

**MAUDE GIRARD**

**ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ÉMULSIFIANTES D'UN COMPLEXE DE PROTÉINES DE  
LACTOSÉRUM ET DE CARBOXYMÉTHYLCELLULOSE**

**Mémoire  
Présenté  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)**

**Centre STELA  
Département de sciences des aliments et nutrition  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL**

**AVRIL 2000**



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-48927-2

**Canada**

## RÉSUMÉ

Les propriétés émulsifiantes d'un complexe de protéines de lactosérum et de carboxyméthylcellulose ont été étudiées à l'aide d'émulsions modèles à différentes concentrations en NaCl, en protéines et en huile ainsi qu'en présence d'un traitement thermique. La stabilité des émulsions a été évaluée à l'aide d'observations visuelles, de la distribution et de la charge protéique et de mesures rhéologiques.

Les émulsions contenant le complexe ont présenté une floculation des gouttelettes d'huile. La formation d'un tel réseau composé de gouttelettes d'huile et des complexes protège davantage l'émulsion contre la coalescence comparativement aux protéines seules. La déstabilisation de l'émulsion témoin contenant les protéines et carboxyméthylcellulose en mélange s'est caractérisée par l'apparition d'un sérum clair dans la phase inférieure de l'émulsion. C'est la présence du polysaccharide non adsorbé qui serait responsable de l'expulsion du polymère au bas de l'émulsion. La formation des complexes a permis de limiter ce type de déstabilisation en fixant le CMC aux protéines.

Le complexe étudié possède des propriétés uniques lui permettant de prévenir la coalescence tout en limitant l'expulsion de sérum observée en présence d'un polymère non adsorbé.

Paul Paquin, directeur

Maude Girard, étudiante

Sylvie Turgeon, co-directrice

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	II
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES .....	VI
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS .....	X
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE .....	3
1.1. <u>LES ÉMULSIONS</u> .....	4
1.1.1. <i>Mécanismes de déstabilisation d'une émulsion</i> .....	5
1.1.2. <i>Évaluation de la stabilité des émulsions</i> .....	7
1.2. <u>LES PROTÉINES DU LACTOSÉRUM</u> .....	7
1.2.1. <i>Origine et structure</i> .....	7
1.2.2. <i>Effet de la température sur la structure des protéines</i> .....	9
1.2.3. <i>Propriétés émulsifiantes des protéines du lactosérum</i> .....	10
1.3. <u>LE CARBOXYMÉTHYLCELLULOSE (CMC)</u> .....	13
1.3.1. <i>Origine et structure</i> .....	13
1.3.2. <i>Influence de paramètres physico-chimiques sur une solution de CMC</i> .....	14
1.3.3. <i>Propriétés fonctionnelles du CMC</i> .....	15
1.4. <u>LES INTERACTIONS PROTÉINE/POLYSACCHARIDE</u> .....	15
1.4.1. <i>Incompatibilité et compatibilité thermodynamique</i> .....	15
1.4.2. <i>Nature des interactions lors d'une compatibilité thermodynamique</i> .....	17
1.4.3. <i>Facteurs influençant la nature des complexes formés</i> .....	17
1.4.4. <i>Méthode de fabrication de complexes électrostatiques</i> .....	20
1.4.5. <i>Les complexes covalents</i> .....	20
1.4.6. <i>Propriétés fonctionnelles des complexes</i> .....	21

1.4.7. Complexes protéines du lactosérum et carboxyméthylcellulose.....	23
HYPOTHÈSES, BUT ET OBJECTIFS.....	26
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	28
2.1. <u>FABRICATION D'UN COMPLEXE PROTÉINES DE LACTOSÉRUM/CMC</u> .....	29
2.1.1. <i>Choix des constituants</i> .....	29
2.2. <u>DÉTERMINATION DES CONDITIONS DE FABRICATION DES COMPLEXES</u> .....	29
2.2.1. <i>Ratio protéines / polysaccharide</i> .....	29
2.2.2. <i>pH optimal de fabrication des complexes</i> .....	30
2.3. <u>PROCÉDÉ DE FABRICATION DES COMPLEXES</u> .....	30
2.3.1. <i>Solution de carboxyméthylcellulose</i> .....	30
2.3.2. <i>Solutions de protéines de lactosérum</i> .....	30
2.3.3. <i>Préparation des complexes</i> .....	31
2.4. <u>DOSAGE DU CMC ET DES PROTÉINES NON COMPLEXÉS</u> .....	32
2.5. <u>OBSERVATION MICROSCOPIQUE</u> .....	32
2.6. <u>INCORPORATION DES COMPLEXES DANS UNE ÉMULSION MODÈLE</u> .....	32
2.6.1. <i>Fabrication des émulsions modèles</i> .....	32
2.6.2. <i>Effet de la force ionique</i> .....	33
2.6.3. <i>Effet d'un traitement thermique</i> .....	33
2.6.4. <i>Effets combinés de la concentration en protéines, en huile et d'un traitement thermique</i> .....	33
2.6.5. <i>Évaluation de la stabilité des émulsions</i> .....	34
2.6.6. <i>Analyses statistiques</i> .....	36
CHAPITRE 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	38
3.1. <u>DÉTERMINATION DES CONDITIONS DE FABRICATION DES COMPLEXES</u> .....	39
3.1.1. <i>pH de fabrication des complexes</i> .....	39
3.2. <u>CARACTÉRISATION DES COMPLEXES</u> .....	39
3.2.1. <i>Observation microscopique</i> .....	39
3.2.2. <i>Proportion de protéines et CMC complexés</i> .....	40
3.3. <u>PROPRIÉTÉS ÉMULSIFIANTES DES COMPLEXES</u> .....	43
3.3.1. <i>Effet de la force ionique</i> .....	43

3.3.2. <i>Effet d'un traitement thermique</i> .....	52
3.3.3. <i>Effets combinés des concentrations en complexes, en huile, d'un traitement thermique et du type de protéines</i> .....	58
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	70
LISTE DES OUVRAGES CITÉS .....	72
ANNEXE A .....	84
ANNEXE B .....	86

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

### CHAPITRE 1

Figure 1.1 Structure tridimensionnelle de la $\beta$ -lactoglobuline.....	8
Figure 1.2 Le carboxyméthylcellulose.....	14
Figure 1.3 Types de comportements adoptés par les macromolécules en solutions.....	16
thermodynamique	

### CHAPITRE 2

Figure 2.1 Schéma de la mesure de la charge protéique des émulsions.....	35
Figure 2.2 Schéma de la mesure de la distribution protéique.....	36

### CHAPITRE 3

Tableau 3.1 Proportions des protéines et CMC non complexés.....	42
Tableau 3.2 Analyse de variance de l'observation visuelle de la stabilité des émulsions en fonction de la concentration NaCl et du type de protéines.....	47
Tableau 3.3 Analyse de variance des résultats de la mesure de la distribution protéique dans les émulsions en fonction de la concentration NaCl et du type de protéines.....	50

Tableau 3.4	Analyse de variance des résultats de la mesure de la charge protéique d'émulsions en fonction de la concentration NaCl et du type de protéines.....	51
Tableau 3.5	Analyse de variance de l'observation visuelle de la stabilité des émulsions en fonction du traitement thermique (121°C, 10 minutes) et du type de protéines.....	54
Tableau 3.6	Analyse de variance des résultats de la mesure de la distribution protéique des émulsions en fonction du traitement thermique (121°C, 10 minutes) et du type de protéines.....	56
Tableau 3.7	Analyse de variance des résultats de la mesure de la charge protéique des émulsions en fonction du traitement thermique (121°C, 10 minutes) et du type de protéines.....	57
Tableau 3.8	Analyse de variance de l'observation visuelle de la stabilité d'émulsions en fonction de la concentration en protéines, du type de protéines, de la concentration en huile et du traitement thermique (121°C, 10 minutes) au cinquième jour d'entreposage...	63
Tableau 3.9	Analyse de variance des résultats de la distribution protéique des émulsions en fonction de la concentration en protéines, du type de protéines, de la concentration en huile et du traitement thermique (121°C, 10 minutes).....	65
Tableau 3.10	Analyse de variance des résultats de la mesure de la charge protéique d'émulsions en fonction de la concentration en protéines, du type de protéines, de la concentration en huile et du traitement thermique (121°C, 10 minutes).....	67
Figure 3.1	Valeurs d'absorbance à 650 nm obtenues lors de l'acidification d'une solution à un ratio 4:1 d'isolat de protéines de lactosérum et de CMC à 0,1% de solides totaux.....	41

Figure 3.2 Complexes IPLCMC observés au microscope optique à un grossissement 400X..	41
Figure 3.3 Distribution du diamètre des complexes IPLCMC.....	42
Figure 3.4 Volume de sérum clair expulsé dans au bas de tubes de 12 ml d'émulsions à différentes concentrations en NaCl et selon le type de protéines.....	49
Figure 3.5 Observation visuelle d'émulsions après 5 jours d'entreposage selon la concentration en NaCl et le type de protéines.....	49
Figure 3.6 Proportion des protéines totales présentes dans les 10 g au bas de tubes d'émulsions modèles à différentes concentrations en NaCl et selon le type de protéines après 5 jours d'entreposage.....	50
Figure 3.7 Charges protéiques d'émulsions modèles à différentes concentrations en NaCl et selon le type de protéines après 5 jours d'entreposage.....	51
Figure 3.8 Volume de sérum expulsé au bas de tubes de 12 ml d'émulsions à 0mM de NaCl avant et après traitement thermique à 121°C (TT) pendant 10 minutes sur une période de 5 jours.....	56
Figure 3.9 Proportion des protéines totales présentes dans les 10 g au bas de tubes d'émulsions modèles à 0mM NaCl après 5 jours d'entreposage ayant subi ou non un traitement thermique à 121°C pendant 10 minutes.....	57
Figure 3.10 Charge protéique d'émulsions modèles, selon le type de protéines, à 0mM de NaCl, ayant subi un traitement thermique à 121°C pendant 10 minutes ou non, après 5 jours d'entreposage.....	58

- Figure 3.11 Volume du sérum expulsé d'émulsions de 12 ml à 0 mM de NaCl avant et après traitement thermique à 121°C pendant 10 minutes (TT) à différentes concentrations en protéines complexées a) 10% d'huile b) 20% d'huile.....64
- Figure 3.12 Émulsions entreposées 5 jours selon la présence d'un traitement thermique a) 20% huile, 1,0% protéines b) 10% huile, 0,50% protéines.....65
- Figure 3.13 Distribution protéique d'émulsions modèles, à 0mM de NaCl, selon le type de protéines, leurs concentrations en huile et en protéines et l'application d'un traitement thermique à 121°C pendant 10 minutes (TT).....66
- Figure 3.14 Charge protéique d'émulsions modèle selon le type de protéines, les concentrations en huile et en protéines et l'application d'un traitement thermique à 121°C 10 minutes (TT).....68
- Figure 3.15 Viscosité apparente d'émulsions modèles en fonction de la fréquence et du pourcentage en protéines.....68
- Figure 3.16 G' et G'' en fonction de la fréquence et de la concentration en protéines complexées.....69

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

*CMC* : Carboxyméthylcellulose

*IPL* : Isolat de protéines de lactosérum

*Protéines seules* : Protéines en absence de CMC

*IPLCMC* : Complexes de protéines de lactosérum et carboxyméthylcellulose

*IPL CMC n.c.* = *IPL CMC libres* = *IPL CMC en mélange* : Protéines et CMC non complexés

*TT* : Émulsion traitée thermiquement à 121°C pendant 10 minutes

$\eta$  : Viscosité de la solution analysée

$\eta_0$  : Viscosité du solvant

*C* : Concentration du polymère (g/l)

$\eta_r$  : Viscosité relative

*k'* : Constante d'Huggins

*K et a* : Constantes de Mark-Houwink

$[\eta]$  : Viscosité intrinsèque

*G'* : Quantité d'énergie emmagasinée et libérée par cycle d'oscillation

*G''* : Quantité d'énergie dissipée en chaleur

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les exemples d'émulsions alimentaires sont nombreux, elles se présentent entre autres sous la forme d'une vinaigrette, d'une mayonnaise ou encore d'un substitut de repas liquide. Ces émulsions sont de type « huile dans eau » lorsqu'une phase lipidique est dispersée dans une phase aqueuse alors que dans le cas contraire, l'émulsion est dite « eau dans huile ». Une émulsion est un système instable au point de vue thermodynamique. La formation de la dispersion de gouttelettes dans une autre phase incompatible requière donc une quantité importante d'énergie mécanique fournie lors d'une homogénéisation. Immédiatement suivant ce traitement, les phases aqueuse et lipidique tendent à minimiser leur aire de contact, la séparation en deux phases distinctes devenant inévitable.

La prolongation de la stabilité de l'émulsion implique l'ajout d'agents émulsifiants et stabilisants. Parmi les émulsifiants on retrouve des macromolécules telles les protéines. Elles agissent en abaissant la tension interfaciale en s'adsorbant à l'interface huile/eau. L'encombrement stérique créé par les protéines adsorbées joue un rôle de stabilisation de l'émulsion en limitant les contacts entre les gouttelettes. Les polysaccharides contribuent à stabiliser les émulsions en augmentant la viscosité de la phase continue. L'emploi simultané de protéines et d'un polysaccharide en zone d'incompatibilité thermodynamique peut induire la déstabilisation de l'émulsion. L'expulsion du polysaccharide peut être observée lorsqu'il n'est pas adsorbé sur les protéines situées à l'interface huile/eau. Ce phénomène pourrait être contrôlé en complexant les protéines sur le polysaccharide par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques, de liens hydrogènes et covalents. Ce type de complexes a déjà été fabriqué selon un procédé développé par Le Hénaff (1996) à partir de protéines de lactosérum et de xanthane. Les propriétés émulsifiantes d'un complexe obtenu d'un tel procédé étaient cependant, jusqu'à ce jour, encore méconnues.

L'objectif général du projet était de mieux comprendre le comportement de complexes de protéines de lactosérum et carboxyméthylcellulose lors d'une incorporation dans une émulsion modèle à différentes conditions de force ionique, de concentration en huile et en complexes ainsi qu'en présence d'un traitement thermique.

**CHAPITRE 1**  
**REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1.1. Les émulsions

Une émulsion est un mélange de deux liquides non miscibles tels l'eau et l'huile. Deux types d'émulsions sont possibles. Les termes «huile dans eau» sont utilisés pour désigner un mélange où l'eau est la phase continue et l'huile la phase dispersée. Lorsque l'eau est la phase dispersée et l'huile la phase continue, l'émulsion est dite «eau dans huile». La formation d'une émulsion requiert beaucoup d'énergie mécanique puisque le phénomène n'est pas spontané. Plus le diamètre des gouttelettes d'huile est petit, plus les valeurs de polarité des deux phases sont éloignées, plus le travail à fournir devra être important. L'utilisation d'un homogénéisateur combinant les effets de cisaillement, de cavitation et de turbulence est nécessaire afin de briser les grosses gouttelettes d'huile en de plus petites (Walstra, 1984).

Certaines substances dites émulsifiantes contribuent à la stabilité de l'émulsion. Les émulsifiants sont des molécules amphiphiles qui diminuent la tension interfaciale en s'adsorbant aux gouttelettes d'huile. Ils peuvent être de nature lipidique tels les phospholipides et les monoacylglycérol ou encore de nature protéique. Les polysaccharides ne possèdent aucun pouvoir émulsifiant mais stabilisent l'émulsion en augmentant la viscosité de la phase continue. Cette viscosité accrue permet de ralentir la remontée de la matière grasse à la surface de l'émulsion. Malgré l'ajout de substances dites émulsifiantes ou stabilisantes, l'intégrité d'une émulsion reste limitée dans le temps. Les liquides non miscibles auront tendance à minimiser leur aire de contact, la séparation de phase étant l'alternative la moins énergétique. La stabilité d'une émulsion dépend de plusieurs facteurs tels le type de traitement mécanique, la nature et la charge de l'agent émulsifiant, le pH, la force ionique et la viscosité de la phase continue, la densité des gouttelettes d'huile, la température, le champ gravitationnel, la structure à l'interface de l'émulsifiant, les propriétés physiques, mécaniques ainsi que de l'épaisseur du film interfacial (Mangino, 1994). La déstabilisation d'une émulsion alimentaire s'effectue selon trois mécanismes principaux : le crémage, la floculation et la coalescence.

### 1.1.1. Mécanismes de déstabilisation d'une émulsion

#### Le crémage

Le crémage est un mécanisme de déstabilisation selon lequel les gouttelettes d'huile remontent en surface dû à leur différence de densité avec la phase continue. La vitesse du crémage est prédite par la loi de Stokes.

$$v = \frac{2r^2 g \Delta \rho}{9\mu}$$

Selon cette équation, la vitesse du crémage est influencée par le rayon des gouttelettes ( $r$ ), la force gravitationnelle ( $g$ ), la différence de densité entre les deux phases ( $\Delta\rho$ ) et la viscosité de la phase continue ( $\mu$ ).

#### La floculation

La floculation est un deuxième mécanisme de déstabilisation selon lequel les gouttelettes d'huile s'agrègent entre elles sans changement de leur diamètre. La floculation est grandement influencée par la fraction de la phase dispersée, la viscosité de la phase continue et l'interactions entre les gouttelettes. Elle est aussi influencée par la taille des gouttelettes, la distribution de leur taille et l'épaisseur de la couche d'émulsifiant adsorbée. Lorsque des protéines sont utilisées comme émulsifiants, la floculation peut être causée par divers facteurs :

- \* Une diminution de la densité de la charge nette de la protéine à la surface des gouttelettes, par exemple lorsque le pH se rapproche du point isoélectrique.
- \* Une augmentation de la force ionique. Les ions agissent comme écran et diminuent la force de la répulsion entre les gouttelettes recouvertes de protéines.
- \* La présence de substances telle l'éthanol dans la phase continue, engendrant l'agrégation des protéines. Les gouttelettes deviennent donc attirées les unes vers les autres.

- \* L'émulsifiant en concentration insuffisante peut s'adsorber sur plus d'une gouttelette, formant ainsi des ponts entre elles.

La floculation des gouttelettes d'huile peut être accompagnée par une expulsion de la phase aqueuse. Cette floculation réversible est causée par la présence de substances non adsorbées sur les gouttelettes. Il peut s'agir de polysaccharides qui ne sont pas tensioactifs et qui, ayant une taille trop grande pour être inclus dans l'espace entre les gouttelettes d'huile, sont expulsés par la pression osmotique ainsi exercée. Ce type de floculation est souvent observé à basse concentration en polysaccharide. La floculation des émulsions peut se produire selon deux mécanismes : la formation de ponts entre les gouttelettes par l'émulsifiant ou la formation de canaux entre les gouttelettes afin d'expulser un polymère incompatible. Un crémage accéléré fut observé dans des émulsions huile dans eau stabilisées par du caséinate de sodium et du carboxyméthylcellulose ou du xanthane. Bien qu'un mécanisme de floculation par formation de ponts entre les gouttelettes ait été proposé pour le xanthane, le cas du carboxyméthylcellulose reste incertain (Cao et al, 1990, 1991; Syrbe et al., 1998). La floculation par formation de ponts se caractérise par l'accélération du crémage contrairement à la floculation par formation de canaux où la vitesse de crémage est constante (Syrbe et al., 1998). La floculation atteint un maximum à une certaine concentration critique en polysaccharide. Elle devient moins importante sous cette concentration puisque les gouttelettes suivent alors un modèle de sphères isolées. Au-dessus de la concentration critique, la floculation entraîne une augmentation de la viscosité de l'émulsion, limitant ainsi la remontée des gouttelettes d'huile (Dalglish, 1997).

#### La coalescence

La coalescence est la fusion des gouttelettes d'huile ayant pour conséquence une augmentation de leur diamètre. Ce phénomène survient suite à la floculation ou au crémage des gouttelettes. La coalescence est généralement influencée par la fraction volumique de la phase dispersée, la viscosité et l'épaisseur de la couche d'émulsifiant adsorbée et la cristallisation de la matière grasse. Elle est aussi influencée par la viscosité de la phase continue et par les interactions électrostatiques et macromoléculaires entre les gouttelettes. Afin d'éviter la coalescence, les

forces de répulsions résultant des charges résiduelles sur les gouttelettes doivent être supérieures aux forces attractives de van der Waals. La présence de protéines sur les gouttelettes permet de contrôler ce type d'instabilité. Dans certains cas, l'émulsifiant forme des cristaux liquides qui préviennent la coalescence en éloignant les gouttelettes d'huile les unes des autres (Mangino, 1994).

### *1.1.2. Évaluation de la stabilité des émulsions*

Selon le mécanisme de déstabilisation, la stabilité des émulsions peut être évaluée de différentes façons. L'observation visuelle des émulsions au long d'un entreposage d'une durée déterminée peut permettre de voir l'apparition de phases lipidique ou aqueuse. L'apparition d'une phase lipidique est indicatrice de coalescence alors que l'apparition d'une phase aqueuse au bas d'une émulsion est plutôt un indice de floculation. La mesure de la charge protéique qui est le dosage des protéines adsorbées par unité de surface des gouttelettes d'huile permet de comparer la susceptibilité de différentes émulsions à la coalescence.

Les mesures rhéologiques permettent de caractériser le type de déstabilisation survenant dans les émulsions. La viscosité apparente augmente en présence d'une floculation et diminue lors de l'apparition d'une coalescence. Les mesures en rhéologie dynamique évaluant  $G'$  et  $G''$  en fonction de la fréquence fournissent aussi des indices sur les mécanismes de déstabilisation des émulsions. Une augmentation de la composante élastique ( $G'$ ) indique une floculation alors qu'une diminution de ce paramètre indique une coalescence de l'émulsion (Curt, 1994).

## 1.2. Les protéines du lactosérum

### *1.2.1. Origine et structure*

Les protéines du lactosérum sont définies comme étant les protéines solubles présentes dans le lactosérum suivant une précipitation des caséines à pH 4,6 à 20°C (Eigel et al., 1984). En fait, les protéines de lactosérum disponibles sur le marché sont des co-produits de la fabrication fromagère et des caséineries. L'azote total du lait se retrouve à 77% dans les caséines et à

17% dans les protéines de lactosérum. Le pourcentage d'azote résiduel est présent sous une forme non protéique. Les protéines du lactosérum sont composées à 80% d'une fraction protéique comprenant la  $\beta$ -lactoglobuline, l' $\alpha$ -lactalbumine, l'albumine de sérum bovin et des immunoglobulines. Une deuxième fraction, non protéique, comprend les protéoses peptones et de l'azote (De Wit, 1981). Les protéines du lactosérum sont disponibles à des concentrations variant entre 10% dans une poudre de lactosérum et 95% dans un isolat (Kilara, 1994). Des concentrés de protéines de 30 à 90% peuvent être obtenus par une ultrafiltration du lactosérum alors qu'un isolat composé à 95% de protéines nécessite une étape additionnelle de chromatographie par échange ionique.

La principale protéine du lactosérum bovin est la  $\beta$ -lactoglobuline (figure 1.1). Elle représente environ 50 à 60 % des protéines du lactosérum. La  $\beta$ -lactoglobuline d'un poids moléculaire de 16400 daltons (De Wit, 1981), est composée de 162 résidus d'acides aminés. La structure secondaire de cette protéine est constituée de 43% à 50% de feuillets  $\beta$ , de 10 à 15% d'hélices  $\alpha$  et de 15% à 20% de courbes  $\beta$  (Cayot et Lorient, 1998). Deux ponts disulfures ainsi qu'un groupe thiol libre contribuent à la structure tertiaire globulaire très organisée de cette protéine. Le cœur de cette structure globulaire est une région hydrophobe composée d'une hélice  $\alpha$  prise entre deux feuillets  $\beta$ , le tout étant maintenu par un pont disulfure (Cayot et Lorient, 1998).

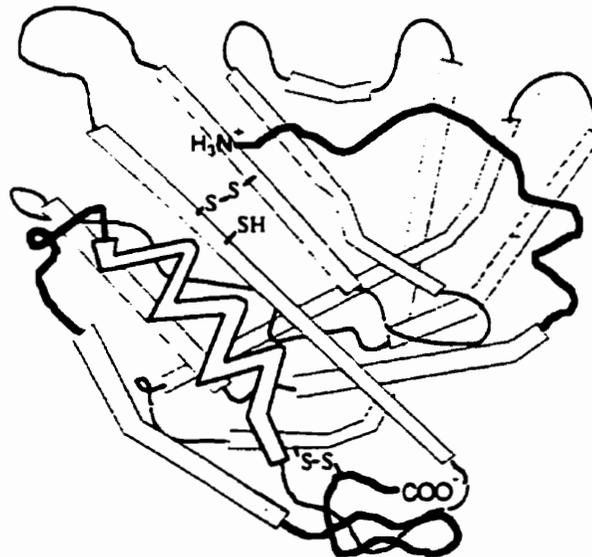


Figure 1.1 Structure tridimensionnelle de la  $\beta$ -lactoglobuline (Cayot et Lorient, 1998)

L' $\alpha$ -lactalbumine est la deuxième protéine en importance du lactosérum. Elle a un poids moléculaire de 14200 daltons (De Wit, 1981) et est composée de 123 résidus d'acides aminés. La structure tertiaire de cette protéine, semblable à celle de la  $\beta$ -lactoglobuline, est maintenue par un ion calcium et 4 ponts disulfures (Cayot et Lorient, 1998). Les protéines minoritaires du lactosérum comprennent l'albumine de sérum bovin (BSA), les immunoglobulines et les protéoses peptones. La BSA est constituée de 582 résidus d'acides aminés, a un poids moléculaire de 69 000 daltons (Morr et Ha, 1993), possède 17 ponts disulfures et un groupe sulfhydryle libre. Les immunoglobulines sont des protéines très hétérogènes de poids moléculaires variant entre 15 et 1000 kd qui, tout comme la BSA, sont retrouvées non seulement dans le lait mais aussi dans le plasma sanguin (Eigel et al., 1984). Les protéoses peptones seraient des fragments de caséines résultant d'une protéolyse (De Wit, 1981).

### *1.2.2. Effet de la température sur la structure des protéines*

Les conditions du milieu telles le pH, la présence de réactifs chimiques, la force ionique ainsi que le solvant utilisé lors de la mise en solution peuvent modifier la structure et les propriétés des protéines du lactosérum. La chaleur est le facteur susceptible de causer le plus de changement dans la structure tridimensionnelle de ces protéines (Morr, 1979, 1984, 1987 ; Schmidt et al., 1984; Kinsella, 1984 ; Modler, 1985). La dénaturation thermique se produit en deux étapes. Premièrement, une température située entre 50°C et 75°C affaiblit les liens hydrogènes, permettant ainsi le déploiement de la molécule et l'exposition des sites réactifs auparavant enfouis. Deuxièmement, les molécules désordonnées s'agrègent par l'intermédiaire des sites réactifs nouvellement exposés, conduisant à la formation de larges agrégats (Morr et Ha, 1993). La vitesse d'agrégation est influencée par la concentration en protéines et la sévérité des traitements appliqués (Cheftel et al., 1985). Lorsque les protéines sont sous forme d'agrégats, le retour à l'état natif n'est plus possible.

Certaines conditions atténuent l'effet d'un traitement thermique. Dans le cas de la  $\beta$ -lactoglobuline, une augmentation de la concentration en lactose, en solides totaux et un pH de 3,0 sont des conditions contribuant à augmenter la stabilité de cette protéine. L'état natif de la  $\beta$ -lactoglobuline devient cependant précaire en présence d'une certaine quantité d'ions

calcium ou en milieu alcalin (pH 8,6) (De Wit et Klarenbeek, 1984). À l'inverse, l'intégrité de la structure de l' $\alpha$ -lactalbumine sera protégée par un pH alcalin, une augmentation de la concentration en ions calcium ainsi qu'une diminution de la concentration en lactose (Schmidt et al., 1984).

Les sucres tels le lactose, le glucose, le galactose et le sorbitol ont un effet protecteur sur la structure des protéines lorsqu'elles subissent un traitement thermique. Les sucres limitent l'agrégation en diminuant les interactions protéine-protéine. Cependant, la présence de sucres réducteurs induit la réaction de Maillard qui implique les groupements amines libres des protéines (Morr et Ha, 1993; Cayot et Lorient, 1998).

### *1.2.3. Propriétés émulsifiantes des protéines du lactosérum*

Les protéines de lactosérum sont incorporées dans certains aliments pour leurs propriétés émulsifiantes. Lorsque la protéine entre en contact avec une gouttelette d'huile, un réarrangement se produit permettant l'orientation des acides aminés polaires vers la phase hydrophile et l'orientation des acides aminés apolaires vers la phase hydrophobe. La quantité de groupements hydrophobes d'une protéine importe peu comparativement à l'accessibilité de ces groupes, dictée par la flexibilité de la molécule (Kinsella et Whitehead, 1988 ; Dickinson et Stainsby, 1988). Généralement, les protéines flexibles telles les caséines diminuent plus efficacement la tension interfaciale que les protéines de lactosérum qui sont globulaires et plus structurées. Toutefois, les protéines globulaires stabilisent plus efficacement les émulsions contre l'agrégation et la coalescence en formant un film protéique plus structuré autour des gouttelettes d'huile. Lors de son adsorption, la  $\beta$ -lactoglobuline perd une partie de sa structure native comparativement à l' $\alpha$ -lactalbumine qui reste sous une forme plus compacte. Les protéines présentes dans la phase continue contribuent à stabiliser l'émulsion en interagissant avec celles déjà adsorbées sur la gouttelette d'huile. Ces interactions n'abaissent pas la tension interfaciale mais peuvent avoir un effet sur la stabilité de l'émulsion par encombrement stérique (Schmitt et al., 1998).

En plus de leur flexibilité, la solubilité des protéines est un deuxième facteur ayant une grande influence sur leurs propriétés émulsifiantes. En effet, une bonne solubilité facilite la diffusion de la protéine dans la phase aqueuse vers l'interface huile/eau (Leman et Kinsella, 1989; Dickinson, 1992). Plusieurs facteurs de l'environnement tels le pH, la température et la force ionique influencent les propriétés émulsifiantes des protéines.

### Le pH

La stabilité d'une émulsion maintenue par des protéines est grandement influencée par le pH. Lorsque la protéine est à son point isoélectrique, la solubilité de la protéine est minimale. Une faible solubilité affecte la diffusion de la protéine jusqu'à l'interface. La  $\beta$ -lactoglobuline native fait exception à cette règle puisqu'elle est soluble à tous pH (Klemaszewski et al., 1992). La vitesse d'adsorption de la  $\beta$ -lactoglobuline est en fait plus rapide aux alentours de son point isoélectrique (Waniska et Kinsella, 1985). Les gouttelettes d'huile formées à ce pH ont un diamètre supérieur dû à la floculation et à coalescence favorisées par la faible répulsion électrostatique entre les gouttelettes d'huile (Langley et al., 1988). Cependant, la proximité du point isoélectrique permet la formation de films protéiques plus cohésifs et plus stables de par l'adsorption compacte favorisée par cette faible répulsion.

### La température

La formation ainsi que la stabilité des émulsions est influencée par la température. Lors de la formation de l'émulsion, une température de 60°C fluidifie la matière grasse facilitant ainsi la diffusion des protéines jusqu'à l'interface. De plus, une température élevée favorise les interactions hydrophobes. Des températures de réfrigération diminueront la stabilité de l'émulsion par l'affaiblissement des interactions hydrophobes. La congélation endommagera la structure de l'émulsion par la formation de cristaux de glace, favorisant ainsi la coalescence des gouttelettes d'huile lors de la décongélation.

L'effet d'un traitement thermique est influencé par la température et le pH de l'émulsion. Le même traitement thermique induit plus de floculation dans une émulsion au point isoélectrique

de l'émulsifiant que lorsque le pH est aux alentours de la neutralité. Ceci s'explique par la répulsion électrostatique existant entre les protéines chargées négativement à un pH supérieur à leur point isoélectrique. Lorsque la température du traitement thermique est située entre 65 et 80°C, la floculation est maximale suite à l'étalement partiel des protéines adsorbées à l'interface les rendant disponibles pour des interactions avec d'autres les gouttelettes (Dalglish, 1996 ; Monahan et al., 1996). Lorsque le traitement est effectué à des températures plus élevées, la floculation diminue. À ces températures, la molécule se réarrange plus rapidement de manière à orienter ses acides aminés hydrophobes vers les gouttelettes, limitant ainsi les interactions hydrophobes avec les protéines adsorbées à d'autres gouttelettes.

Un traitement thermique dénaturant effectué sur les protéines de lactosérum à pH 7 diminue leurs propriétés émulsifiantes. En effet, les agrégats protéiques formés s'adsorbent mais recouvrent difficilement toute la surface de la gouttelette. Lorsque le traitement thermique dénaturant est effectué sur l'émulsion contenant les protéines natives, la stabilité de l'émulsion contre la coalescence augmente. Ceci s'explique par la structure gélifiée que prend le film protéique suite à des interactions intramoléculaires (Mangino, 1994). Cependant, une floculation peut être induite lorsque les protéines adsorbées sur des gouttelettes différentes interagissent par des interactions hydrophobes ou par des ponts disulfures.

La force ionique

L'ajout de NaCl conduit à une augmentation du diamètre des gouttelettes d'huile lors de la formation de l'émulsion (Cayot et Lorient, 1998). Cette augmentation du diamètre est maximale pour un pourcentage en protéines du lactosérum de 2% à un pH de 4,8 (Demetriades et al, 1997a). La présence de sel augmente la floculation aux alentours du point isoélectrique de la protéine ainsi que le crémage dû à la formation d'un écran électrostatique limitant les interactions répulsives entre les gouttelettes. La floculation augmente la viscosité de l'émulsion puisque la fraction volumique des gouttelettes augmente suite à l'emprisonnement de molécules d'eau entre les amas de gouttelettes (Dickinson, 1992). Les émulsions présentant une floculation ont le comportement d'un fluide thixotropique puisque les amas de

gouttelettes sont dispersés avec une augmentation du taux de cisaillement (Demetriades et al, 1997a et b).

### 1.3. Le carboxyméthylcellulose (CMC)

#### *1.3.1. Origine et structure*

Le CMC est un polysaccharide anionique linéaire dérivé de la cellulose. Ce polysaccharide est majoritairement extrait d'un co-produit de l'industrie du coton et des pulpes de bois. La cellulose, provenant des parois des cellules végétales, est le polysaccharide de structure le plus abondant. Sa structure est celle d'un agrégat linéaire de polymères de D-glucopyranosyle reliés par des liens  $\beta$ -1,4. La résistance de la cellulose ainsi que son insolubilité dans l'eau sont dues en partie aux nombreux liens hydrogènes reliant les agrégats par l'intermédiaire des groupements hydroxyles. À l'état solide, la cellulose est composée de zones cristallines très organisées et de zones amorphes dont les groupes réactifs sont plus accessibles (Coffey et al., 1995).

On obtient le carboxyméthylcellulose en traitant la cellulose en milieu alcalin afin de briser les liens hydrogènes responsables de l'union des chaînes de polymères, en commençant par les zones amorphes. Suite à ce traitement, du monochloroacétate est ajouté à la cellulose hydratée afin d'obtenir le dérivé CMC (figure 1.2). Le pK de la molécule obtenue se situe entre 4,2 et 4,4 (Keller, 1986). Globalement, certains des groupements hydroxyles de la cellulose se sont trouvés substitués par des groupements carboxyméthyles. Le nombre de ces groupements carboxyméthyles par unité anhydroglucose est appelé le degré de substitution (DS). Le CMC de qualité alimentaire est d'un DS égal ou inférieur à 0,95 (Coffey et al., 1995), d'une viscosité minimale de 25 cps lorsqu'il est en solution à 2% à 25°C, d'une pureté minimale de 99,5% sur base sèche (Ganz, 1977) et d'un poids moléculaire situé entre 90000 et 700000 daltons (Keller, 1984).

Le degré de substitution ainsi que l'uniformité de cette substitution affectent les propriétés du polymère. Plus le degré de substitution est élevé, plus l'hydratation ainsi que la stabilité en

milieu acide sont bonnes. Un polysaccharide possédant un DS de moins de 0,4 est pratiquement insoluble dans l'eau. Lorsque la substitution est irrégulière, l'écoulement du polymère en solution devient moins fluide. Ceci s'explique par le fait que les sections de chaînes mal hydratées n'ont pas tendance à s'aligner mais plutôt à se lier entre elles de manière à créer un réseau. La viscosité du carboxyméthylcellulose augmente avec le degré de polymérisation (100-200) qui est le nombre d'unités anhydroglucoses par chaîne de polymère ainsi qu'avec le poids moléculaire de la molécule.

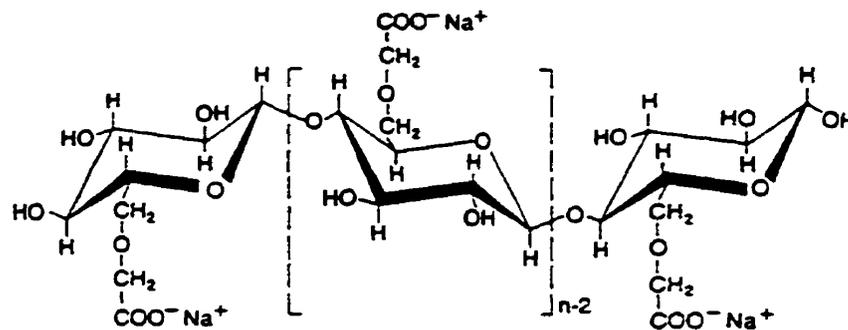


Figure 1.2 Le carboxyméthylcellulose (Coffey et al., 1995)

### 1.3.2. Influence de paramètres physico-chimiques sur une solution de CMC

La viscosité du CMC est influencée non seulement par la structure même du CMC mais aussi par les conditions du milieu telles la température, le pH et la présence de sels.

La viscosité d'une solution de CMC diminue avec une augmentation de température. Lorsque le traitement thermique est modéré, le CMC recouvre sa viscosité initiale lors du refroidissement. À des valeurs de pH situées entre 5 et 9, la viscosité du polymère est peu modifiée. À un pH inférieur à 4,0, la forme acide du CMC est produite conduisant à une éventuelle précipitation du polymère. Un pH supérieur à 10 entraîne la dégradation du CMC ceci résultant en une baisse de viscosité de la solution (Coffey et al., 1995).

L'addition de sels peut causer une perte de viscosité d'une solution de CMC, tout dépendant

les molécules d'eau devenues moins disponibles pour l'hydratation du polysaccharide. Lorsque la viscosité de la solution doit être préservée, l'ajout du sel suivant l'hydratation du CMC provoque une baisse de viscosité moins importante. En général, une concentration modérée en sels monovalents n'affectera pas l'apparence d'une solution de CMC. L'ajout de cations divalents induira la formation de sels plus ou moins solubles, diminuant ainsi la qualité de la solution de CMC obtenue. Les cations trivalents précipitent généralement le polymère. L'aluminium, le chrome, le fer, l'argent et le zinc sont des cations incompatibles avec le CMC (Coffey et al., 1995).

### *1.3.3. Propriétés fonctionnelles du CMC*

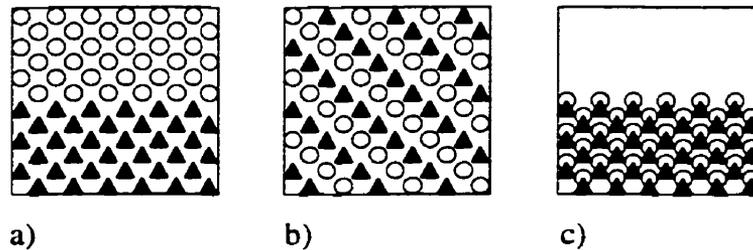
Le CMC est utilisé principalement pour ses capacités stabilisante, épaississante, de contrôle de cristallisation et de rétention d'eau (Coffey et al., 1995). Les desserts congelés, les produits de boulangerie, les sauces à salade, les sirops, les boissons, les aliments extrudés et les aliments réduits en calories sont des exemples d'aliments comptant le CMC parmi leurs ingrédients (Coffey et al., 1995). Dans une émulsion, le CMC augmente la viscosité de la phase continue, ralentissant ainsi le processus de séparation des phases aqueuse et lipidique. Les propriétés fonctionnelles de ce polysaccharide anionique peuvent être modifiées en présence de protéines avec lesquelles il peut interagir.

## 1.4. Les interactions protéine/polysaccharide

### *1.4.1. Incompatibilité et compatibilité thermodynamique*

Lorsqu'une protéine et un polysaccharide anionique sont dans une même solution, trois types de comportements peuvent être observés. Premièrement, les deux polymères peuvent être en deux phases distinctes sans interagir, il s'agit du phénomène d'incompatibilité thermodynamique (figure 1.3a). Cette incompatibilité existe lorsque les interactions entre polymères de même nature sont favorisées au dépend de celles entre polymères de natures différentes. Une grande concentration en polymère peut induire une séparation de phase où l'une d'elles est enrichie en protéines et l'autre en polysaccharide (Veis et al., 1967).

L'incompatibilité dépend des charges relatives sur chaque polymère, donc du pH, de la flexibilité des chaînes de polysaccharide (Tolstoguzov, 1986), du poids moléculaire et de la concentration en sels (Morris, 1990).



*Figure 1.3 Types de comportements adoptés par les macromolécules en solutions a) incompatibilité thermodynamique b) co-solubilité c) compatibilité thermodynamique*

Le deuxième cas, rarement observé, se produit lorsqu'il y a présence d'une seule phase où les polymères de même charge ou de charges opposées n'interagissent pas ou sont sous forme de complexes solubles (figure 1.3c). Cet état est en compétition constante avec celui d'incompatibilité thermodynamique. Des interactions électrostatiques et des liens hydrogènes maintiennent ces complexes (Samant et al., 1993).

Troisièmement, il peut y avoir présence de deux phases où les polymères de charges opposées sont dans la même phase (figure 1.3b). Il s'agit de compatibilité thermodynamique où les deux polymères forment un complexe insoluble maintenu majoritairement par des interactions électrostatiques (van Oss, 1993). La compatibilité thermodynamique est observée lors de la formation de complexes ioniques ou non ioniques entre un polysaccharide chargé négativement, et une protéine sous son point isoélectrique. Les interactions entre polymères différents sont alors favorisées. Les interactions entre polysaccharides et protéines ont fait l'objet de nombreuses études visant à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la formation de complexes et leurs applications possibles (Hill et Zadow, 1974; Ledward, 1979; Tolstoguzov, 1986). La structure de ces complexes dans le cas de l'albumine de sérum bovin (BSA) et du poly(chlorure de diméthylallylammonium) (PDMAAC) serait celle d'une chaîne de polysaccharide chargée négativement où plusieurs protéines chargées positivement

viendraient se fixer (Xia et al., 1993; Mattison et al., 1995).

#### *1.4.2. Nature des interactions lors d'une compatibilité thermodynamique*

Les interactions impliquées lors de la formation de complexes peuvent être de différents types. La force, la spécificité ainsi que leur nature attractive ou répulsive influencent le type de complexe formé (Syrbe et al., 1998).

Lorsque le polysaccharide et la protéine doivent être de charges opposées pour avoir la formation d'un complexe, on parle d'interactions électrostatiques. Les complexes solubles et insolubles sont les deux types de complexes pouvant être obtenus de ces interactions selon le rapport entre les charges de chacune des molécules (Schmitt et al., 1998).

Des liens hydrogènes peuvent stabiliser le complexe lorsqu'un atome d'hydrogène situé sur un atome électronégatif tel un azote ou un oxygène, interagit avec un autre hydrogène situé sur un groupe carboxyle ou carbonyle. Ces liens hydrogènes permettent parfois la formation d'un complexe au dessus du point isoélectrique de la protéine. La formation de complexes à basse température indique la présence de ce type de liens (Tolstoguzov, 1991; Schmitt et al., 1998).

Les interactions hydrophobes sont favorisées lors d'une augmentation de température. Ces interactions jouent un rôle crucial lors de la stabilisation de complexes par un chauffage à des températures visant l'exposition des sites réactifs des protéines par dénaturation thermique (Chen et al., 1989; Tolstoguzov, 1991; Sanchez et Paquin, 1997).

#### *1.4.3. Facteurs influençant la nature des complexes formés*

##### **Charge des macromolécules**

La nature et la densité des charges présentes sur les deux macromolécules sont les facteurs ayant le plus d'influence sur la formation de complexes (Mattison et al., 1995). La formation de complexes est inhibée lorsque les densités de charge des molécules sont faibles alors

qu'une précipitation ou une gélification peut se produire lorsque cette densité est élevée. Des complexes électrostatiques peuvent être formés même au dessus du point isoélectrique de la protéine par l'intermédiaire de zones chargées positivement qui annulent l'effet de répulsion des charges de même signe (Noguchi, 1956, 1959; Park et al., 1992).

#### Nature du polysaccharide

Les polysaccharides contenant des groupes carboxyles forment moins de complexes. Leur action se situe principalement dans la diminution des liens protéine/protéine. Ces polysaccharides ne complexent pas les protéines globulaires à une force ionique supérieure à 0,2 ou à des valeurs de pH supérieures au point isoélectrique des protéines. Les polysaccharides anioniques n'ont pas tous le même degré de compatibilité avec les protéines, dans un ordre décroissant : la pectine, le CMC, l'alginate de sodium, la gomme arabique et le dextran sulfate (Polyakov et al, 1980).

#### Poids moléculaire du polysaccharide

Lorsque les interactions électrostatiques entre la protéine et le polysaccharide sont très fortes, l'effet du poids moléculaire du polysaccharide sur la quantité de protéines complexées est plutôt négligeable (Morr et Ha, 1993). Lorsque ces interactions sont faibles, un polysaccharide de poids moléculaire élevé permet la précipitation d'une plus grande quantité de protéines dû à l'espace plus grand occupé par le polysaccharide en solution favorisant ainsi le contact avec les protéines (Semenova, 1996).

#### Le pH

Le pH a un effet sur la nature des charges présentes sur les groupes amines et carboxyliques, affectant ainsi la nature de la charge nette portée par la macromolécule. Un maximum de complexation survient lorsque le pH d'équivalence électrique est atteint (PEE). À ce point, la protéine et le polysaccharide ont la même charge en valeur absolue (Schmitt et al, 1998).

## La force ionique

Habituellement, la formation de complexes insolubles se produit à faible force ionique et sous le point isoélectrique de la protéine. À force ionique élevée, les ions diminuent la charge totale des macromolécules inhibant, à la limite, la complexation (Schmitt et al., 1998). Une trop faible force ionique serait aussi responsable d'une inhibition de la complexation. Le mécanisme expliquant ce comportement est mal connu. Une des hypothèses est que la forte charge portée par les macromolécules modifie leur configuration de manière à favoriser la formation de petits agrégats plutôt que de complexes (Singh et Burgess, 1989; Burgess, 1990).

## Le ratio protéine / polysaccharide

Le ratio protéine/polysaccharide influence grandement les propriétés du complexe obtenu. Le ratio optimal est propre à chaque système et dépend des propriétés recherchées. Lorsque la concentration d'une macromolécule par rapport à l'autre est en excès, la présence de charges résiduelles sur les complexes permet de les solubiliser. La formation de complexes peut cependant être inhibée lorsque la concentration en macromolécules est trop importante. On observe alors le phénomène d'incompatibilité thermodynamique (Tolstoguzov, 1986, 1997).

## Conditions du milieu

La température affecte la formation de complexes en favorisant les interactions hydrophobes et covalentes à haute température et les liens hydrogènes à basse température (Stainsby, 1980; Shimada et Cheftel, 1989 ; Kelly et al., 1994). Le temps du traitement de cisaillement influence la taille des complexes, plus il est long plus les complexes auront une grande taille (Schmitt et al., 1998). L'application d'une pression hydrostatique peut faciliter la formation des complexes en induisant une dénaturation partielle des protéines, donc une exposition de sites réactifs (Dickinson et Pawlowski, 1996). La microfluidisation, employant les hautes pressions dynamiques, a permis de réduire la taille de 20 mm à 0,2 mm de complexes xanthane/protéines de lactosérum en fractionnant les fibres de xanthane par des forces de cisaillement, cavitation et turbulence (Le Hénaff, 1996).

#### *1.4.4. Méthode de fabrication de complexes électrostatiques*

Des complexes électrostatiques sont obtenus par le titrage lent d'une solution de protéines et de polysaccharide avec de l'acide chlorhydrique, citrique ou acétique. Les complexes seraient d'abord solubles et deviendraient insolubles lorsque les charges deviennent égales au point d'équivalence électrique (Schmitt et al, 1998). Cette affirmation a par la suite été supportée par l'étude de complexes à l'aide de titrages turbidimétriques et de mesures de diffusion de la lumière (Mattison et al., 1995).

Ces complexes électrostatiques sont toutefois très sensibles aux variations de pH, de force ionique et de force de cisaillement (Chen et al., 1989). Un procédé simple de fabrication de complexes microparticulés de protéines du lactosérum et de xanthane a récemment été développé (Le Hénaff, 1996). Une solution comportant un ratio de protéines et de polysaccharides de 5:1 a tout d'abord été acidifiée jusqu'au point isoélectrique du complexe. Ce point se situe entre le pI des protéines et le pK du polysaccharide (Chen et al, 1989). Il a pu être déterminé par des mesures de turbidité à l'aide d'un spectrophotomètre où une grande valeur de turbidité correspondait à une formation maximale de complexes (Le Hénaff, 1996). La solution contenant les complexes a ensuite subi un traitement thermique, stabilisant les complexes contre une variation éventuelle des conditions du milieu. L'agrégation des protéines entre elles est limitée par la présence du polysaccharide (Le Hénaff, 1996). Le complexe est formé par les protéines de lactosérum qui sont liées tout au long des molécules de xanthane (Miller, 1994). En général, les microparticules peuvent avoir une forme sphérique, elliptique, linéaire ou irrégulière, selon le type de macromolécules utilisées (Sanchez et Paquin, 1997).

#### *1.4.5. Les complexes covalents*

Depuis quelques années, des complexes liés de manière covalente font l'objet de nombreux travaux de recherche (Kato et al., 1989; Hattori et al., 1994; Schmitt et al., 1998). L'interaction entre le polysaccharide et la protéine devient spécifique, forte et permanente. Un lien covalent amide est obtenu par une réaction entre le groupement amine de la protéine et le

groupe carboxylique du polysaccharide (Stainsby, 1980). Cette réaction peut être provoquée par une déshydratation par chauffage ou par lyophilisation. La réaction de Maillard est aussi utilisée afin de fabriquer des complexes covalents. Elle s'effectue généralement sur 3 semaines à une température de 60°C. Ce temps de réaction ainsi que des produits secondaires de la réaction limitent l'application alimentaire de ces complexes. Le polysaccharide et la protéine peuvent aussi être liés par l'intermédiaire du carbodiimide, un réactif utilisé en tant qu'agent liant. Les complexes covalents ont des propriétés fonctionnelles supérieures à celles des macromolécules utilisées seules et sont plus stables lors de variations de pH et de force ionique que les complexes électrostatiques (Schmitt et al., 1998).

#### *1.4.6. Propriétés fonctionnelles des complexes*

Les propriétés fonctionnelles telles la solubilité, la viscosité, la gélification, l'agrégation ainsi que les propriétés interfaciales des complexes diffèrent habituellement de celles des polysaccharides et protéines non complexés (Smith et al., 1962).

##### La solubilité

La solubilité d'un polymère dépend de son affinité pour le solvant comparativement à celle qu'il a pour lui-même (Damodaran, 1997). La solubilité d'une protéine aux environs de son point isoélectrique peut être augmentée en la complexant avec un polysaccharide. Les complexes insolubles d'abord formés aux alentours du pI de la protéine (M-complexes) peuvent devenir solubles suite à un titrage acide à faible force ionique (T-complexes), les charges nettes des deux types de molécules devenant inégales (Tolstoguzov, 1986). L'augmentation de la charge nette du complexe, en s'éloignant du point isoélectrique, serait responsable de cette solubilisation lors du titrage.

Le ratio protéine/polysaccharide est le facteur ayant le plus d'influence sur la solubilité des complexes. Une étude réalisée sur des complexes de protéines de soya et de xanthane (Xie et Hettiarachchy, 1997) a démontré qu'un ratio 1:2 (protéine/polysaccharide) conférait aux protéines une meilleure solubilité qu'un ratio 3:1. L'espace occupé par le polysaccharide

limiterait la formation de liens protéine/protéine. Lorsqu'on veut utiliser un polysaccharide pour récupérer une protéine, le ratio en protéines doit être suffisamment élevé pour permettre la formation de complexes insolubles. Un ratio supérieur à 5:1 permettrait la formation de complexes insolubles dû aux protéines en excès (Larichev et al., 1983). Les protéines en excès se comportent de manière non coopérative en se liant plus ou moins uniformément sur le polysaccharide par des interactions électrostatiques, réduisant ainsi la charge nette du complexe. Ces complexes peuvent cependant devenir solubles lorsque les solutions sont mélangées à pH neutre, le milieu étant lentement acidifié par la suite. Dans ce cas, les protéines se comporte de manière coopérative en se liant d'abord entre elles jusqu'à un certain point avant d'interagir avec le polysaccharide (Tolstoguzov, 1986). Les complexes solubles peuvent aussi être obtenus en ajustant la force ionique de la solution.

La densité des charges sur chaque macromolécule a aussi un effet sur la solubilité des complexes. Les complexes formés sont insolubles lorsque les solutions sont mélangées à une valeur de pH où les polymères ont des charges égales et opposées (Ledward, 1994). Lorsque le pH de formation des complexes n'est pas le point d'équivalence électrique, la charge résiduelle portée par le complexe permet une interaction avec les molécules de solvant, augmentant ainsi sa solubilité (Mattison, 1995; Tolstoguzov, 1997).

#### La viscosité

La viscosité est définie comme étant le ratio entre la force de cisaillement et le taux de cisaillement. La viscosité d'une solution de polymère dépend de la concentration en polymère, des interactions entre le polymère et le solvant et finalement de la structure du polymère (Schmitt et al., 1998). Un polymère de grand poids moléculaire, flexible et hydrophile donnera une solution de grande viscosité. Plus spécifiquement, la viscosité d'une solution de complexes dépend de la fraction volumique des macromolécules, de leur densité de charge, de l'épaisseur de leur couche d'hydratation, de leur taille, leur forme et leur déformabilité.

La formation de complexes solubles aux alentours du point isoélectrique de la protéines est responsable d'une augmentation de la viscosité de la solution. Cette observation a été faite dans le cas de complexes de carboxyméthylcellulose et de protéines du lactosérum (Hidalgo et al, 1971; Ganz, 1974).

#### Le pouvoir émulsifiant

Vers la fin des années quarante, un brevet concernant les propriétés émulsifiantes de complexes insolubles de gélatine-alginate et gélatine-alginate-diméthylcellulose fut déposé (Le Gloahec, 1947). Un peu plus tard, des complexes solubles de protéines du lactosérum et de carboxyméthylcellulose furent brevetés pour la même utilisation (Ganz, 1968). Les complexes protéine-polysaccharide ont souvent démontré de meilleures propriétés émulsifiantes que les deux macromolécules utilisées seules (Tolstoguzov, 1991, 1997).

Le mécanisme de stabilisation des émulsions par des complexes BSA-dextran fut exploré dans deux études (Larichev et al, 1983 ; Tokaev et al., 1987). Puisque le polysaccharide employé seul sans la BSA ne comportait pas de propriétés interfaciales et que les propriétés émulsifiantes des complexes étaient dépendantes des conditions de pH et de force ionique, la nature des interactions entre le complexe et l'émulsion serait électrostatique (Schmitt et al, 1998). La stabilité d'émulsions traitées à la chaleur et contenant des complexes s'expliquerait par le fait que le polysaccharide augmente la viscosité du film entourant les gouttelettes d'huile, formant une structure semblable à celle d'un gel (Schmitt et al, 1998).

#### *1.4.7. Complexes protéines du lactosérum et carboxyméthylcellulose*

Au début des années soixante-dix, le caractère anionique du CMC fut exploité pour la récupération des protéines du lactosérum de fromagerie (Hidalgo et Hansen, 1969, 1971; Hansen et al., 1971; Ganz, 1974 ; Hill et Zadow, 1974, 1978). Des complexes insolubles étaient alors formés lors de l'acidification du lactosérum par l'association du polysaccharide chargé négativement et des protéines chargées positivement.

En plus d'être récupérées à un pH de 3,2, les protéines de lactosérum peuvent être fractionnées en contrôlant le ratio CMC/protéine, la force ionique et le pH. La  $\beta$ -lactoglobuline ainsi que la BSA sont précipitées à un pH de 4,0. Lorsque le pH est ensuite abaissé à 3,2, le complexe contiendra l' $\alpha$ -lactalbumine. Un pH réajusté à 7,5, permet la récupération des protéoses peptones (Hidalgo et Hansen, 1971).

La formation de complexes de CMC et de protéines de lactosérum est favorisée lorsque le polysaccharide a un poids moléculaire supérieur à 100 kd (Chen et al., 1989). La formation de complexes est optimisée par l'utilisation de CMC ayant un DS se rapprochant de 0,9 puisque les groupements carboxyméthyles pouvant réagir avec les sites chargés positivement des protéines sont plus nombreux (Chen et al., 1989).

Parallèlement, le CMC est très efficace pour inhiber la précipitation des protéines. Un excès de polysaccharide permet la resolubilisation du complexe insoluble produit sous le pI de la protéine. Ceci s'explique par le fait que le CMC ajouté en surplus permet une réaction de redistribution des protéines sur le polysaccharide améliorant ainsi la solubilité et l'hydratation des complexes (Hidalgo et Hansen, 1969).

Le coût d'opération élevé comparativement aux techniques de séparation par membranes et le fait qu'une partie du CMC demeure liée aux protéines limitent l'application de cette technologie pour la récupération des protéines dans le lactosérum. Cependant, les complexes de protéines du lactosérum et de carboxyméthylcellulose ont des propriétés fonctionnelles propres faisant d'eux un ingrédient fonctionnel potentiel (Mann et Malik, 1996). Comparativement aux protéines seules, la solubilité des complexes est étroitement liée au pH. Une solubilité maximale est observée à pH 7,0 alors qu'une solubilité minimale survient à un pH de 3,5. Les complexes peuvent former un gel à pH 4,5, probablement par la formation d'un réseau entre les groupes hydroxyles du CMC et les groupes amines et carboxyles des protéines. Les complexes sont moins efficaces que les protéines lors de la formation d'une mousse mais confèrent toutefois une stabilité supérieure. Le pouvoir émulsifiant de ce type de complexes serait meilleur que celui des protéines seules, cette affirmation ayant été faite suite à des mesures de viscosité relative des émulsions selon la température (20 à 80°C) et la

concentration en complexes (2 à 10% p/v) à l'aide d'un viscosimètre Falling Ball Hopper's (Mann et Malik, 1996).

## HYPOTHÈSES, BUT ET OBJECTIFS

Le procédé de fabrication des complexes de protéines de lactosérum/xanthane comportait une étape d'homogénéisation préalable du xanthane afin de réduire la taille des complexes 20 mm à 0,2 mm (Le Hénaff, 1996). *Le CMC d'un poids moléculaire (150 kDa) inférieur à celui du xanthane (2 000 kDa) permettra d'obtenir des complexes de protéines de lactosérum/CMC suffisamment petits pour éliminer l'étape d'homogénéisation préalable du polysaccharide lors de la formation des complexes.*

La présence d'un polysaccharide non adsorbé aux protéines situées à l'interface huile/eau peut occasionner une floculation caractérisée par une expulsion de la phase aqueuse. *L'utilisation de complexes de protéines de lactosérum/carboxyméthylcellulose permettra la formation d'émulsions plus stables que celles contenant les protéines seules ou les protéines et CMC en mélange.*

Ce projet visait donc à mieux comprendre le comportement de complexes de protéines du lactosérum/carboxyméthylcellulose lorsqu'incorporés dans une émulsion à différentes conditions de concentrations en huile et en complexes, de force ionique et de traitement thermique.

Les objectifs du projet se définissent ainsi :

*1. Fabrication des complexes*

- Évaluer le pH optimal pour la fabrication de complexes solubles.
- Évaluer la quantité de protéines de lactosérum et de CMC qui n'est pas complexée au pH et au ratio de formation.
- Fabriquer un complexe protéines de lactosérum / CMC (ratio 4 :1) selon le procédé développé pour le xanthane.
- Étudier l'apparence et la taille des complexes de protéines de lactosérum / CMC.

*2. Étude du pouvoir émulsifiant*

- Évaluer l'effet de la concentration en protéines (0,5 ; 0,75 ; 1,0 ; 1,25), en huile (10 et 20%) en NaCl (0, 30, 60 et 90 mM) ainsi que l'effet d'un traitement thermique (121°C, 10 minutes) sur la stabilité d'émulsions modèles par des mesures de distribution protéique, de charge protéique ainsi que d'indice de crémage.
- Étude des mécanismes de déstabilisation des émulsions selon le type de protéines (seules ou complexées) à l'aide de mesures de viscosité et d'écoulement.

**CHAPITRE 2**  
**MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 2.1. Fabrication d'un complexe protéines de lactosérum/CMC

### *2.1.1. Choix des constituants*

#### Carboxyméthylcellulose (CMC)

Le CMC 9M8F (Hercules inc., Canada) choisi avait un degré de substitution se situant entre 0,8 et 0,95 et une viscosité moyenne se situant entre 400 et 800 cps (Brookfield). Le poids moléculaire moyen de ce CMC a été estimé à 150 kdaltons par la mesure de sa viscosité intrinsèque (Annexe A). Le CMC 9M8F a été choisi pour l'ensemble de ses caractéristiques favorisant la formation de complexes avec les protéines de lactosérum et pour son grade alimentaire.

#### Les protéines du lactosérum

Les protéines de lactosérum qui ont été utilisées pour la formation de complexe provenaient d'un isolat à 93,66 % de protéines sur base humide (Bipro, Davisco inc, E.-U.). La composition de l'isolat est décrite à l'annexe B.

## 2.2. Détermination des conditions de fabrication des complexes

### *2.2.1. Ratio protéines / polysaccharide*

Un ratio protéines : polysaccharide de 4:1 fut déterminé selon des informations tirées de la littérature. En effet, un complexe obtenu de la précipitation des protéines de lactosérum à pH 4,0 possède un ratio protéines:carboxyméthylcellulose de 3,6:1. De plus, pour des volumes égaux de lactosérum (0,61% protéines) et de solution de CMC, un maximum de complexation a été observé à une concentration en CMC de 0,175 %, correspondant à un ratio protéine:CMC de 4:1 (Hidalgo et Hansen, 1971).

### *2.2.2. pH optimal de fabrication des complexes*

Le pH optimal de fabrication des complexes fut déterminé par mesure de turbidité de solutions de complexes faites en duplicata à différents pH situés entre 3,8 et 5,2. Premièrement, les solutions de CMC et de protéines à 0,1% étaient agitées 1 heure (35°C pour le CMC) et laissées au repos 1 heure supplémentaire afin de permettre une hydratation complète. Des volumes de 25µl de HCl 1N ont été ajoutés à chaque solution, suivi d'une agitation de 4 minutes. La solution était ensuite laissée au repos pendant 10 minutes afin de laisser les particules non solubles précipiter au fond du bécher. 3 aliquots furent prélevés dans chaque solution et l'absorbance mesurée à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (8451A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard, Palo Alto, CA). À chaque mesure, les échantillons étaient remis dans la solution mère afin de conserver le volume initial.

### 2.3. Procédé de fabrication des complexes

#### *2.3.1. Solution de carboxyméthylcellulose*

Le CMC était mis en solution à une concentration de 3,0 %. Pour ce faire, l'eau était d'abord agitée dans le mélangeur Stéphan à 300 rpm (Universal Machine UM5 electronic, Allemagne) afin de créer un vortex. Le CMC était alors incorporé à l'eau sur une période de 3 minutes. La solution était ensuite agitée 3 minutes à 1200 rpm. Après avoir raclé les bords du mélangeur à l'aide d'une spatule, la solution était de nouveau agitée à 1200 rpm pendant 3 minutes. Le bol était à nouveau raclé avant une agitation finale à 1200 rpm pendant 5 minutes. La solution de CMC était ensuite laissée au repos pendant une heure.

#### *2.3.2. Solutions de protéines de lactosérum*

La solution avait une concentration de 6% (p/p) en protéines. L'IPL était mis en solution dans de l'eau déionisée. La solution était agitée pendant 1 heure à l'aide d'un agitateur à pale (Caframo Ltd, Warton, Ontario, Canada) et laissée au repos 1 heure additionnelle afin de permettre une solubilisation complète des protéines.

### 2.3.3. Préparation des complexes

Les deux solutions de CMC et de protéines étaient ensuite mélangées de manière à obtenir un ratio protéines : CMC de 4 :1.

#### Acidification

L'acidification s'est fait par ajout d'acide chlorhydrique 1N sous constante agitation, jusqu'à l'atteinte du pH optimal de fabrication des complexes déterminé auparavant.

#### Traitement thermique

Un traitement thermique à 80°C pendant 5 minutes permettait de stabiliser les complexes formés au pH optimal. Les protéines partiellement déployées, se lient alors au polysaccharide plus fortement. Un cuiseur à double paroi muni d'une pale agitatrice dans laquelle circule de la vapeur (Lee Metal Products co inc., Philisburg PA) a été utilisé afin d'effectuer le traitement.

#### Ajustement du pH à 7,0

Le pH des solutions de complexes était ajusté à 7,0 avant le séchage. Un pH neutre permet une meilleure solubilité des complexes rendant la solution plus homogène en vue du séchage par atomisation.

#### Séchage

Un atomiseur (Niro, Copenhague, Danemark) muni d'un disque rotatif a été utilisé pour sécher les complexes. La température de l'atomiseur était de 200°C à l'entrée et de 80°C à la sortie.

## 2.4. Dosage du CMC et des protéines non complexés

Ce dosage fut effectué sur des solutions de complexes n'ayant pas été séchées par atomisation. Les solutions de complexes furent d'abord centrifugées à 48000g. Les analyses ont été faites en duplicata sur le surnageant ainsi que sur le culot solubilisé dans l'eau déionisée. La quantité de CMC non complexé a été dosée par la méthode phénol-acide sulfurique (Chaplin, 1986). Le principe général de cette méthode est d'ajouter du phénol en solution ainsi qu'une quantité d'acide sulfurique concentré. Une couleur orangée se développe au cours de la réaction, la D.O. est ensuite mesurée en duplicata à 490 nm. La quantité de CMC présente dans les solutions est déterminée par une lecture faite sur une courbe standard préalablement établie à l'aide de concentrations connues en CMC.

La quantité de protéines non complexée fut déterminée en duplicata par une analyse Kjeldahl (AOAC, 1991) effectuée sur le surnageant.

## 2.5. Observation microscopique

Les solutions de complexes ont d'abord été colorées au bleu de toluidine (0,05% p/p) afin de pouvoir observer les polysaccharides en mauve et les protéines en bleu. Les solutions de complexes furent ensuite observées au microscope optique (Carl Zeiss 64448, Iena, Allemagne) à un grossissement de 400X. À l'aide du logiciel Matrox, l'analyse des images observées au microscope a pu être effectuée. La taille des complexes a été mesurée en triplicata en observant trois lames par solution, 10 photos étant prises par lame.

## 2.6. Incorporation des complexes dans une émulsion modèle

### *2.6.1. Fabrication des émulsions modèles*

Le pourcentage en protéines des poudres de complexes fut préalablement déterminé par un dosage de l'azote à l'aide de la méthode Kjeldahl. Les poudres de complexes IPLCMC s'hydratant assez difficilement. Avant d'être incorporé à l'émulsion, le complexe était mis en

solution et conservé à 4°C pendant 20 heures. Cette période de repos permet une meilleure hydratation et la sédimentation des particules insolubles au fond du contenant, évitant leur incorporation dans l'émulsion. Un homogénéisateur fut utilisé à 700 bar 1 passe pour la formation de l'émulsion (modèle Emulsiflex C-50, Avestin inc. Canada). Ces émulsions furent fabriquées dans le but d'étudier l'effet de trois paramètres de fabrication : la force ionique, un traitement de stérilisation ainsi que les concentrations en protéines et en huile.

#### *2.6.2. Effet de la force ionique*

Les complexes IPLCMC furent incorporés à 0,5% de protéines dans des émulsions modèles contenant 20% d'huile de maïs à différentes concentrations en NaCl (0, 30, 60 et 90 mM). Des émulsions témoins aux mêmes concentrations en NaCl contenant soit la source protéique seule soit la source protéique et le CMC sous forme non complexée ont aussi été fabriquées en duplicata. Le mélange d'huile et de solution aqueuse était ensuite passé à l'Ultra Turrax pendant 1 minute à 70. Les mélanges étaient ensuite homogénéisés à une passe à une pression de 700 bar.

#### *2.6.3. Effet d'un traitement thermique*

Le complexe IPLCMC fut incorporé dans des émulsions modèles à 0,50% de protéines, 20% d'huile et à 0 mM de NaCl pour finalement subir un traitement thermique qui s'est effectué dans un autoclave à 121°C pendant 10 minutes. Ces émulsions furent comparées à d'autres contenant les protéines seules ainsi que les protéines et le CMC sous forme non complexée. Les émulsions ainsi obtenues furent comparées à des témoins n'ayant pas subi de traitement thermique.

#### *2.6.4. Effets combinés de la concentration en protéines, en huile et d'un traitement thermique*

La concentration en polysaccharide pouvant influencer la stabilité des émulsions, les complexes ont été incorporés à différentes concentrations (0,5 ; 0,75 ; 1,00 et 1,25 % de protéines) ainsi que l'huile (10 et 20 %). L'émulsion témoin contenant les deux

macromolécules non complexées n'a pas été fabriquée vu son instabilité évidente. Un traitement thermique fut aussi appliqué sur les émulsions afin de vérifier une interaction possible entre les concentrations des constituants et ce traitement.

#### *2.6.5. Évaluation de la stabilité des émulsions*

Les émulsions mentionnées dans les paragraphes précédents ont toutes été analysées selon le même protocole. Premièrement l'observation visuelle des émulsions, deuxièmement la mesure de la distribution des protéines dans les émulsions et troisièmement la quantité de protéines (mg) par gramme de gras émulsifié (charge protéique) furent les analyses effectuées.

##### Observation des émulsions en fonction du temps

La stabilité des émulsions fut évaluée en les entreposant dans des tubes gradués de 12 ml et en mesurant quotidiennement la quantité de sérum expulsé sur une période de 5 jours à 20°C.

##### Mesure de la charge protéique des émulsions

Afin de quantifier la déstabilisation des émulsions, la quantité de protéines adsorbée par gramme d'huile émulsifiée fut mesurée lors de la formation des émulsions et après un entreposage de 5 jours (figure 2.1). Les émulsions furent d'abord centrifugées à 40000g pendant 60 minutes à 5°C (Sorvall RC5C, Rotor SS-34, Dupont Company, Newtown, CT). Deux phases furent observées : celle du dessus contenant la matière grasse et celle du bas contenant la phase aqueuse. Ces deux phases ont été séparées et pesées précisément. La quantité de protéines dans la phase contenant la matière grasse fut dosée par la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1990). Le facteur de conversion utilisé était de 6,38 puisqu'il s'agit de protéines laitières. La charge protéique, qui était dans ce cas-ci la quantité de protéines par gramme de gras émulsifié, a été calculée selon l'équation suivante :

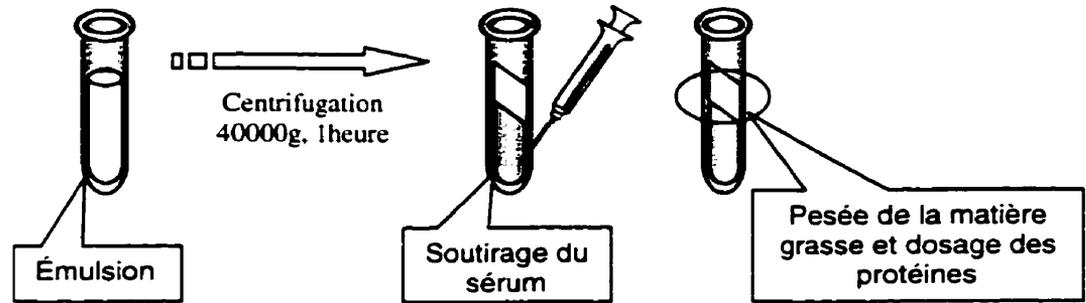


Figure 2.1 Schéma de la mesure de la charge protéique des émulsions

Charge protéique (mg protéine / g gras émulsifié) =

$$\frac{\text{pourcentage de protéines de la phase grasse centrifugée} \times \text{masse phase grasse centrifugée (g)}}{\text{pourcentage d'huile théorique de l'émulsion} \times \text{masse de l'émulsion centrifugée (g)}}$$

(Troy et Sharp, 1928; Mulder et Walstra, 1974)

La taille des globules de gras n'a pu être déterminée par spectroscopie à corrélation de photons dû à l'interférence causée par la présence des complexes.

Mesure de la distribution protéique

Afin de mieux quantifier les observations visuelles, la distribution protéique des émulsions a été évaluée. Les émulsions ont été entreposées pendant 5 jours dans des tubes d'égale dimension. Les 10 g au haut du tube furent prélevés à l'aide d'une pipette. Les 10 g au bas du tube furent prélevés à l'aide d'une seringue. Les protéines furent ensuite dosées dans les deux fractions par la méthode de Kjeldahl. La proportion des protéines totales présente dans cette fraction a ensuite été comparée à celle qui aurait dû être présente dans une émulsion stable.

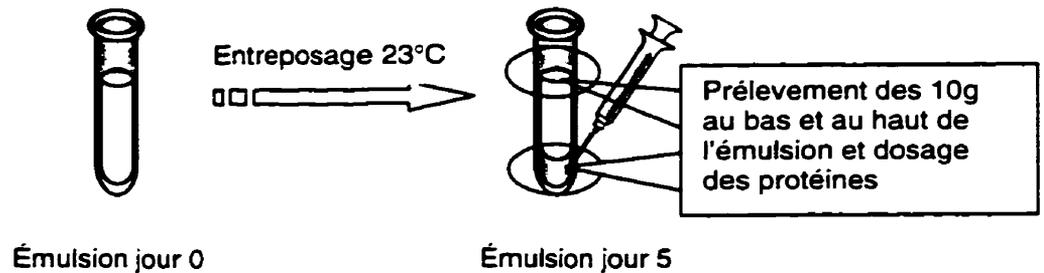


Figure 2.2 Schéma de la mesure de la distribution protéique

### Mesures rhéologiques

Afin de caractériser les mécanismes de déstabilisation des émulsions, des mesures ont été effectuées à l'aide d'un rhéomètre à déformation imposée (Rheometrics Scientific inc., Piscataway, USA) utilisant une couette d'un diamètre interne de 48mm et d'un diamètre externe de 50mm. Les émulsions étudiées étaient composées à 20% d'huile et avaient des concentrations en protéines (complexées ou seules) de 0,50; 0,75; 1,00 et 1,25 %. Un balayage de déformation a d'abord été effectué afin de situer la force de déformation maximale dans la zone linéaire. Une force de déformation maximale de 0,50% a ainsi été déterminée. Les valeurs des composantes élastique et solide ( $G'$  et  $G''$ ) ont été obtenues pour les émulsions contenant les protéines complexées lors d'un balayage de fréquences (0,1-10 Hz). La viscosité apparente des émulsions a été mesurée sur les émulsions lors d'un balayage du taux de cisaillement (0,1-100  $s^{-1}$ ), déterminant ainsi le type d'écoulement des émulsions.

#### 2.6.6. Analyses statistiques

Le plan expérimental concernant l'évaluation de l'effet de la force ionique est un factoriel 4 X 3 entièrement aléatoire effectué en duplicata où il y avait 4 niveaux de concentration en NaCl (0; 30; 60 et 90mM) et 3 types de protéines (complexées, seules, en mélange CMC). L'effet d'un traitement thermique a été évalué à l'aide d'un plan factoriel 2 X 3 entièrement aléatoire effectué en duplicata où il y avait absence ou présence du traitement thermique et 3 types de protéines (complexées, seules, en mélange CMC). Le troisième plan expérimental est un

factoriel 2X 2 X 2 X 4 entièrement aléatoire effectué en duplicata où il y avait 2 types de protéines (complexées, seules), 2 niveaux d'huile (10 et 20%), absence ou présence d'un traitement thermique, 4 niveaux de concentrations en protéines (0,50; 0,75; 1,00; 1,25 %).

Les résultats obtenus concernant la stabilité des émulsions selon les plans expérimentaux mentionnés ont été traités à l'aide d'analyses de variance et de comparaison de moyennes.

**CHAPITRE 3**  
**RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### 3.1. Détermination des conditions de fabrication des complexes

Voici premièrement les résultats ayant servi à l'établissement des conditions de fabrication des complexes de protéines de lactosérum et de carboxyméthylcellulose.

#### *3.1.1. pH de fabrication des complexes*

L'absorbance d'une solution de protéines de lactosérum et de carboxyméthylcellulose a été mesurée lors de son acidification afin de connaître l'évolution de la formation des complexes. La figure 3.1 démontre que l'acidification de la solution sous le pI des protéines de lactosérum (5,2) induit la formation de complexes insolubles. La formation de ces complexes s'explique par le fait que lorsque le pH devient plus acide que le point isoélectrique des protéines, soit 5,2, les protéines portent une charge nette positive. Cette charge nette positive des protéines de lactosérum permet une interaction électrostatique avec le CMC, chargé négativement à ce pH. La précipitation des complexes à un pH inférieur à 4,0 s'explique par la forme acide insoluble que prend le CMC. Afin de contrôler la taille des complexes et conserver une certaine solubilité, un pH de 4,2 a été choisi pour la fabrication des complexes de protéines de lactosérum et de CMC (IPLCMC).

### 3.2. Caractérisation des complexes

#### *3.2.1. Observation microscopique*

La microscopie optique à un grossissement de 400X a permis d'observer l'apparence de complexes de protéines de lactosérum et carboxyméthylcellulose colorés au bleu de toluidine (figure 3.2). On peut discerner les amas de protéines présents sous forme de taches plus sombres fixées sur le polysaccharide d'un poids moléculaire approximatif de 150 kdaltons.

Le diamètre des complexes ainsi observés a été mesuré au pH de fabrication à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images. D'après les résultats présentés à la figure 3.3, la majorité des complexes ont un diamètre situé entre 10 et 30  $\mu\text{m}$ , le diamètre moyen étant de 20  $\mu\text{m}$ . Le

seuil de détection d'une particule en bouche étant situé entre 30 et 60  $\mu\text{m}$  (Miller, 1994), ces complexes auraient une taille suffisamment petite pour permettre leur incorporation dans une émulsion alimentaire liquide sans perception d'une texture granuleuse. Le diamètre moyen des complexes IPLCMC (20 $\mu\text{m}$ ) est inférieur à celui des complexes contenant le xanthane (20 000 $\mu\text{m}$ ) (Le Hénaff, 1996). Ce résultat permet de valider la première hypothèse affirmant que la taille du polysaccharide influence la taille des complexes.

### 3.2.2. *Proportion de protéines et CMC complexés*

Le dosage des protéines et CMC non complexés (tableau 3.1) démontre qu'il y aurait 18,7 % de CMC et 1,86 % de protéines non complexés lors du procédé de fabrication des complexes. Hidalgo et Hansen (1971) ont obtenu que seules la  $\beta$ -lactoglobuline et la BSA étaient complexées au CMC à pH 4,0. Le complexe n'était pas traité thermiquement et avait un ratio protéine/CMC de 3,57. Les auteurs ont utilisé le lactosérum comme source protéique sans effectuer de dosage permettant de connaître les proportions des différentes fractions protéiques. Par contre, il est connu que l' $\alpha$ -lactalbumine représente environ 20% des protéines totales du lactosérum (Cayot et Lorient, 1998). Le faible pourcentage de protéines non complexée (1,86%) lors de la fabrication des complexes pourrait s'expliquer par le traitement thermique effectué à 80°C pendant 5 minutes. Ce traitement serait responsable de l'agrégation des protéines libres ( $\alpha$ -lactalbumine, protéoses peptones, immunoglobulines) avec les complexes et/ou la  $\beta$ -lactoglobuline.

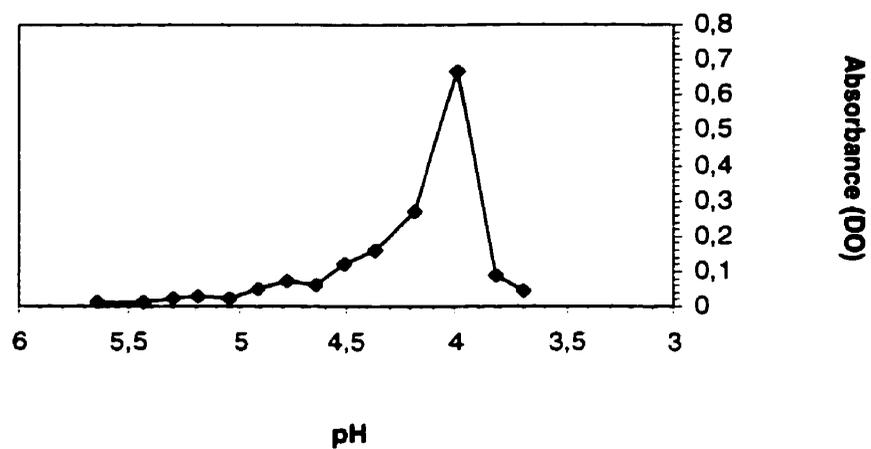


Figure 3.1 Valeurs d'absorbance à 650 nm obtenues lors de l'acidification d'une solution à un ratio 4 :1 d'isolat de protéines de lactosérum et de CMC à 0,1% de solides totaux.

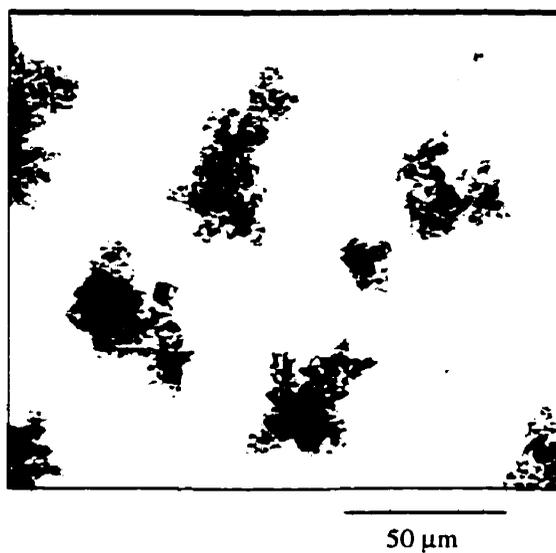


Figure 3.2 Complexes IPLCMC observés au microscope optique à un grossissement 400X

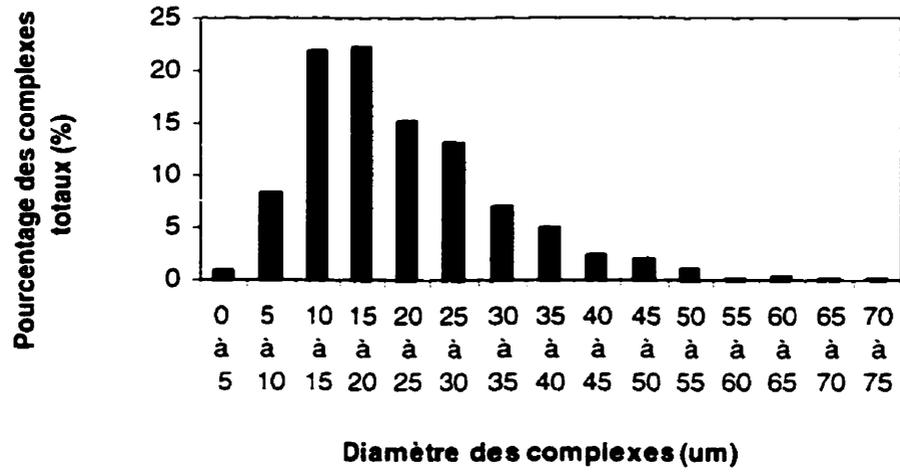


Figure 3.3 Distribution du diamètre des complexes de carboxyméthylcellulose et de protéines de lactosérum

Tableau 3.1 Proportions des protéines et CMC totaux non complexés

COMPOSANTE	NON COMPLEXÉ (%)	ÉCART-TYPE (±)
Carboxyméthylcellulose	118,7	1,88
Protéines de lactosérum	1,86	0,01

### 3.3. Propriétés émulsifiantes des complexes

Plusieurs éléments sont susceptibles d'influencer la stabilité d'une émulsion de type huile dans eau. Dans cette troisième partie seront présentés les effets de deux paramètres du milieu (force ionique et traitement thermique), de trois facteurs intrinsèques à l'émulsion (concentrations en huile et en protéines ainsi que le type de protéines) ainsi que leurs interactions.

#### *3.3.1. Effet de la force ionique*

Que ce soit pour améliorer la conservation ou les propriétés organoleptiques, l'emploi de sels dans les aliments est presque généralisé. Connaître l'effet de la force ionique d'une émulsion sur les complexes IPLCMC devient donc essentiel afin de pouvoir optimiser leur utilisation dans un aliment.

#### **Observation visuelle**

Le complexe IPLCMC a été incorporé dans des émulsions modèles contenant 20% d'huile, 0,50% de protéines et à différentes concentrations en NaCl. Une interaction significative entre le type de protéines (complexées, seules ou en mélange avec le CMC) et la concentration en NaCl a influencé la stabilité des émulsions dès le deuxième jour d'entreposage (tableau 3.2).

Les émulsions contenant les protéines seules ne sont pas représentées sur la figure 3.4 ainsi que sur les figures 3.8, 3.11 et 3.12, puisqu'aucune apparition de sérum n'a été notée. Ces émulsions contenant les protéines seules sont restées stables pendant la durée de l'analyse peu importe la concentration en sel. Selon Cayot et Lorient (1998), l'ajout de chlorure de sodium dans une émulsion stabilisée par des protéines augmente la taille des gouttelettes d'huile dû à une diminution des répulsions électrostatiques. La dissonance entre les résultats publiés par ces auteurs et ceux obtenus dans la présente étude peut s'expliquer par la courte durée des observations et le manque de sensibilité des méthodes d'analyses utilisées.

Les émulsions contenant les complexes ont présenté une stabilité intermédiaire, laissant apparaître un sérum clair (figure 3.5b, tubes 2 et 3). La figure 3.4 démontre que le NaCl tend à déstabiliser ces émulsions en augmentant la quantité de sérum expulsé. Cette observation est confirmée à la figure 3.5a où l'augmentation de l'accumulation de sérum au bas des émulsions avec une augmentation de la concentration en sel est bien visible. Les figures 3.4 et 3.5b démontrent que les émulsions contenant les protéines et le CMC en mélange se sont déstabilisées plus rapidement que les émulsions contenant les complexes. Contrairement aux émulsions contenant les complexes, on observe une tendance vers la stabilisation des émulsions contenant les espèces en mélange lors de l'ajout de sel.

### **Mesures de distributions protéiques**

Afin de quantifier les observations visuelles effectuées sur les émulsions, la distribution des protéines dans l'émulsion a été mesurée. Le dosage des protéines effectué sur le haut des émulsions n'est pas présenté puisqu'il n'existe pas de différence significative entre les valeurs obtenues et la valeur théorique.

Le sérum clair apparaissant au bas des émulsions est très pauvre en protéines, il donc possible de faire une relation entre le pourcentage de protéines dosé et la stabilité de l'émulsion. Cette analyse a permis de déceler que seul le type de protéines avait eu un effet significatif sur la proportion de protéines présentes au bas des tubes (tableau 3.3). Théoriquement, une émulsion stable devrait avoir ses protéines également réparties dans l'émulsion ce qui correspond à 23,5% des protéines présentes dans chaque phase prélevée. En tenant compte de cette valeur, on peut affirmer que tout comme les observations visuelles, la proportion des protéines au bas des émulsions démontre que les émulsions contenant les complexes sont moins stables que celles contenant l'IPL seul mais tout de même plus stables que celles contenant l'IPL et le CMC en mélange (figure 3.6). La détermination de la distribution protéique permet d'observer les même tendances notées lors de la première analyse à savoir que le NaCl déstabilise les émulsions contenant les complexes et stabilise les émulsions contenant les protéines et CMC en mélange.

L'observation visuelle a permis d'établir que la déstabilisation des émulsions caractérisée par l'apparition d'un sérum clair est influencée à la fois par la force ionique et le type de protéines (seules, complexées ou en mélange avec CMC). Les mesures de charges protéiques présentées dans les paragraphes qui suivent ont permis de vérifier s'il existait un effet de la force ionique sur l'adsorption des protéines à l'interface.

### **Mesures de charges protéiques**

La mesure de la charge protéique n'a pas permis de déceler de différences significatives entre les émulsions contenant les différents types de protéines et les différentes concentrations en NaCl (tableau 3.4). La charge protéique moyenne de ces émulsions était de 20mg de protéines/g d'huile émulsifiée. Aucune différence significative n'ayant été observée entre les charges protéiques mesurées au jour de la fabrication et celles mesurées après 5 jours d'entreposage, seuls ces derniers résultats sont présentés.

L'ajout d'un sel dans une émulsion vient modifier les forces impliquées. Les forces de van der Waals et les interactions électrostatiques sont réduites par un effet d'écran électrostatique. Lorsque la concentration en sel devient importante, il peut y avoir déshydratation des groupes à la surface des gouttelettes, réduisant ainsi leur diamètre effectif. La diminution du diamètre entraîne l'affaiblissement des interactions d'exclusion réduisant ainsi le volume de solution exempte de polysaccharide (Demetriades et McClements, 1998). L'effet de l'ajout de sels sur une émulsion peut donc être variable selon les forces et interactions présentes dans le système d'origine.

Dans l'étude présente, le NaCl a démontré une tendance à déstabiliser les émulsions contenant les complexes. Le NaCl agirait en tant qu'écran électrostatique, bloquant ainsi les sites chargés des complexes aidant normalement à la stabilisation des émulsions. L'effet déstabilisant du sel avait déjà été rapporté dans une étude où des caséines et une pectine étaient incorporées dans une émulsion (Dickinson et al., 1998).

Une tendance stabilisante du NaCl a été observée pour les émulsions contenant les protéines et CMC en mélange. Cet effet stabilisant pourrait être premièrement dû à la diminution des

interactions d'exclusion. Deuxièmement, il pourrait être dû à l'augmentation de la viscosité de l'émulsion lorsque l'ajout de sel s'effectue sous la concentration critique en polysaccharide. L'effet contraire se produit lorsque l'ajout de sels s'effectue à une concentration supérieure au seuil critique (Demetriades et McClements, 1998). Troisièmement, l'augmentation de stabilité de ces émulsions pourrait être due à une meilleure solubilité des protéines en présence de NaCl par 'salting in' (Inyang et Iduh, 1996).

Le type de protéines utilisé (complexées, seules ou en mélange avec le CMC) a un effet majeur sur la déstabilisation des émulsions. L'apparition du sérum clair au bas des émulsions peut s'expliquer premièrement par la présence du CMC libre représentant 100% du CMC des émulsions contenant les protéines et CMC en mélange et 18,7% du CMC des émulsions contenant les complexes. Ce CMC libre est incompatible thermodynamiquement avec les protéines à un pH de 7, il est donc expulsé du réseau de l'émulsion. La déstabilisation des émulsions pourrait aussi s'expliquer par la concentration en carboxyméthylcellulose qui se situerait aux alentours de la concentration critique. Le CMC non adsorbé au film protéique à l'interface occupe plus d'espace qu'il en existe entre les gouttelettes d'huile. Le polysaccharide est alors expulsé du réseau de l'émulsion par l'action d'une force osmotique résultant des interactions d'exclusion. Ce type de déstabilisation caractérisée par l'apparition d'un sérum clair indique un mécanisme de floculation (Dickinson et Galazka, 1991; Cao et al., 1991; Dickinson et al., 1994 ; Dickinson et Pawlowski, 1996 ; Dickinson et al., 1998). Il pourrait s'agir d'une floculation par expulsion de sérum ou par formation de ponts (Cao et al., 1990). La présence de ponts entre les gouttelettes est remarquée lorsqu'il y a formation de complexes à un pH supérieur au point isoélectrique des protéines. Ces ponts étant généralement maintenus par des liens de faible énergie, la floculation peut être réversible. Ce phénomène a été noté dans le cas d'un complexe électrostatique de BSA-t-carraghénane incorporé dans une émulsion de tétradécane (45%)/eau. Un excès de polysaccharide se retrouve à l'interface lorsque la concentration en carraghénane est supérieure à 0,004% p/p. Par la formation de ponts entre les gouttelettes de matière grasse, le polysaccharide est responsable de la floculation de l'émulsion. Le crémage de l'émulsion résulte de la formation d'un réseau de polysaccharide à partir d'une concentration en carraghénane de 0,02% (Dickinson et Pawlowski, 1997).

Lors d'une étude menée par Ward-Smith et al. (1994), la floculation par formation de ponts a aussi été observée pour une émulsion de di-n-butyl phthalate stabilisée par la méthémoglobine et une faible concentration en CMC. La microélectrophorèse a pu démontrer que le CMC était adsorbé sur la méthémoglobine, et ce, à un pH supérieur au pI de la protéine. La formation de complexes à un pH supérieur au pI est due à la présence de zones chargées positivement sur la protéine. Les complexes formés dans ces conditions sont solubles (Dickinson, 1998). Des résultats semblables ont été obtenus lors d'une autre étude où l'augmentation de la viscosité à l'interface d'une émulsion huile dans eau contenant du caséinate et du CMC a permis de constater qu'il y avait formation de complexes entre le polysaccharide et la protéine à pH neutre. Cette formation de complexes aurait aussi entraîné une floculation par formation de ponts entre les gouttelettes (Cao et al., 1991).

*Tableau 3.2 Analyse de variance de l'observation visuelle de la stabilité des émulsions en fonction de la concentration NaCl et du type de protéines.*

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F <sub>0</sub>	PR > F
Jour 1					
Modèle	11	0.983	0.090	3.97	0.0127
Type de protéines* (COMP)	2	0.516	0.258	11.46	0.0016
Concentration en NaCl (NACL)	3	0.197	0.065	2.91	0.0779
NACL*COMP	6	0.271	0.045	2.01	0.1435
Erreur	12	0.270	0.022		
Total	23	1.253			
Jour 2					
Modèle	11	4.093	0.372	13.95	0.0001
Type de protéines* (COMP)	2	3.026	1.513	56.73	0.0001
Concentration en NaCl (NACL)	3	0.323	0.108	4.04	0.0336

NACL*COMP	6	0.744	0.124	4.65	0.0114
Erreur	12	0.320	0.0267		
Total	23	4.413			
<hr/>					
Jour 3					
Modèle	11	7.143	0.649	23.61	0.0001
Type de protéines* (COMP)	2	5.866	2.933	106.65	0.0001
Concentration en NaCl (NACL)	3	0.297	0.099	3.60	0.0462
NACL*COMP	6	0.981	0.163	5.94	0.0044
Erreur	12	0.330	0.027		
Total	23	7.473			
<hr/>					
Jour 4					
Modèle	11	14.464	1.315	21.76	0.0001
Type de protéines* (COMP)	2	12.186	6.093	100.85	0.0001
Concentration en NaCl (NACL)	3	0.265	0.088	1.46	0.2747
NACL*COMP	6	2.014	0.336	5.56	0.0058
Erreur	12	0.725	0.060		
Total	23	15.490			
<hr/>					
Jour 5					
Modèle	11	19.355	1.759	35.49	0.0001
Type de protéines* (COMP)	2	15.731	7.865	158.63	0.0001
Concentration en NaCl (NACL)	3	0.195	0.065	1.31	0.3171
NACL*COMP	6	3.429	0.571	11.53	0.0002
Erreur	12	0.595	0.049		
Total	23	19.949			

\* Complexes, protéines seules, protéines et CMC en mélange

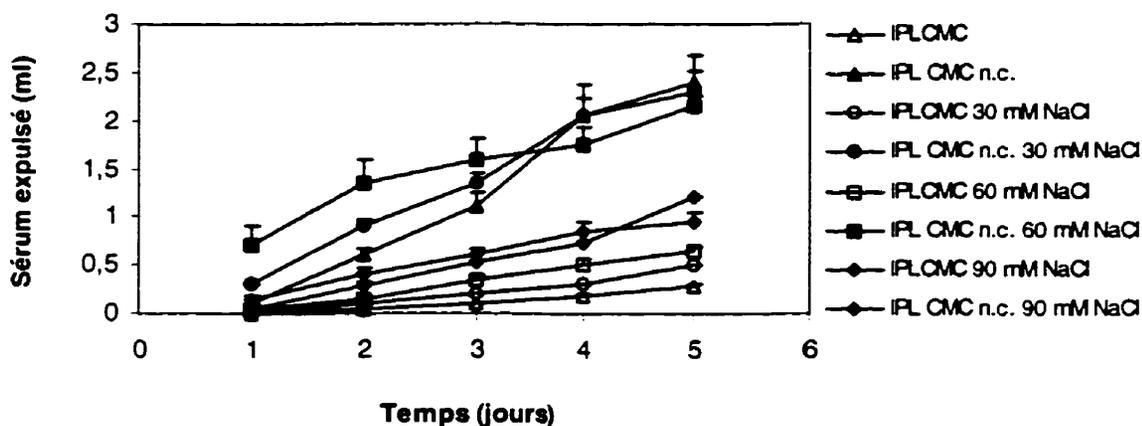


Figure 3.4 Volume de sérum clair expulsé dans au bas de tubes de 12 ml d'émulsions à différentes concentrations en NaCl et selon le type de protéines.

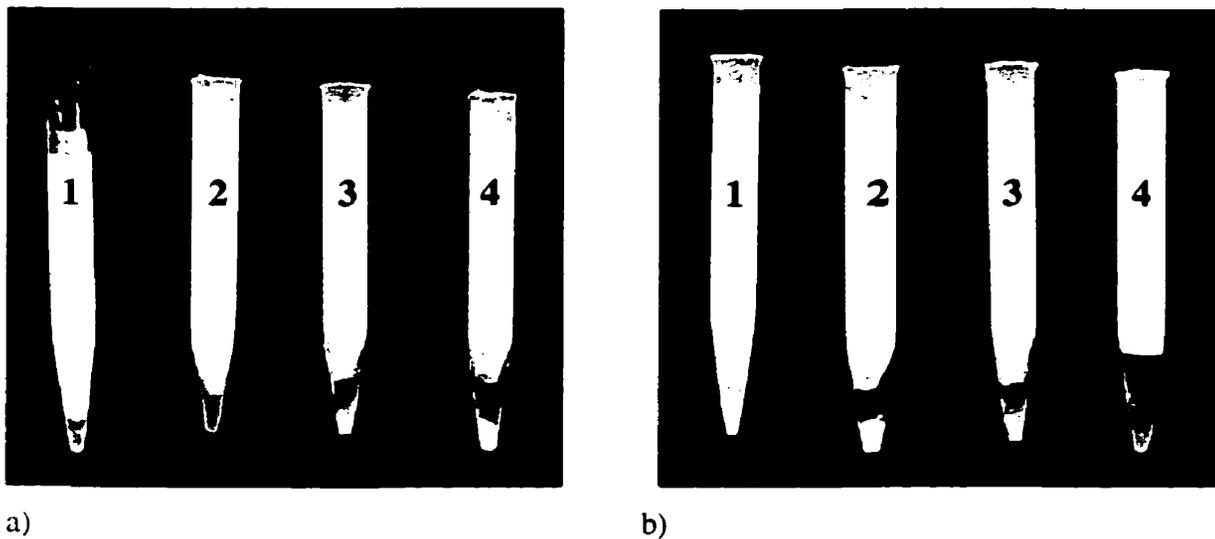
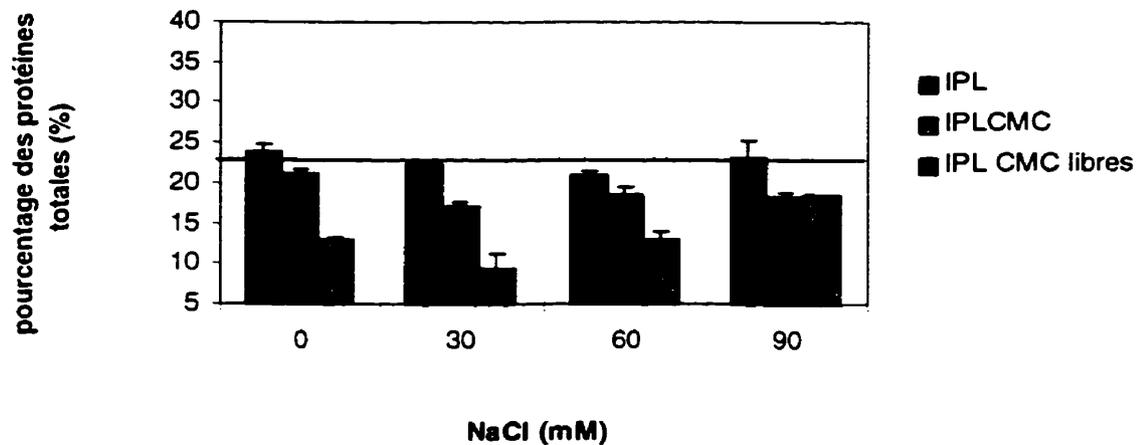


Figure 3.5 Observation visuelle d'émulsions après 5 jours d'entreposage a) avec complexes  $l=0$ ;  $2=30$ ;  $3=60$  et  $4=90$  mM NaCl b) à  $0$  mM de NaCl  $1 =$  protéines seules,  $2 =$  complexes (lot 1),  $3 =$  complexes (lot 2) et  $4 =$  protéines et CMC en mélange.

*Tableau 3.3 Analyse de variance des résultats de la mesure de la distribution protéique dans les émulsions en fonction de la concentration NaCl et du type de protéines.*

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F <sub>0</sub>	PR > F
Modèle	15	105.649	7.043	1.93	0.1025
Type de protéines* (COMP)	3	76.351	25.450	6.96	0.0033
Concentration en NaCl (NACL)	3	11.486	3.829	1.05	0.3939
NACL*COMP	9	17.811	1.979	0.54	0.8241
Erreur	16	58.530	3.658		
Total	31	164.179			



*Figure 3.6. Proportion des protéines totales présentes dans les 10 g au bas de tubes d'émulsions modèles à différentes concentrations en NaCl et selon le type de protéines après 5 jours d'entreposage.*

Tableau 3.4 Analyse de variance des résultats de la mesure de la charge protéique d'émulsions en fonction de la concentration NaCl et du type de protéines.

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F <sub>0</sub>	PR > F
Modèle	15	106.153	7.077	1.11	0.4198
Type de protéines* (COMP)	3	40.391	13.464	2.11	0.1397
Concentration en NaCl (NACL)	3	41.293	13.764	2.15	0.1336
NACL*COMP	9	24.467	2.719	0.43	0.9024
Erreur	16	102.287	6.393		
Total	31	208.440			

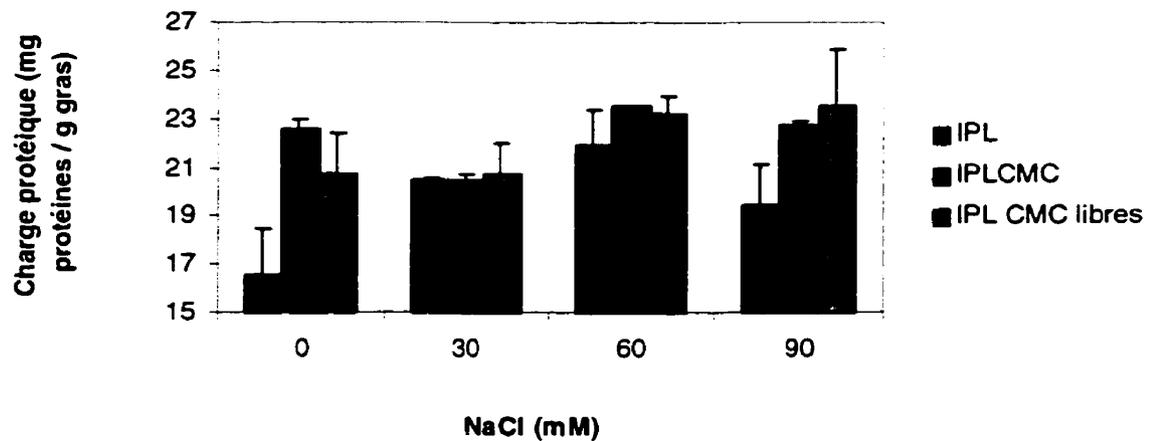


Figure 3.7 Charges protéiques d'émulsions modèles à différentes concentrations en NaCl et selon le type de protéines après 5 jours d'entreposage

### 3.3.2. Effet d'un traitement thermique

Les émulsions modèles fabriquées contenaient 20% d'huile de maïs, 0,50% de protéines et 0 mM de NaCl. La moitié d'entre elles subissaient un traitement thermique de 10 minutes à 121°C.

#### **Observation visuelle**

La stabilité des émulsions contenant les protéines seules n'a pas été modifiée par le traitement thermique. Ce résultat est en désaccord avec la publication de Mangino (1994) qui mentionne que la stabilité d'une émulsion contenant des protéines natives augmente lors d'un chauffage. Cette stabilité accrue serait due à la gélification du film interfacial. Cependant, le même traitement de chaleur peut induire la floculation de l'émulsion en favorisant les interactions hydrophobes ainsi que la formation de ponts disulfures entre les protéines adsorbées sur des gouttelettes différentes (Mangino, 1994).

L'analyse statistique des résultats présentés à la figure 3.8 démontre une interaction significative existe entre le traitement thermique et le type de protéines aux deuxième et troisième jour d'entreposage. Dès la quatrième journée, seul l'effet du type de protéines est significatif (tableau 3.5). Cette interaction s'explique par le fait que la stabilité des émulsions contenant les complexes a été peu modifiée lors du traitement thermique. Cependant, dans le cas de l'émulsion contenant les protéines et CMC en mélange, on remarque une tendance du traitement thermique à accélérer la déstabilisation.

#### **Mesures de distributions protéiques**

L'analyse statistique des résultats obtenus lors du dosage des protéines au bas des émulsions a permis d'établir la présence d'une interaction entre le type de protéines et le traitement thermique (tableau 3.6).

Théoriquement, une émulsion stable devrait avoir 23,5% de ses protéines présentes dans

chacune des phases prélevées dans les émulsions. Cette valeur est représentée par le trait horizontal tracé sur la figure 3.9. En se basant sur cette valeur, la déstabilisation des émulsions augmente avec la concentration en CMC libre. Autrement dit, les émulsions contenant les protéines seules sont les plus stables suivies par celles contenant les complexes qui sont plus stables que les émulsions contenant les protéines et CMC en mélange. La déstabilisation des émulsions contenant le CMC libre est accélérée lors du traitement thermique.

### **Mesures de la charge protéique**

Le traitement thermique influence significativement la charge protéique des émulsions de même que le type de protéines incorporées (figure 3.10) sans qu'il n'y ait interaction entre les deux facteurs (tableau 3.7). Pour une même quantité de protéines, l'émulsion contenant les protéines seules a une charge protéique inférieure à celle des émulsions contenant les complexes ou les protéines et CMC en mélange. Lorsque les protéines incorporées sont seules ou complexées, la charge protéique diminue après le traitement thermique. Lorsque les protéines et le CMC en mélange sont incorporés, cette charge protéique reste constante. Voici maintenant l'analyse des résultats obtenus lors de l'étude de l'effet d'un traitement thermique sur la stabilité d'émulsions modèles.

La distribution protéique a permis de détecter une interaction entre le type de protéines présentes dans l'émulsion et la présence d'un traitement thermique. L'effet du type de protéines a déjà été expliqué dans la section portant sur l'effet de la force ionique sur la stabilité de l'émulsion. L'effet du traitement thermique pourrait s'expliquer par le fait que la présence de chaleur accélérerait et intensifierait les réactions entraînant la formation d'un réseau dans l'émulsion. Le polymère incompatible, en l'occurrence le CMC libre, serait alors expulsé plus rapidement du réseau de l'émulsion, la stabilité dans le temps étant alors diminuée.

La diminution de la charge protéique des émulsions contenant les protéines seules et les complexes et ayant subi le traitement thermique s'explique difficilement. Dans le cas des

émulsions contenant les protéines et CMC en mélange, l'incompatibilité du polysaccharide à pH 7 exercerait une pression sur les protéines, favorisant ainsi leur adsorption aux gouttelettes d'huile (Ward-Smith et al., 1994). Cette dernière explication serait aussi valable pour les émulsions contenant les complexes où près de 19% du CMC est sous forme libre. Dans le cas des émulsions contenant les complexes, la formation d'un réseau impliquant les protéines et CMC complexés pourrait aussi expliquer cette différence de charge protéique. Le réseau, plutôt que les protéines seules, serait adsorbé sur les gouttelettes d'huile, augmentant ainsi la quantité de protéines présentes dans la phase lipidique de l'émulsion.

Les dernières conclusions sur cette section, à savoir la présence d'un réseau dans les émulsions contenant les complexes, indiquent un comportement différent de celui des émulsions contenant les protéines seules lors d'une variation des concentrations en huile et en protéines. La variable traitement thermique a été conservée afin de vérifier une interaction possible avec les concentrations en huile et en protéines.

*Tableau 3.5 Analyse de variance de l'observation visuelle de la stabilité des émulsions en fonction du traitement thermique (121 °C, 10 minutes) et du type de protéines.*

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F <sub>0</sub>	PR > F
<b>Jour 1</b>					
Modèle	5	1.307	0.261	4.90	0.0394
Traitement thermique (TT)	1	0.213	0.213	4.00	0.0924
*Type de protéines (COMP)	2	0.667	0.333	6.25	0.0341
TT*COMP	2	0.427	0.213	4.00	0.0787
Erreur	6	0.320	0.053		
Total	11	1.627			
<b>Jour 2</b>					
Modèle	5	7.524	1.505	26.17	0.0005
Traitement thermique (TT)	1	0.907	0.907	15.78	0.0073
*Type de protéines (COMP)	2	4.962	2.480	43.14	0.0003

TT*COMP	2	1.655	0.827	14.39	0.0051
Erreur	6	0.345	0.057		
Total	11	7.869			
<hr/>					
Jour 3					
Modèle	5	13.284	2.657	39.85	0.0002
Traitement thermique (TT)	1	1.141	1.141	17.11	0.0061
*Type de protéines (COMP)	2	10.042	5.021	75.31	0.0001
TT*COMP	2	2.102	1.051	15.76	0.0041
Erreur	6	0.400	0.067		
Total	11	13.684			
<hr/>					
Jour 4					
Modèle	5	20.666	4.133	43.80	0.0001
Traitement thermique (TT)	1	0.350	0.350	3.71	0.1024
*Type de protéines (COMP)	2	19.758	9.879	104.68	0.0001
TT*COMP	2	0.558	0.279	2.96	0.1278
Erreur	6	0.566	0.094		
Total	11	21.232			
<hr/>					
Jour 5					
Modèle	5	20.666	4.133	40.80	0.0001
Traitement thermique (TT)	1	0.350	0.350	3.71	0.1024
*Type de protéines (COMP)	2	19.758	9.879	104.68	0.0001
TT*COMP	2	0.558	0.279	2.96	0.1278
Erreur	6	0.566	0.094		
Total	11	21.232			

\*Complexes, protéines seules, protéines et CMC en mélange

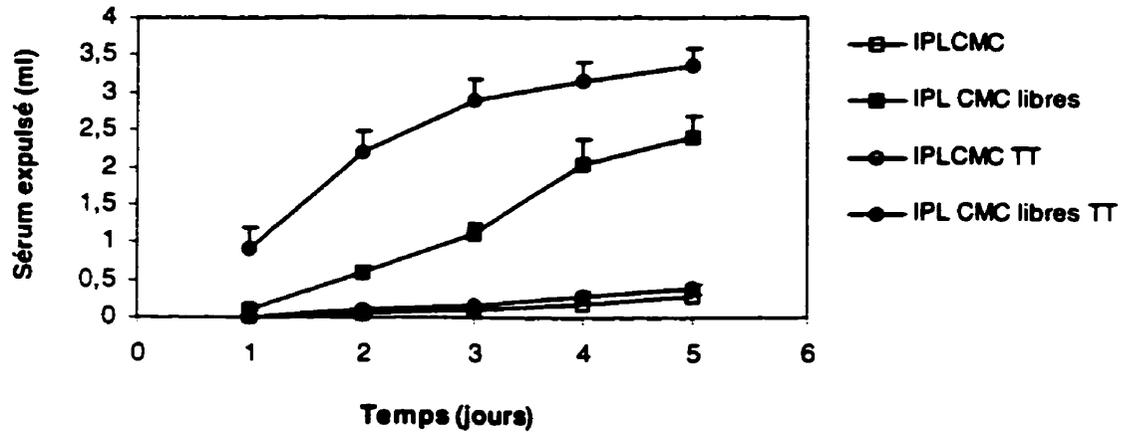


Figure 3.8. Volume de sérum expulsé au bas de tubes de 12 ml d'émulsions à 0mM de NaCl avant et après traitement thermique à 121°C (TT) pendant 10 minutes sur une période de 5 jours.

Tableau 3.6 Analyse de variance des résultats de la mesure de la distribution protéique des émulsions en fonction du traitement thermique (121°C, 10 minutes) et du type de protéines.

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F <sub>0</sub>	PR > F
Modèle	7	454.657	64.951	80.43	0.0001
Traitement thermique (TT)	1	34.222	34.222	42.38	0.0002
*Type de protéines (COMP)	3	406.587	135.529	167.84	0.0001
TT*COMP		13.847	4.616	5.72	0.0217
Erreur	8	6.460	0.807		
Total	15	461.117			

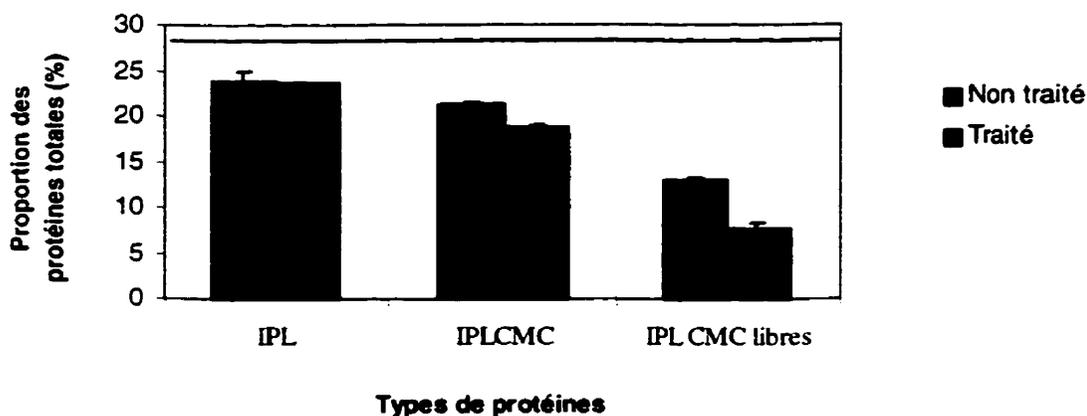


Figure 3.9 Proportion des protéines totales présentes dans les 10 g au bas de tubes d'émulsions modèles à 0mM NaCl après 5 jours d'entreposage ayant subi ou non un traitement thermique à 121°C pendant 10 minutes.

Tableau 3.7 Analyse de variance des résultats de la mesure de la charge protéique des émulsions en fonction du traitement thermique (121°C, 10 minutes) et du type de protéines.

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F <sub>0</sub>	PR > F
Modèle	7	142.614	20.373	4.54	0.0248
Traitement thermique (TT)	1	49.351	49.351	11.01	0.0106
*Type de protéines (COMP)	3	81.022	27.007	6.02	0.0189
TT*COMP		12.242	4.081	0.91	0.4779
Erreur	8	35.865	4.483		
Total	15	178.479			

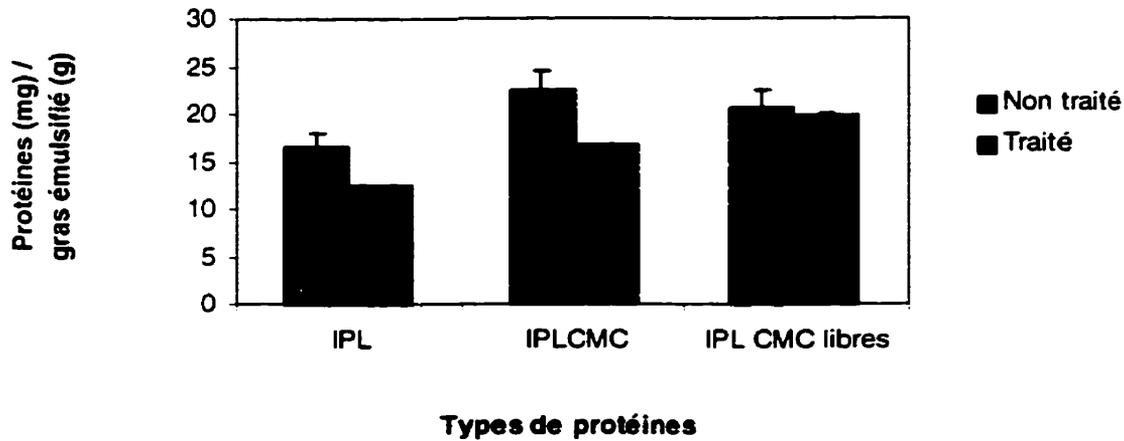


Figure 3.10 Charge protéique d'émulsions modèles, selon le type de protéines, à 0mM de NaCl, ayant subi un traitement thermique à 121°C pendant 10 minutes ou non, après 5 jours d'entreposage

### 3.3.3. Effets combinés des concentrations en complexes, en huile, d'un traitement thermique et du type de protéines

#### Observation visuelle

La stabilité des émulsions observée visuellement selon le type de protéines, les pourcentages en protéines et en huile ainsi que la présence d'un traitement thermique après un entreposage de 5 jours est présentée aux figures 3.11 a) b) et 3.12 a) b).

Les résultats illustrés démontrent que les émulsions contenant les protéines seules sont stables, pendant la durée de l'observation, peu importe les conditions imposées. Les émulsions contenant les protéines complexées voient leur stabilité augmenter avec les concentrations en protéines et en huile. Ceci est confirmé par le traitement statistique des résultats qui a démontré une interaction triple entre le type de protéines et les concentrations en protéines et en huile (tableau 3.8). Le traitement thermique diminue la stabilité des émulsions contenant les complexes surtout lorsque les concentrations en huile et en protéines sont faibles. L'analyse statistique a mis en évidence les interactions doubles du traitement thermique avec

les concentrations en huile et en protéines (tableau 3.8). Après un entreposage de 5 jours, parmi les émulsions contenant 20% d'huile, les émulsions à 1,25% de protéines traitées ou non et celles à 1,00% de protéines non traitées sont restées stables. Parmi les émulsions à 10% d'huile, seules celles à 1,25% de protéines sont demeurées stables.

### **Mesures de distribution protéique**

Dans cette section de résultats, la proportion des protéines totales se retrouvant dans la fraction du bas d'une émulsion stable devrait être de 28,6%. L'analyse statistique a démontré deux interactions doubles significatives entre le type de protéines et les concentrations en huile et en protéines (tableau 3.9). La figure 3.13 démontre que les émulsions contenant les protéines seules sont stables. Dans le cas des émulsions contenant les complexes, on voit leur stabilité augmenter avec la concentration en complexes et en huile, confirmant ce qui a été observé visuellement.

### **Mesures de charges protéiques**

La charge protéique des émulsions contenant les protéines complexées augmente avec la concentration en protéines et la diminution de la concentration en huile (figure 3.14). Tout comme lors de l'observation visuelle, l'interaction triple entre le type de protéines et les concentrations en huile et en protéines est significative (tableau 3.10). La charge protéique augmente rapidement aux basses concentrations en protéines et tend à se stabiliser vers les concentrations en protéines plus élevées, probablement dû à la saturation des gouttelettes d'huile. La charge protéique augmente de près de 170 % lorsque la concentration en protéines complexées passe de 0,50% à 1,25% pour une émulsion à 10% d'huile. Lorsque la concentration en huile est de 20%, cette augmentation est de 78%. La charge protéique est plus faible pour les émulsions contenant les protéines seules et l'augmentation en fonction de la diminution du pourcentage d'huile et de l'augmentation de la concentration en protéines, beaucoup plus modérée. Lorsque la concentration passe de 0,50% à 1,25% de protéines pour une émulsion à 10% d'huile, l'augmentation de la charge protéique est de 42% alors qu'elle est de 22% dans une émulsion à 20% d'huile.

Les interactions doubles du traitement thermique avec les concentrations en huile et en protéines sont significatives. Un traitement thermique effectué à basse concentration en protéines a tendance à diminuer la charge protéique alors que l'effet contraire se produit lorsque la concentration en protéines atteint 0,75%.

### **Rhéologie des émulsions selon la concentration en complexes**

La figure 3.15 illustre la viscosité apparente d'émulsions modèles selon le taux de cisaillement, la concentration ainsi que le type de protéine. Les émulsions contenant les complexes ont un comportement pseudoplastique caractérisé par la diminution linéaire du logarithme de la viscosité apparente en fonction du logarithme du taux de cisaillement. Les émulsions contenant les protéines seules ont un comportement de type newtonien puisqu'aucune baisse de viscosité en fonction du taux de cisaillement n'est observée (les courbes, ayant une valeur nulle en abscisse, ne sont pas représentées sur la figure). Les mesures rhéologiques effectuées en conditions dynamiques sont présentées sur la figure 3.16. Seuls les résultats obtenus pour les émulsions contenant les complexes sont présentés, les émulsions contenant les protéines seules étant d'une viscosité insuffisante pour ce type de mesure.

Les résultats obtenus à l'aide de l'observation visuelle et de la distribution protéique démontrent que la stabilité des émulsions contenant les complexes augmente avec les concentrations en huile et en protéines. Ces résultats sont un indice de floculation où un réseau de microcanaux est formé par des interactions d'exclusion. En effet, une plus grande quantité de molécules dans l'émulsion ralentirait la formation d'un tel réseau par lequel le CMC libre est expulsé.

L'augmentation de la stabilité pourrait aussi être due à l'augmentation de la concentration en CMC dans l'émulsion. Lorsque les émulsions contiennent les protéines seules, les forces de répulsions stériques et électrostatiques sont suffisantes pour prévenir la floculation. Lorsque le CMC est présent dans l'émulsion sous forme libre, les interactions d'exclusion apparaissent et augmentent jusqu'à l'atteinte d'une concentration critique en CMC. Le CMC ajouté à une concentration supérieure, la stabilité de l'émulsion augmentera due à une importante

floculation et à une viscosité accrue de la phase continue, limitant ainsi les forces d'exclusion. Des résultats semblables ont été obtenus par plusieurs auteurs (Dickinson et al, 1994 ; Parker et al, 1995 ; Demetriades et McClements, 1998). L'effet déstabilisant du traitement thermique lorsque la concentration en molécules dans l'émulsion est faible serait due à l'accélération de la formation du réseau de microcanaux par l'action de la chaleur.

La charge protéique élevée des émulsions contenant les complexes vient appuyer une fois de plus la formation d'un réseau où les complexes sont adsorbés sur les gouttelettes d'huile. L'adsorption des complexes sur les gouttelettes d'huile plutôt qu'une simple inclusion de ces dernières s'est confirmée lors de la centrifugation des émulsions. Un réseau de complexes non adsorbé aurait formé un culot au fond du tube, les deux autres phases étant aqueuse et lipidique. La centrifugation des émulsions a plutôt conduit à deux phases, la première comprenant la matière grasse et les complexes et la deuxième une phase aqueuse transparente. La présence d'un tel réseau fait de complexes et de gouttelettes d'huile expliquerait l'augmentation de la charge protéique lors d'une augmentation de la concentration en protéines et d'une diminution de la concentration en huile. Les gouttelettes d'huile d'une émulsion contenant les protéines seules deviennent saturées à une certaine concentration en protéines. Dans le cas des émulsions contenant les complexes, l'adsorption n'est pas limitée à la surface des gouttelettes puisque le réseau de complexes entier est adsorbé, le tout étant maintenu par des liens électrostatiques. Le mécanisme de stabilisation d'une émulsion par des complexes de protéines du lactosérum et carboxyméthylcellulose serait une combinaison d'encombrement stérique et d'adsorption sur les gouttelettes d'huile.

La charge protéique élevée des émulsions contenant les complexes aurait un effet protecteur contre la coalescence des gouttelettes. Cette affirmation est appuyée par une observation faite lors de la centrifugation des émulsions où les phases lipidiques récupérées n'avaient pas la même apparence si les protéines étaient seules ou complexées. À la surface des phases lipidiques des émulsions contenant les protéines seules on pouvait observer une mince couche d'huile. Cette couche d'huile indicatrice d'une coalescence des gouttelettes était absente sur les phases lipidiques des émulsions contenant les protéines complexées. La stabilité à long

terme des émulsions contenant les complexes n'est cependant pas connue, les dosages et observations visuelles s'étant effectués au cinquième jour d'entreposage.

La déstabilisation des émulsions contenant les protéines seules étant plus caractérisée par une coalescence que par une floculation, les techniques d'observation visuelle et de mesure de distribution protéique ne peuvent mesurer ce type de déstabilisation. Des mesures en rhéologie ont tenté de caractériser et de supporter les mécanismes proposés lors de l'interprétation des résultats précédents.

Les résultats obtenus lors de l'étude du comportement des émulsions en écoulement ont démontré le caractère pseudoplastique des émulsions contenant les complexes et le caractère newtonien dans le cas des émulsions contenant les protéines seules. Cette pseudoplasticité indique la présence d'une floculation des gouttelettes d'huile dans l'émulsion (Dickinson et al., 1998). La viscosité initiale élevée des émulsions contenant les complexes s'explique par la présence de phase continue emprisonnée dans les amas de gouttelettes. La force de cisaillement brise ces amas, conduisant à une diminution de la viscosité apparente (Demetriades et al., 1997a et b). Le comportement newtonien des émulsions contenant les protéines seules indique que le mécanisme de déstabilisation des émulsions serait probablement la coalescence.

La rhéologie dynamique permet de mesurer le degré de viscoélasticité d'une émulsion. Le paramètre  $G'$  représente la quantité d'énergie emmagasinée et libérée par cycle d'oscillation alors que  $G''$  est la quantité d'énergie dissipée en chaleur (Turgeon et al., 1996). Lorsque  $G'$  est presque indépendant de la fréquence et est supérieur à  $G''$ , le système présente les caractéristiques d'un gel ou d'une suspension viscoélastique pouvant résulter de la formation d'un réseau par floculation des gouttelettes d'huile (Dickinson et al., 1998; Dickinson et Pawlowski, 1997). L'écart grandissant entre les composantes  $G'$  et  $G''$  en fonction de la concentration en protéines démontre un accroissement de la floculation dans l'émulsion. Cette floculation stabilise l'émulsion en formant un réseau de plus en plus organisé à la manière d'un gel faible.

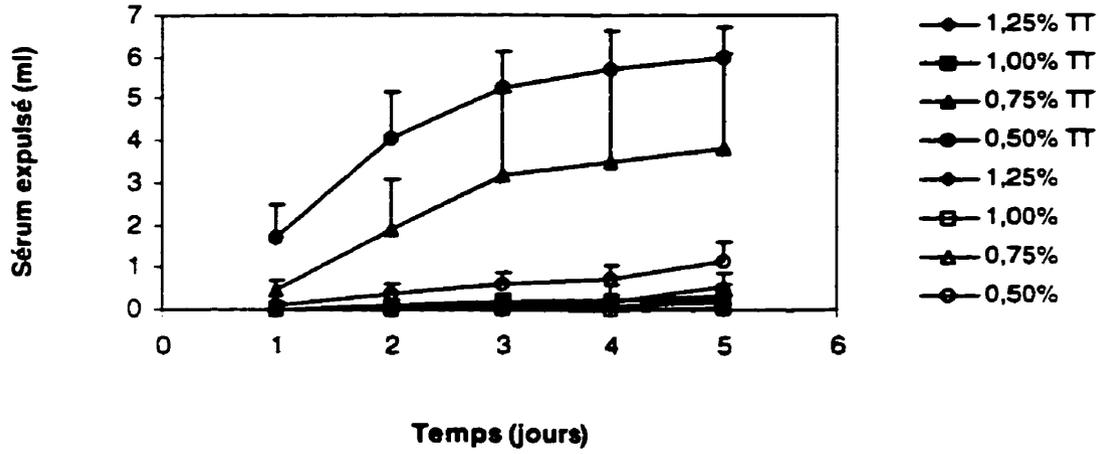
L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude portant sur les propriétés émulsifiantes d'un complexe de protéines de lactosérum et de carboxyméthylcellulose permettent de d'émettre l'hypothèse que l'utilisation de complexes IPLCMC, fabriqués de manière à éliminer toute espèce non complexée, permettront une meilleure stabilisation des émulsions contre la coalescence comparativement aux protéines de lactosérum employées seules.

*Tableau 3.8 Analyse de variance de l'observation visuelle de la stabilité d'émulsions en fonction de la concentration en protéines, du type de protéines, de la concentration en huile et du traitement thermique (121°C, 10 minutes) au cinquième jour d'entreposage.*

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F <sub>0</sub>	PR > F
Modèle	31	5914.783	190.799	4.05	0.0001
Traitement thermique (TT)	1	289.256	289.256	6.15	0.0186
Concentration en protéines (PROT)	3	638.855	212.952	4.52	0.0094
*Type de protéines (COMP)	1	669.903	669.903	14.23	0.0007
Concentration en huile (HUI)	1	500.228	500.228	10.63	0.0026
TT*PROT	3	288.357	96.119	2.04	0.1276
TT*COMP	1	309.890	309.890	6.58	0.0152
TT*HUI	1	238.391	238.391	5.07	0.0314
PROT*HUI	3	440.844	146.948	3.12	0.0395
PROT*COMP	3	613.923	204.641	4.35	0.0112
COMP*HUI	1	482.652	482.652	10.26	0.0031
TT*PROT*COMP	3	265.828	88.276	1.88	0.1535
TT*PROT*HUI	3	264.427	88.142	1.87	0.1540
PROT*COMP*HUI	3	433.927	144.642	3.07	0.0416
TT*PROT*COMP*HUI	4	479.299	119.825	2.55	0.0585
Erreur	32	1505.997	47.062		
Total	63	7420.779			

\*Complexes, protéines seules

a)



b)

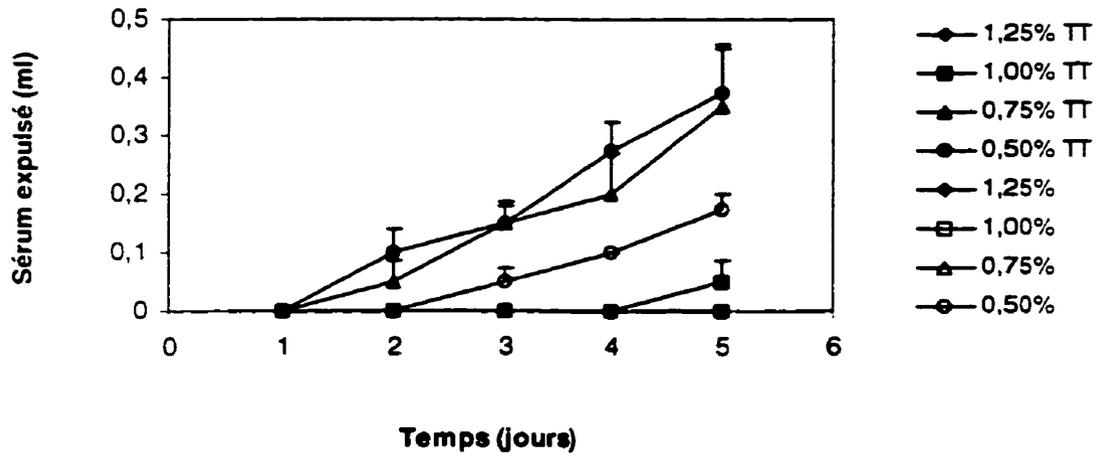


Figure 3.11 Volume du sérum expulsé d'émulsions de 12 ml à 0 mM de NaCl avant et après traitement thermique à 121°C pendant 10 minutes (TT) à différentes concentrations en protéines complexées a) 10% d'huile b) 20% d'huile.

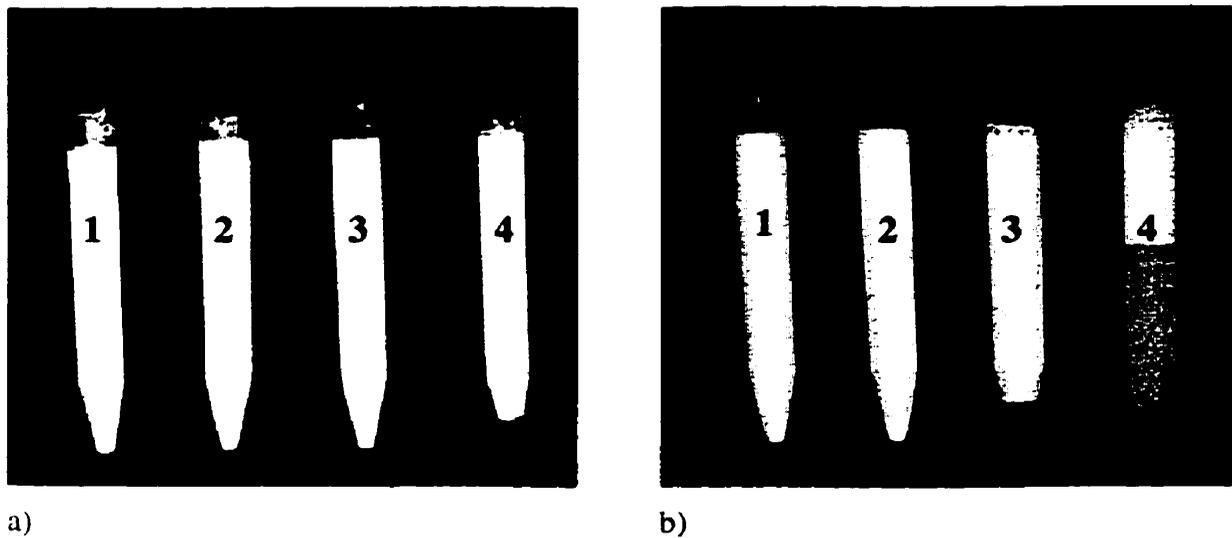


Figure 3.12. Émulsions entreposées 5 jours a) 20% huile, 1,0% protéines b) 10% huile, 0,50% protéines. 1 = protéines seules, 2 = protéines seules + traitement thermique, 3 = complexes, 4 = complexes + traitement thermique.

Tableau 3.9 Analyse de variance des résultats de la distribution protéique des émulsions en fonction de la concentration en protéines, du type de protéines, de la concentration en huile et du traitement thermique (121°C, 10 minutes).

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F <sub>0</sub>	PR > F
Modèle	31	743.490	23.983	3.17	0.0008
Traitement thermique (TT)	1	2.473	2.473	0.33	0.5712
Concentration en protéines (PROT)	3	103.541	34.514	4.57	0.0090
Type de protéines (COMP)	1	270.284	270.284	35.77	0.0001
Concentration en huile (HUI)	1	17.440	17.440	2.31	0.1385
TT*PROT	3	27.976	9.325	1.23	0.3134

TT*COMP	1	3.481	3.481	0.46	0.5022
TT*HUI	1	5.897	5.897	0.78	0.3836
PROT*HUI	3	9.784	3.261	0.43	0.7318
PROT*COMP	3	145.909	48.636	6.44	0.0016
COMP*HUI	1	68.142	68.142	9.02	0.0052
TT*PROT*COMP	3	25.141	8.380	1.11	0.3598
TT*PROT*HUI	3	22.747	7.582	1.00	0.4039
PROT*COMP*HUI	3	35.493	11.830	1.57	0.2168
TT*PROT*COMP*HUI	4	5.180	1.29	0.17	0.9514
Erreur	32	241.778	7.556		
Total	63	985.269			

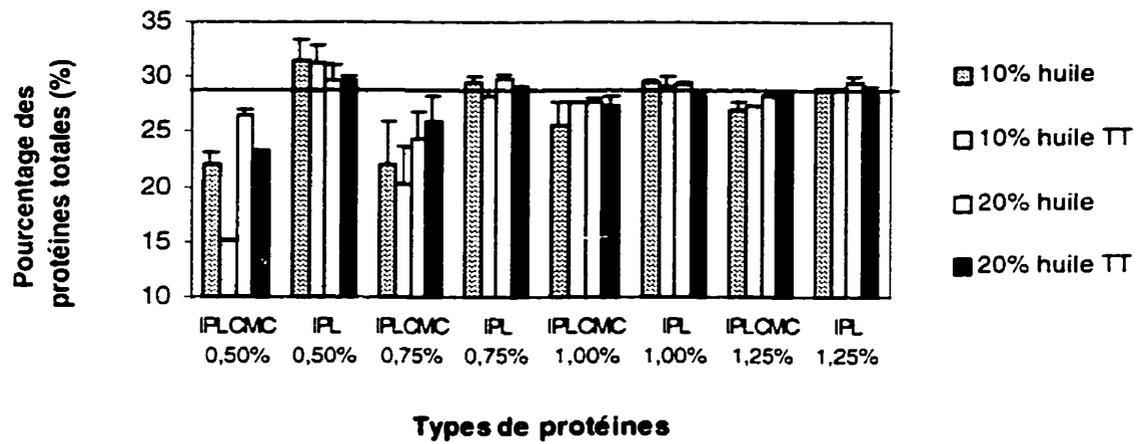


Figure 3.13 Distribution protéique d'émulsions modèles, à 0mM de NaCl, selon le type de protéines, leurs concentrations en huile et en protéines et l'application d'un traitement thermique à 121 °C pendant 10 minutes (TT).

*Tableau 3.10 Analyse de variance des résultats de la mesure de la charge protéique d'émulsions en fonction de la concentration en protéines, du type de protéines, de la concentration en huile et du traitement thermique (121°C, 10 minutes).*

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F <sub>0</sub>	PR > F
Modèle	31	18452.622	595.246	52.95	0.0001
Traitement thermique (TT)	1	89.0234	89.024	7.92	0.0083
Concentration en protéines (PROT)	3	5368.999	1789.666	159.20	0.0001
Type de protéines* (COMP)	1	6560.296	6560.296	583.57	0.0001
Concentration en huile (HUI)	1	2855.389	2855.389	254.00	0.0001
TT*PROT	3	130.137	43.379	3.86	0.0183
TT*COMP	1	33.571	33.571	2.99	0.0936
TT*HUI	1	65.626	65.626	5.84	0.0216
PROT*HUI	3	399.952	133.317	11.86	0.0001
PROT*COMP	3	1738.471	579.490	51.55	0.0001
COMP*HUI	1	852.629	852.629	75.85	0.0001
TT*PROT*COMP	3	2.151	0.717	0.06	0.9786
TT*PROT*HUI	3	38.109	12.703	1.13	0.3516
PROT*COMP*HUI	3	311.477	103.825	9.24	0.0002
TT*PROT*COMP*HUI	4	6.790	1.697	0.15	0.9612
Erreur	32	359.732	11.242		
Total	63	18812.354			

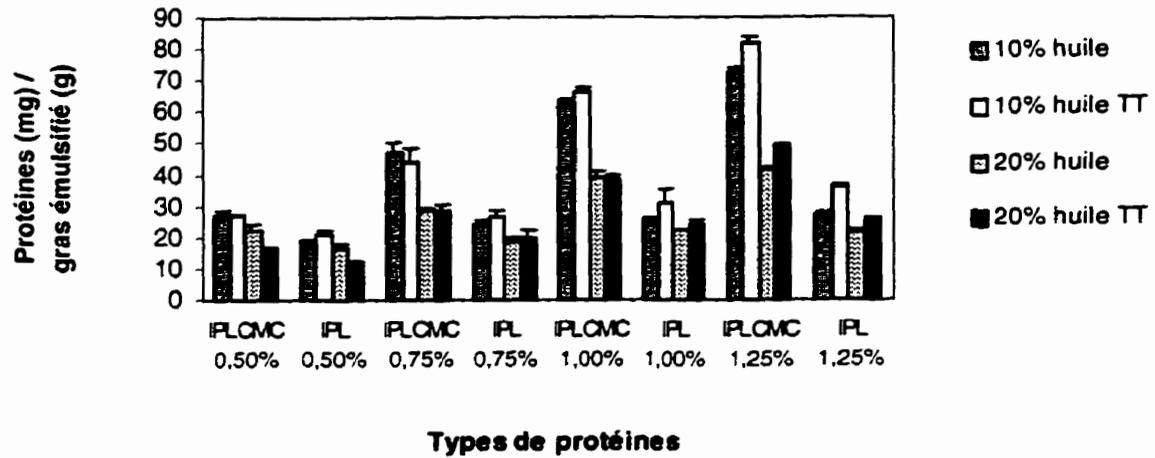


Figure 3.14 Charge protéique d'émulsions modèle selon le type de protéines, les concentrations en huile et en protéines et l'application d'un traitement thermique à 121 °C 10 minutes (TT).

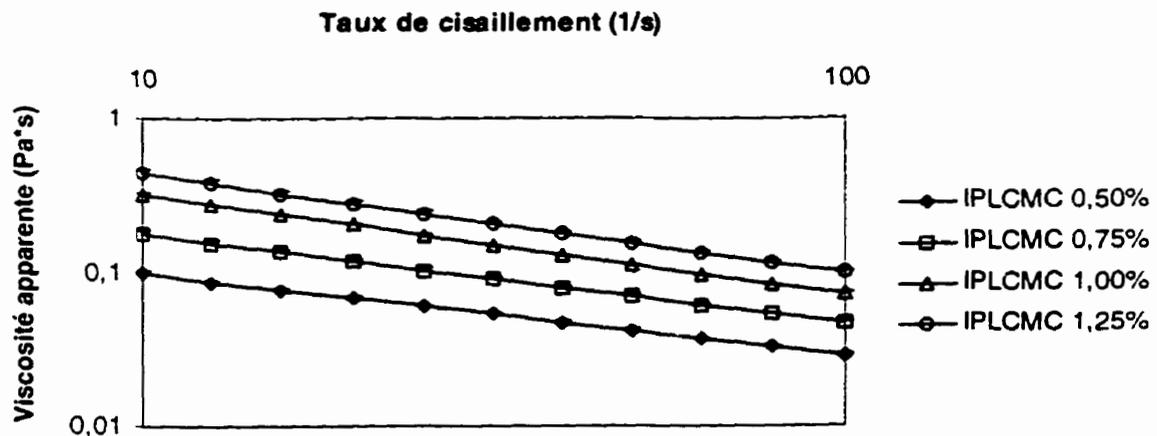


Figure 3.15 Viscosité apparente d'émulsions modèles à 20% d'huile en fonction de la fréquence et du pourcentage en protéines.



## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les agents émulsifiants et stabilisants sont nombreux et diversifiés. La mise au point d'un nouvel ingrédient est toujours d'actualité puisque la stabilité des émulsions se veut toujours de plus en plus longue. La perception négative des émulsifiants chimiques par les consommateurs pousse la recherche vers des ingrédients fonctionnels le plus naturel possible. L'emploi de protéines et de polysaccharides s'avère donc être une alternative intéressante. Le coût des ingrédients choisis doit être acceptable et leur fonctionnalité optimale. Les protéines de lactosérum et le carboxyméthylcellulose sont deux macromolécules répondant bien à ces exigences. Un complexe de protéines de lactosérum et de CMC stabilisé thermiquement et séché devient donc un nouvel ingrédient aux propriétés fonctionnelles uniques. Le projet avait donc pour but de mieux comprendre le comportement de ce complexe lorsque incorporé dans une émulsion modèle.

Les complexes de protéines de lactosérum et de carboxyméthylcellulose fabriqués selon le procédé développé par Le Hénaff (1996) ont un diamètre moyen d'un même ordre de grandeur que celui des complexes contenant le xanthane microfluidisé. On peut donc en conclure que la nature du polysaccharide ainsi que son poids moléculaire influence la taille des complexes formés.

Lorsque les complexes IPLCMC ont été fabriqués, 18,7 % du CMC est resté sous forme libre. Ce pourcentage de polysaccharides non complexé serait responsable de l'apparition de sérum au bas des émulsions vu l'incompatibilité du CMC avec les protéines de lactosérum à pH 7,0. L'expulsion du polysaccharide du réseau de l'émulsion s'effectuerait par l'action de forces osmotiques naissant de l'attraction entre les gouttelettes d'huile.

Les émulsions contenant les complexes ont vu leur stabilité diminuer avec une augmentation de la force ionique. Le NaCl agirait tel un écran électrostatique, diminuant le pouvoir émulsifiant des complexes attribué majoritairement à des interactions électrostatiques. L'effet d'un traitement thermique à 121°C pendant 10 minutes sur les émulsions a accéléré la déstabilisation des émulsions contenant les complexes en favorisant les réactions entraînant l'expulsion du sérum.

Les mesures de charge protéique ont permis de constater que les complexes formaient un réseau avec les gouttelettes d'huile. La charge protéique des émulsions contenant les complexes ne parvient jamais à saturation, peu importe la concentration en protéines, puisque la totalité des protéines se retrouve dans le réseau de l'émulsion. Dans le cas des émulsions contenant les protéines seules, les protéines non adsorbées lors de la saturation des gouttelettes restent libres dans la phase aqueuse. Le réseau formé dans les émulsions contenant les complexes isolerait les gouttelettes d'huile les unes des autres, empêchant ainsi leur coalescence. Ce réseau serait en fait dû à la floculation des gouttelettes d'huile, phénomène confirmé lors de mesures rhéologiques en dynamique et en écoulement. Aucune évidence ne permet d'affirmer que la floculation s'effectue par la formation de ponts entre les gouttelettes ou par formation de canaux entre les gouttelettes entraînant l'expulsion du CMC libre. La microscopie électronique serait un moyen d'observer le mécanisme de floculation.

Afin de mieux caractériser le comportement de ces complexes, l'utilisation de fractions protéiques serait tout indiquée. Cependant leur coût élevé limiterait leur utilisation dans un produit alimentaire. Il serait intéressant de refaire l'étude en mettant au point un procédé qui éliminerait la présence d'espèces libres lors de la formation des complexes. Une étape de filtration pourrait éliminer les CMC et protéines non complexés et solubles au pH de fabrication des complexes. L'étude des propriétés émulsifiantes de complexes IPLCMC en fonction du le ratio protéine/polysaccharide pourrait aussi être intéressante. La stabilité des émulsions à long terme est un aspect très important qui mériterait d'être investigué dans de futures études.

## LISTE DES OUVRAGES CITÉS

AOAC (1990), **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15<sup>th</sup> ed.)**, Association Official Analytical Chemists Washington, D.C.

BURGESS D.J. (1990) - **Practical Analysis of Complex Coacervate Systems** - *Journal of Colloid and Interface Science*, 140 (1) 227-238

CAO Y., DICKINSON E., WEDLOCK D.J. (1990) - **Creaming and Flocculation in Emulsions Containing Polysaccharide** - *Food Hydrocolloids*, 4 (3) 185-195

CAO Y., DICKINSON E., WEDLOCK D.J. (1991) - **Influence of Polysaccharides on the Creaming of Casein-Stabilized Emulsions** - *Food Hydrocolloids*, 5 (5) 443-454

CAYOT P., LORIENT D. (1998) - **Structures et Technofonctions des Protéines du Lait** - Arilait Recherches, Paris, 37-182

CHAPLIN M.F. (1986) – **Monosaccharides**, in : CHAPLIN M.F., KENNEDY J.F. (eds) – Carbohydrates Analysis : a Practical Approach, IRL Press ltd, Oxford, UK, 1-36

CHEFTEL J.C., CUQ J.L., LORIENT D. (1985) - **Amino Acids, Peptides and Proteins**, in : O.F. FENNEMA (eds) - Food Chemistry, Marcel Dekker inc., 2eme édition, New York, 245-369

- CHEN W.S., HENRY G.A., GAUD S.M., MILLER M.S., KAISER J.M., BALMACEDA E.A., MORGAN R.G., BAER C.C., BORWANKAR R.P., HELLGETH L.C., STRANDHOLM J.J., HASENHUETTL G.L., KERWIN P.J., CHEN C.C., KRATOCHVIL J.F., LLOYD W.L. (1989) - Microfragmented Ionic Polysaccharide / Protein Complexes Dispersions - European Patent Application 0,340,035 (Kraft inc.)
- COFFEY D.G., BELL D.A., HENDERSON A. (1995) – Cellulose and Cellulose Derivatives, in STEPHEN A.M. (eds) - Food Polysaccharides and their Applications, Marcel Dekker inc., New York, 123-153, 501-515
- CURT C. (1994) – Revue : Méthodes d'évaluation de la Stabilité des émulsions, principes, applications, avantages et inconvénients – *Sciences des aliments*, 14, 699-724
- DALGLEISH D.G. (1996) – Food Emulsions, in : SJOBLÖM J. (eds) – Emulsions and Emulsion stability, Marcel Dekker inc., New York, 287-325
- DALGLEISH D.G. (1997) – Adsorption of Protein and the Stability of Emulsions - *Trends in Food Science and Technology*, 8 (1) 1-6
- DAMODARAN S. (1997) - Food Protein : An Overview, in : DAMODARAN S., PARAF A. (eds) - Food Proteins and their Applications, Marcel Dekker inc., New York, 1-24
- DE WIT J.N. (1981) - Structure and Functional Behavior of Whey Proteins - *Netherland Milk Dairy Journal*, 35, 47-64
- DE WIT J.N., KLARENBEK G. (1984) - Effects of Various Heat Treatments on Structure and Solubility of Whey Proteins - *Journal of Dairy Science*, 67 (11) 2701-2710
- DEMETRIADES K., COUPLAND J.N., McCLEMENTS D.J. (1997a) – Physical Properties of Whey Protein Stabilized Emulsions as Related to pH and NaCl – *Journal of Food Science*, 62 (2) 342-347

- DEMETRIADE K., COUPLAND J.N., McCLEMENTS D.J. (1997b) – Physicochemical Properties of Whey Protein-Stabilized Emulsions as Affected by heating and Ionic Strength – *Journal of Food Science*, 62 (3) 462-467
- DEMETRIADES K., McCLEMENTS D.J. (1998) – Influence of Dextran Sulfate and NaCl on the Flocculation of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by a Nonionic Surfactant - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10) 3929-3935
- DICKINSON E. (1989) – Surface and Emulsifying Properties of Caseins – *Journal of Dairy Research*, 56 (3) 471-478
- DICKINSON E. (1992) - Structure and Composition of Adsorbed Protein Layers and the Relationship to Emulsion Stability - *Journal of Chemical Society, Faraday Transactions*, 88 (20) 2973-2983
- DICKINSON E. (1998) – Stability and Rheological Implications of Electrostatic Milk Protein-Polysaccharide Interactions – *Trends in Food Science and Technology*, 9, 347-354
- DICKINSON E., GALASKA V.B. (1991) - Emulsion Stabilization by Ionic and Covalent Complexes of  $\beta$ -lactoglobulin with Polysaccharides - *Food Hydrocolloids*, 5 (3) 281-296
- DICKINSON E., MA J., POVEY M.J.W. (1994) – Creaming of Concentrated Oil-in-Water Emulsions Containing Xanthan – *Food Hydrocolloids*, 8, 481-497
- DICKINSON E., PAWLOWSKI K. (1996) - Effect of High-Pressure Treatment of Protein on the Rheology of Flocculated Emulsions Containing Protein and Polysaccharide - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (10) 2992-3000

- DICKINSON E., PAWLOWSKI K. (1997) - Effect of  $\iota$ -Carrageenan on Flocculation, Creaming and Rheology of a Protein-Stabilized Emulsion - *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45, 3799-3806
- DICKINSON E., SEMENOVA M.G., ANTIPOVA A., PELAN E.G. (1998) – Effect of High-Methoxy Pectin on Properties of Casein-stabilized Emulsions – *Food Hydrocolloids*, 12, 425-432
- DICKINSON E., STAINSBY G. (1988) – Emulsion Stability, in : DICKINSON E. (eds) - Advances in Food Emulsions and Foams, Elsevier Applied Science, Barking, UK, 1-44
- EIGEL W.N., BUTLER J.E., ERNSTROM C.A., FARRELL H.M. J.R., HARWALKAR V.R., JENNESS R., WHITNEY R.M. (1984) - Nomenclature of Proteins of Cow's Milk : fifth revision -*Journal of Dairy Science*, 67 (8) 1599-1631
- GANZ A.J. (1968) - Protein-Polymer Complexes and Process - US patent application 3,407,076, Hercules inc.
- GANZ A.J. (1974) How Cellulose Gum Reacts with Proteins - *Food Engineering*, 46 (6) 67-69
- GANZ A.J. (1977) - Cellulose Hydrocolloids, in : HORACE D. GRAHAM (eds) - Food Colloids, AVI inc., Connecticut, 383-417
- HANSEN P.M.T., HIDALGO J., GOULD I.A. (1971) - Reclamation of Whey Protein with Carboxymethylcellulose - *Journal of Dairy Science*, 54 (6) 830-834
- HATTORI M., NAGASAWA K., AMETANI A., KAMINOGAWA S. ET TAKAHASHI K. (1994) - Functional Changes in  $\beta$ -Lactoglobulin by Conjugation with Carboxymethyl Dextran - *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42 (10) 2120-2125

- HIDALGO J., HANSEN P.M.T. (1969) – Interactions between Food Stabilizers and  $\beta$ -lactoglobuline – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17 (5) 1089-1092
- HIDALGO J., HANSEN P.M.T. (1971) - Selective Precipitation of Whey Proteins with Carboxymethylcellulose - *Journal of Dairy Science*, 54 (9) 1270-1274
- HILL R.D. ZADOW J.G. (1974) - The Precipitation of Whey Proteins by Carboxymethylcellulose of Differing Degrees of Substitution - *Journal of Dairy Science*, 41, 373-380
- HILL R.D., ZADOW J.G. (1978) - Recovery of Whey Proteins Precipitated Complexes of Carboxymethylcellulose and Protein - *Journal of Dairy Research*, 45, 77-83
- INYANG U.E., IDUH A.O. (1996) – Influence of pH and Salt Concentration on Protein Solubility, Emulsifying and Foaming Properties of Sesame Protein Concentrate - *Journal of the American Oil Chemists Association*, 73 (12) 1663-1667
- KATO A., SATO T. ET KOBAYASHI K. (1989) - Emulsifying Properties of Protein-Polysaccharide Complexes and Hybrids - *Agriculture and Biological Chemistry*, 53 (8) 2147-2152
- KELLER J.D. (1984) - Sodium Carboxymethylcellulose (CMC) - *New York State Agricultural Experiment Station*, 53, 9-19
- KELLER J.D. (1986) - Sodium Carboxymethylcellulose, in : GLICKSMAN M. (eds) - Food Hydrocolloids vol. III, CRC Press, Floride, 42-110
- KELLY R., GUDO E.S., MITCHELL J. R. AND HARDING S.E. (1994) - Some Observations on the Nature of Heated Mixtures of Bovine Serum Albumin with an Alginate and a Pectin - *Carbohydrate Polymer*, 23, 115-120

- KILARA A. (1994) - **Whey Protein Functionality**, in : HETTIARACHCHY N.S. ET ZIEGLER G.R. (eds) - **Protein Functionality in Food Systems**, Marcel Dekker inc., New York, 325-350
- KINSELLA J.E. (1984) - **Milk Proteins : Physicochemical and Functional Properties** – CRC, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21 (3) 197-262
- KINSELLA J.E., WHITEHEAD D.M. (1988) – **Emulsifying and Foaming Properties of Chemically Modified Proteins**, in : DICKINSON E., STAINSBY G. (eds) – **Advances in Food Emulsions and Foams**, Elsevier Applied Science, New York, 163
- KLEMASZEWSKI J.L., DAS K.P., KINSELLA J.E. (1992) - **Formation and Coalescence Stability of Emulsions Stabilized by Different Milk Proteins** - *Journal of Food Science*, 57, 366-379
- LANGLEY K.R., MILLARD D., EVANS W.E. (1988) - **Emulsifying Capacity of Whey proteins Produced by Ion-Exchange Chromatography** - *Journal of Dairy Research*, 55, 197-203
- LAPASIN R., PRICL S. (1995) – **Rheologie of polysaccharide systems**, in : : BLACKIE ACADEMIC AND PROFESSIONAL (eds) - **Rheology of Industrial Polysaccharide : Theory and Application**, New York, 250-494
- LARICHEV N.A., GUROV A.N., TOLSTOGUZOV V.B. (1983) - **Protein-Polysaccharide Complexes at the Interphase. 1. Characteristics of Decane / Water Emulsions Stabilized by Complexes of Bovine Serum Albumine with Dextran Sulfate** - *Colloids and surfaces*, 6, 27-34
- LE GLOAHEC V.C.H. (1947) – **Proteinous Compound and the Manufacture Thereof**, US Patent Application 2,430,180, Algin Corporation

- LEDWARD D.A. (1979) – Protein-Polysaccharide Interactions, in : BLANSHARD J.M.V. AND MITCHELL J.R. (eds)- Polysaccharides in Food, Butterworth & Co ltd, Londres, 205-217
- LEDWARD D.A. (1994) - Protein-Polysaccharide Interactions, in : HETTIARACHCHY N.S. ET ZIEGLER G.R. (eds) - Protein Functionality in Food Systems, Marcel Dekker inc., New York, 225-259
- LE HÉNAFF S. (1996) - Microparticules de Complexes de Protéines de Lactosérum et de Xanthane comme Substitut de Matière Grasse - mémoire de maîtrise, Université Laval, Québec.
- LEMAN J., KINSELLA J.E. (1989) - Surface Activity, Film Formation and Emulsifying Properties of Milk Proteins - *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28 (2) 115-138
- MANGINO M.E. (1994) - Protein Interactions in Emulsions : Protein-Lipid Interactions, in : HETTIARACHCHY N.S. ET ZIEGLER G.R. (eds) - Protein Functionality in Food Systems, Marcel Dekker inc., New York, 147-179
- MANN B., MALIK R.C. (1996) - Studies on some Functional Characteristics of Whey Protein-Polysaccharide Complex - *Journal of Food Science and Technology, India*, 33 (3) 202-206
- MATTISON K.W., BRITTAIN I.J., DUBIN P.L. (1995) - Protein-Polyelectrolyte Phase Boundaries, *Biotechnology Progress*, 11 (6) 632-637
- MILLER M.S. (1994) – Proteins as Fat Substitutes, in : HETTIARACHCHY N.S. ET ZIEGLER G.R. (eds) – Protein Functionality in Food Systems, Marcel Dekker inc., New York, 435.

- MODLER H.V. (1985) - Functional Properties of Non-fat Dairy Ingredient- A Review.  
Modification of Lactose and Products Containing Whey Proteins - *Journal of Dairy Science*, 68, 2206-2214
- MONAHAN F.J., McCLEMENTS D.J., GERMAN J.B. (1996) – Disulfide-mediated Polymerization Reactions and Physical Properties of Heated WPI-stabilized Emulsions – *Journal of Food Science*, 61 (3) 504-509
- MORR C.V. (1979) - Functionality of Whey Protein Products - *New Zealand Dairy Science Journal and Technology*, 14, 185-204
- MORR C.V. (1984) - Production and Use of Milk Proteins in Food - *Food Technology*, 38 (7) 39-48
- MORR C.V. (1987) - Effect of HTST Pasteurization of Milk, Cheese Whey, and Cheese Whey UF Retentate upon the Composition, Physicochemical and Functional Properties of Reference Whey Protein Concentrates - *Journal of Food Science*, 52 (2) 312-317
- MORR C.V., HA E.Y.W. (1993) - Whey Protein Concentrates and Isolates : Processing and Functional Properties - *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33 (6) 431-476
- MORRIS V.J. (1990) – Biotechnically Produced Carbohydrates with Functional Properties for Use in Food Systems – *Food Biotechnology*, 4 (1) 45-57
- MULDER H. ET WALSTRA P. (1974) – The Milk Fat Globule- Pudoc, Wageningen, Netherlands and Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, U.K., p. 116
- NOGUCHI H. (1956) - Interactions of Proteins with Polymeric Materials - *Biochimica et Biophysica Acta*, 22, 459-462

- NOGUCHI H. (1959) - Interactions of Serum Albumine and Synthetic Polyelectrolytes in Various Buffer Systems - *Journal of Physics and Chemistry*, 64, 185-187
- PARK J.M., MUHOBERAC B.B., DUBIN P.L. ET XIA J. (1992) - Effects of Protein Charge Heterogeneity in Protein-Polyelectrolyte Complexation - *Macromolecules*, 25 (1) 290-295
- PARKER A., GUNNING P.A., NG K., ROBINS M.M. (1995) – How does Xanthan Stabilize Salad Dressings ? – *Food Hydrocolloids*, 9, 333-342
- POLYAKOV V.I., GRINBERG V.YA ET TOLSTOGUZOV V.B. (1980) - Application of Phase-Volume-Ratio Method for Determining the Phase Diagram of Water-Casein-Soybean Globulins System - *Polymer Bulletin*, 2, 757-760
- SAMANT S.K., SINGHAL R.S., KULKARNI P.R., REGE D.V. (1993) - Protein-Polysaccharide Interactions : A new Approach in Food Formulation - *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 547-562
- SANCHEZ C., ET PAQUIN P. (1997) - Protein and Protein-Polysaccharide microparticles, in : DAMODARAN S. ET PARAF A. (eds) - Food Proteins and their Applications, Marcel Dekker inc., New York, 503-528
- SCHMIDT R.H., PACKARD V.S., MORRIS H.A. (1984) - Effect of Processing on Whey Protein Functionality - *Journal of Dairy Science*, 67, 2723-2733
- SCHMITT C., SANCHEZ C., DESOBRY-BANON S., HARDY J. (1998) - Structure and Functional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes : A Review - *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (8) 689-753
- SEMENOVA M.G. (1996) - Factor Determining the Character of Biopolymer-Biopolymer Interactions in Multicomponent Aqueous Solutions Modeling Food Systems, in :

PARRIS N., KATO A., CREAMER L.K., PEARCE J. (eds) - Macromolecular Interactions in Food Technology, ACS Symposium Series 650, Washington DC, 37-49

SHIMADA K. AND CHEFTEL J.C. (1989) - Sulfhydryl Group / Disulfide Bond Interchange Reactions During Heat-Induced Gelation of Whey Protein Isolate - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 161-168

SINGH O.N. BURGESS D.J. (1989) - Characterization of Albumin-Alginic Acid Complex Coacervation - *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 41, 670-673

SMITH A.K., NASH A.M., ELDRIDGE A.C., WOLF W.J. (1962) – Recovery of Soybean Whey Protein with Edible Gums and Detergents – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10 (4) 302-304

STAINSBY G. (1980) - Proteinaceous Gelling Systems and their Complexes with Polysaccharides - *Food Chemistry*, 6, 3-14

SYRBE A., BAUER W.J., KLOSTERMEYER H. (1998) - Polymer Science Concepts in Dairy Systems-An Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloids Interaction - *International Dairy Journal*, 8, 179-193

TOKAEV E.S., GUROV A.N., ROGOV I.A., TOLSTOGUZOV V.B. (1987) -Properties of Oil / Water Emulsions Stabilized by Casein-Acid Polysaccharide Mixtures - *Nahrung*, 31 (8) 825-834

TOLSTOGUSOV V.B. (1991) - Functional Properties of Food Proteins and Role of Protein-Polysaccharide Interaction - *Food hydrocolloids*, 4 (6) 429-468

TOLSTOGUZOV V.B. (1997) - Protein-Polysaccharide Interactions, in : DAMODARAN S. ET PARAF A. (eds) - Food Protein and their Applications, Marcel Dekker inc., New York, 171-198

- TOLSTOGUZOV V.B., GRINDBERG V.YA AND GUROV N. (1985) - Some Physicochemical Approaches to the Problem of Protein Texturization - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33 (2) 151-159
- TROY H.C. ET SHARP F. (1928) – Physical Factors Influencing the Formation and Fat Content of Gravity Cream, *Journal of Dairy Science*, 11, 189-226
- TURGEON S.L., SANCHEZ C., GAUTHIER S.F., PAQUIN P. (1996) – Stability and Rheological Properties of Salad Dressing Containing Peptidic Fractions of Whey Proteins - *International Dairy Journal*, 6, 645-658
- VAN OSS C.J. (1993) - Acid-Base Interfacial Interactions in Aqueous Media - *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 78, 1-49
- VEIS A., BODOR E. ET MUSSEL S. (1967) - Molecular Weight Fractionation and the Self-Suppression of Complex Coacervation - *Biopolymers*, 5, 37-59
- WALSTRA P., JENNESS R. (1984) - Dairy Chemistry and Physics, in : JOHN WILEY INTERSCIENCE PUBLICATION (eds) - New York, 254-278
- WANISKA R.D., KINSELLA J.E. (1985) - Surface Properties of  $\beta$ -lactoglobulin : Adsorption and Rearrangement during film formation - *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 33, 1143-1148
- WARD-SMITH R.S., HEY M.J., MITCHELL J.R. (1994) – Protein-Polysaccharide Interactions at the Oil-Water Interface - *Food Hydrocolloids*, 8 (3-4) 309-315
- XIA J. ET DUBIN P.L. DAUTZENBERG H. (1993) – Light Scattering, Electrophoresis, and Turbidimetry Studies of Bovine Serum Albumin - Poly(dimethyldiallylammonium chloride) Complex – *Langmuir*, 9, 2015-2019

**XIE Y.R. ET HETTIARACHCHY N.S. (1997) - Xanthan Gum Effects on Solubility and Emulsification Properties of Soy Protein Isolate - *Journal of Food Science*, 62 (6) 1101-1104**

## ANNEXE A

### Estimation du poids moléculaire du CMC

Le viscosimètre capillaire Cannon-Fenske (Fisher Scientific, type CFRC-050) fut utilisé pour déterminer la viscosité de la solution. L'opération fut répétée 3 fois pour chaque concentration. La viscosité cinématique est obtenue lorsqu'on multiplie la moyenne des temps en secondes par une constante en centistoke/seconde ( $K=0,004$ ). La viscosité dynamique peut alors être calculée par la multiplication de la viscosité cinématique par la masse volumique (g/ml) mesurée à l'aide d'un pycnomètre. Lorsque la viscosité dynamique est connue pour 5 concentrations situées entre 0,01 g/l et 0,25 g/l, la viscosité intrinsèque peut être obtenue par la méthode de calcul suivante :

Étant donnée la dilution des solutions, les interactions entre les macromolécules sont considérées négligeables,  $\eta = \eta_0 (1 + [\eta]_0 C)$

où  $\eta$  : viscosité de la solution à analyser en centipoise

$\eta_0$  : viscosité du solvant (eau déionisée)

C : concentration g/l du polymère

L'expression  $[(\eta - \eta_0)/(\eta_0 C)]$  connue comme étant la viscosité réduite peut idéalement être indépendante de la concentration et elle devient ainsi à la limite de la concentration zéro.

Cette valeur limite de viscosité réduite est appelée la viscosité intrinsèque.

$$[\eta] = [\eta]_0 = \lim_{C \rightarrow 0} (\eta - \eta_0) / \eta_0 C$$

La viscosité réduite peut-être écrite sous la forme de l'équation d'Huggins :

$$\eta_{sp}/C=[\eta]+k'[\eta]^2C$$

où  $\eta_{sp}/(nr-1)$  : viscosité spécifique

$n_r$  = viscosité relative =  $\eta/\eta_0 = \eta_{\text{solution}}/\eta_{\text{solvant}}$

$k'$  = constante d'Huggins

Pour les solutions très diluées, la première partie de l'équation seule peut être utilisée. La viscosité intrinsèque en dl/g est déterminée par la pente de la droite de la viscosité relative en fonction de la concentration de la solution g/l, selon  $n_r = [\eta]C + 1$

Le poids moléculaire peut ensuite être estimé à partir de l'équation de Mark-Houwink

$$[\eta] = K \cdot M_w^a$$

où  $[\eta]$  : viscosité intrinsèque

$K, a$  : constantes de Mark-Houwink (Lapasin et Priel, 1995)

$K$  :  $72 \times 10^{-6}$

$a$  : 0,95

$M_w$  : poids moléculaire (d)

## ANNEXE B

Composition de l'isolat de protéines de lactosérum utilisé

CONSTITUANTS	BASE HUMIDE	BASE SECHE
<b>Protéines (%)</b>	93,66	98,95
<i>BSA (mg/g)</i>	16,2	17,12
<i><math>\alpha</math>-lactalbumine (mg/g)</i>	130,4	137,77
<i><math>\beta</math>-lactoglobuline (mg/g)</i>	812,9	858,85
<b>Matières grasses (%)</b>	0,78	0,82
<b>Lactose (%)</b>	0,10	0,105
<b>Humidité (%)</b>	5,35	---
<b>Cendres (%)</b>	2,12	2,24
<b>Minéraux (mg/g)</b>		
<i>Potassium</i>	0,831	0,878
<i>Sodium</i>	4,658	4,921
<i>Calcium</i>	0,854	0,902
<i>Magnésium</i>	0,111	0,117
<i>Chlorures</i>	0,037	0,040
<i>Sulfates</i>	0,328	0,347
<i>Citrate</i>	0,0	0,0
<i>Phosphate</i>	0,031	0,033