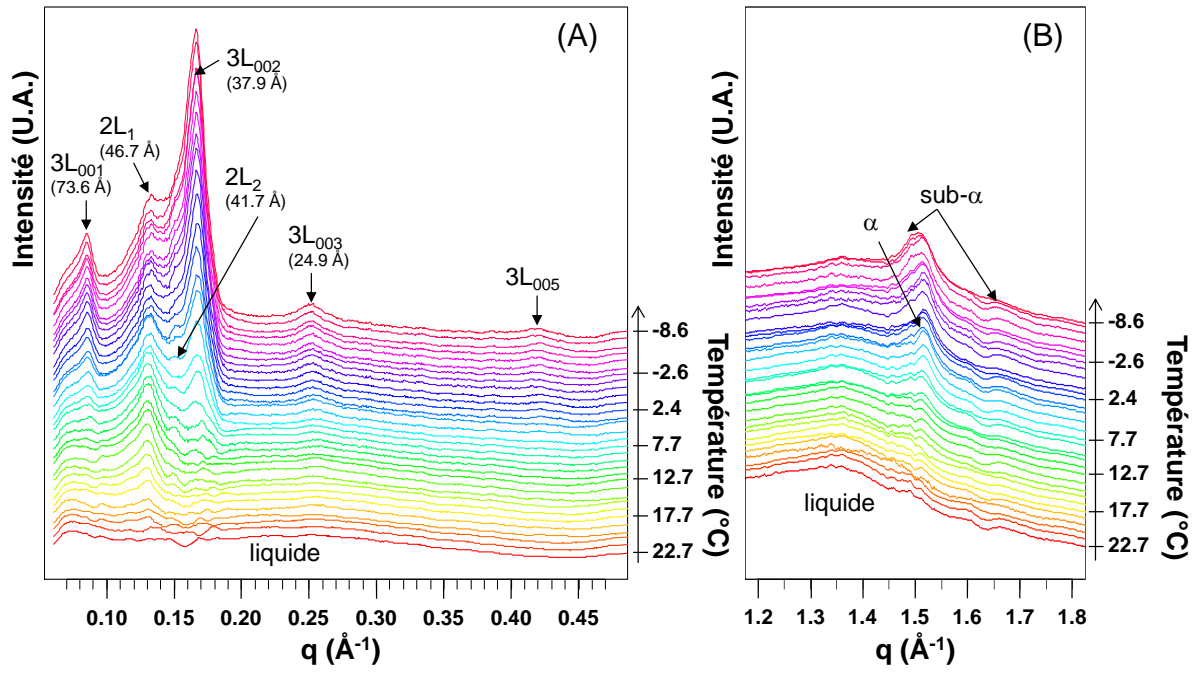


Figure A-14 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du refroidissement de la crème B7 de 60°C à -7°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

ANNEXE IV : DIAGRAMMES DE DIFFRACTION DES RAYONS X ENREGISTRÉS AU CHAUFFAGE DES CREMES AUTRES QUE B8 ET B10

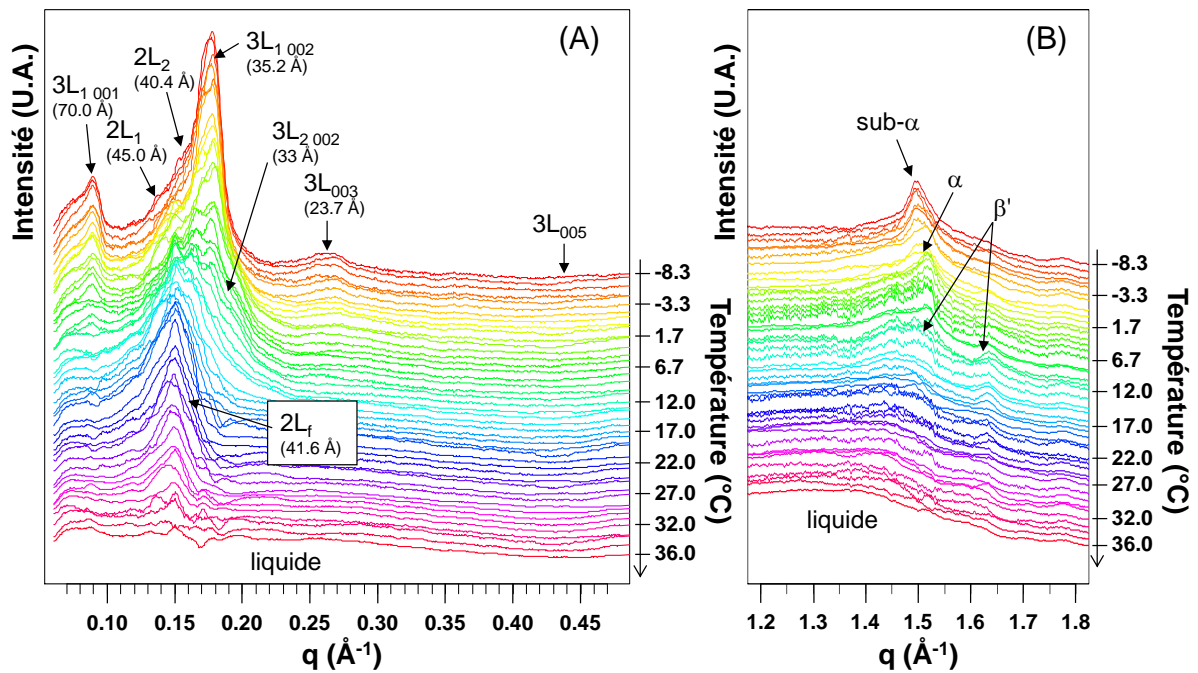


Figure A-15 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du chauffage de la crème B1 de -7°C à 60°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

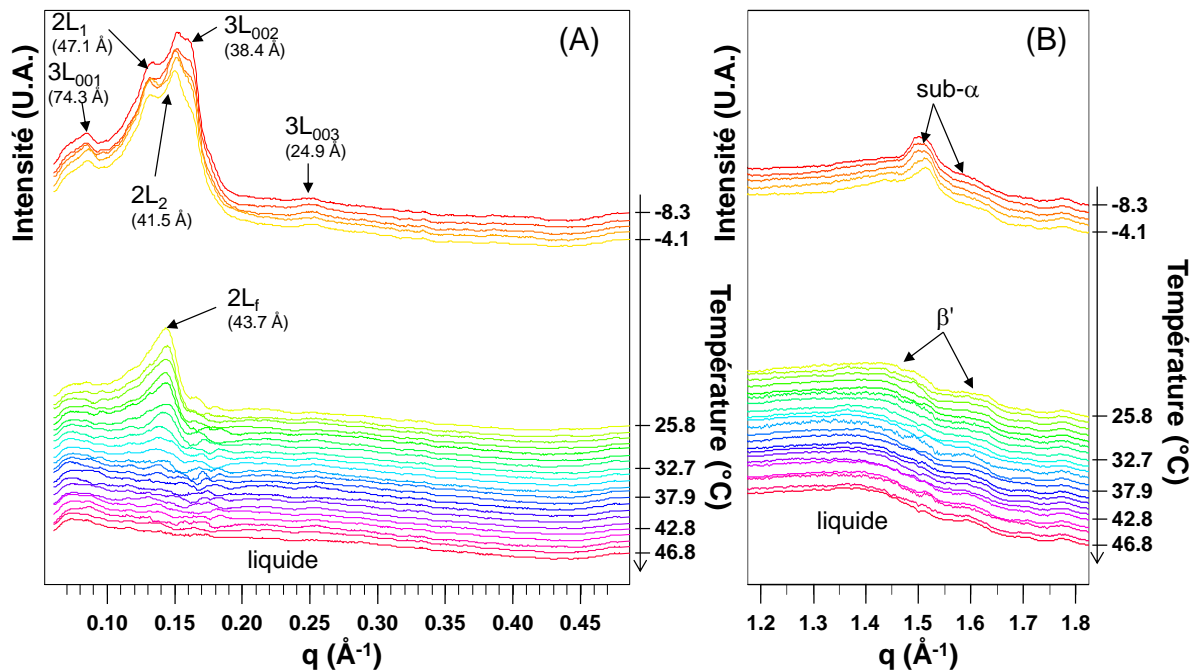


Figure A-16 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du chauffage de la crème B2 de -7°C à 60°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure. L'enregistrement des rayons X a

rencontré un problème entre -4°C et 26°C , ce qui explique l'absence de diagramme dans cette gamme de température.

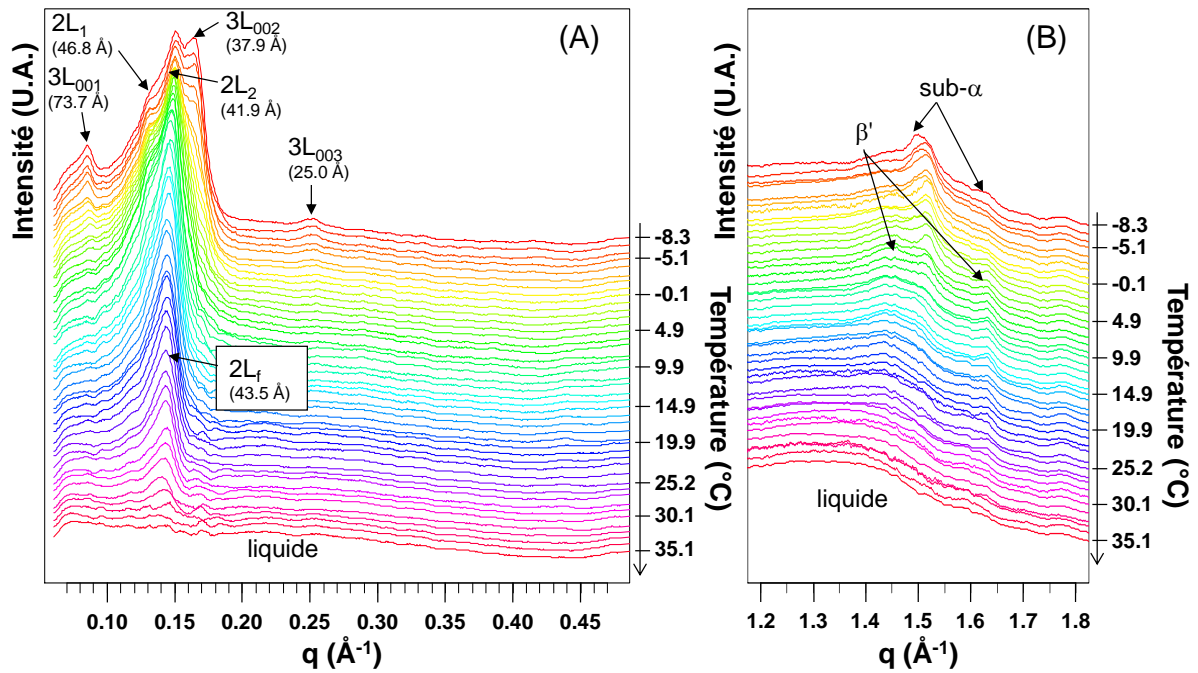


Figure A-17 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du chauffage de la crème B3 de -7°C à 60°C à $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

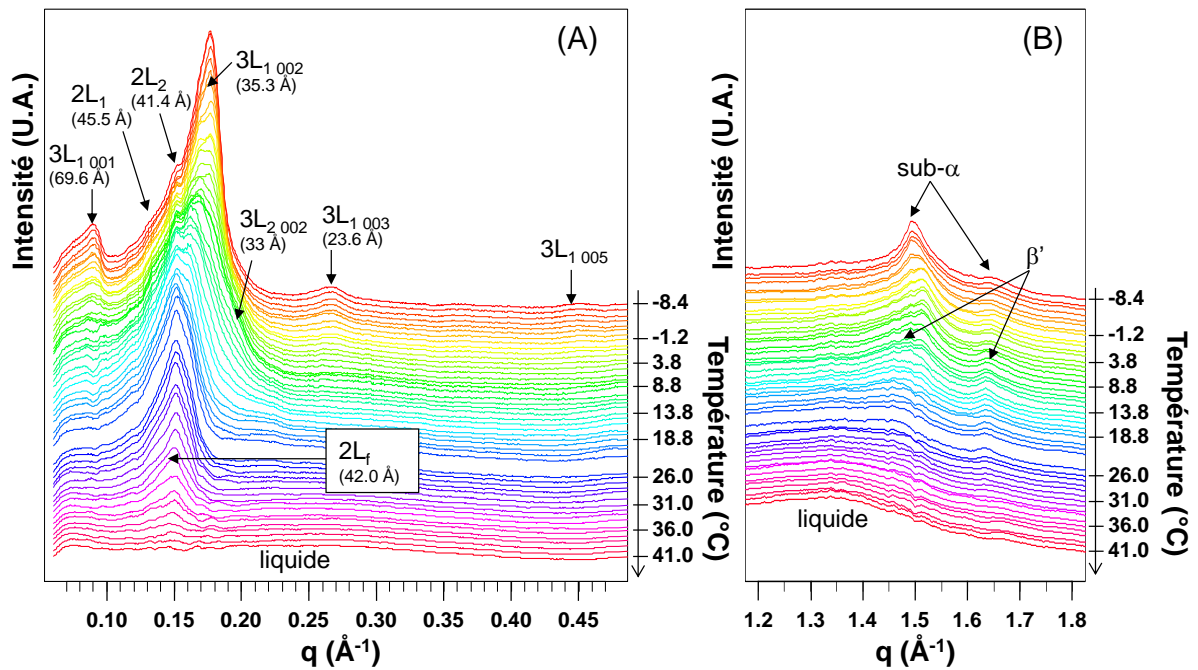


Figure A-18 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du chauffage de la crème B5 de -7°C à 60°C à $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

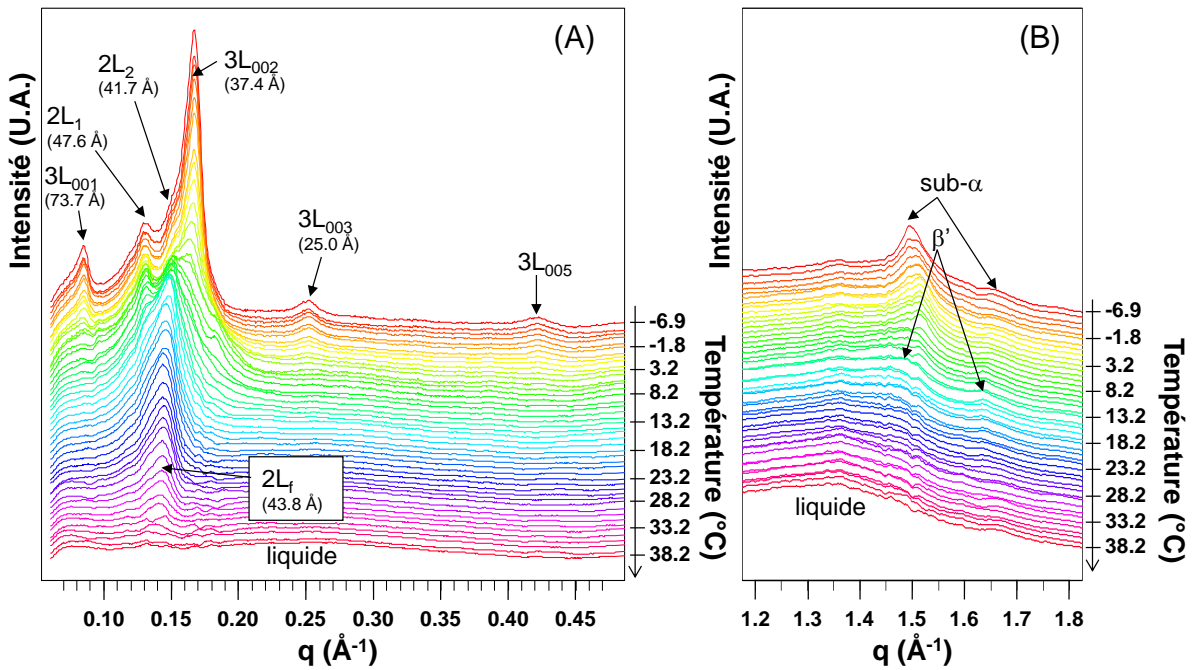


Figure A-19 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du chauffage de la crème B6 de -7°C à 60°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

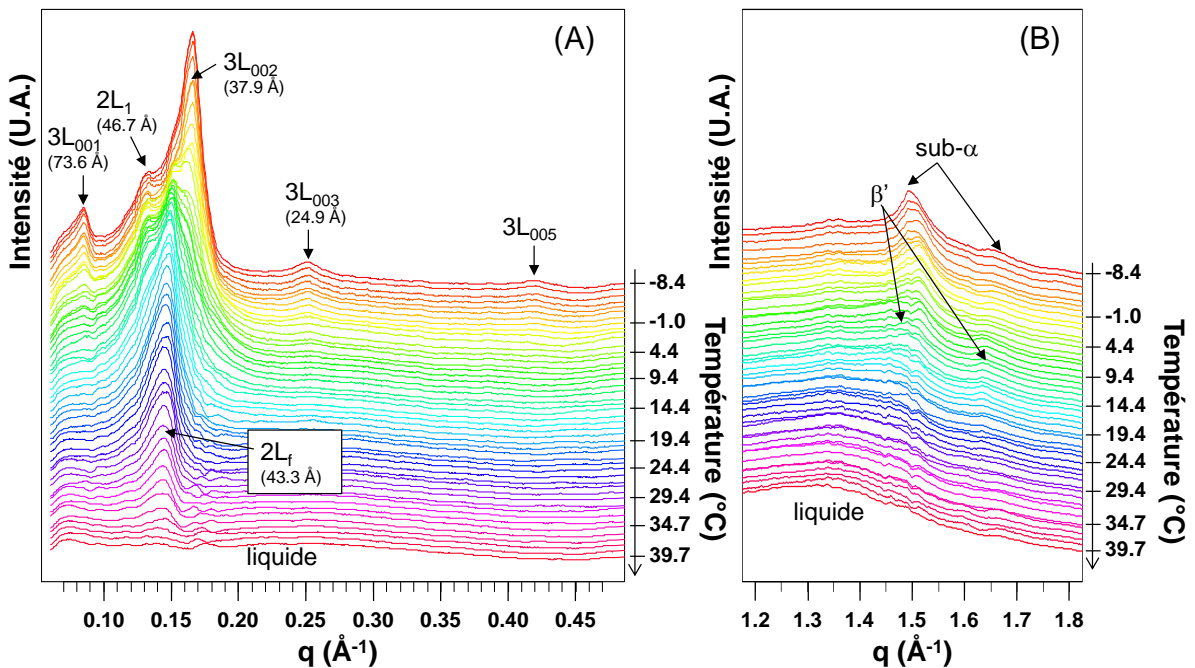


Figure A-20 : diagrammes de DRXT enregistrés au cours du chauffage de la crème B7 de -7°C à 60°C à 0,5°C/min aux petits (A) et grands angles de diffraction (B). Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

ANNEXE V : DIAGRAMMES DE DIFFRACTION DES RAYONS X ENREGISTRES AU CHAUFFAGE DEPUIS 4°C DES CREMES AUTRES QUE B8 ET B10

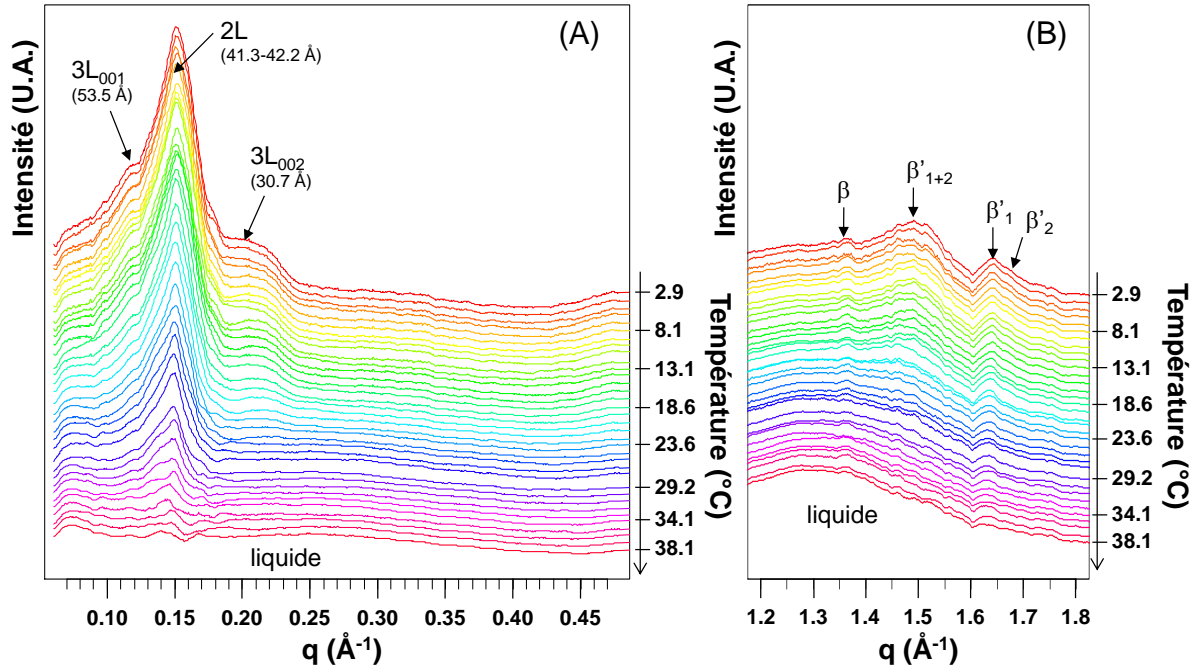


Figure A-21 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours du chauffage de la crème B1 de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après stockage de $t > 48$ h à 4°C. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

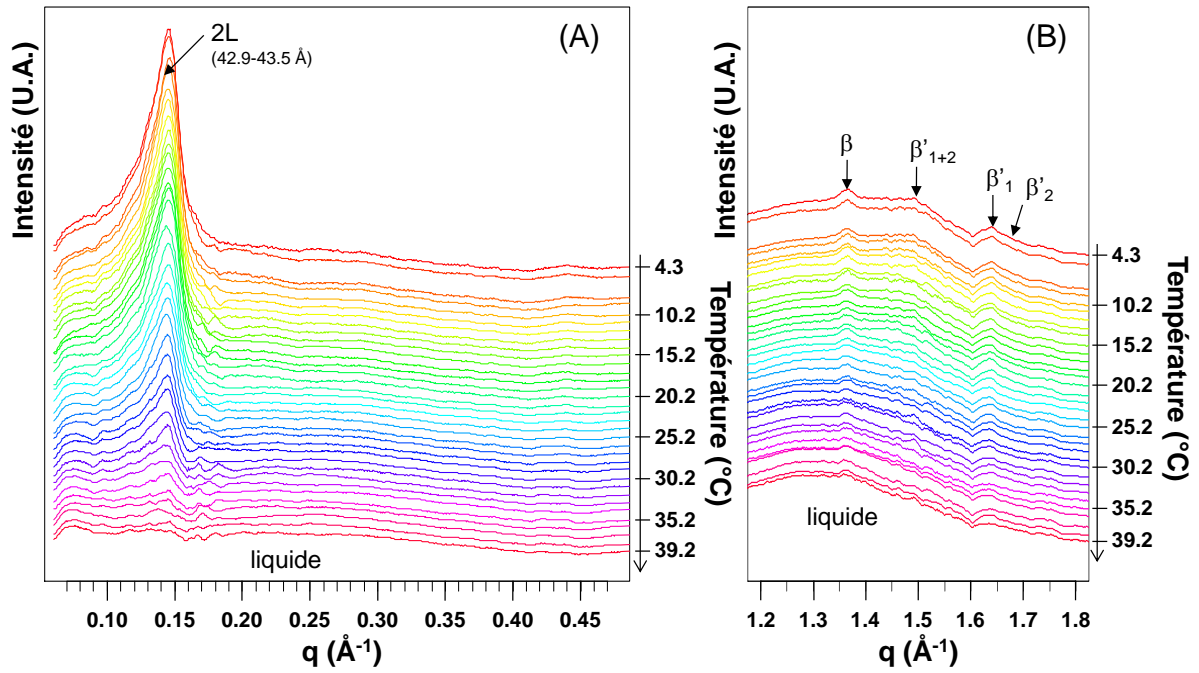


Figure A-22 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours du chauffage de la crème B2 de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après stockage de $t > 48$ h à 4°C. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

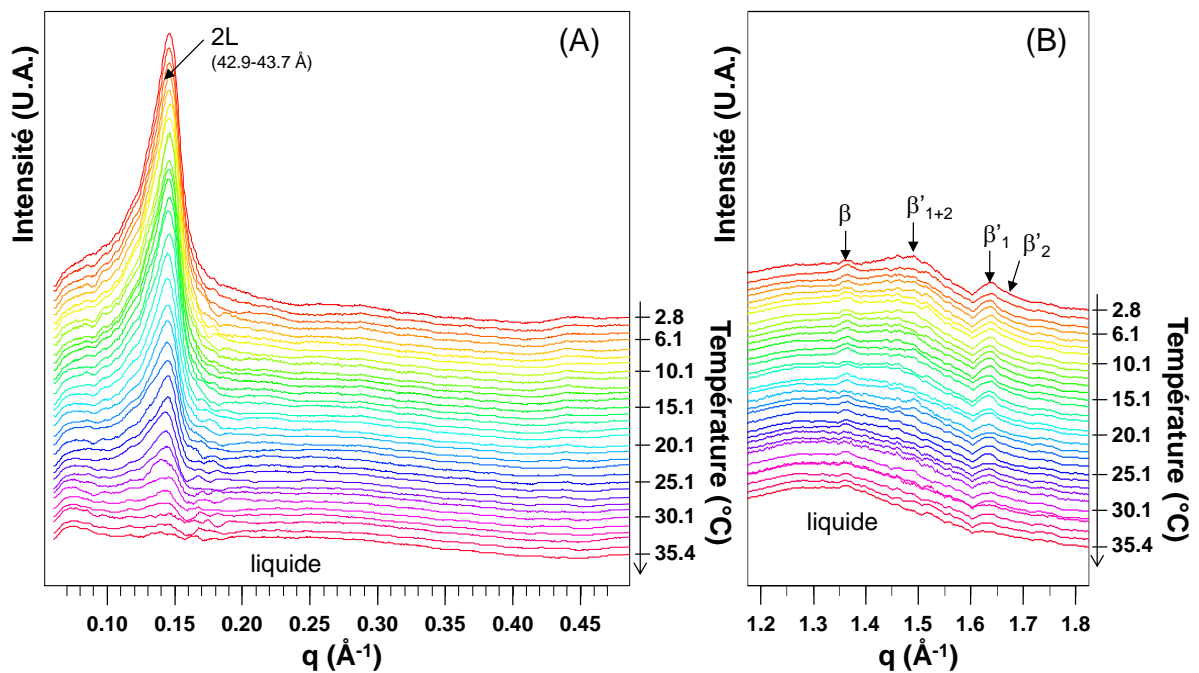


Figure A-23 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours du chauffage de la crème B3 de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après stockage de $t > 48$ h à 4°C. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

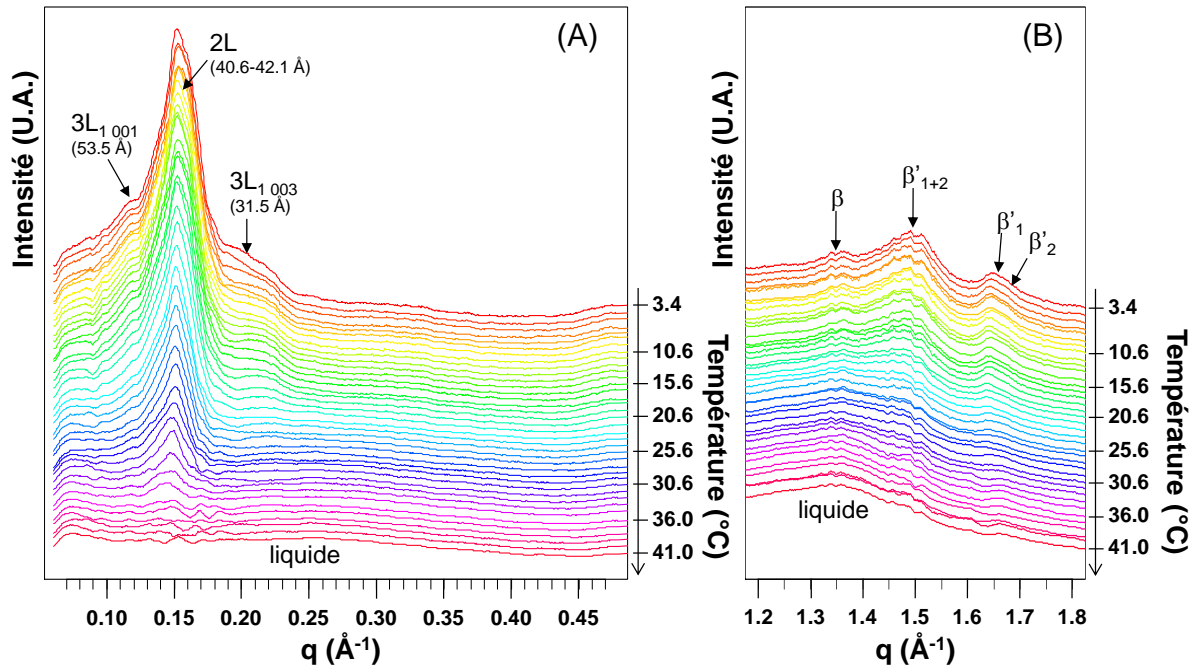


Figure A-24 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours du chauffage de la crème B5 de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après stockage de $t > 48$ h à 4°C. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

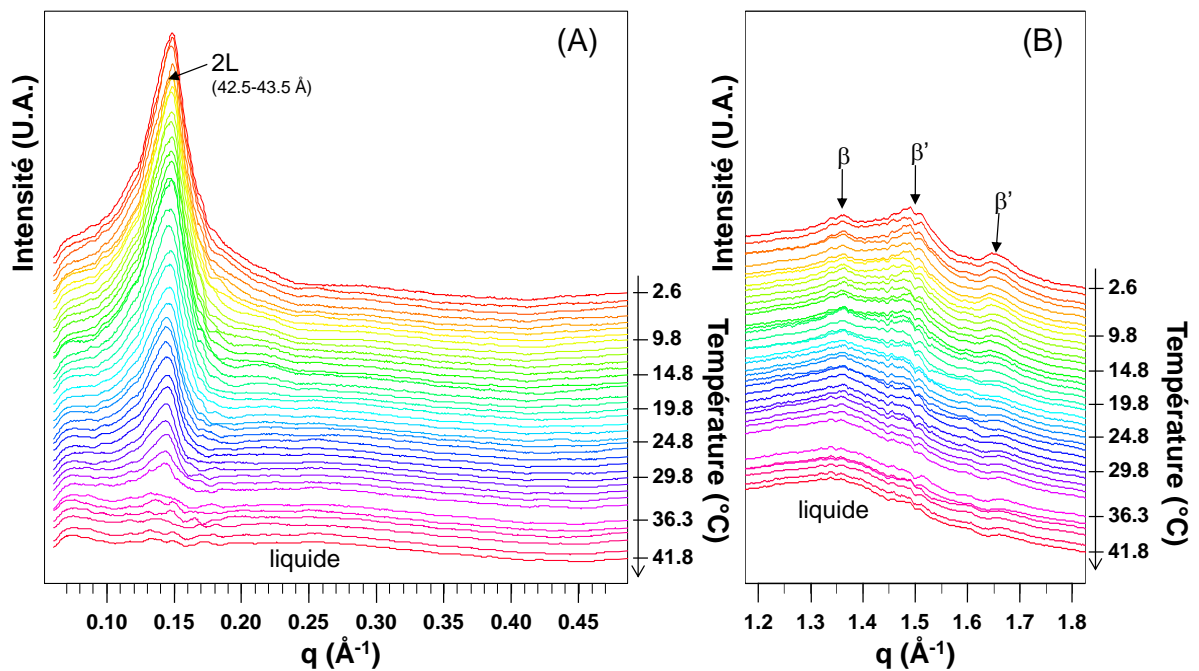


Figure A-25 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours du chauffage de la crème B6 de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après stockage de $t > 48$ h à 4°C. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

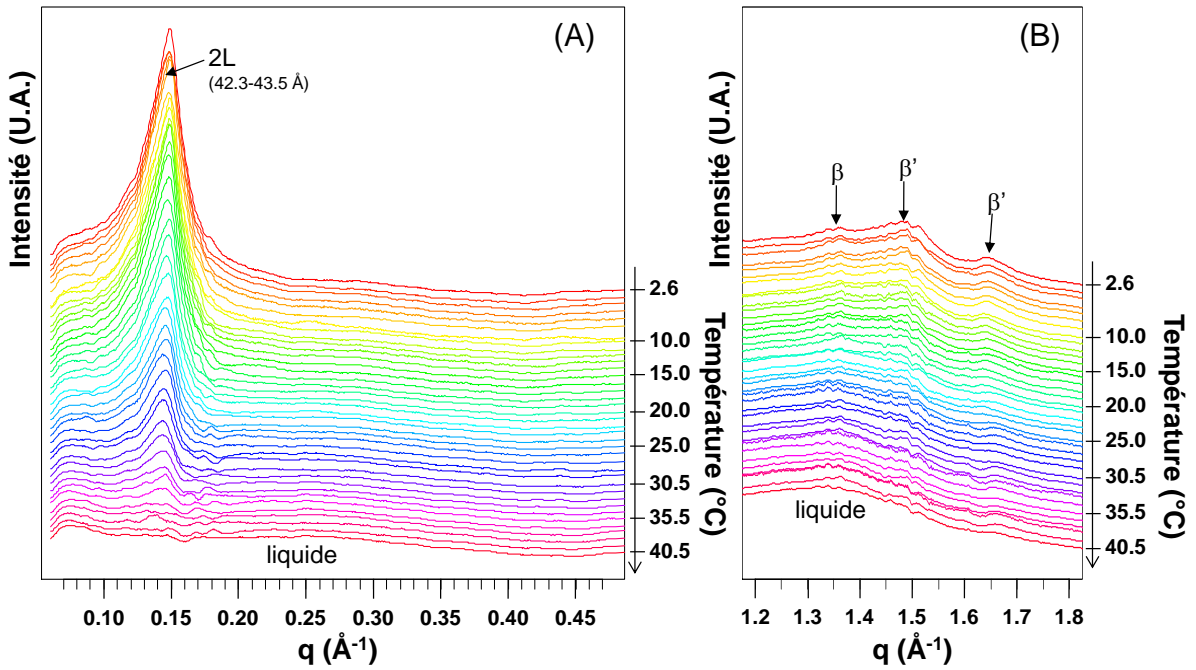


Figure A-26 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours du chauffage de la crème B7 de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après stockage de $t > 48$ h à 4°C. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

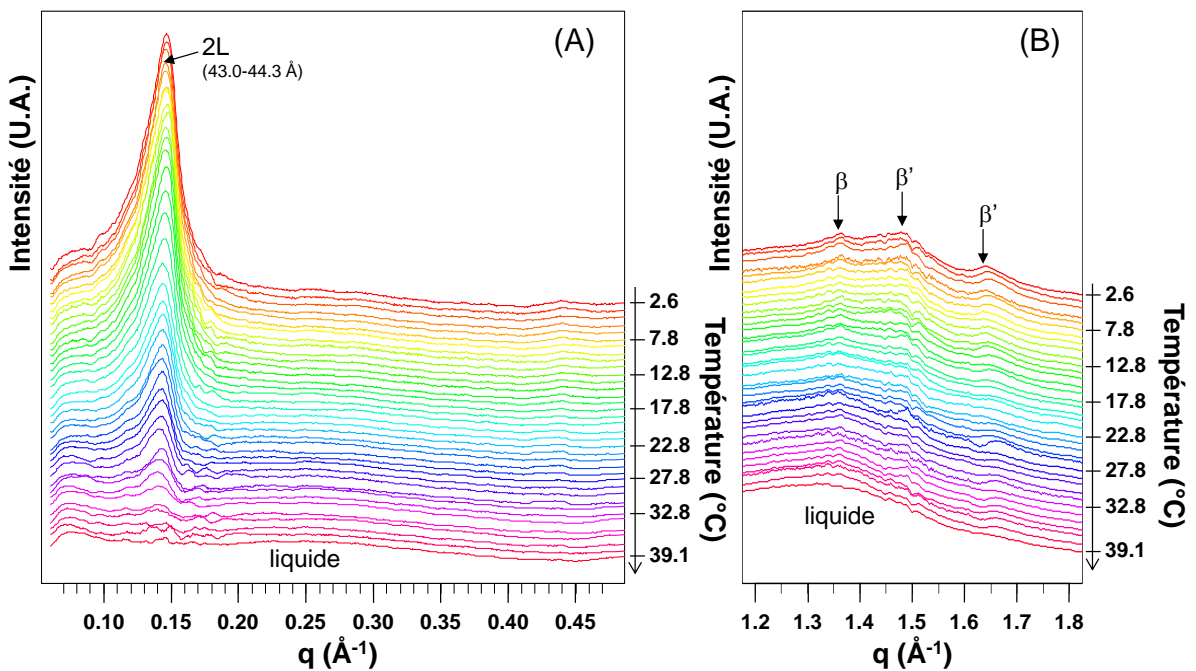


Figure A-27 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours du chauffage de la crème B9 de 4°C à 60°C à 0,5°C/min après stockage de $t > 48$ h à 4°C. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

ANNEXE VI : DIAGRAMMES DE DIFFRACTION DES RAYONS X ENREGISTRES AU COURS DES 20 MINUTES DE TREMPE A -7°C DES CREMES AUTRES QUE B8 ET B10

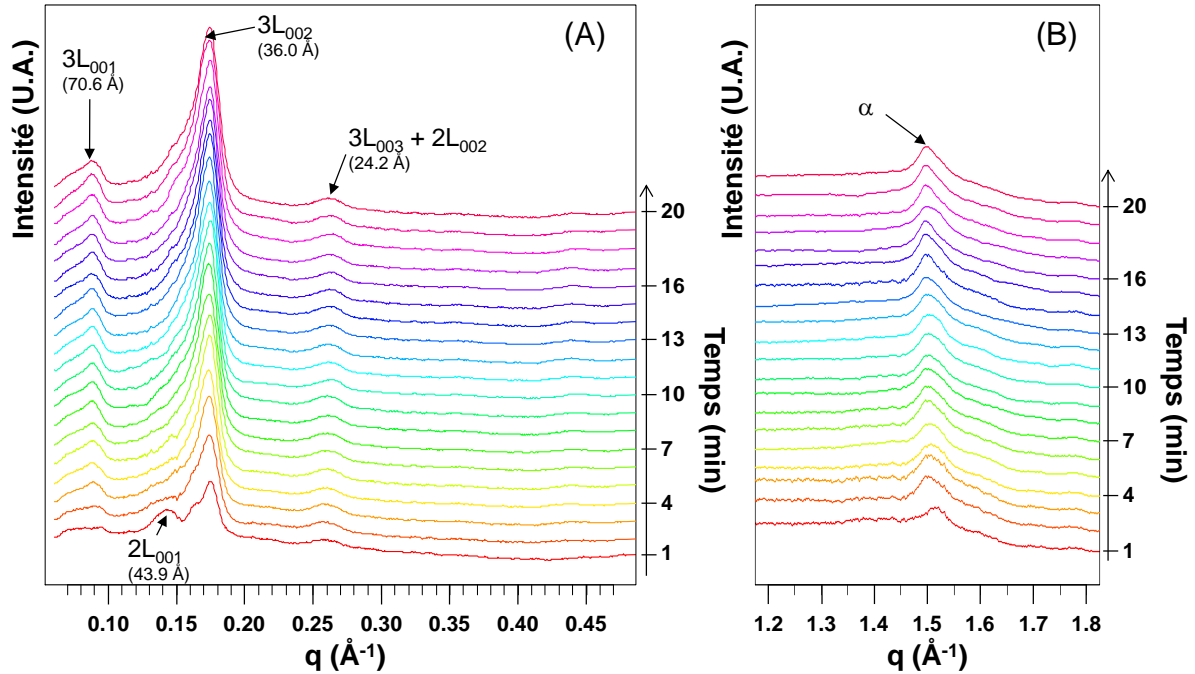


Figure A-28 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours des 20 minutes de trempe de 60°C à -7°C de la crème B1. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

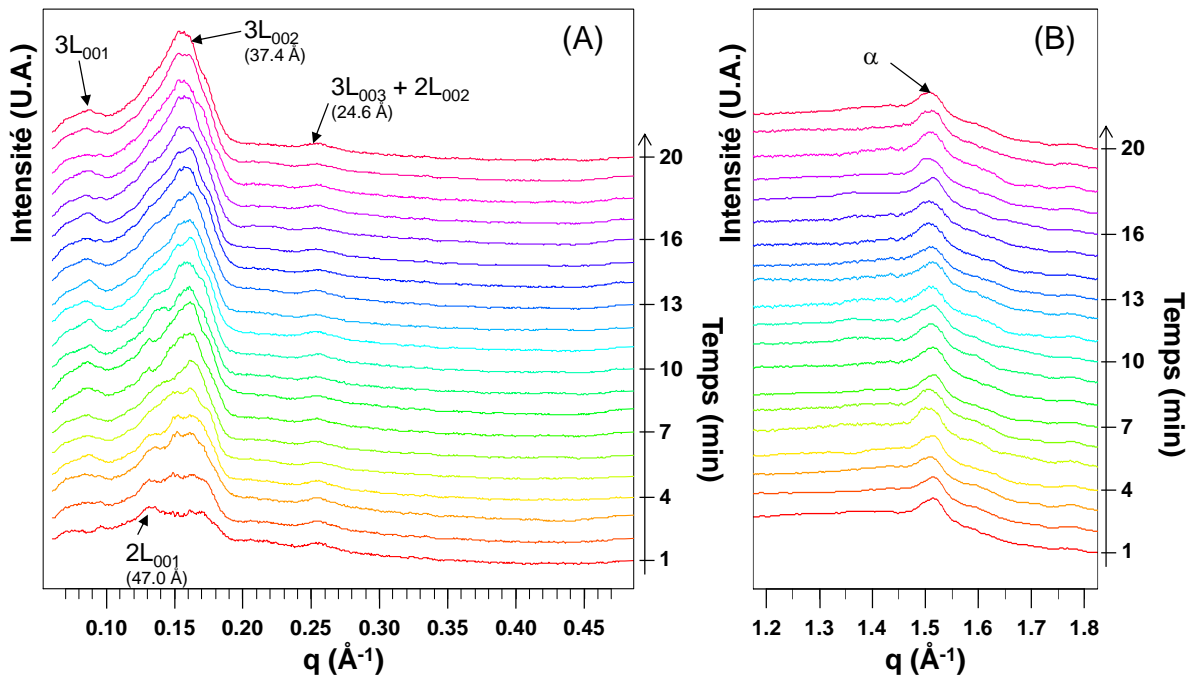


Figure A-29 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours des 20 minutes de trempe de 60°C à -7°C de la crème B2. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

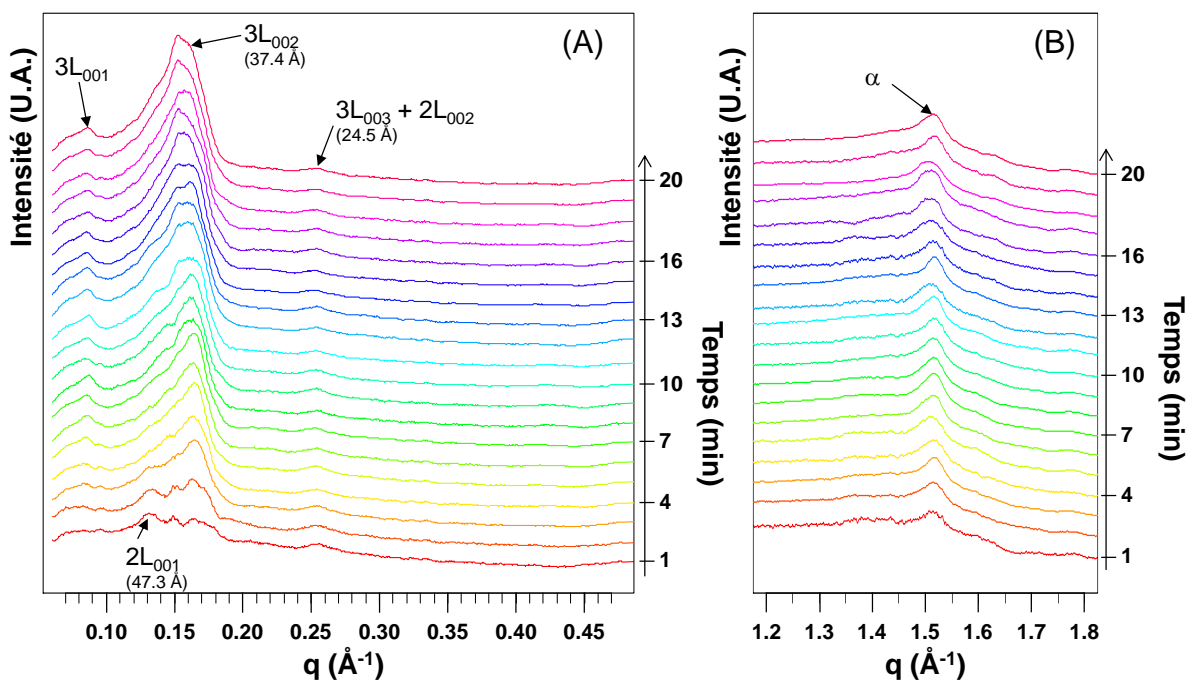


Figure A-30 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours des 20 minutes de trempe de 60°C à -7°C de la crème B3. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

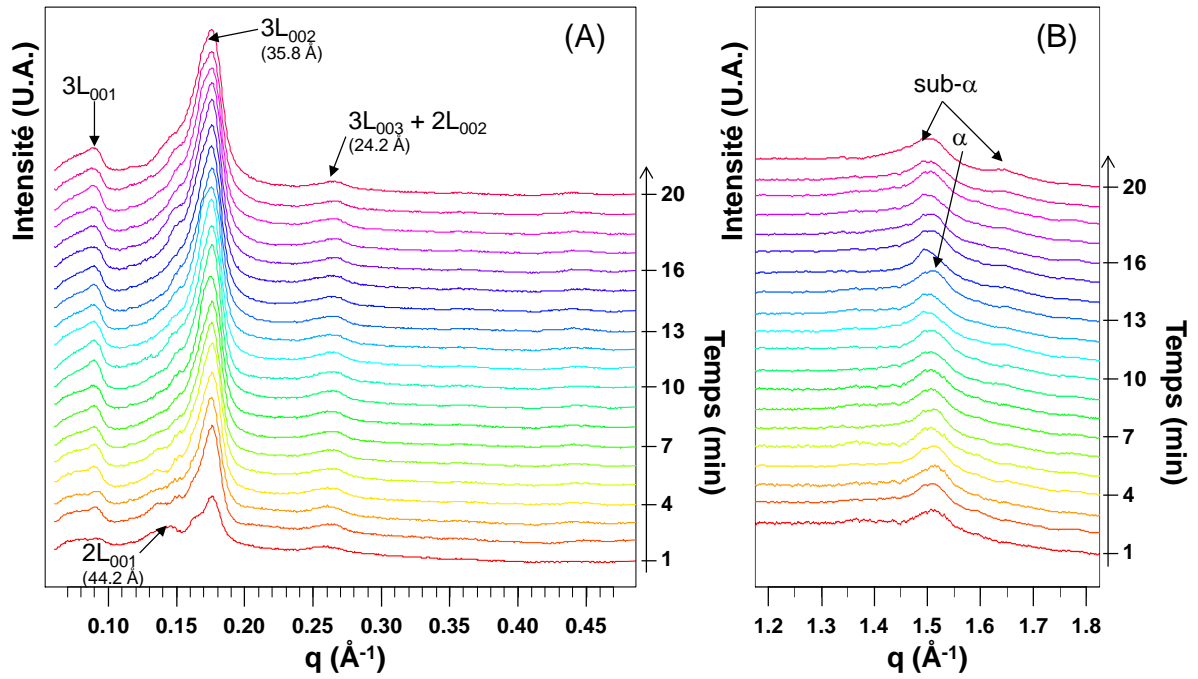


Figure A-31 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours des 20 minutes de trempe de 60°C à -7°C de la crème B5. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

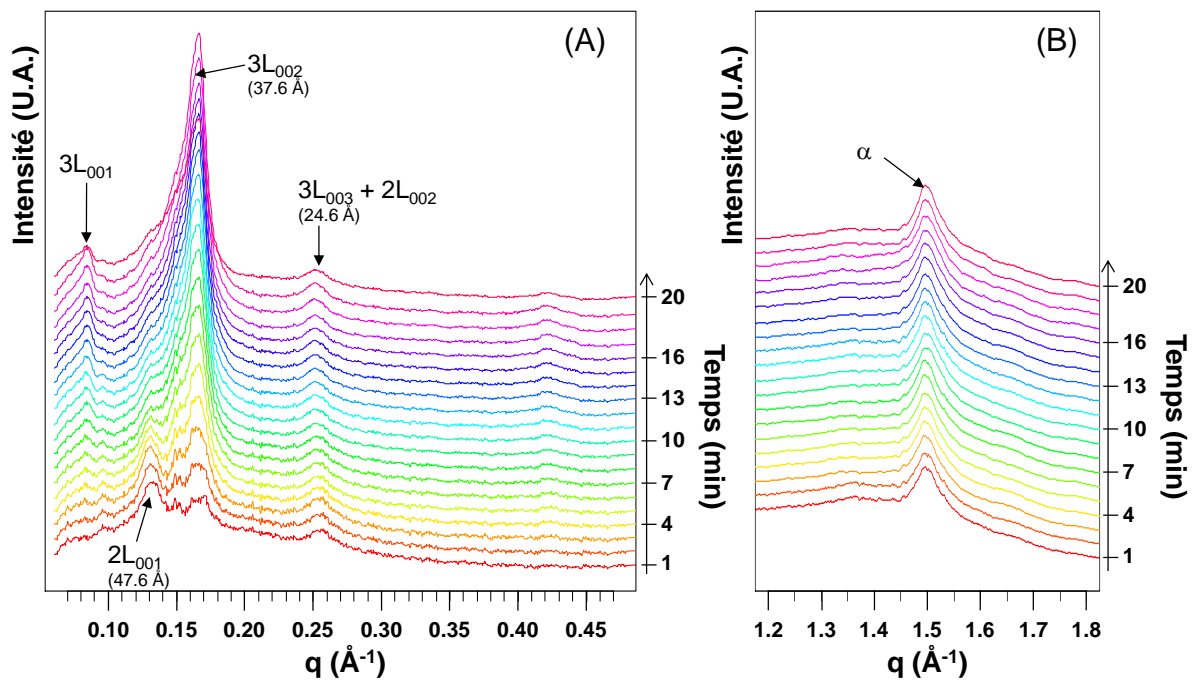


Figure A-32 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours des 20 minutes de trempe de 60°C à -7°C de la crème B6. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

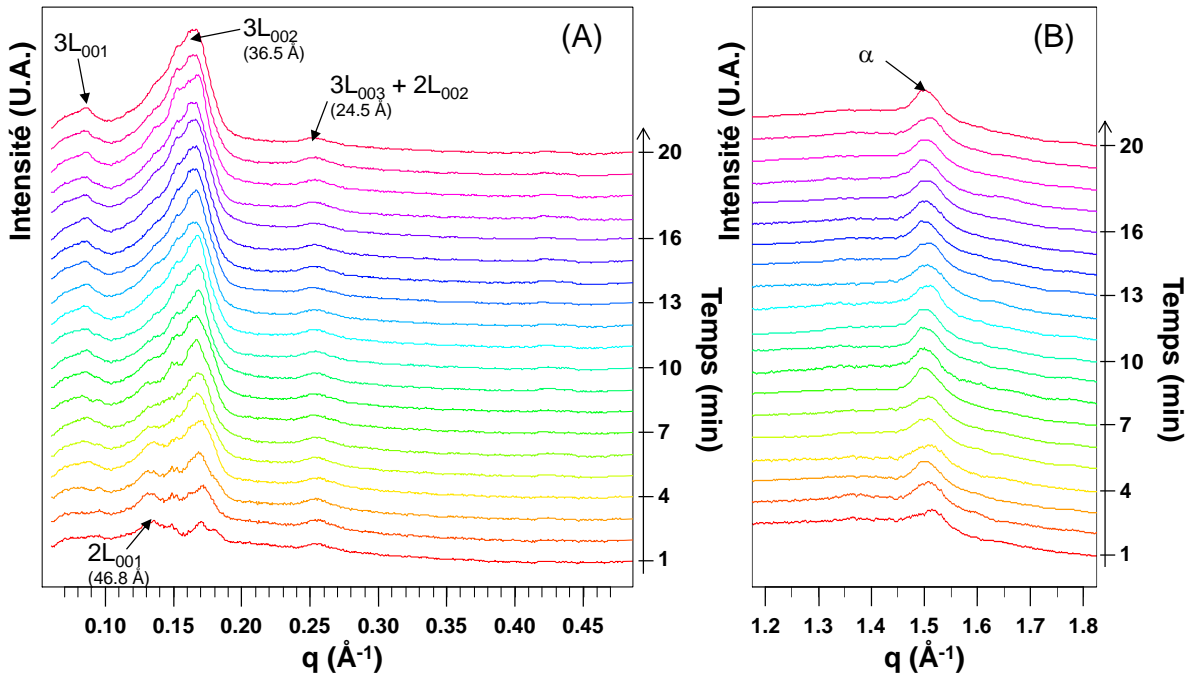


Figure A-33 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours des 20 minutes de trempe de 60°C à -7°C de la crème B7. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

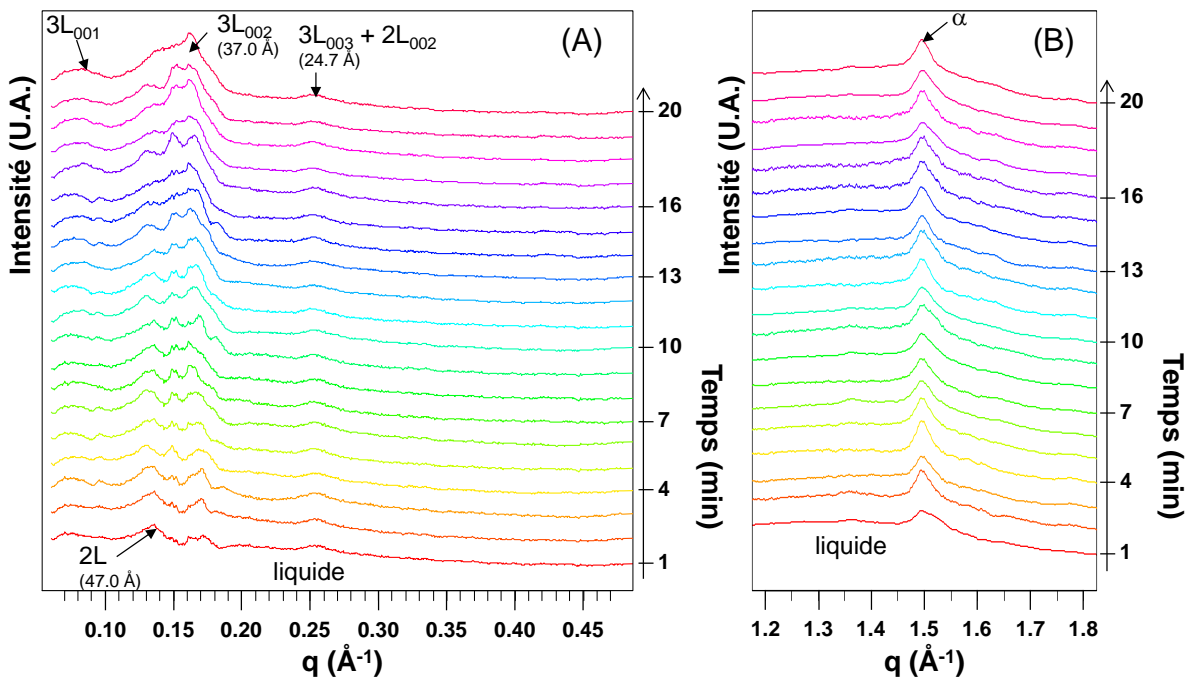


Figure A-34 : diagrammes de DRXT enregistrés aux petits (A) et grands angles de diffraction (B) au cours des 20 minutes de trempe de 60°C à -7°C de la crème B9. Les structures longitudinales et transversales sont indiquées sur la figure.

ANNEXE VII : POSTERS DE PRESENTATION DE RESULTATS PRESENTES A DIVERS CONGRES

Poster présenté au congrès Dairy Science & Technology organisé par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL) à Rennes en mai 2009. Ce poster a reçu le deuxième prix de la FIL France (2nd ALF Award).

ENRICHMENT IN UNSATURATED FATTY ACIDS LEADS TO DIFFERENT CRYSTALLINE STRUCTURES FORMED BY TRIACYLGLYCEROLS IN MILK FAT GLOBULES STORED AT 4°C

Simon BUGEAT^{1,2,3}, Claudie BOURGAUX³, Anne FERLAY⁴, Philippe PRADEL⁵, Sylviane LESIEUR³ and Christelle LOPEZ²



¹CNIEL, Paris, France
²UMR 1253 STLO INRA-Agrocampus Ouest, Rennes, France
³UMR 8612 CNRS-Université Paris XI, Châtenay-Malabry, France
⁴INRA Unité de Recherches sur les Herbivores, Saint-Genès-Champagnelle, France
⁵INRA Domaine expérimental, Marcenat, France
 Simon.Bugeat@rennes.inra.fr ; Christelle.Lopez@rennes.inra.fr



Introduction

With the objective to improve the nutritional quality of milk fat, studies are focusing on the increase in unsaturated fatty acid (UFA) content, mainly ω3. However, changes in the FA composition may affect the functional and sensorial properties of dairy products. Particularly, the crystallization properties of milk fat participate in the texture and structure of dairy products (butter, chantilly...).

Increasing the knowledge about the crystallization and melting properties of UFA-enriched triacylglycerols (TG; 98% of milk fat) is of primary importance. The objective of this study was to characterize the crystalline structures formed by TG in regular vs UFA-enriched milk fat globules in cold storage conditions.

Material and methods

- Milks: the control milk was produced from 6 cows fed a base diet of corn silage, grass silage and alfalfa. The UFA enriched milks were produced from 6 cows fed the same base diet with additions of sunflower or linseed oil (+5% lipids).
- Fat globules were concentrated from the experimental milks to ~ 500 g/kg fat.
- The fatty acid (FA) compositions of fat globules were determined by Gas Chromatography

Fatty acid compositions

The addition of vegetable oils leads to a large increase in UFA: 30% in the control sample and 50% in the UFA enriched samples. The quality of the oil added to the base diet leads to slight differences in FA composition, e.g. C18:2 and C18:1 trans FA.

Schematic organizations of TG molecules in the solid state

SAXS: longitudinal organization of TG
 WAXS: lateral packing of FA chains

Diagram of the X-ray diffraction setup showing X-ray source, beam stop, PSD Small angles, Reference, Sample, PSD Wide angles, Counting Elect, TCC, Calorimeter, Slits, X-Rays, Multilayer Mirror, and nVmeter.

- X-Ray Diffraction and Differential Scanning Calorimetry (DSC) experiments (figure): Thermal and structural characterizations were carried out thanks to the coupling of DSC with X-Ray Diffraction as a function of Temperature (XRDT) at small (SAXS) and wide (WAXS) angles.
- The calorimeter Microcalix® [1] was inserted on the XRD laboratory beam line. Fat globules were stored at 4°C for t>48h and then introduced in the calorimeter to identify the crystalline structures. Heating was performed at 0.5°C/min from 4°C to 60°C.
- Complementary DSC experiments were performed using a DSC Q1000 (TA Instruments) in the same experimental conditions to ensure reproducibility of the results

XRDT patterns

For t > 48h storage at 4°C (fridge conditions), the crystalline structures formed by TG in milk fat globules correspond to the coexistence of a 2L (40.7 Å) and a 3L (54.2 Å) organizations for regular FA composition, whereas only a 2L (~43 Å) is formed in the UFA-enriched fat globules. We deduced that UFA-enriched TG, known to crystallize in 3L structures, were not in a solid state during storage of fat globules at 4°C.

Four polymorphic forms: α, β₁, β₂ and β coexisted in all the samples. On heating, no polymorphic reorganization was encountered before final melting, proving the stability of the crystalline structures formed at low temperature.

DSC

Regular and UFA-enriched fat globules revealed similar melting profiles on heating, but different enthalpy (ΔH) and final temperature (T_{offset}) of melting.

Table. Thermal parameters extracted from the thermograms recorded in triplicate. Solid fat contents were determined as in [2]: SFC = (partial ΔH / total ΔH) x 100

	UFA enriched TG		
	control diet	sunflower oil diet	linseed oil diet
T _{offset} (°C)	38.6 ± 0.8 a	37.4 ± 1.0 b	36.4 ± 0.2 c
partial ΔH (J/g fat)	75.6 ± 3.6 a	35.7 ± 3.2 b	40.5 ± 1.8 b
total ΔH (J/g fat)	89.1 ± 6.9 a	78.2 ± 3.2 b	70.1 ± 2.8 c
calculated SFC at 4°C (%)	85 ± 3 a	46 ± 2 c	58 ± 1 b

↑ UFA leads to ↓ SFC_{4°C}

Conclusions

Increasing the UFA content from 30% to 50% leads to:

- the formation of different crystalline structures during storage of fat globules at 4°C, with an absence of 3L structure and a 2L with a higher thickness (~2.4 Å)
- a decrease in the solid fat content at 4°C from 85% to 58% with addition of sunflower oil and to 46% with addition of linseed oil

For 50% UFA, the quality of the UFA enrichment:

- did not affect the crystallization behavior
- decreased the final melting point (~1.1 °C) by addition of linseed oil vs sunflower oil: C18:2 content.

Such study improves the knowledge of TG crystallization during the storage of dairy products

Acknowledgements:
 This work was funded by ANR - French National Research Agency, project «ANR-06-PNRA-012, AGILAIT» and the French dairy board (CNIEL, France).

References:
 [1] Olivon, M., et al. (2006). Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 85 pp 219-224
 [2] Lopez, C., et al. (2006). Journal of Dairy Science, 89 pp. 2894-2910

Poster présenté au congrès World Dairy Summit organisé par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL) à Berlin en septembre 2009.



ENRICHMENT IN UNSATURATED FATTY ACIDS AND EMULSION DROPLET SIZE AFFECT THE CRYSTALLIZATION PROPERTIES OF MILK TRIACYLGLYCEROLS AT 4°C.



Simon BUGEAT^{1,2,3}, Javier PEREZ⁴, Valérie BRIARD-BION², Philippe PRADEL⁵, Anne FERLAY⁶, Sylviane LESIEUR³, Claudie BOURGAUX³ and Christelle LOPEZ²



¹CNIEL, Paris, France
²UMR 1253 STLO INRA-Agrocampus Ouest, Rennes, France
³UMR 8612 CNRS-Université Paris XI, Châtenay-Malabry, France
⁴Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France
⁵INRA Domaine expérimental, Marcenat, France
⁶INRA Unité de Recherches sur les Herbivores, Saint-Genès-Champagnelle, France
 Simon.Bugeat@rennes.inra.fr; Christelle.Lopez@rennes.inra.fr



Introduction

With the objective of improving the nutritional quality of milk fat, studies are focusing on the increase in unsaturated fatty acids (UFA), mainly $\omega 3$. However, changes in the FA composition may affect the functional properties of dairy products, particularly, the crystallization properties of triacylglycerols (TG; 98% of milk fat) which participate in the structure and texture of dairy products (butter, whipped creams such as chantilly...). Moreover, most of the consumed dairy products are emulsions in which milk fat is dispersed as droplets of various sizes.

The objective of this study was to characterize the crystalline structures formed by TG in either control or UFA-enriched milk fat emulsions in fridge storage conditions, with emphasis on the size of the emulsion droplets.

Fatty acid compositions & emulsion droplet size

The addition of linseed oil leads to increases in UFA: 30% in the control vs 50% in the UFA-enriched samples, with huge increases in C18:1:c9 (40% higher), conjugated linoleic acid (CLA, +4-fold) and C18:1 trans FA (+5-fold).

The size distributions of the small (0.2 μm) and large (1.4 – 1.7 μm) emulsions droplets were well-separated, whatever the FA composition.

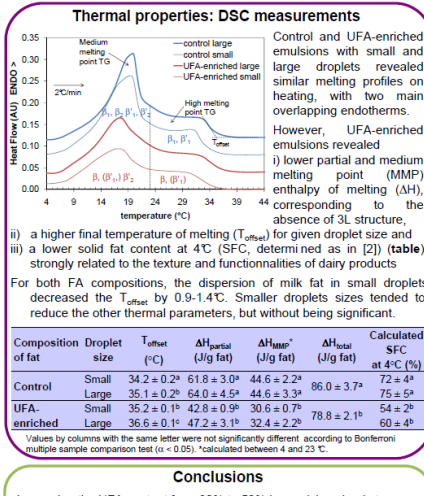
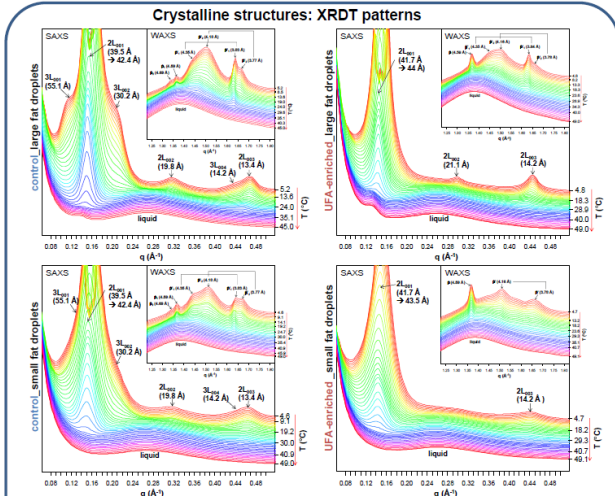
Materials and methods

- Milks:** the control milk was produced from 6 cows fed a base diet of grass silage. The UFA enriched milks were produced from 6 cows fed the same base diet with additions of linseed oil (+ 5% lipids).
- Emulsions** of small (0.2 μm) and large (1.4 – 1.7 μm) droplets were produced by high pressure homogenization from milk fats extracted from the control and UFA-enriched milks (Stansted homog.).
- Size measurements** of the emulsion droplets were performed by laser light scattering (Malvern).
- The fatty acid (FA) compositions** of the milk fats were determined by Gas Chromatography (Agilent).

X-Ray Diffraction and Differential Scanning Calorimetry (DSC) experiments (FIGURE):

Thermal and structural characterizations were carried out by coupling DSC and temperature-controlled X-Ray Diffraction (XRD) at small (SAXS) and wide (WAXS) angles. The calorimeter Microcalix ① [1] was inserted on the beamline Swing of the synchrotron SOLEIL. Emulsions were stored at 4°C for t>48h in quartz capillaries and then introduced in the calorimeter to identify the crystalline structures. Heating was performed at 2°C/min from 4°C to 60°C.

Complementary DSC experiments were performed using a DSC Q1000 calorimeter (TA Instruments) in the same experimental conditions to ensure reproducibility of the results.



References cited: [1] Dillvon, M., et al. (2009). J. Therm. Anal. Calorim. 85, 219-224. [2] Lopez, C., et al. (2006). J. Dairy Sci., 89, 2944-2950.

Acknowledgements: This work was funded by ANR - French National Research Agency, project «ANR-06-PNRA-012, AGILAIT» and the French dairy board (CNIEL, France).

Conclusions

Increasing the UFA content from 30% to 50% in emulsions leads to:

- the formation of different crystalline structures during the storage of TG emulsion droplets at 4°C, with an absence of 3L structure and a thicker 2L (-2.2 Å) due to either the mean carbon number composing the 2L structure or to the lateral packing of the FA chains.
- a decrease of the SFC at 4°C from -73% to -57% with addition of linseed oil, and different melting properties in the temperature range of consumption of dairy products (MMP).

Smaller emulsion droplets lead to a decrease of:

- the 3L structure (when existing), and of the β_2 and β_1 forms.
- the final melting temperature by about 1°C.

The increase in UFA contents affects the crystallization properties of milk fat during the storage of emulsions at 4°C and may alter the texture and sensorial properties of dairy products.

Résumé de la thèse

Comprenant environ 65 % d'acides gras saturés (AGS) réputés néfastes pour la santé, la matière grasse laitière (MGL), dont les triacylglycérols (esters de glycérol et d'acides gras) constituent la majeure partie, est présente dans de nombreux produits alimentaires. Sa composition et sa complexité structurale lui confèrent des propriétés de cristallisation particulières et des qualités organoleptiques appréciées dans divers produits : beurre, crèmes, mousses, etc. L'enjeu majeur est de diminuer la proportion des AGS tout en conservant les propriétés culinaires de la MGL.

L'objectif de cette thèse est de quantifier les propriétés physiques de MGL à teneur réduite en AGS par le biais de l'alimentation animale dans des matrices de complexité croissante : à l'état anhydre, en émulsion (lait et émulsion modèle) et dans des produits finis (beurre et fromage). Pour cela, une approche systémique a été utilisée ; les échantillons ont été étudiés pour leur composition et leurs propriétés physiques à différentes échelles : moléculaire, microscopique et macroscopique.

Ainsi, les cristaux formés par ces triacylglycérols modifiés montrent des caractéristiques moléculaires liées directement à la nature de leurs acides gras. La stabilité thermique de ces cristaux est altérée : bien qu'ayant une plage de fusion globale conservée, ils ne se réorganisent pas dans la zone classique 0-20°C. Les propriétés de dureté des triacylglycérols sont diminuées jusqu'à 30%. En émulsion, la taille des gouttelettes influence fortement sur le mécanisme de nucléation et la nature des cristaux de ces triacylglycérols complexes en mélange.

Abstract

Including about 65% of saturated fatty acids (SFA) considered harmful to human, milk fat (MF) is present in a lot of food products. Triacylglycerols which are esters of glycerol and fatty acids are the major components of MF. The composition and structural complexity of MF provides specific crystallization properties and organoleptic qualities highly valued in several products: butter, creams, foams, etc. The stake is thus to decrease the SFA rate of MF while keeping its cooking properties.

The objective of this PhD thesis is to quantify the physical properties of SFA-lowered MF obtained thanks to animal feeding strategy into forms of increasing complexity: anhydrous MF, emulsified MF (milk and model emulsion) and MF in end products (butter and cheese). Therefore, a systemic approach was used; the samples were studied for their composition and physical properties at different scales: molecular, microscopic and macroscopic.

Hence, the crystals formed by these modified triacylglycerols show molecular characteristics directly linked to the nature of their fatty acids. The thermal stability of these crystals is altered: although keeping a global temperature of fusion range, they hardly reorganize in the 0-20°C zone. The hardness properties of these triacylglycerols is lowered by 30%. In emulsion, the droplet size strongly impacts the nucleation mechanism and the crystals nature of such complex triacylglycerol mixes.