



**HAL**  
open science

## Agrégation protéique et propriétés gélifiantes et moussantes des protéines laitières - Quoi de neuf sur le plan des connaissances ?

Marie-Hélène Famelart, Fanny Guyomarc'H, Marion Morand, Bruno Novales

### ► To cite this version:

Marie-Hélène Famelart, Fanny Guyomarc'H, Marion Morand, Bruno Novales. Agrégation protéique et propriétés gélifiantes et moussantes des protéines laitières - Quoi de neuf sur le plan des connaissances ?. Innovations Agronomiques, 2011, 13, pp.117-132. hal-01454173

**HAL Id: hal-01454173**

**<https://hal.science/hal-01454173>**

Submitted on 29 May 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## **Agrégation protéique et propriétés gélifiantes et moussantes des protéines laitières – quoi de neuf sur le plan des connaissances ?**

Famelart M.H.<sup>ab</sup>, Guyomarc'h F.<sup>ab</sup>, Morand M.<sup>ab</sup>, Novalet B.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR1253, STLO, 35000 Rennes, France,

<sup>b</sup> AGROCAMPUS OUEST, UMR1253, 35000 Rennes, France

<sup>c</sup> INRA, UR1268, BIA, Equipe Interfaces Systèmes Dispersés, 44316 Nantes

Correspondance : marie-helene.famelart@rennes.inra.fr

### **Résumé**

Lors de la transformation du lait en aliments, les traitements thermiques subis par le lait induisent la formation de nouvelles entités protéiques ou agrégats thermo-induits. Ces agrégats confèrent des propriétés fonctionnelles aux produits laitiers. Une approche d'ingénierie des agrégats thermo-induits a été développée à l'UMR-STLO qui vise à produire par des moyens variés des agrégats thermo-induits de propriétés physico-chimiques et structurales ciblées, puis à les introduire dans un lait recombinaison afin d'évaluer leur propriétés fonctionnelles pour la formation des gels acides, pris comme un modèle du yaourt. Il est connu que la dénaturation et les traitements thermiques améliorent également les propriétés interfaciales et moussantes des protéines. Le laboratoire BIA mène des recherches pour comprendre le rôle des agrégats thermo-induits dans la formation et la stabilisation des mousses. Alors que les protéines non agrégées s'adsorbent rapidement à l'interface, la présence d'agrégats thermo-induits stabilise la mousse par formation d'un réseau de type gel dans la phase continue. L'objectif de ces travaux est de déterminer les propriétés des agrégats qui sont favorables à l'établissement de nouvelles interactions dans les produits, ces dernières étant à l'origine de l'amélioration de leurs propriétés d'usage et de créer de nouveaux ingrédients techno-fonctionnels.

**Mots-clefs** : agrégat protéique, lait, gel, mousse,  $\beta$ -lactoglobuline

**Abstract:** Milk protein aggregates and their gelation and foaming properties – what's new on the science front

During the manufacture of dairy products, heat treatments of milk result in the conversion of whey proteins into protein aggregates. These heat-induced aggregates provide new functional properties to dairy products. A protein tailoring approach is developed at UMR-STLO to produce heat-induced aggregates with targeted physicochemical and structural properties, and then to introduce them in a recombined milk to test their functional properties for the formation of dairy acid gels, used as models of yoghurts. It is also well known that denaturation and heat treatments improve interfacial and foaming properties of proteins. The BIA research unit works on understanding the role of heat-induced aggregates in the formation and stability of foams. While non-aggregated proteins adsorb rapidly at the interface, the heat-induced aggregates present in the continuous phase build a protein network that stabilizes the foam. The objective of these studies is to determine the properties of aggregates that promote the building of new interactions in products that will result in the improvement of custom properties of dairy products and to produce new functional ingredients.

**Keywords:** protein aggregate, milk, gel, foam,  $\beta$ -lactoglobulin

## Introduction

Le lait est composé de 2 grandes classes de protéines, les caséines, au nombre de 4 (caséines  $\kappa$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$ s1 et  $\alpha$ s2) assemblées en particules colloïdales, les micelles de caséine, d'environ 100 nm de diamètre et les protéines de lactosérum, solubles et globulaires, dont les principales sont la  $\beta$ lactoglobuline ( $\beta$ lg) et l' $\alpha$ lactalbumine ( $\alpha$ lac).

Lors de la transformation du lait en aliments structurés tels que les gels (fromage, yaourt) ou les mousses (crème glacée...), les protéines établissent des interactions qui modifient profondément les propriétés mécaniques du milieu et permettent de donner à ce liquide un caractère visqueux et/ou solide. Cette aptitude «technofonctionnelle» des protéines laitières peut être naturelle, mais elle est le plus souvent acquise durant la mise en œuvre des procédés d'usage courant tels que le traitement thermique, les cisaillements... Nos recherches s'attachent à comprendre en quoi ces protéines ont été transformées par ces pré-traitements et à identifier les interactions qu'elles permettent d'établir lors de la structuration de l'aliment. En s'affranchissant des usages courants de l'industrie, on peut modifier une très large gamme des propriétés des protéines. Ainsi, non seulement les mécanismes qui président à l'élaboration des aliments sont-ils ainsi mieux compris, mais on peut également espérer contrôler les conditions du pré-traitement du lait, en vue d'optimiser l'aptitude technofonctionnelle de ses protéines.

## Agrégation protéique et propriétés gélifiantes

### *La gélification acide du lait*

Lors de la fabrication du yaourt, les bactéries lactiques fermentent le lactose en acide lactique. L'abaissement du pH du lait ainsi produit entraîne une précipitation des micelles de caséine lorsque leur charge électrique devient nulle, c'est-à-dire à leur point isoélectrique (pI) à environ 4 - 4.5. Au cours de l'abaissement du pH, il se forme des interactions responsables de l'apparition de floccs, puis les floccs interagissent entre eux pour former un gel mou et fragile qui a tendance à présenter une expulsion de sérum à sa surface. Avant d'ensemencer le lait en bactéries, on chauffe celui-ci dans le but d'éliminer les bactéries initialement présentes. Or, si on chauffe fortement le lait, c'est-à-dire à environ 90°C pendant 10 min, le gel de yaourt obtenu est beaucoup plus ferme et plus résistant à l'expulsion de sérum. Il se forme aussi à un pH plus élevé, donc pour une charge résiduelle portée par les micelles de caséine plus élevée.

Quand on chauffe le lait à environ 90°C pendant 10 min, les protéines globulaires du lait vont perdre leur structure native en subissant une exposition en surface des groupements aminés hydrophobes et du groupement sulfhydryle (SH) qui est enfoui au sein de la structure protéique. Ces démasquages vont entraîner la formation de nouvelles interactions entre ces protéines dénaturées, soit hydrophobes, soit des ponts disulfures (SS). Ces ponts SS se forment soit par oxydation de 2 SH ensemble, soit par des échanges SS/SH inter protéiques. De nouveaux agrégats protéiques apparaissent qui ont, comme les micelles de caséines, la capacité d'interagir entre elles et avec d'autres protéines lorsque le lait est acidifié (de Wit et al., 1988).

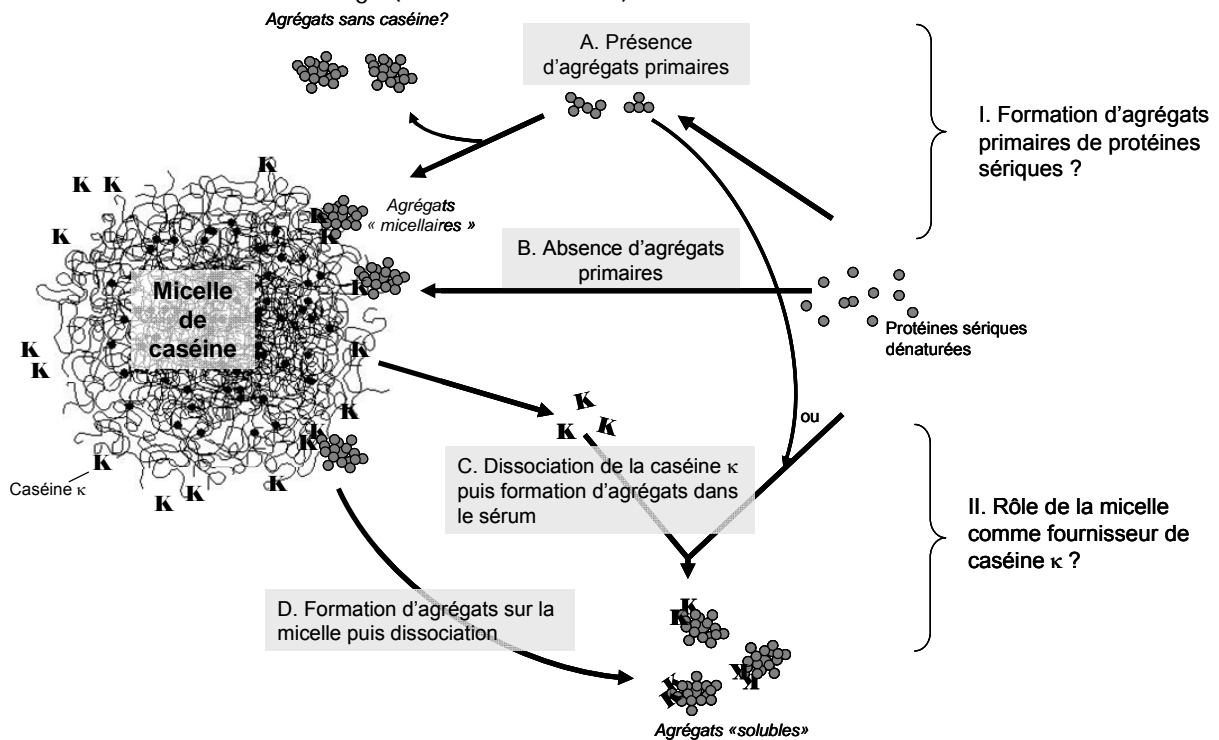
L'amélioration de la texture des yaourts par le chauffage du lait est très clairement attribuée à l'apparition de ces agrégats (Lucey et al., 1998). Si on les ajoute à un lait qui n'a pas été traité thermiquement, on peut également produire rapidement des gels de yaourts fermes et sans synérèse (Schorsch et al., 2001; O'Kennedy et al., 2000). On suppose qu'ils améliorent les gels par le fait qu'ils rajoutent des connections entre les espèces protéiques présentes dans le lait en cours d'acidification, mais personne, jusqu'à présent, n'est parvenu à identifier (et donc à contrôler) leur ou leurs modes d'action.

Par ailleurs, la législation Française (Journal officiel, 1997) autorise l'ajout de poudres laitières au lait de fabrication des yaourts pour augmenter sa teneur en matière sèche et rendre ainsi les yaourts plus fermes. On appelle cela le poudrage du lait. Afin d'optimiser ou de diversifier les textures des gels acides, il est donc possible de cibler les protéines laitières ajoutées au lait avant son chauffage. Pour cette raison, nos travaux s'intéressent non seulement au lait en tant que système naturel, siège de toutes ces transformations, mais aussi aux systèmes modèles issus de la combinaison de fractions protéiques laitières. Ainsi, la formation d'agrégats pendant le chauffage du lait peut être considérée sous l'angle de l'ingrédient techno-fonctionnel.

### *Les agrégats protéiques produits dans le lait de fabrication des yaourts et leurs propriétés*

Dans le lait, ces agrégats sont majoritairement composés des protéines globulaires dénaturées par le chauffage, principalement  $\beta$ lg et  $\alpha$ lac, et d'un peu de caséine, principalement la caséine  $\kappa$ . Une partie des agrégats apparaît en suspension dans le sérum du lait et l'autre partie est présente à la surface des micelles de caséine.

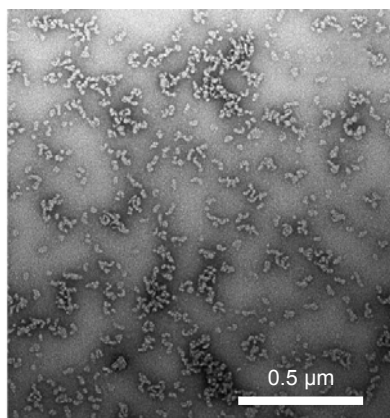
Il est maintenant certain que la micelle de caséine joue un rôle important au cours de la formation de ces agrégats dans le lait, ne serait-ce que parce qu'elle fournit la caséine  $\kappa$  qui y est présente. Pour cette raison, les agrégats formés naturellement dans le lait au cours de son chauffage sont probablement différents de leurs substituts produits en chauffant des lactosérums, par exemple. La Figure 1 expose les différentes voies possibles de formation des agrégats dans les différentes phases du lait au cours de son chauffage (Donato et al., 2009).



**Figure 1** : Schéma des différents mécanismes de formation des agrégats solubles et micellaires dans le lait au cours du traitement thermique. Deux premières alternatives sont possibles (I), qui reposent sur l'existence ou pas d'agrégats primaires (ou « intermédiaires ») constitués de protéines sériques uniquement (respectivement les voies A et B). Le mode d'interaction entre la caséine  $\kappa$  et les protéines sériques est également en débat (II), avec une solubilisation préalable de caséine  $\kappa$ , puis des interactions formées en phase sérique (voie C) ou une interaction ayant lieu sur la micelle et une solubilisation ultérieure des agrégats (voie D).

Selon des résultats récents (Mollé et al., 2006), il est peu probable que des agrégats puissent se former uniquement avec des protéines sériques. En revanche, malgré de nombreux travaux, on ne sait toujours pas à quel moment, ni sous quelle forme, cette caséine intervient dans l'agrégation (voies C et D). Par contre, il est établi que la caséine  $\kappa$  a un rôle important dans le contrôle de la taille et de la forme des agrégats (Guyomarc'h et al., 2009b; Morand et al., 2011).

Dans les conditions du lait écrémé chauffé à 90°C pendant 10 min, les agrégats présentent un diamètre d'environ 70 nm et sont à peu près sphériques (Figure 2). Leur pI est de ~ 4.5, pour une charge électrique de -17 mV à pH 7. Ils ont une hydrophobie de surface supérieure à celle de la micelle de caséine (Guyomarc'h et al., 2003; Jean et al., 2006; Guyomarc'h et al., 2007).



**Figure 2** : Les agrégats thermo-induits natifs du lait tels qu'ils apparaissent dans la phase soluble d'un lait chauffé selon Jean et al. (2006) observés en microscopie électronique à transmission.

De nombreux travaux (Anema et al., 2000; Donato et al., 2006; Guyomarc'h et al., 2003) ont montré qu'au cours du chauffage du lait, une partie des agrégats se retrouvent associées à la micelle de caséine. Au cours de l'acidification, les agrégats solubles se complexent à leur tour à la micelle de caséine avant la gélification du lait (Guyomarc'h et al., 2009a). Sur la base de ces observations, nous pensons que les agrégats ainsi fixés fonctionnalisent la micelle de caséines en lui conférant de nouvelles propriétés d'interactions, qui expliqueraient que les micelles se déstabilisent à pH élevé, d'une part, et forment des gels très réticulés, hygroscopiques et élastiques, d'autre part.

### *L'ingénierie protéique pour produire des agrégats de propriétés variées et ciblées*

A partir de cette hypothèse, l'idée est de produire des agrégats hors du lait à l'aide de moyens variés afin de leur conférer des propriétés physico-chimiques et structurales ciblées, puis de les introduire dans un lait modèle afin de tester leurs fonctionnalités (Figure 3). Si la propriété modifiée sur les agrégats est corrélée avec une modification substantielle de l'aptitude des micelles à la gélification acide, alors nous identifions un type d'interaction pertinent dans l'élaboration des gels de yaourt.

Les types d'interactions soupçonnées, ainsi que les différents moyens accessibles pour les moduler ont été listés dans une récente revue bibliographique (Morand et al., 2011) (Tableaux 1 et 2). Pour l'évaluation des propriétés fonctionnelles vis-à-vis de la gélification acide, on utilise la rhéométrie pour suivre la formation du gel : on applique une très faible oscillation sinusoïdale en rotation et on mesure la résistance croissante qu'opposent le lait liquide, puis le gel.

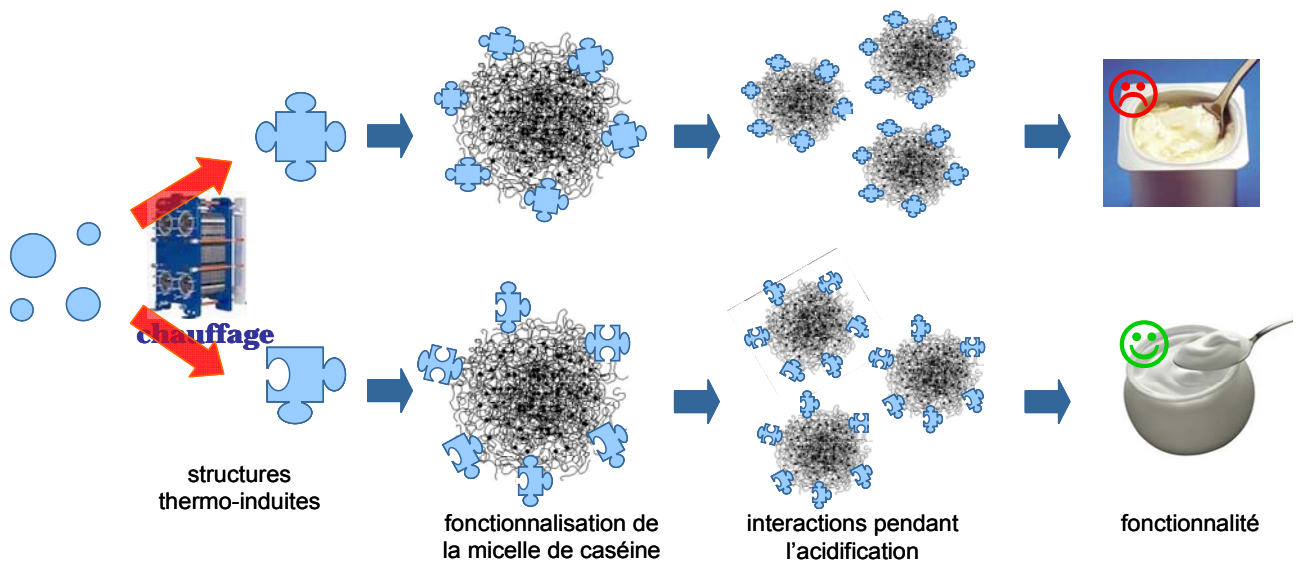


Figure 3 : Ingénierie des agrégats protéiques thermo-induits et fonctionnalités lors de la gélification acide

Propriété	Moyens scientifiques	Moyens alimentaires
Présence de caséine $\kappa$ comme point d'ancrage	- protéines purifiées	- cracking du lait
Point isoélectrique	- greffage chimique - ligands ioniques	- addition de protéines globulaires de pl variables - provoquer la réaction de Maillard - déglycosylation de la caséine $\kappa$
Hydrophobie de surface	- greffage chimique - ligands non-ioniques	- contrôle de la dénaturation - emprésurage

Tableau 1 : Hypothèse des propriétés des agrégats susceptibles de modifier le pH de déstabilisation de la micelle de caséine, et les moyens pour les moduler.

Propriété	Moyens scientifiques	Moyens alimentaires
Pontages disulfures inter et intra	- réduction/oxydation chimique du thiol - greffage ou masquage chimique de thiols - génie génétique	- conditions redox - électroréduction - pH - addition de protéines riches en SH
Taille	- minéraux et force ionique - ligands	- pH - ratio caséine/protéines de lactosérum - concentration en protéines - lactose et ions
Forme	- protéines purifiées - greffage (carboxymethylation des caséines $\kappa$ )	- pH - ratio caséine/ protéines de lactosérum

Tableau 2 : Hypothèse des propriétés des agrégats susceptibles de modifier l'aptitude de la micelle de caséine à former un gel ferme, et les moyens pour les moduler.

### *La charge et le point isoélectrique des agrégats protéiques thermo-induits déterminent le pH de gélification des gels acides modèles*

Le pI des agrégats semble modifier le pH de gélification du lait. Une hypothèse est que les agrégats thermo-induits, en se fixant à la micelle, la fonctionnalisent en modifiant son pI (Lucey et al., 1997) et accélèrent ainsi la déstabilisation du lait. On a donc fait varier le pI des agrégats protéiques. Le challenge dans ce type d'approche est d'être capable de produire des agrégats possédant des pI différents, mais avec les mêmes autres propriétés physico-chimiques et structurales. Les différentes voies possibles sont schématisées dans la figure 4.

Une première voie consiste à modifier le pI des protéines entrant dans la composition du mélange que l'on chauffe pour produire les agrégats (voie A de la Figure 4). Ceci peut être obtenu en mettant à profit les variations génétiques naturelles des protéines de lactosérum. Il existe en effet 11 variants différents de la  $\beta$ lg (Farrell et al., 2004). Par exemple, la  $\beta$ lg A a une charge négative supérieure à celle du variant B. On peut aussi former les agrégats protéiques en présence de ou avec des protéines non laitières de pI différents de ceux des protéines de lait, comme le lysozyme, les protéines glycinine et conglycinine de soja (Roesch et al., 2004; Roesch et al., 2006) et l'ovalbumine (Famelart et al., 2003; Famelart et al., 2004). On peut modifier le pI de la  $\beta$ lg par glycation, puisqu'il s'agit de rajouter un sucre sur l'amine  $\epsilon$  avec une élimination concomitante d'une charge positive (Chevalier et al., 2001; Chobert et al., 2006) ou par conjugaison avec un oligosaccharide acide (Hattori et al., 2004). Enfin, on peut modifier le pI des protéines par des greffages chimiques ou enzymatiques (Alting et al., 2003) ou par phosphorylation chimique des protéines (Sitohy et al., 1995). Le défaut de cette approche est que les cinétiques de dénaturation et d'agrégation des protéines greffées peuvent être modifiées avec pour conséquence peu ou pas d'agrégats produits, ou des agrégats très différents de la forme naturelle.

Une deuxième voie consiste à modifier les conditions lors du traitement thermique, par exemple le pH ou la force ionique au cours du chauffage (voie B de la figure 4). Ceci est mis à profit par Bovetto et Schmitt (Schmitt et al., 2009; Bovetto et al., 2007), mais il est délicat d'obtenir des agrégats de taille constante en faisant varier les conditions ioniques au cours du chauffage comme rapporté par de nombreux travaux sur les tailles des complexes (Caussin et al., 2004; Xiong, 1992; O'Kennedy et al., 2009).

La dernière voie, celle que nous empruntons, consiste à produire des agrégats protéiques dans des conditions constantes permettant d'atteindre une taille connue constante, puis à les modifier par la suite (voie C de la Figure 4). Ces modifications peuvent être réalisées par fixation de ligands chargés comme le SDS (Jung et al. 2008) ou par succinylation ou méthylation (Alting et al., 2002). Toutefois, le greffage de tensio-actifs comme le SDS pourrait induire des modifications structurales des agrégats, dans la mesure où ils modifient les interactions hydrophobes qui contribuent à leur formation.

Nous avons produit des agrégats par chauffage à 68.5°C pendant 2 h de protéines de lactosérum en solution à 90 g.kg<sup>-1</sup> dans de l'eau à pH 7.5. Nous avons ensuite modifié leur pI par succinylation et méthylation. Les agrégats sont plus ou moins succinylés avec de l'anhydride succinique (Alting et al., 2002) ou méthylés avec de la méthylamine (Broersen et al., 2007). Les agrégats témoins, succinylés et méthylés sont appelés respectivement N0, N-1-N-2 et N+1-N+2 selon l'intensité des modifications (voir Figure 5). Les agrégats sont lavés dans de l'eau pour éliminer les réactifs, puis mis en équilibre dans de la phase soluble de lait, où ils sont caractérisés. Ils sont ensuite introduits dans un modèle de lait écrémé exempt de protéines du lactosérum, afin de constituer un lait chauffé recombinaison. Ce lait est enfin acidifié par addition de glucono- $\delta$ -lactone ; la formation du gel acide est suivie par rhéométrie.

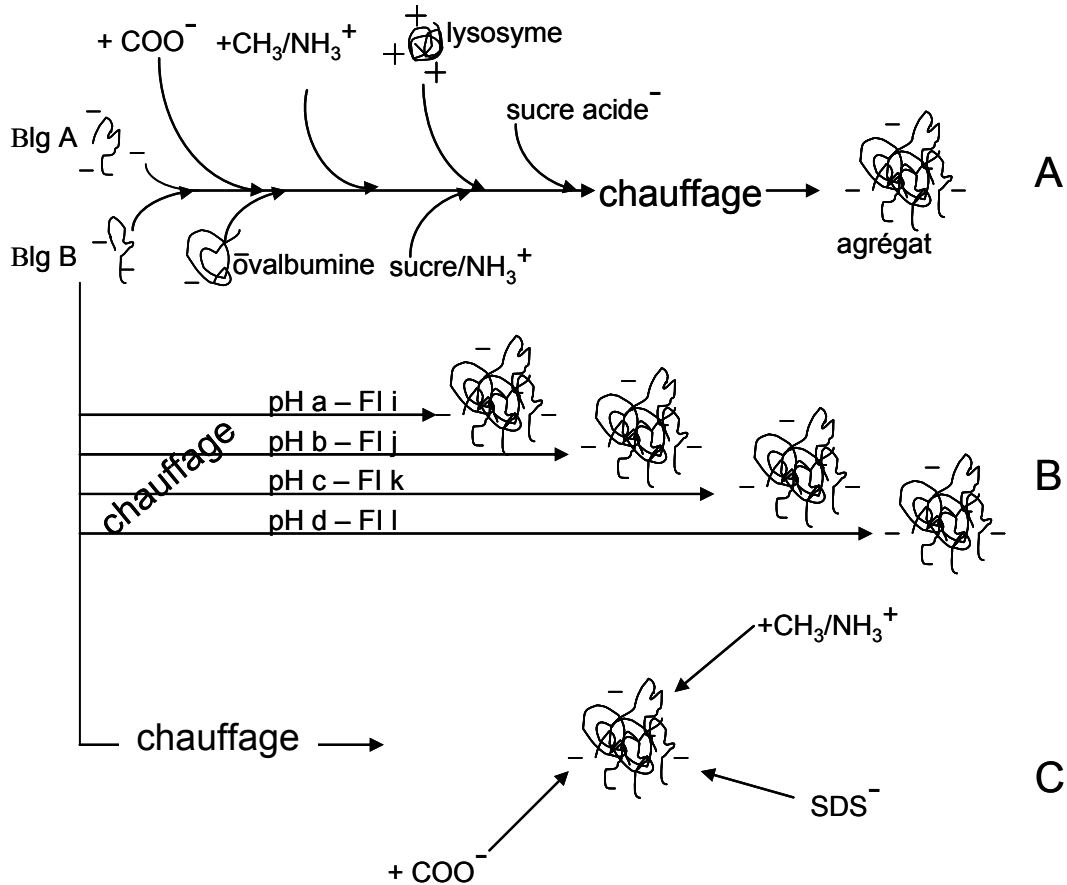


Figure 4 : Schéma des différentes voies possibles de modification du pI et des charges des agrégats thermo-induits. A : modification du pI des protéines en solution avant le traitement thermique ; B : modification des conditions ionique (pH et force ionique) lors du chauffage ; C : modification des agrégats thermo-induits. Voir le texte pour détails.

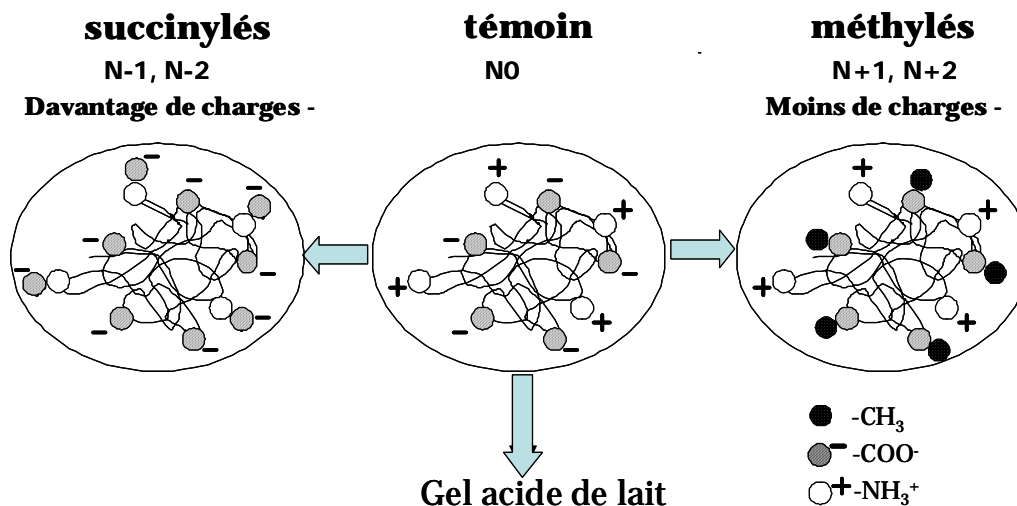
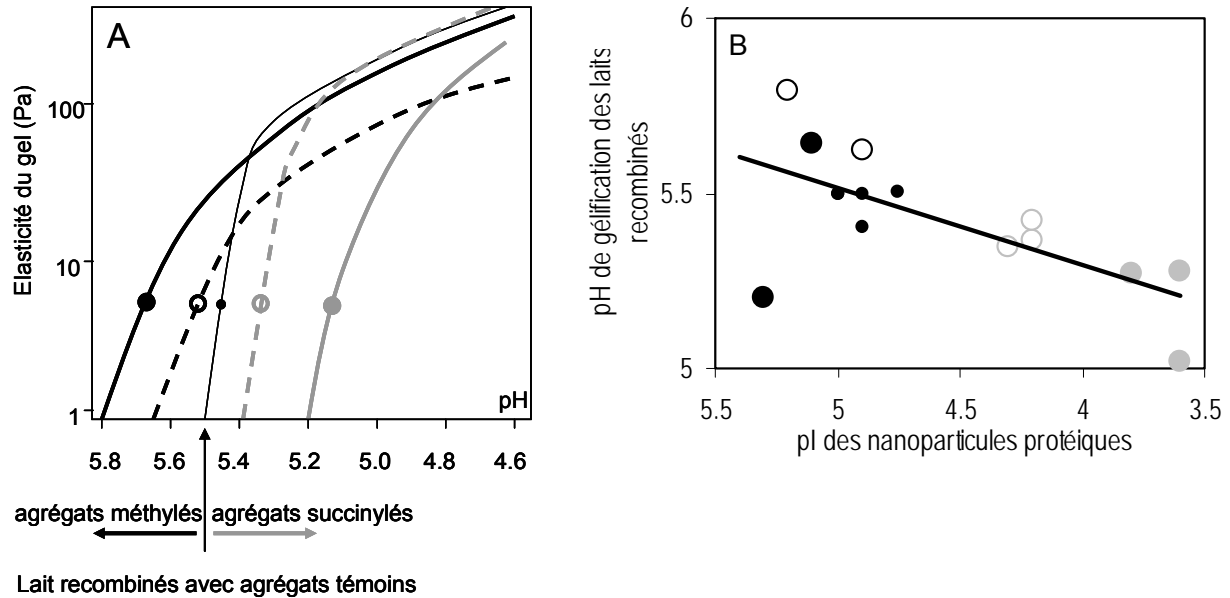


Figure 5 : Schéma de la fabrication des agrégats protéiques de pI et charges électriques modifiés



Les caractéristiques physico-chimiques et structurales des agrégats témoins et modifiés ont été mesurées. A part leur pI et leur charge, toutes les autres caractéristiques (taille, forme, hydrophobie de surface, teneur en thiol, structure secondaire) sont identiques pour tous les agrégats obtenus. Ainsi, des agrégats de pI variable entre 3.5 et 5.5 ont été produits, toutes choses égales par ailleurs, et peuvent donc être comparés. La Figure 6 montre la cinétique de gélification des laits recombinaés avec ces agrégats. La modification du pI des agrégats entraîne essentiellement des modifications du pH de gélification des laits. Lorsque le pI des agrégats est diminué, la gélification a lieu à un pH plus acide, alors qu'une élévation du pI entraîne une gélification précoce, c'est-à-dire à un pH plus élevé.



**Figure 6** : Gélification acide des laits recombinaés contenant les agrégats témoins, succinylés et méthylés (A) : les pH de gélification sont corrélés avec le point isoélectrique des agrégats (B). Mêmes symboles dans A et B.

La charge des agrégats pilote donc la gélification des laits chauffés. Celle-ci a lieu lorsque les agrégats thermo-induits approchent leur charge nulle. Pourtant, les agrégats thermo-induits ne représentent que 20% des protéines dans les laits, alors que la micelle de caséine est présente à 80%. Ceci s'explique par une fonctionnalisation de la micelle de caséine par les agrégats : en se fixant à la surface des micelles, les propriétés de charge des agrégats se substituent à celles de la micelle.

### Conclusions

C'est lorsque la charge des agrégats est la plus faible qu'a lieu la gélification du lait. Ceci s'explique probablement par la réduction des répulsions électrostatiques, mais la nature des interactions constructives dans le gel reste à démontrer. Les autres propriétés candidates des agrégats sont en cours d'étude (voir Tableaux 1 et 2).

Cette approche d'ingénierie de ces nanoparticules peut fort bien être transposée à l'étude de la construction d'autres gels (fromages, gels thermiques...) ou à d'autres types d'interactions (protéines-polysaccharides, protéines-lipides) ou même à l'étude de la déstructuration des aliments au cours de la digestion, par exemple afin d'étudier le devenir des d'interactions dans le tube digestif.

## Propriétés moussantes d'agrégats de protéines

La formation de mousses aqueuses à partir de solutions de protéines dépend de la nature des protéines et de leur capacité à stabiliser les interfaces eau-air. Du fait des traitements thermo-mécaniques qu'elles subissent lors des procédés industriels, les protéines sont plus ou moins agrégées. Les propriétés de ces structures agrégées ne sont en général pas les mêmes que celles des protéines non agrégées. Peu de recherches ont été cependant menées pour comprendre et mieux déterminer le rôle de ces assemblages dans la formation et la stabilisation des mousses. Il a cependant été montré que la dénaturation et les traitements thermiques améliorent les propriétés interfaciales et moussantes des protéines grâce à l'augmentation de la flexibilité moléculaire et de l'hydrophobie de surface des protéines (Kim et al., 2005). Zhu et Damodaran (1994) ont mis en évidence que les changements conformationnels que subissent les protéines induisaient l'amélioration des propriétés moussantes des solutions de protéines et ont montré l'importance du ratio protéines non agrégées/agrégats. Ils ont suggéré que les protéines non agrégées doivent s'adsorber plus rapidement à l'interface contribuant à la formation de la mousse alors que les agrégats s'adsorbant plus lentement ne viennent que contribuer à la stabilité du film interfacial de protéines déjà formé. D'autres études (Davis et al., 2004) ont montré que les agrégats peuvent augmenter l'élasticité des couches adsorbées à l'interface. Il est également admis dans la littérature (Langevin, 2000; Dickinson, 1999) l'importance de la rhéologie interfaciale dans la stabilité des interfaces et des mousses. Les protéines forment des couches viscoélastiques aux interfaces eau/air, résultantes de fortes interactions intermoléculaires. Ce réseau formé à l'interface permet ainsi de renforcer la stabilité de ces systèmes.

Cependant, les études entreprises sur les agrégats de protéines et leur comportement aux interfaces eau/air et dans les mousses négligent en réalité les protéines non agrégées résiduelles qui sont présentes en larges quantités (Schmitt et al., 2009). Dans ce cas, les protéines non agrégées gouvernent les propriétés interfaciales et moussantes du mélange car elles sont suffisantes pour couvrir les interfaces formées mais elles ne permettent pas d'expliquer les changements de propriétés constatées quand elles sont en présence d'agrégats.

Dans ce contexte, il apparaît primordial de prendre en compte l'état d'agrégation des protéines pour mieux comprendre leur capacité à former et à stabiliser les interfaces eau/air puis les mousses.

Dans le cadre des travaux menés au sein du laboratoire BIA de l'INRA de Nantes sur les propriétés moussantes de biopolymères, la  $\beta$ lg est couramment utilisée comme protéine modèle. Ses mécanismes d'agrégation étant parfaitement connus (Mahmoudi et al., 2007), des agrégats de taille et de forme diverses peuvent être obtenus en jouant sur les conditions du milieu. Ainsi, en changeant la concentration initiale en protéines (de 1 à 10 g/L), nous avons pu obtenir des agrégats de taille variable par traitement thermique pendant 24 h à 80°C (Figure 7). Les tailles moyennes d'agrégats mesurées par diffusion de la lumière sont pour les différents types d'agrégats : 35, 71, 117 et 197 nm. Ces agrégats peuvent ensuite être utilisés pour former des mousses modèles qui permettent de déterminer le rôle respectif des agrégats et des protéines non agrégées au sein d'une mousse en formant des mélanges ayant des proportions variables d'agrégats et de protéines non agrégées.

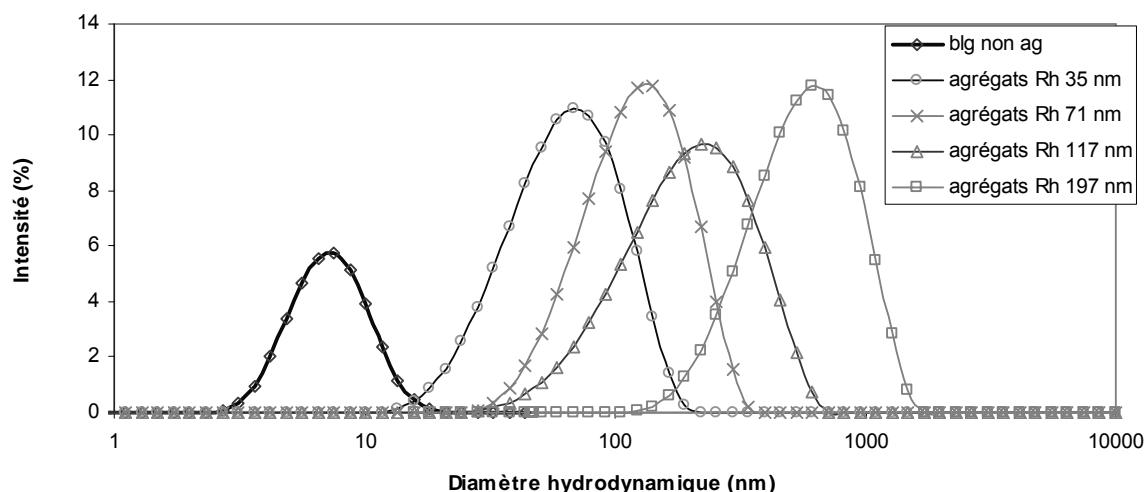


Figure 7 : Distribution en taille de la  $\beta$ lg non agrégée et des agrégats de protéines obtenue en diffusion dynamique de la lumière.

Nous avons ainsi pu montrer que dans tous les cas, les propriétés moussantes des agrégats en l'absence de protéines non agrégées sont plus faibles que celles de la protéine non agrégée (Figure 8). Plus la taille des agrégats augmente, plus on s'éloigne du comportement de la protéine non agrégée : les mousses sont soit plus instables, soit impossibles à former.

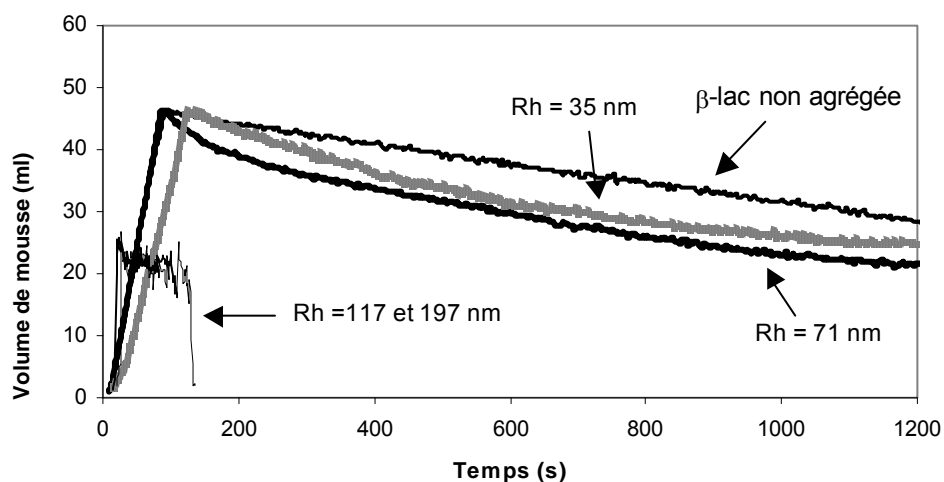
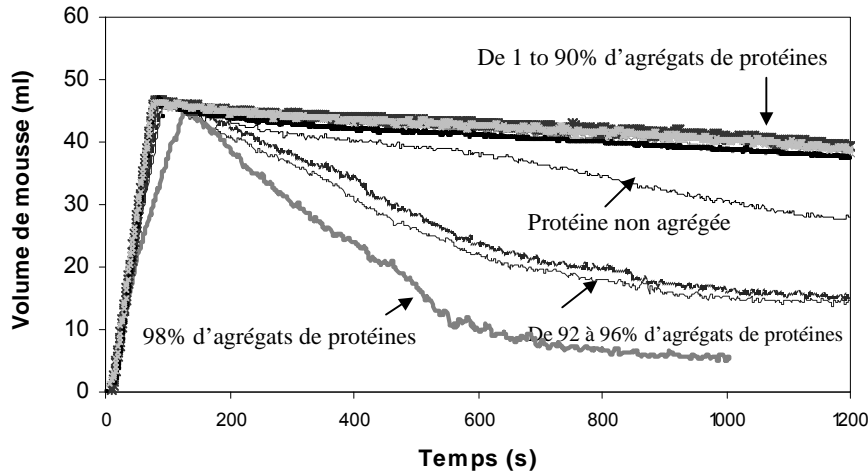


Figure 8 : Evolution du volume de mousse pour des solutions de  $\beta$ lg non agrégée et d'agrégats de protéines. Les mousses sont obtenues par bullage d'une solution de protéines à 1 g/L. Le volume de mousse est déterminé en temps réel à l'aide d'une caméra.

Puisque plusieurs études ont montré que la présence d'agrégats pouvait améliorer les propriétés moussantes des protéines, il apparaît donc que les protéines non agrégées jouent un rôle primordial dans la stabilisation des mousses par des agrégats de protéines.

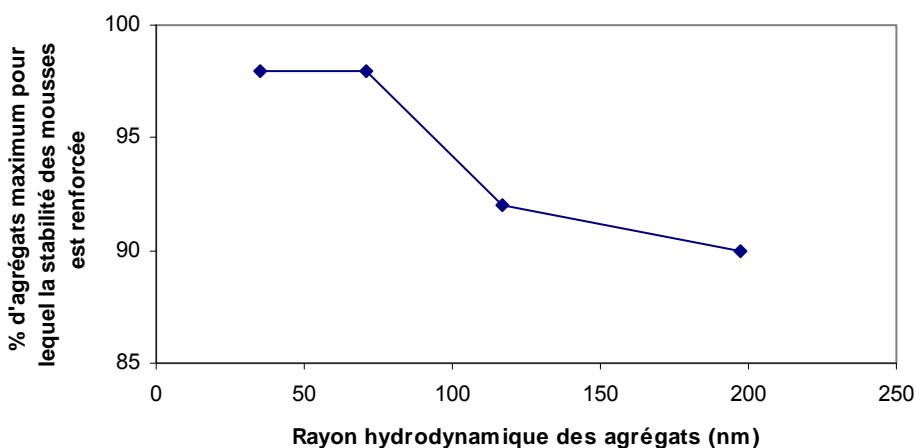
En effet, lorsque des proportions variables de protéines non agrégées sont ajoutées à des solutions d'agrégats, leurs propriétés moussantes en sont fortement affectées comme le montre la Figure 9.



**Figure 9 :** Evolution du volume de mousse en fonction du temps pour différents mélanges de protéines non agrégées/agrégats (1 g/L) pour des agrégats de protéine avec un  $R_h$  de 197 nm

Nous observons que le volume des mousses mesuré à la fin de l'expérience pour des mélanges contenant de 1 à 90 % de larges agrégats est supérieur à celui de la mousse de protéines non agrégées. Lorsque la quantité d'agrégats est supérieure à 90 %, la stabilité de la mousse est fortement affectée. Les mélanges qui contiennent de 92 % à 96 % de larges agrégats de protéines présentent des volumes de mousse à la fin de l'expérience (c'est-à-dire 1200 s après la fin du bullage) inférieurs à 20 mL. Pour des mélanges contenant 98 % d'agrégats de protéines, la mousse se déstabilise très rapidement car le volume de mousse final est seulement de 5 mL environ. Pour une taille d'agrégats donnée, la quantité d'agrégats est un paramètre clé dans la stabilisation des mousses. Dès que l'on ajoute une faible quantité d'agrégats à une solution de protéines (dès 1% d'agrégats), les propriétés moussantes de cette solution sont améliorées. Cet effet persiste tant que l'on ne dépasse pas la quantité critique évoquée préalablement pour laquelle les mousses sont moins stables.

De plus, la stabilité des mousses dépend également fortement de la taille des agrégats. En effet, le rapport maximal agrégat / protéine non agrégée pour lequel la stabilité de la mousse est renforcée, est dépendant de la taille des agrégats. Plus la taille des agrégats est petite et plus ce rapport est élevé comme l'indique la Figure 10.

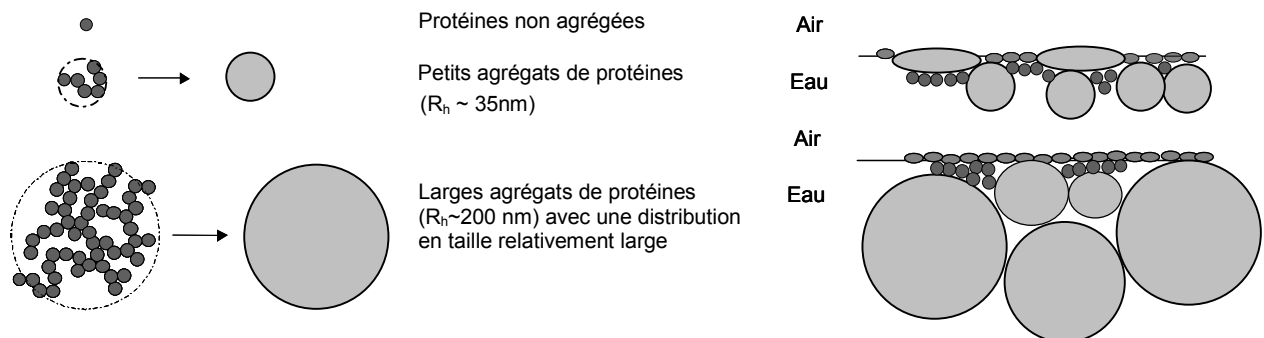


**Figure 10 :** Evolution de la proportion maximale d'agrégats de protéines pour laquelle la stabilité des mousses est renforcée en fonction de la taille des agrégats

Afin de comprendre les mécanismes de stabilisation des mousses par ces mélanges d'agrégats et de protéines non agrégées, des études ont été réalisées sur des films de mousses isolés ainsi que sur des

interfaces modèles eau/air. Elles ont permis de montrer qu'en mélange, des phénomènes de compétition se produisent entre les espèces agrégées ou non. Du fait de la différence de taille et donc de mobilité entre les protéines non agrégées et les agrégats, ce sont les protéines non agrégées qui s'adsorbent préférentiellement à l'interface. Les agrégats viennent ensuite interagir avec les protéines adsorbées. Les couches interfaciales sont alors plus élastiques que celles formées par les protéines non agrégées. Les protéines non agrégées ainsi que les petits agrégats présents dans le mélange jouent à l'interface le rôle de points d'ancrage pour les agrégats pour former des structures connectées entre elles.

Au sein des films isolés, de larges structures de quelques microns peuvent se former. Il existe une proportion minimale de protéines non agrégées, proportion elle-même dépendante de la taille des agrégats, pour laquelle ces structures sont connectées entre elles. La connectivité ainsi que la mobilité des structures dépend du ratio protéines non agrégées / agrégats. En présence d'une faible quantité d'agrégats, la connectivité des structures est partielle. Un phénomène de confinement des agrégats et de percolation peut se produire dans les films. En présence d'une forte quantité d'agrégats, ce phénomène aboutit à la formation d'un réseau de type gel dans lequel les structures sont totalement connectées entre elles et emplissent le film. L'interface n'est alors que partiellement couverte en raison de la faible quantité de protéines non agrégées présentes dans le mélange. En dépit de la formation du réseau de type gel, l'interface est moins efficacement stabilisée, supportant des changements de pression plus faibles que dans le cas de mélanges contenant une forte quantité de protéines non agrégées. Ces mélanges sont fortement résistants aux changements de pression, même si la connectivité des structures n'est que partielle. Dans ce cas, les protéines non agrégées sont présentes en quantité suffisante pour stabiliser efficacement l'interface. La résistance des films de mousse dépend donc à la fois de la couverture de l'interface par les protéines non agrégées et de la connectivité des structures formées (Figure 11).



**Figure 11 :** Représentation schématique des couches adsorbées formées par les mélanges de protéines non agrégées et d'agrégats de protéines selon leur taille.

La présence d'agrégats contribue à augmenter les propriétés viscoélastiques des couches adsorbées et conduit à la formation de mousses stables. Le drainage (écoulement du liquide présent dans la mousse) est ralenti par la présence d'agrégats, et ce d'autant plus que la taille et la quantité d'agrégats augmentent.

Les agrégats de protéines peuvent être considérés comme des nanoparticules présentant des propriétés de surface spécifiques. Les récents travaux sur les mousses de particules (Hunter et al., 2008; Guignot, 2008; Horozov, 2008) permettent de discuter sur une analogie entre mousses d'agrégats de protéines et mousses de particules. Comme dans le cas des protéines, les particules s'adsorbent aux interfaces de manière irréversible à partir du moment où elles présentent des propriétés mouillantes satisfaisantes (angle de contact optimal) et une gamme de taille correcte (de 30 nm à 1,6  $\mu$ m). Binks et Horozov (2005) ont observé un phénomène d'agrégation de particules, conduisant à une augmentation de la viscosité de la phase continue, améliorant la stabilité des mousses. Ce phénomène peut être relié à celui observé dans le cas des agrégats de protéines. La grande stabilité des mousses de particules résulte de deux points-clés : d'une part, la capacité des

particules à former une couche dense autour des bulles de gaz, et d'autre part la formation d'un réseau de type gel dans la phase continue. La forme, la taille, la concentration ainsi que l'hydrophobie des particules ont été identifiées comme étant les principaux facteurs de stabilisation des mousses. La Figure 11 schématise l'analogie entre mousse de particules et mousses d'agrégats de protéines.

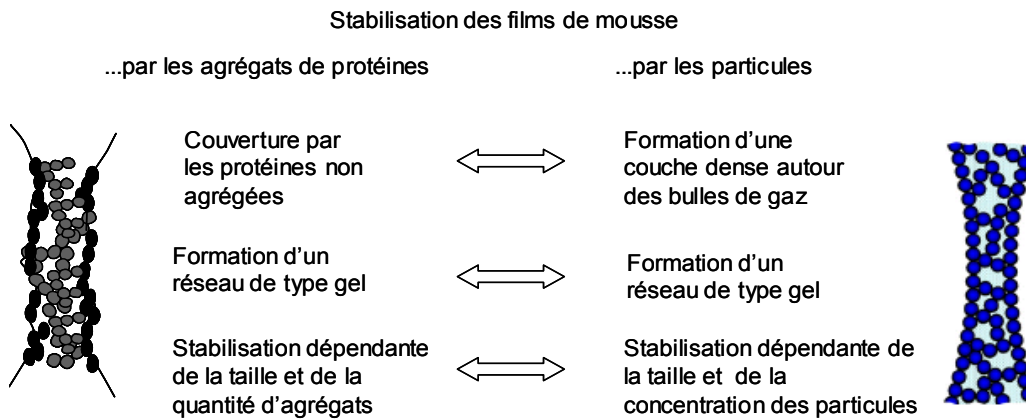


Figure 12 : Analogie entre mousse d'agrégats de protéines et mousses de particules. Le schéma du film de mousse stabilisé par les particules est tiré d'Horozov et al. (2008)

Ces résultats sur les propriétés moussantes d'agrégats de protéines ouvrent la voie à l'obtention d'agrégats aux propriétés contrôlées en termes de structure et de surface, domaine généralement appelé «design» ou «ingénierie» moléculaire. D'un point de vue de l'intérêt industriel, la compréhension des phénomènes de stabilisation des mousses par les agrégats pourrait contribuer à mieux maîtriser les formulations et les procédés afin d'obtenir des propriétés moussantes contrôlées. Des industriels des ingrédients commercialisent déjà des kits enrichis en agrégats de protéines préformés. On peut imaginer par exemple, dans un système qui aura de faibles propriétés moussantes, que le fait de le pré-enrichir en une solution d'agrégats aux propriétés moussantes connues permettra de conférer au système les propriétés moussantes désirées.

## Conclusion

Qu'il s'agisse des gels ou des mousses ou plus généralement d'aliments transformés à base de protéines laitières, ces avancées témoignent de la question centrale des interactions qui s'établissent au sein d'un système au moment de sa structuration (transition sol/gel, foisonnement). Après avoir étudié la nature et les propriétés des «biobriques» issues du lait ou de sa préparation courante (traitement thermique en particulier), nos recherches se sont ainsi intéressées aux interactions par lesquelles ces biobriques confèrent leurs aptitudes fonctionnelles – gélifiante ou moussante – à la matière première. En permettant l'identification des interactions formées entre les particules et la maîtrise des conditions pour les obtenir, cette étude de «l'assemblage des assemblages» a ouvert la voie au design ou ingénierie des biobriques issues des protéines laitières. Intéressante sur le plan scientifique, cette approche permettra également de revisiter la création d'ingrédients technofonctionnels laitiers.

Nous remercions la Région Bretagne pour le financement de la thèse de Marion Morand qui a participé à l'obtention de certains des résultats présentés ici.

## Références bibliographiques

- Alting A.C., De Jongh H.H.J., Visschers R.W., Simons J.-W.F.A., 2002. Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4682-4689.
- Alting A.C., Hamer R.J., de Kruif C.G., De Jongh H.H.J., Simons J.W.F.A., Visschers R.W., 2003. Physical and chemical interactions in pH-induced aggregation and gelation of whey proteins. *Food Colloids, Biopolymers and Materials* 284, 49-57.
- Anema S.G., Li Y., 2000. Further studies on the heat-induced, pH dependent dissociation of casein from the micelles in reconstituted skim milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology* 33, 335-343.
- Binks B.P., Horozov T.S., 2005. Aqueous foams stabilized solely by silica nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition* 44, 3722-3725.
- Bovetto L.J.R, Schmitt C.J.E., Beaulieu M., Carlier N., Unterhaslberger G., 2007. Nanoparticulated whey proteins. Brevet n°11/691,705, US 2007/0231453 A1, 1-7.
- Broersen K., Weijers M., de Groot J., Hamer R.J., De Jong H.H.J., 2007. Effect of protein charge on the generation of aggregation-prone conformers. *Biomacromolecules* 8, 1648-1656.
- Caussin F., Bouhallab S., 2004. Environnement minéral et propriétés fonctionnelles des protéines sériques. In : F.Gaucheron (Eds.), *Minéraux et produits laitiers*, Tec et Doc, Londres, England, p.343-390.
- Chevalier F., Chobert J.M., Popineau Y., Nicolas M.G., Haertle T., 2001. Improvement of functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal* 11, 145-152.
- Chobert J.M., Gaudin J.C., Dalgalarondo M., Haertle T., 2006. Impact of Maillard type glycation on properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *Biotechnology Advances* 24, 629-632.
- Davis J.P., Foegeding E.A., 2004. Foaming and interfacial properties of polymerized whey protein isolate. *Journal of Food Science* 69, C404-C410.
- de Wit J.N., Hontelez-backx E., Adamse M., 1988. Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates 3-Functional properties in aqueous solution. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 42, 155-172.
- Dickinson E., 1999. Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 15, 161-176.
- Donato L., Dalgleish D.G., 2006. Effect of pH of heating on the qualitative and quantitative compositions of the sera of reconstituted skim milks and on the mechanisms of formation of soluble aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7804-7811.
- Donato L., Guyomarc'h F., 2009. Formation and properties of the whey protein/ $\kappa$ -casein complexes in heated skim milk - a review. *Dairy Science and Technology* 89, 3-29.
- Famelart M.H., Tomazewski J., Piot M., Pezennec S., 2003. Comparison of rheological properties of acid gels made from heated casein combined with  $\beta$ -lactoglobulin or egg ovalbumin. *International Dairy Journal* 13, 123-134.
- Famelart M.H., Tomazewski J., Piot M., Pezennec S., 2004. Comprehensive study of acid gelation of heated milk with model protein systems. *International Dairy Journal* 14, 313-321.
- Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F., Swaisgood H.E., 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision. *Journal of Dairy Science* 87, 1641-1674.
- Guignot S., 2008. Rôle des particules colloïdales sur la stabilité de mousses de décontamination. Thèse de doctorat, Doctorat de l'Université Paris-Est, pp 169.
- Guyomarc'h F., Jemin M., Le Tilly V., Madec M.N., Famelart M.H., 2009a. Role of the heat-induced whey protein/ $\kappa$ -casein complexes in the formation of acid milk gels: a kinetic study using rheology and confocal microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5910-5917.

- Guyomarc'h F., Law A.J.R., Dalgleish D.G., 2003. Formation of soluble and micelle-bound protein aggregates in heated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4652-4660.
- Guyomarc'h F., Nono M., Nicolai T., Durand D., 2009b. Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of  $\kappa$ -casein or sodium caseinate. *Food Hydrocolloids* 23, 1103-1110.
- Guyomarc'h F., Renan M., Chatriot M., Gamberre V., Famelart M.H., 2007. Acid gelation properties of heated skim milk as a result of enzymatically induced changes in the micelle/serum distribution of the whey protein/ $\kappa$ -casein aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 10986-10993.
- Hattori M., Miyakawa S., Ohama Y., Kawamura H., Yoshida T., To O., Kuriki T., Takahashi K., 2004. Reduced immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4546-4553.
- Horozov T.S., 2008. Foams and foam films stabilised by solid particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13, 134-140.
- Hunter T.N., Pugh R.J., Franks G.V., Jameson G.J., 2008. The role of particles in stabilising foams and emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 137, 57-81.
- Jean K., Renan M., Famelart M.H., Guyomarc'h F., 2006. Structure and surface properties of the serum heat-induced protein aggregates isolated from heated skim milk. *International Dairy Journal* 16, 303-315.
- Journal officiel, 1997. Décret relatif aux laits fermentés et au yaourt ou yoghourt n°88-1203 du 30 décembre 1988NOR:ECOC8800150D, consolidé au 3 avril 1997.
- Jung J.M., Savin G., Pouzot M., Schmitt C., Mezzenga R., 2008. Structure of heat-induced  $\beta$ -lactoglobulin aggregates and their complexes with sodium-dodecyl sulfate. *Biomacromolecules* 9, 2477-2486
- Kim D.A., Cornec M., Narsimhan G., 2005. Effect of thermal treatment on interfacial properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science* 285, 100-109.
- Langevin D., 2000. Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. *Advances in Colloid and Interface Science* 88, 209-222.
- Lucey J.A., Singh H., 1998. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International* 30, 529-542.
- Lucey J.A., Teo C.T., Munro P.A., Singh H., 1997. Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. *Journal of Dairy Research* 64, 591-600.
- Mahmoudi N., Mehalebi S., Nicolai T., Durand D., Riaublanc A., 2007. Light-scattering study of the structure of aggregates and gels formed by heat-denatured whey protein isolate and  $\beta$ -lactoglobulin at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3104-3111.
- Mollé D., Jean K., Guyomarc'h F., 2006. Chymosin sensitivity of the heat-induced serum protein aggregates isolated from skim milk. *International Dairy Journal* 16, 1435-1441.
- Morand M., Guyomarc'h F., Famelart M.H., 2011. How to tailor heat-induced whey protein/-casein complexes, as a means to investigate the acid gelation of milk - a review. *Dairy Science and Technology* DOI 10.1007/s13594-011-0013-x.
- O'Kennedy B.T., Kelly P.M., 2000. Evaluation of milk protein interactions during acid gelation using a simulated yoghurt model. *Milchwissenschaft* 55, 187-190.
- O'Kennedy B.T., Mounsey J.S., 2009. The dominating effect of ionic strength on the heat-induced denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin in simulated milk ultrafiltrate. *International Dairy Journal* 19, 123-128.
- Roesch R., Corredig M., 2006. Study of the effect of soy proteins on the acid-induced gelation of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8236-8243.
- Roesch R., Juneja M., Monagle C., Corredig M., 2004. Aggregation of soy/milk mixes during acidification. *Food Research International* 37, 209-215.



Schmitt C., Bovay C., Vuillomenet A.M., Rouvet M., Bovetto L., Barbar R., Sanchez C., 2009. Multiscale characterization of individualized  $\beta$ -lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions. *Langmuir* 25, 7899-7909.

Schorsch C., Wilkins D.K., Jones M.J., Norton I.T., 2001. Gelation of casein-whey mixtures: effects of heating whey proteins alone or in the presence of casein micelles. *Journal of Dairy Research* 68, 471-481.

Sitohy M., Chobert J.M., Popineau Y., Haertle T., 1995. Functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin phosphorylated in the presence of different aliphatic amines. *Le Lait* 75, 503-512.

Xiong Y.L., 1992. Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 380-384.

Zhu H.M., Damodaran S., 1994. Heat-Induced Conformational-Changes in Whey-Protein Isolate and Its Relation to Foaming Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 846-855.