



Mélanges lait / polysaccharides : création de microstructures par effet de compétition entre gélification acide et séparation de phases

Anne Rohart

► To cite this version:

Anne Rohart. Mélanges lait / polysaccharides : création de microstructures par effet de compétition entre gélification acide et séparation de phases. Alimentation et Nutrition. AgroParisTech, 2014. Français. NNT : 2014AGPT0017 . tel-03635216

HAL Id: tel-03635216

<https://pastel.hal.science/tel-03635216>

Submitted on 8 Apr 2022

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

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



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement
(AgroParisTech)**

Spécialité : Sciences et Procédés des Aliments

présentée et soutenue publiquement par

Anne ROHART

le 31 mars 2014

**Mélanges lait / polysaccharides :
création de microstructures par effet de compétition
entre gélification acide et séparation de phases**

Directrice de thèse : **Camille MICHON**

Jury

Mme Sylvie TURGEON, Professeur, Dépt sciences des aliments & nutrition, Université Laval, Canada

M. Philippe CAYOT, Professeur, UMR PAM, Agrosup Dijon

Mme Catherine DACREMONT, Professeur, UMR CSGA, Agrosup Dijon

Mme Véronique BOYER, Responsable de projet, Senoble

Mme Camille MICHON, Professeur, UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Massy

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

AgroParisTech
UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech / INRA / CNAM
1, avenue des Olympiades – 91744 Massy Cedex

*Merci à tous ceux qui m'ont aidée à mener à bien ce travail
ainsi qu'à ceux qui ont accepté de le juger.*

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I. FORMATION DES GELS LAITIERS ACIDES	3
I.1. LE LAIT	3
I.1.1. <i>Composition et principales caractéristiques.....</i>	3
I.1.2. <i>Composition protéique.....</i>	3
I.2. LE PROCESSUS DE GELIFICATION ACIDE : DU LAIT AU GEL.....	8
I.3. FACTEURS INFLUENÇANT LES PROPRIETES DES GELS ACIDES BRASSES.....	11
I.3.1. <i>Traitement thermique.....</i>	11
I.3.2. <i>Méthode d'acidification.....</i>	15
I.3.3. <i>Température et vitesse d'acidification.....</i>	17
I.3.4. <i>Traitement mécanique.....</i>	19
II. STABILITE DES MELANGES DE BIOPOLYMERES	20
II.1. LES PHENOMENES DE SEPARATION DE PHASES	20
II.1.1. <i>Interactions polymères / polymères.....</i>	20
II.1.2. <i>Interactions polymères / particules colloïdales : les phénomènes de floculation.....</i>	24
II.2. LES PHENOMENES DE SEPARATION DE PHASES DANS LES MELANGES LAIT / POLYSACCHARIDES.....	27
II.2.1. <i>Séparation de phases de mélanges protéines de lait / polysaccharides neutres.....</i>	28
II.2.2. <i>Séparation de phases de mélanges protéines de lait / polysaccharides chargés.....</i>	33
III. GELIFICATION EN PRESENCE D'UNE SEPARATION DE PHASES.....	42
III.1. EFFET DE LA GELIFICATION D'AU MOINS UNE DES DEUX PHASES	42
III.1.1. <i>Propriétés des gels en présence d'une séparation de phases.....</i>	42
III.1.2. <i>Effet de la gélification sur la séparation de phases</i>	45
III.1.3. <i>Gélification sous cisaillement de systèmes en présence d'une séparation de phases</i>	48
III.2. GELIFICATION DE MELANGES PROTEINES DE LAIT / POLYSACCHARIDES EN PRESENCE D'UNE SEPARATION DE PHASES.....	52
III.2.1. <i>Propriétés des gels acides en présence d'une séparation de phases.....</i>	53
III.2.2. <i>Effet de la gélification sur la séparation de phases de mélanges protéines de lait / polysaccharides.....</i>	58

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES	61
I. FABRICATION DES GELS LAITIERS ENRICHIS EN POLYSACCHARIDES	61
I.1. LES MATIERES PREMIERES.....	61
I.1.1. Le lait.....	61
I.1.2. Les polysaccharides.....	61
I.1.3. Les agents acidifiants.....	62
I.2. PREPARATION DES MELANGES LAIT / POLYSACCHARIDES	63
I.2.1. Reconstitution du lait.....	63
I.2.2. Traitement thermique du lait	63
I.2.3. Solubilisation des polysaccharides.....	63
I.3. FABRICATION DES GELS ACIDES	64
I.3.1. Acidification.....	64
I.3.2. Brassage des gels fermes acides.....	65
II. CARACTERISATION DES MELANGES ET DES GELS ACIDES ENRICHIS EN POLYSACCHARIDES PAR DES METHODES INSTRUMENTALES	66
II.1. COMPORTEMENT DE SEPARATION DE PHASES DANS LES MELANGES LAIT / POLYSACCHARIDES EN MILIEUX NEUTRES ET ACIDIFIES.....	66
II.2. MESURE DU PH	67
II.3. MESURES RHEOLOGIQUES.....	68
II.3.1. Propriétés d'écoulement.....	68
II.3.2. Détermination de la viscosité intrinsèque des polysaccharides	69
II.3.3. Mesure des propriétés viscoélastiques en régime dynamique	71
II.4. OBSERVATION DES SYSTEMES PAR MICROSCOPIE.....	73
II.4.1. Microscopie optique et à épifluorescence	73
II.4.2. Microscopie confocale à balayage laser	74
II.5. AUTRES CARACTERISATIONS	77
II.5.1. Mesure du potentiel zêta de solutions de polysaccharides.....	77
II.5.2. Etude des interactions protéines de lait / polysaccharides par une méthode spectrophotométrique	77
II.5.3. Détermination de la teneur en matière sèche des micro-gels.....	78
II.5.4. Détermination de la concentration en protéines des micro-gels	79
III. CARACTERISATION SENSORIELLE ET INSTRUMENTALE DES YAOURTS ENRICHIS EN MICRO-GELS	80
III.1. PREPARATION DES YAOURTS ENRICHIS EN MICRO-GELS	80
III.1.1. Milieu de dispersion.....	80

III.1.2. Micro-gels	80
III.2. ANALYSE SENSORIELLE DES YAOURTS ENRICHIS EN MICRO-GELS	80
III.3. CARACTERISATION INSTRUMENTALE DES YAOURTS ENRICHIS EN MICRO-GELS	81
III.3.1. Détermination de la distribution granulométrique	81
III.3.2. Propriétés rhéologiques	82
III.3.3. Observation microscopique.....	83
III.4. ANALYSES STATISTIQUES	83
CHAPITRE 3 : MELANGES LAIT / GUAR AVANT ET APRES GELIFICATION	85
I. PROPRIETES DES MELANGES LAIT / GUAR AVANT ET APRES GELIFICATION	85
I.1. PROPRIETES DES MELANGES LAIT / GUAR AVANT GELIFICATION	85
I.1.1. Propriétés des mélanges lait / guar avant séparation de phases.....	85
I.1.2. Suivi de la séparation de phases des mélanges lait / guar	89
I.1.3. Propriétés des mélanges lait / guar à l'équilibre.....	94
I.2. PROPRIETES DES GELS ACIDES ENRICHIS EN GUAR.....	97
I.2.1. Comportement macroscopique des gels fermes acides avant brassage.....	97
I.2.2. Microstructure des gels acides brassés	99
I.2.3. Propriétés viscoélastiques des gels acides brassés.....	100
II. EFFET DE LA GELIFICATION AU REGARD DE LA CINETIQUE DE SEPARATION DE PHASES	102
II.1. EFFET DE LA CINETIQUE DE GELIFICATION SUR LES PROPRIETES DES GELS ACIDES BRASSES.....	102
II.1.1. Effet de la concentration en GDL sur la cinétique de gélification	102
II.1.2. Effet de la cinétique de gélification sur les propriétés des gels à 0,3% de guar	104
II.1.3. Effet de la cinétique de gélification sur les propriétés des gels à 0-0,5% de guar	108
II.2. EFFET DE LA CINETIQUE DE SEPARATION DE PHASES SUR LES PROPRIETES DES GELS ACIDES BRASSES	116
III. CONCLUSION.....	118
CHAPITRE 4 : MELANGES LAIT / XANTHANE AVANT ET APRES GELIFICATION.....	119
I. EXISTENCE D'INTERACTIONS ASSOCIATIVES ENTRE PROTEINES DE LAIT ET XANTHANE ?	121
II. PROPRIETES DES MELANGES LAIT / XANTHANE AVANT GELIFICATION	139
II.1. MICROSTRUCTURE DES MELANGES LAIT / XANTHANE.....	139
II.2. PROPRIETES RHEOLOGIQUES DES MELANGES LAIT / XANTHANE	140
II.2.1. Propriétés d'écoulement.....	140
II.2.2. Propriétés viscoélastiques	142

III. PROPRIETES DES GELS ACIDES BRASSES ENRICHIS EN XANTHANE	143
III.1. ACIDIFICATION A L' AIDE DE HCL	143
III.2. ACIDIFICATION A L' AIDE DE GDL	147
III.3. MECANISMES DE FORMATION DES STRUCTURES FIBREUSES	162
IV. CONCLUSION.....	163
 CHAPITRE 5 : EFFET DE L'HISTOIRE THERMOMECHANIQUE SUR LES PROPRIETES DES GELS ACIDES ENRICHIS EN POLYSACCHARIDES	 166
I. EFFET DE L'HISTOIRE THERMIQUE.....	166
I.1. EFFET DE LA TEMPERATURE D'ACIDIFICATION	166
I.2. MODIFICATION DE L'HISTOIRE THERMIQUE AVANT GELIFICATION	185
II. EFFET D'UN TRAITEMENT MECANIQUE	191
III. CONCLUSION.....	197
 CHAPITRE 6 : INFLUENCE DE LA MICROSTRUCTURE SUR LA PERCEPTION SENSORIELLE DE YAOURTS BRASSES ENRICHIS EN MICRO-GELS	 198
I. STRATEGIE EXPERIMENTALE	198
II. PROPRIETES SENSORIELLES.....	200
III. CARACTERISATION INSTRUMENTALE	203
IV. RELATION ENTRE DONNEES SENSORIELLES ET INSTRUMENTALES	206
V. RELATION ENTRE LES PARAMETRES DE STRUCTURE ET LES DONNEES SENSORIELLES	208
VI. CONCLUSION.....	211
 CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	 213
I. DISCUSSION GENERALE	213
II. CONCLUSION GENERALE	221
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 227

Avant-propos

Ce travail de recherche a été réalisé dans le cadre du projet FUI « SATIAROME » (2010-2014) coordonné par SENOBLE. Il a bénéficié d'une convention CIFRE portée par SENOBLE et a été mené au sein de l'UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments AgroParisTech / INRA / CNAM (GENIAL) dans l'équipe « Structuration des Produits par le Procédé » (SP2) sous la direction scientifique du Professeur Camille Michon.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

- **Publications dans des revues internationales à comité de lecture**

Rohart A. and Michon C. (2014). Designing microstructure into xanthan gum-enriched acid milk gels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. doi: 10.1016/j.ifset.2014.01.002. Sous presse.

Rohart A., Moulin G. and Michon C. (2014). Interplay between phase separation and gel formation in stirred acid milk/guar gum gels: effect of acidification rate. *Biopolymers*. 101(9), pp. 966–974. doi: 10.1002/bip.22484.

Rohart A., Jouan-Rimbaud Bouveresse D., Rutledge D.N. and Michon C. (2014). Spectrophotometric analysis of polysaccharide / milk protein interactions with methylene blue using Independent Components Analysis. *Food Hydrocolloids*. Soumis.

Rohart A., Sieffermann J.M. and Michon C. (2014). Effect of micro-gel shape and concentration on sensory perception of micro-gels-enriched stirred yoghurts. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Soumis.

- **Publications dans des actes de conférences**

Rohart A. and Michon C. (2013). Designing microstructure into acid skim milk/guar gum gels. *InsideFood Symposium*. Leuven, Belgium, 6 pages. www.insidefood.eu.

Rohart A. and Michon C. (2014). Phase separation and gel formation in kinetically trapped guar gum/acid milk gels. In: *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, 17, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips. Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 205-213.

- **Communications orales**

Rohart A. and Michon C. Phase separation and gel formation in kinetically trapped guar gum/acid milk gels. *Gums and Stabilizers for the Food Industry 17*. Wrexham, UK, 26-28 juin 2013.

Rohart A. and Michon C. Designing microstructure into xanthan gum enriched acid milk gels. *FORMULA VII*. Mulhouse, France, 1-4 juillet 2013.

Rohart A. and Michon C. Designing microstructure through kinetical trapping of guar gum / acid milk gels. *Biopolymers 2013*. Nantes, France, 3-5 décembre 2013.

Rohart A. et Michon C. Design de particules de gels laitiers acides en maîtrisant la compétition entre gélification et séparation de phases à l'aide d'un galactomannane. *Workshop « Structuration des gels laitiers mixtes »*. Paris, France, 1^{er} avril 2014.

Jouan-Rimbaud Bouveresse D., Rohart A., Michon C. et Rutledge D.N. Intérêt de l'analyse en composantes indépendantes pour l'étude des interactions polysaccharides / protéines de lait. *Workshop « Structuration des gels laitiers mixtes »*. Paris, France, 1^{er} avril 2014.

Rohart A. et Michon C. Effet de la taille et de la forme de micro-gels laitiers sur la perception sensorielle du granuleux en bouche. *Workshop « Structuration des gels laitiers mixtes »*. Paris, France, 1^{er} avril 2014.

- **Posters**

Rohart A. et Michon C. Utilisation de mesures rhéologiques comme outil de sélection de formules de yaourts brassés. *Journées des Jeunes Rhéologues*. Saint-Rémy-lès-Chevreuse, France, 21-23 mars 2012.

Rohart A. and Michon C. Designing microstructure into guar gum enriched acid milk gels. *InsideFood Symposium*. Leuven, Belgium, 9-12 avril 2013.

Rohart A. and Michon C. Designing microstructure into xanthan gum enriched acid milk gels. *DREAM International Conference "From Model Foods to Food Models"*. Nantes, France, 24-26 juin 2013.

Rohart A. and Michon C. Effect of the microstructure design on sensory perception of micro-gels-enriched stirred yoghurts. *15th Food Colloids Conference*. Karlsruhe, Germany, 13-16 avril 2014.

Introduction

La consommation de produits laitiers frais, et particulièrement des laits fermentés, représente une part de marché en constante augmentation en France et dans le monde. Dans cette filière très dynamique, le haut degré de concurrence conduit les industriels à de constants renouvellements et optimisations des formules nécessitant bien souvent une connaissance approfondie de ces systèmes. A l'exemple du secteur des yaourts sans matière grasse, la formulation de produits présentant des propriétés organoleptiques séduisantes pour les consommateurs reste un défi pour les industriels. Afin de développer des textures mieux adaptées ou de prévenir certains défauts de qualité, il est d'usage d'intégrer des agents épaississants et gélifiants au sein des produits laitiers. A l'exception de la gélatine, tous ces additifs alimentaires sont des polysaccharides : galactomannanes, carraghénanes, xanthane, pectines, amidons...

Présentes dans la majorité des aliments, les protéines peuvent participer de manière directe à la structuration des produits, aboutissant dans le cas des yaourts à un réseau gélifié qui se forme suite à la précipitation des micelles de caséines par acidification. Dans certaines formulations, la mise en place de la structure requiert également l'utilisation de polysaccharides qui sont alors en mélange avec les protéines de lait. Néanmoins, la thermodynamique des solutions de polymères prévoit que ces mélanges sont incompatibles, ce qui conduit généralement à une séparation de phases, la miscibilité étant l'exception. Dans cette situation, deux possibilités s'offrent alors au formulateur : maîtriser l'évolution de la texture et la stabilité du produit pendant son temps de conservation avant consommation, ou exploiter cette immiscibilité, entre autres, pour créer des nouvelles textures. C'est vers ce second axe de développement que ce travail de recherche s'est orienté.

L'objectif de cette étude a été de contribuer à une meilleure compréhension de la structuration des systèmes mixtes brassés protéines de lait / polysaccharides subissant à la fois une séparation de phases et une gélification. Dans ce but, il s'agissait d'identifier les paramètres de composition et de procédé déterminant la morphologie des micro-gels aux propriétés rhéologiques et sensorielles originales.

Pour répondre à cet objectif, la stratégie mise en œuvre a consisté, dans un premier temps, à étudier de manière détaillée les propriétés microstructurales et rhéologiques de deux mélanges lait / polysaccharides en milieux neutres et acidifiés. Le premier système intégrant un polysaccharide neutre, le guar, peut être considéré comme un modèle ségrégatif. En revanche, le second mélange composé de xanthane chargé négativement a été utilisé entre autres comme élément de comparaison,

afin d'étudier l'effet de l'encombrement stérique et d'éventuelles interactions associatives. Ces deux mélanges ont en commun la présence de protéines de lait, en quantité légèrement supérieure à celle d'un lait classique afin de pallier l'absence de matière grasse tout en se rapprochant d'un système réel tel qu'un yaourt brassé maigre. Au sein de l'ensemble des mélanges, l'acidification a été menée par un ajout de glucono- δ -lactone ou ponctuellement par l'action de ferments et le brassage réalisé de manière standardisée. Dans un second temps, une modification des histoires thermiques et mécaniques des mélanges lait / guar a permis d'élargir les conditions explorées dans ce travail. Tout au long de cette étude, l'originalité de la démarche adoptée a consisté à prendre en compte l'aspect cinétique des phénomènes.

Le manuscrit est composé de sept chapitres.

La synthèse bibliographique, objet du premier chapitre, décrit l'état des connaissances sur le sujet. Après un rappel des mécanismes qui permettent la mise en place d'un réseau gélifié à partir de micelles de caséines, les phénomènes de séparation de phases dans les mélanges mixtes sont détaillés à l'aide d'exemples de divers polysaccharides neutres et chargés. Ensuite, l'accent est mis sur le phénomène de compétition entre séparation de phases et gélification.

Le deuxième chapitre est consacré aux matériels et méthodes utilisés lors de cette étude.

Les quatre chapitres suivants présentent les résultats obtenus comprenant certaines parties sous la forme de publications soumises dans des revues à comité de lecture. Les chapitres 3 et 4 concernent respectivement l'étude des mélanges lait / guar et lait / xanthane avant et après gélification sur la base d'une analyse des propriétés macroscopiques, microstructurales et rhéologiques. Le chapitre 5 s'attache plus particulièrement à identifier les facteurs clés de la microstructure des gels brassés par une modification de l'histoire thermomécanique subie par les mélanges avant et après leur gélification. De manière complémentaire, une étude sensorielle est proposée dans le chapitre 6 afin d'appréhender l'impact de la morphologie des micro-gels sur les textures sensorielle et instrumentale des produits.

Pour conclure, le chapitre 7 vise à répondre à la question d'une généralisation des phénomènes aboutissant à différents types de morphologies de micro-gels et enfin à proposer un schéma général d'interprétation faisant appel à un effet de compétition entre les processus de gélification et de séparation de phases.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

I. FORMATION DES GELS LAITIERS ACIDES

I.1. Le lait

I.1.1. Composition et principales caractéristiques

D'un point de vue physico-chimique, le lait est une suspension colloïdale dans laquelle deux types de particules sont dispersés : les globules de matière grasse et les micelles de caséines. La phase dispersante, composée essentiellement de sels minéraux, de lactose, de protéines sériques et de vitamines hydrosolubles, constitue le lactosérum (Figure 1). Les caractéristiques de la matière grasse ne seront pas détaillées puisque du lait écrémé a été utilisé dans cette étude. Le pH du lait est d'environ 6,7 à 20°C et la force ionique d'environ 0,1 M.

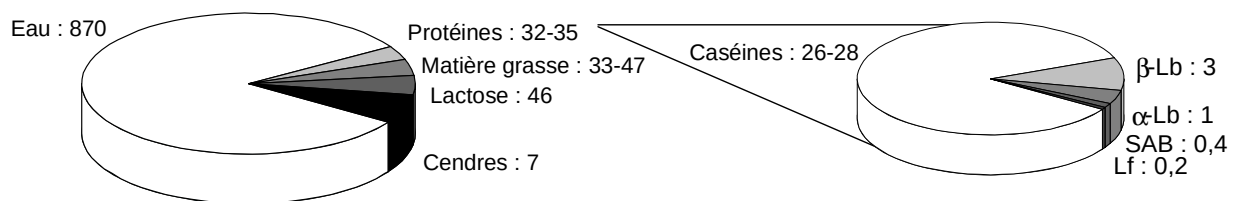


Figure 1 : Composition moyenne du lait de vache (g.L⁻¹) avec le détail de sa composition en protéines (g.L⁻¹) (β-Lb : β-lactoglobuline, α-Lb : α-lactalbumine, SAB : albumine de sérum bovin, Lf : lactoferrine) (d'après Cayot & Lorient, 1998 ; Johnson, 1978 ; Swaisgood, 1982 ; Ribadeau Dumas & Grappin, 1989)

I.1.2. Composition protéique

Les protéines du lait sont subdivisées en deux grandes catégories :

- les caséines, regroupées sous la forme de micelles de caséines, un ensemble supramoléculaire comprenant ces différents types de protéines ;
- les protéines sériques, qui ne précipitent pas à pH 4,6 lors d'une acidification du lait ou après ajout de chymosine.

I.1.2.1. Caséines et micelles de caséines

I.1.2.1.1. Caractéristiques physico-chimiques et composition

Les caséines constituent environ 80% des protéines du lait, avec quatre fractions principales : les caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ selon un rapport massique moyen de 3 / 0,8 / 3 / 1. Leur concentration

dans le lait écrémé est donnée sur la Figure 1. Ces fractions de caséines sont associées à des minéraux, en particulier sous forme de phosphate de calcium.

Bien qu'à des degrés différents, toutes les caséines contiennent du phosphore intégré aux chaînes peptidiques sous forme de groupements phosphoséryl ainsi qu'une proportion importante de groupements hydrophobes. Elles se distinguent par leur nombre de groupements phosphorylés, par leur caractère hydrophobe ou encore par la présence ou non de résidus cystéine et de groupements glycosylés (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes fractions de caséines (d'après Walstra & Jenness, 1984)

	α_{s1}	α_{s2}	β	κ
Résidus acides aminés	199	207	209	169
Résidus cystéine	0	2	0	2
Groupements phosphorylés (nombre par mole)	8-9	10-13	5	1-2
Groupements hydrophobes (nombre par mole)	88	69	111	88
Groupements glycosylés (nombre par mole)	0	0	0	0 à 5
Charge à pH 6,6	-20,9	-14,8	-12,3	-3
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-

Par ailleurs, la répartition des charges et des groupements hydrophobes le long des chaînes peptidiques des différentes fractions n'est pas uniforme (Figure 2). De ce point de vue, la caséine κ présente un caractère amphiphile particulièrement marqué avec une partie C-terminale très hydrophile et une partie N-terminale hydrophobe. D'autre part, la fraction κ possède une région étendue d'acides aminés (entre les résidus 20 et 115) qui, à l'exception d'un seul, sont exclusivement chargés positivement. Cet excès de charge positive demeure même à des pH alcalins (Snoeren et al., 1975).

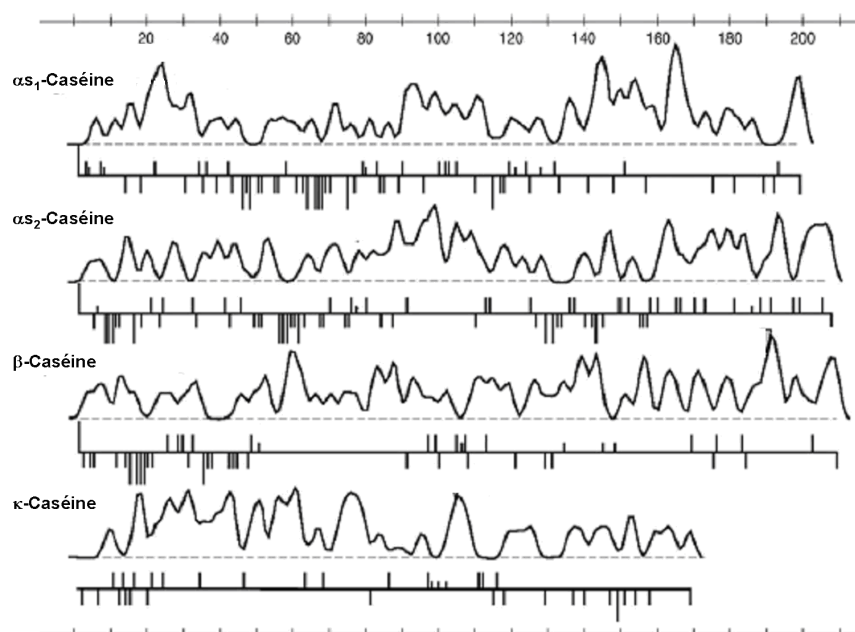


Figure 2 : Répartition des charges et des zones hydrophiles et hydrophobes le long des molécules de caséines. Les courbes continues représentent la distribution lissée de l'hydrophobicité des acides aminés individuels et les barres verticales indiquent les charges distinctes de chaque acide aminé (d'après Fuquay et al., 2011)

Dans le lait, environ 95% des caséines sont structurées en un édifice supramoléculaire sphérique et volumineux, la micelle, dont la taille varie de 20 à 600 nm, avec un diamètre moyen voisin de 180 nm (Cayot & Lorient, 1998). Outre les caséines, les micelles de caséines sont composées d'eau et de minéraux notamment. Le potentiel zêta des micelles de caséines est de l'ordre de -20 mV à pH 6,7 et leur point isoélectrique est d'environ 4,6 (Dalglish, 2011).

1.1.2.1.2. Organisation des micelles de caséines

L'organisation des différentes caséines au sein de la micelle s'explique par leur sensibilité au calcium et le positionnement de leurs groupements hydrophobes. Etant très sensibles à la présence de calcium, les caséines α_{s1} , α_{s2} et β se situent à l'intérieur de la micelle. En revanche, l'insensibilité au calcium de la caséine κ lui permet de se positionner en périphérie et ainsi d'aider à la stabilisation des autres caséines par la formation d'une structure « chevelue » (Holt & Horne, 1996).

Même si à ce jour, la structure micellaire des caséines n'est pas complètement élucidée, de nombreux modèles de micelles de caséines se sont succédé (Figure 3a-d) (le modèle noyau-enveloppe (Payens, 1966), le modèle à structure interne (Ribadeau Dumas & Garnier, 1970), le modèle sub-micellaire (Schmidt, 1982 ; Walstra & Jenness, 1984 ; Ono & Obata, 1989) et le modèle à structure ouverte (Holt & Horne, 1996). Un grand nombre d'interactions contribue au maintien de l'édifice

micellaire. Néanmoins, le phosphate de calcium joue un rôle déterminant dans la formation de la micelle, c'est sur ce point que varient les hypothèses.

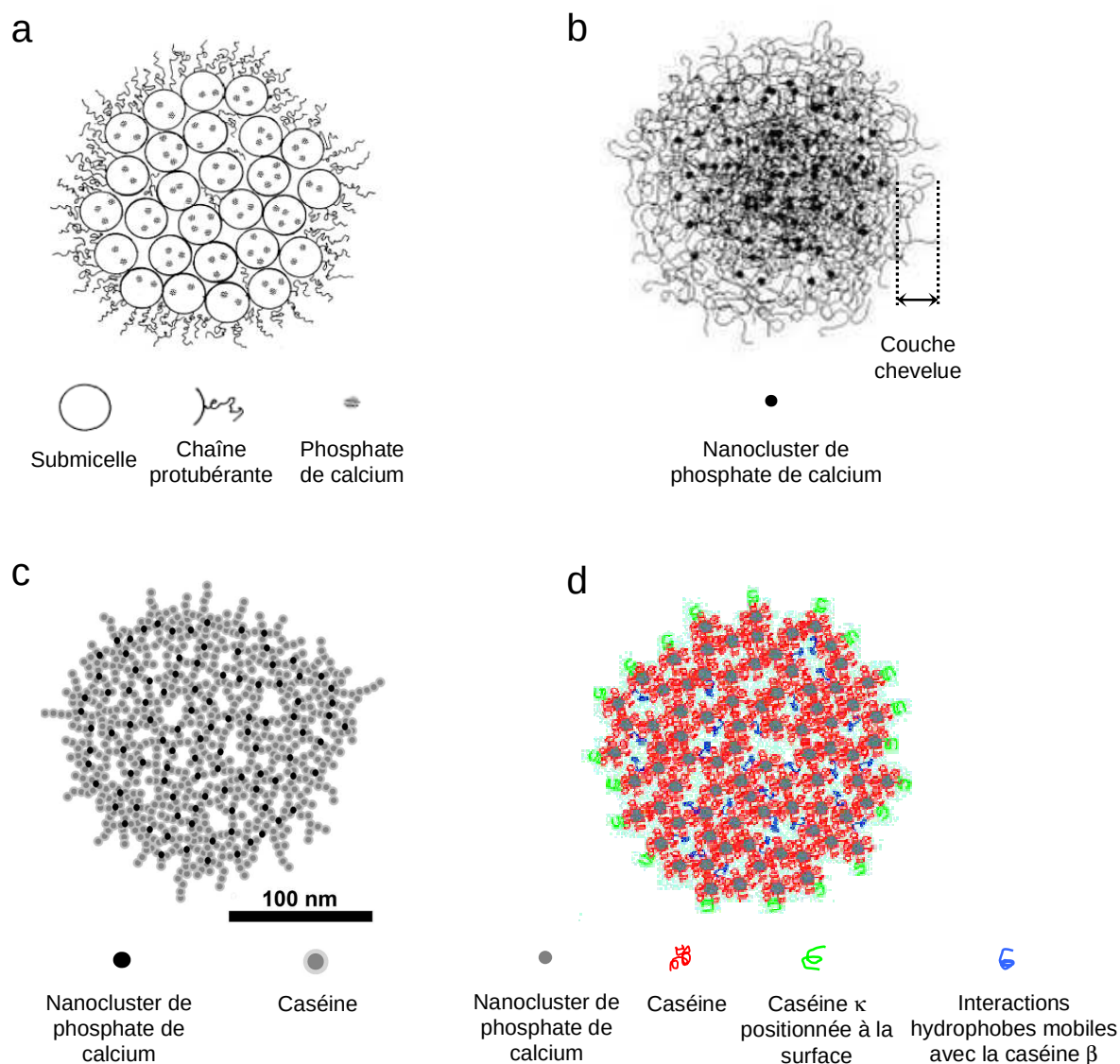


Figure 3 : Modèles de la micelle de caséines (a) submicellaire (d'après Walstra, 1999) (b) à structure ouverte (d'après Holt & Horne, 1996), modèles proposés par (c) McMahon & Oommen (2008) et par (d) Dalgleish (2011)

Le modèle submicellaire est basé sur l'idée que les caséines forment un ensemble de submicelles maintenues notamment par des ponts phosphocalciques (Schmidt, 1982 ; Walstra, 1999) (Figure 3a). Néanmoins, une étude de diffraction de neutrons (Holt et al., 2003) a remis en question la structure submicellaire de la micelle de caséines. Ainsi, la micelle de caséines serait un assemblage protéique poreux et sa croissance se ferait autour de granules de phosphate de calcium (Holt & Horne, 1996) (Figure 3b).

Plus récemment, McMahon & Oommen (2008) ont proposé un modèle dans lequel des agrégats de caséines ainsi que des agrégats de caséines/phosphate de calcium contribueraient à l'intégrité micellaire (Figure 3c). Les caséines formeraient des chaînes linéaires et branchées de 2 à 5 unités protéiques imbriquées dans les nanoclusters de phosphate de calcium via des interactions hydrophobes, électrostatiques et des ponts phosphocalciques. La combinaison d'une structure en réseau imbriqué et des multiples interactions mises en jeu résulterait en une supramolécule colloïdale ouverte, en éponge.

Dalgleish (2011) a repris ce modèle et défini également l'intérieur de la micelle de caséines comme un système bicontinu de canaux d'eau et d'agrégats de caséines/phosphate de calcium (Figure 3d). Ces agrégats de caséines α_s /phosphate de calcium seraient stabilisés au sein de la micelle de caséines par des interactions avec la caséine β , hautement amphiphile et mobile. Cette structure ouverte contribuerait à l'hydratation de la micelle de caséines.

Les différents modèles proposés s'accordent toutefois sur la localisation de la caséine κ en périphérie de la micelle et son rôle clé dans la stabilisation des micelles de caséines. Bien que la structure réelle de la micelle de caséines reste complexe, les modèles les plus récents contribuent à décrire de plus en plus fidèlement cet édifice supramoléculaire et ainsi à expliquer la réactivité des micelles de caséines entre elles mais également vis-à-vis des autres macromolécules des milieux dans lesquels elles sont mises en œuvre.

1.1.2.1.3. Stabilité des micelles de caséines

La stabilité des micelles de caséines résulte d'un équilibre entre les forces répulsives, de nature électrostatique ou stérique, et les forces attractives dues aux interactions hydrophobes, électrostatiques ou de Van der Waals. Dans le lait, différents aspects confèrent à la micelle de caséines une stabilité remarquable :

- sa charge nette négative due à la localisation en surface de la partie hydrophile de la caséine κ . Elle crée des répulsions électrostatiques entre les micelles de caséines ;
- les répulsions stériques dues aux excroissances de caséine κ très hydrophiles s'étendant à partir de la surface de la micelle, sur une épaisseur de 6 à 12 nm ;
- le haut degré d'hydratation des micelles, entre 3 et 4 kg d'eau pour 1 kg de protéines (Dalgleish, 2011), qui forme une couche protectrice vis-à-vis des autres particules en suspension.

Les micelles de caséines peuvent devenir un édifice instable en fonction des conditions du milieu, ce qui peut mener à leur agrégation. Cette instabilité vis-à-vis de l'agrégation dépend à la fois de l'environnement (force ionique, pH) et de la composition micellaire (caséines, phosphate et calcium). Par ailleurs, l'action d'enzymes protéolytiques, telles que la présure, ou encore le traitement thermique modifient la réactivité des micelles vis-à-vis de leur agrégation. L'effet de la diminution du pH sur la structure et la stabilité des micelles de caséines sera détaillé dans le paragraphe I.2 de ce chapitre.

I.1.2.2. Protéines sériques

Les protéines sériques, ou protéines du lactosérum, sont définies comme l'ensemble des protéines ne coagulant pas à pH 4,6 à 20°C. Elles sont composées à 90% de β -lactoglobuline, d' α -lactalbumine, d'albumine de sérum bovin et d'immunoglobulines. D'un point de vue fonctionnel et quantitatif, les deux protéines principales sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine, qui représentent respectivement environ 50% et 20% des protéines du lactosérum (Cayot & Lorient, 1998). A la différence des caséines, les protéines sériques sont des protéines globulaires possédant une conformation tridimensionnelle très organisée, ce qui les rend thermosensibles. La sensibilité au traitement thermique des protéines sériques sera discutée dans le paragraphe I.3.1 de ce chapitre.

I.2. Le processus de gélification acide : du lait au gel

La transformation du lait en gel résulte en la mise en place d'une structure complexe et d'un changement important des propriétés rhéologiques du système : le produit passe d'un état liquide Newtonien à un état de gel viscoélastique dont la déstructuration est irréversible. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour obtenir un gel laitier : l'emprésurage, lors duquel la partie C-terminale de la caséine κ est coupée par la chymosine (principe de la fabrication des fromages) et l'acidification (principe de la fabrication des yaourts). Seuls les mécanismes de l'acidification seront détaillés.

Lors de la baisse du pH, les micelles de caséines subissent des changements importants. De nombreux modèles de mécanismes de gélification acide du lait ont été proposés (Heertje et al., 1985 ; Banon & Hardy, 1991 ; Gastaldi, 1994 ; Herbert et al., 1999 ; Famelart et al., 2004). Dans tous ces modèles, la mise en place du réseau gélifié implique des mécanismes de dissociation et d'association au sein et entre les micelles de caséines. Plus récemment, McMahon et al. (2009) ont proposé un modèle de gélification acide du lait en trois phases en utilisant la microscopie électronique (Figure 4).

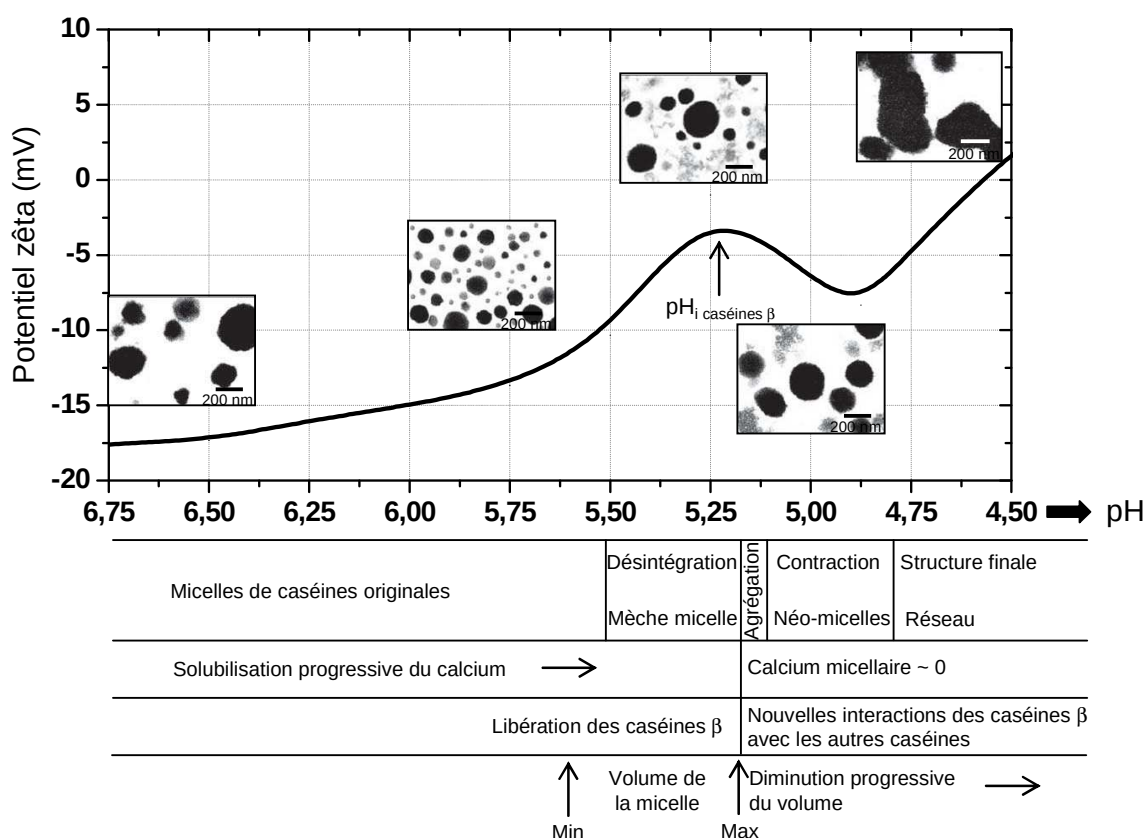


Figure 4 : Potentiel zêta mesuré lors de l'acidification de micelles de caséines dans le lait écrémé et proposition d'interprétation des événements ayant lieu lors de la formation de la structure (d'après Walstra & Jenness, 1984 ; Heertje et al., 1985). Les schémas sont issus d'observations obtenues en microscopie électronique d'un lait acidifié à l'aide de GDL à 40°C. Les micelles de caséines natives sont représentées en noir et les agrégats de protéines enchevêtrées de manière lâche en gris (d'après McMahon et al., 2009)

La première phase, entre un pH de 6,7 et 5,3, implique la dissociation des caséines de la micelle (Dalgleish & Law, 1988). Lorsque le pH diminue, cette dissociation entraîne la libération de caséines, formant ainsi des agrégats de protéines enchevêtrées de manière lâche et de taille aussi grande que les micelles de caséines natives. A pH 5,70, une diminution de la taille des micelles de caséines a lieu (30 à 50 nm).

La deuxième phase a lieu entre un pH de 5,3 et 4,9. Celle-ci implique la réassociation des protéines avec les micelles de caséines libres ou avec les agrégats de protéines enchevêtrées, formant ainsi des particules colloïdales plus compactes et de grande taille (200 à 300 nm).

Enfin, à pH 5,2, la micelle de caséines perd son intégrité et les protéines dissociées forment des agrégats denses. Le réseau gélifié résultant intègre des chaînes de particules compactes. Par ailleurs, le réarrangement des particules conduit à une contraction du gel à un pH inférieur à 4,8 (Heertje et al., 1985).

Les mécanismes physico-chimiques à l'origine de la modification de la structure micellaire lors de l'acidification peuvent être expliqués par le suivi de différents paramètres.

L'acidification du lait s'accompagne d'une importante solubilisation des minéraux colloïdaux (Lucey et al., 1996). Lorsque le pH atteint 5, la solubilisation du calcium micellaire est totale (Heertje et al., 1985). Puisque le phosphate de calcium micellaire permet d'assurer en partie l'intégrité de la structure micellaire, sa solubilisation résulte en une dissociation de certaines molécules de caséines. La caséine β , qui possède peu de résidus de phosphosérine, est la première à fuir la micelle. Cependant, les particules résiduelles formées par un enchevêtrement des caséines α_s gardent la forme et la taille des micelles de caséines natives (Cayot & Lorient, 1998).

Le suivi du potentiel zêta en fonction du pH permet d'expliquer les interactions électrostatiques ayant lieu lors de l'acidification. De manière générale, le potentiel zêta augmente à mesure que le pH diminue, en passant d'environ -18 mV à 0 mV au point isoélectrique de la micelle de caséines, principalement en raison de la protonation des groupes carboxyliques. Cependant, cette chute n'est pas linéaire : un minimum et un maximum local sont atteints à respectivement pH 5,2 et 4,9 (Figure 4). Le minimum de potentiel zêta observé autour de pH 5,2 serait lié à la réintégration dans la structure micellaire de la caséine β dont le pH_i se situe à environ pH 5,2 (Heertje et al., 1985). En s'associant à la micelle de caséines encore chargée négativement, la caséine β augmenterait ponctuellement la charge nette de la micelle, sans toutefois en modifier son volume.

La transition sol-gel fait intervenir des interactions intermoléculaires de nature hydrophobe et électrostatique (Horne, 1999). D'une part, les interactions hydrophobes aident à maintenir l'intégrité micellaire malgré la solubilisation du phosphate de calcium. D'autre part, à l'approche du pH_i de la micelle de caséines, la neutralisation des charges s'accompagne d'une diminution des répulsions électrostatiques entre les groupements protéiques de la micelle de caséines. La protonation des groupes carboxyliques des acides aminés diminue la capacité de stabilisation de la micelle par effet stérique lié au positionnement de la caséine κ à l'extérieur de la micelle. Ainsi, les répulsions électrostatiques et stériques assurées par la couche chevelue de la caséine κ s'atténuent considérablement à mesure que le pH décroît.

Tableau 2 : Phénomènes de désagrégation et d'agrégation et modifications physico-chimiques conduisant à la coagulation des micelles (d'après Fox & McSweeney, 2003 ; Tamine, 2009)

Désagrégation	↔	Agrégation
pH > 5,3		pH < 5,3
Solubilisation du phosphate de calcium colloïdal		↗ Force ionique du sérum ↘ Répulsions électrostatiques et stériques ↗ Interactions hydrophobes
Dissociation des caséines de la micelle		Réabsorption des caséines de la micelle à leur pH_i
↗ Hydratation de la micelle ↗ Volume de la micelle (gonflement)		↘ Hydratation de la micelle ↘ Volume de la micelle (rétrécissement)

Finalement, l'acidification du lait est accompagnée d'un ensemble de changements physico-chimiques, qui se distinguent en deux phénomènes opposés (Tableau 2) : une tendance à la désagrégation à un pH supérieur à 5,3, et à l'inverse, une tendance à l'agrégation à un pH inférieur à 5,3, qui mène à une structure gélifiée.

I.3. Facteurs influençant les propriétés des gels acides brassés

I.3.1. Traitement thermique

I.3.1.1. Dénaturation des protéines sériques et formation des complexes

L'utilisation d'un traitement thermique du lait conduit à l'obtention d'un gel acide aux propriétés très différentes d'un gel obtenu à partir d'un lait non chauffé. Le chauffage préalable du lait à des températures supérieures à 60°C provoque une dénaturation irréversible des protéines sériques, en particulier de la β -lactoglobuline et de l' α -lactalbumine. En perdant leur structure secondaire et tertiaire, elles se déploient et interagissent par l'intermédiaire de ponts disulfures et d'interactions hydrophobes pour former des complexes thermo-induits.

Dans le lait, ces complexes sont présents sous la forme de complexes thermo-induits solubles et sous la forme de complexes ou agrégats micellaires, situés en surface de la micelle de caséines. D'une part, la formation des complexes solubles implique les interactions de la β -lactoglobuline avec les résidus cystéine d'autres molécules de β -lactoglobuline et/ou α -lactalbumine. D'autre part, les interactions de la β -lactoglobuline avec la caséine κ , située au niveau de la couche chevelue de la micelle de caséines, conduisent au recouvrement des micelles par les macromolécules de β -lactoglobuline (Donato & Guyomarc'h, 2009 ; Morand et al., 2011). Des quantités importantes d' α -lactalbumine et de protéines sériques mineures peuvent également interagir avec les micelles de caséines (Corredig & Dalgleish, 1996). Dans ce cas, la fixation de l' α -lactalbumine à la surface des

micelles de caséines en supplément de la β -lactoglobuline diminue l'aptitude du lait à la gélification par acidification (Mottar et al., 1989 ; Cayot & Lorient, 1998).

Le pH du lait avant traitement thermique oriente la répartition entre complexes solubles de protéines sériques et complexes protéines sériques-micelles (Anema et al., 2004 ; Anema & Li, 2003 ; Anema & Klostermeyer, 1997 ; Corredig & Dalgleish, 1996 ; Vasbinder & de Kruif, 2003 ; Vasbinder et al., 2003). Ainsi, lorsque le traitement thermique est effectué à pH 6,5, la plupart des protéines sériques s'associe aux micelles de caséines, alors que s'il est réalisé à un pH plus élevé, la proportion de protéines sériques solubles augmente et les caséines κ se dissocient progressivement de la micelle de caséines (Vasbinder & de Kruif, 2003).

Le traitement thermique du lait conduit à la formation d'un mélange complexe de protéines sériques natives et dénaturées présentes sous la forme d'agrégats solubles et d'agrégats micellaires. L'intensité de la dénaturation des protéines sériques est fonction de la température et du temps de traitement thermique, mais aussi de la composition et du pH du système. A titre d'exemple, dans le cas de traitements thermiques à 85°C pendant 30 min et à 90°C pendant 2 min, le taux de dénaturation des protéines sériques est respectivement de 76,5% et 55% (Hui & Sherkat, 2006).

I.3.1.2. Effet du traitement thermique sur la micelle de caséines

Il est généralement admis que les caséines, considérées dans leur état monomérique, sont moins sensibles à la dénaturation que les protéines sériques (Cayot & Lorient, 1998). Toutefois des modifications notables interviennent également sur la structure micellaire lors d'un chauffage, notamment en raison de l'interaction de protéines sériques dénaturées sur la micelle (Figure 5).

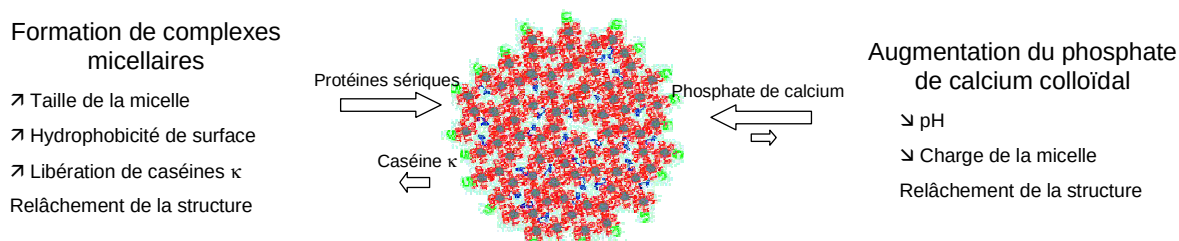


Figure 5 : Modifications micellaires provoquées par un traitement thermique supérieur à 90°C (schéma de la micelle d'après Dalgleish, 2011)

Lorsqu'un traitement thermique de 90°C est appliqué, Anema & Li (2003) ont montré que la formation de complexes micellaires conduit à une augmentation de la taille des micelles de caséines d'environ 30 à 35 nm. Cette augmentation s'expliquerait par l'association des protéines sériques, en

particulier de la β -lactoglobuline, sur la surface des micelles de caséines plutôt que par la formation de complexes de protéines sériques solubles.

Malgré la nature poreuse de la micelle de caséines (Holt & Horne, 1996 ; Dalglish, 2011), seule une faible fraction des caséines semble mobile, mais en présence de protéines sériques et à température élevée, un relâchement de la structure de la micelle est mis en évidence (Cayot & Lorient, 1998).

Par ailleurs, la surface de la micelle de caséines subit des transformations importantes en raison de l'association des protéines sériques avec la caséine κ . D'une part, la formation de protubérances contribue à une augmentation des irrégularités et de l'hydrophobicité de la surface (Dalglish et al., 2004). D'autre part, la couche « chevelue » créée par les caséines κ tend à diminuer. En effet, à des pH supérieurs à 6,5, l'association entre les caséines κ et les molécules de β -lactoglobuline implique une redistribution des ponts disulfures, ce qui revient à dépolymériser la caséine κ . Les chaînes de caséines κ associées à celles de la β -lactoglobuline pourraient finalement être arrachées de la surface de la micelle. En revanche, pour des pH inférieurs à 6,5, l'agrégation probable de β -lactoglobuline en surface de micelle limiterait la perte de caséines κ (Cayot & Lorient, 1998).

Outre les modifications des protéines, les équilibres minéraux sont fortement perturbés, notamment pour des températures de traitement thermique supérieures à 90°C (Gaucheron et al., 2004 ; Tamine & Robinson, 2007). Ainsi, le traitement thermique peut donner lieu à un transfert du phosphate de calcium de la phase soluble vers la phase micellaire ainsi qu'à une « précipitation » de phosphate de calcium. Jusqu'à 35% de la quantité totale de phosphate de calcium pourraient être ainsi « échangeables » (Cayot & Lorient, 1998). Une des conséquences de ces altérations d'équilibres minéraux est la diminution du pH du lait consécutive à la transformation des sels phosphocalciques et à une dégradation du lactose en produits acides. La réduction de la charge des micelles est également accentuée par ces changements physico-chimiques (Gaucheron et al., 2004).

I.3.1.3. Effet du traitement thermique sur les propriétés des gels acides

Le traitement thermique du lait conduit à des modifications physico-chimiques lors de l'acidification. Un décalage du pH de gélification de 4,6 (point isoélectrique des caséines) à 5,3 (point isoélectrique des β -lactoglobulines) est mis en évidence lors de l'application d'un traitement thermique du lait (Lucey et al., 1998 ; Heertje et al., 1985 ; Vasbinder et al., 2003).

Ce comportement est une conséquence de l'incorporation des protéines sériques dénaturées à la structure du gel acide. En effet, dans le lait non chauffé, les protéines sériques natives restent solubles et n'interviennent pas dans le processus de gélification. En revanche, dans un lait traité thermiquement, elles sont dénaturées et insolubles à leur point isoélectrique. Les complexes de protéines sériques de caséines κ solubles ou micellaires participent alors à la formation du réseau protéique (Figure 6).

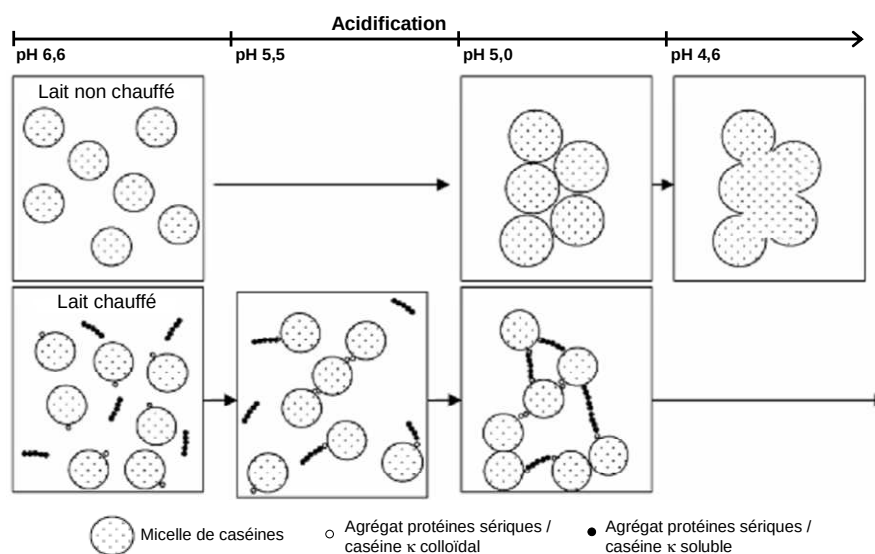


Figure 6 : Schématisation de l'effet du traitement thermique du lait sur la microstructure des gels acides (d'après Famelart et al., 2004)

L'association des protéines sériques dénaturées avec les micelles de caséines contribue à augmenter le nombre et la force des liaisons entre protéines (Lucey et al., 1998). Cette augmentation du nombre de points de contacts entre micelles de caséines conduit alors à une fermeté du gel plus élevée et à une diminution de l'expulsion de lactosérum (Figure 7) (Lucey et al., 1999 ; Xu et al., 2008). L'épaulement à 5000 s (Figure 7), correspondant à un pH proche de 5, est attribué à la déstructuration de la micelle de caséines suite à la dissociation du phosphate de calcium (Donato & Guyomarc'h, 2009).

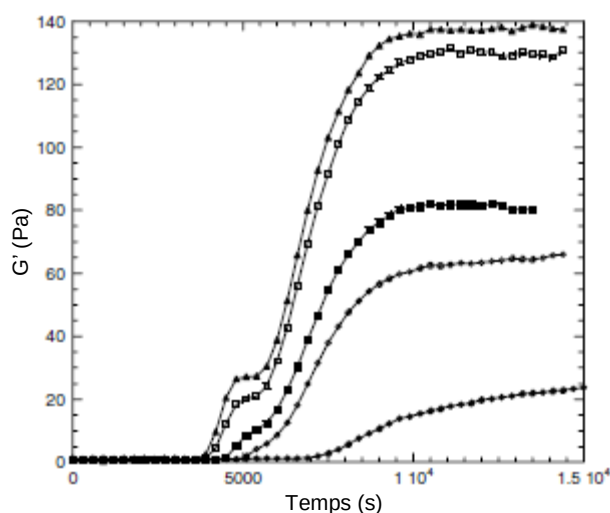


Figure 7 : Module élastique (G') en fonction du temps pour des gels laitiers fermentés à 45°C à base de lait écrémé non traité thermiquement (●), traité thermiquement à (○) 80°C, (■) 85°C, (□) 90°C ou (▲) 95°C pendant une minute (d'après Xu et al., 2008)

Les complexes thermo-induits solubles interviennent également de manière importante dans la structuration du gel (Donato & Guyomarc'h, 2009 ; Vasbinder & de Kruif, 2003 ; Anema et al., 2004). Ainsi, en ralentissant les phénomènes d'agrégation des micelles de caséines, une microstructure fine serait favorisée pour les gels à base de lait traité thermiquement, alors que de gros agrégats seraient présents dans les gels obtenus par gélification acide d'un lait non traité thermiquement (Figure 8) (Lucey et al., 1998).

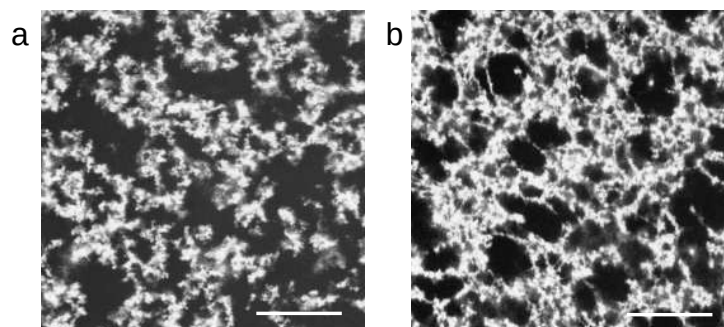


Figure 8 : Images obtenues en microscopie confocale à balayage laser de gels laitiers acidifiés à 30°C à l'aide de 1,3% de GDL à partir de lait (a) non traité thermiquement et (b) traité thermiquement à 80°C pendant 30 min. La barre représente 20 µm (d'après Lucey et al., 1999)

I.3.2. Méthode d'acidification

Seule une cinétique d'acidification lente associée à une absence d'agitation lors de la transition sol-gel permet d'obtenir un gel ferme et cohésif. En effet, dans le cas d'une dissociation brutale des caséines de la micelle, l'effondrement de la structure empêche la mise en place d'un réseau gélifié.

De nombreuses études scientifiques ont été réalisées en utilisant une acidification chimique, au moyen d'acide chlorhydrique (HCl), et plus fréquemment de glucono- δ -lactone (GDL). Contrairement à l'HCl, la GDL s'hydrolyse progressivement. De plus, elle présente l'avantage de s'affranchir des variations de l'activité bactérienne lors de l'utilisation de ferments, tout en assurant une acidification du lait (Cayot & Lorient, 1998). En effet, l'utilisation de bactéries lactiques, telles que généralement *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* dans le cas de la fabrication des yaourts, expose à une production d'exopolysaccharides et une activité protéolytique variables (Duboc & Mollet, 2001 ; Ruas-Madiedo et al., 2002 ; Hassan et al., 2003). Néanmoins, Lucey et al. (1998) ont montré des différences rhéologiques et microstructurales entre les gels acides obtenus par hydrolyse de GDL ou par fermentation.

En comparaison avec une acidification par fermentation, les gels obtenus par acidification chimique à l'aide de GDL présentent un temps de gélification plus court (Figure 9) mais un module élastique G' plus élevé (Figure 10). La zone de transition sol-gel, proche du point isoélectrique des micelles de caséines, plus longue pour l'acidification au moyen de GDL, pourrait expliquer en partie la valeur élevée de G' (Figure 9) (Lucey et al., 1998). Il est à noter que les cinétiques d'acidification sont largement influencées par la température, ce qui est vrai aussi bien pour une acidification à l'aide de GDL que lors de l'utilisation de ferments (paragraphe I.3.3 de ce chapitre).

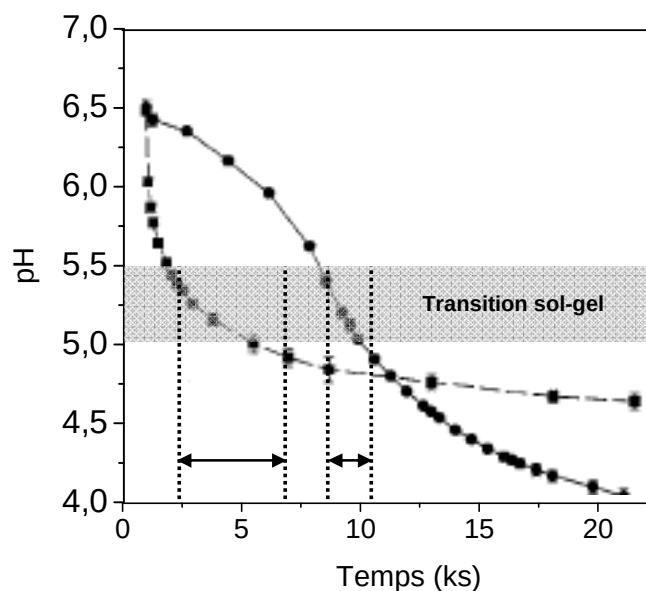


Figure 9 : Suivi du pH lors de l'acidification à 42°C d'un lait acidifié à l'aide de (■) 1,3% de GDL ou (●) 2% de ferments. Le traitement thermique était de 85°C pendant 30 min (d'après Lucey et al., 1998)

La microstructure est également affectée par la méthode d'acidification. Des gels ayant une microstructure plus fine et homogène sont obtenus lors d'une acidification chimique, alors que la fermentation bactérienne génère des gels contenant de plus grands agrégats de particules et des pores de plus grande taille, augmentant ainsi la séparation de lactosérum (Figure 10). L'hétérogénéité des gels obtenus via l'utilisation de bactéries lactiques serait provoquée par un gradient de pH, en raison d'une production d'acide plus importante dans certaines zones confinées de croissance des colonies de bactéries (Laligant et al., 2003 ; Renan et al., 2008).

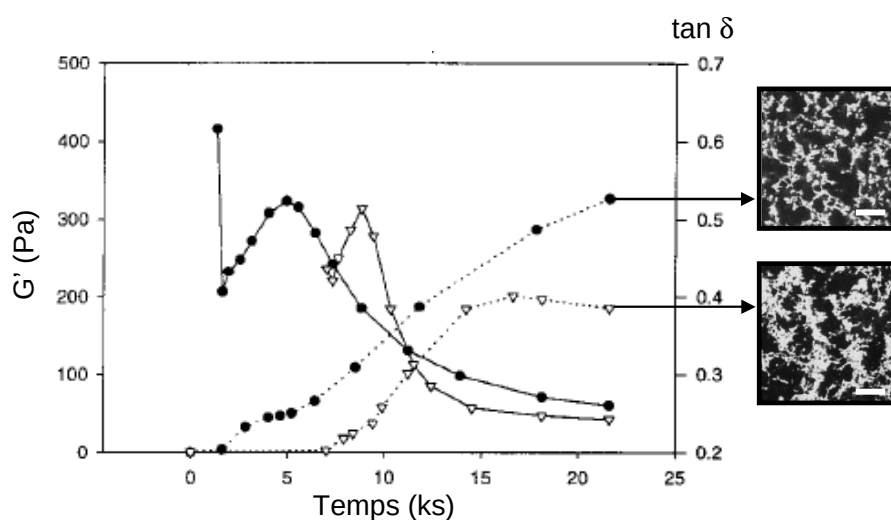


Figure 10 : Module élastique G' (lignes pleines) et $\tan \delta$ (lignes en pointillés) en fonction du temps et images obtenues en microscopie confocale à balayage laser de gels laitiers acidifiés à 30°C pour des gels laitiers acidifiés à 42°C à l'aide de (●) 1,3% de GDL ou (▽) 2% de ferments. Le traitement thermique était de 85°C pendant 30 min. La barre représente 10 μm (d'après Lucey et al., 1998)

I.3.3. Température et vitesse d'acidification

Les cinétiques d'acidification dépendent certes de la méthode d'acidification (Figure 9), mais aussi de la température. Ainsi, l'utilisation de températures d'acidification élevées résulte en une diminution du temps de formation du gel mais en une augmentation du pH de gélification (environ 0,1 unité pH pour une variation de température de 10°C) (Haque et al., 2001). En revanche, l'effet de la température d'acidification sur le module G' varie en fonction de la méthode d'acidification. Alors que Lucey et al. (1998), utilisant la GDL, obtiennent un gel plus faible pour une température d'acidification de 42°C en comparaison avec 30°C, Haque et al. (2001) montrent une augmentation du module élastique G' lorsque la température d'acidification augmente, suite à une acidification à l'aide de ferments. Selon Haque et al. (2001), les interactions hydrophobes, favorisées aux températures d'acidification élevées, seraient la force conductrice de l'agrégation des micelles, et

augmenteraient la force du gel. De plus, ces interactions hydrophobes permettraient au gel de se former à des pH plus élevés, en nécessitant une diminution des répulsions électrostatiques moins importante pour que l'agrégation ait lieu (Haque et al., 2001 ; McMahon et al., 2009 ; Niki et al., 2000).

De manière générale, les résultats de la littérature ne sont pas consensuels quant aux propriétés des gels obtenus aux différentes vitesses d'acidification en considérant la méthode d'acidification utilisée (Jacob et al., 2011 ; Lee & Lucey, 2004 ; Kristo et al., 2003 ; Peng et al., 2009 ; Béal et al., 1999). Cependant, même si le pH de gélification n'est pas modifié par la vitesse d'acidification pour une température d'acidification donnée (McMahon et al., 2009), les variations de vitesse de solubilisation du phosphate de calcium et du temps disponible pour le réarrangement des particules génèrent un réseau de particules de caséines contenant différents niveaux de minéralisation, ce qui pourrait participer à une variation importante de la microstructure des gels.

La température d'acidification a une influence importante sur la microstructure des gels obtenus par acidification chimique et non sur celle des gels fermentaires (Lucey et al., 1998). La perméabilité, la taille des pores et la séparation de lactosérum sont autant de paramètres qui augmentent lorsque la température d'acidification est élevée. La nature compacte mais poreuse du réseau formé aux températures élevées s'explique par la force des interactions hydrophobes, suffisantes pour maintenir les protéines sous forme de particules colloïdales sphériques, ce qui diminue les zones de contact entre protéines. Au contraire, l'agrégation lente des caséines aux faibles températures d'acidification, augmenterait le nombre de jonctions entre les agrégats de caséines et par conséquent, la finesse du réseau (Figure 11) (McMahon et al., 2009 ; Vétier et al., 1997 ; Lee & Lucey, 2004).

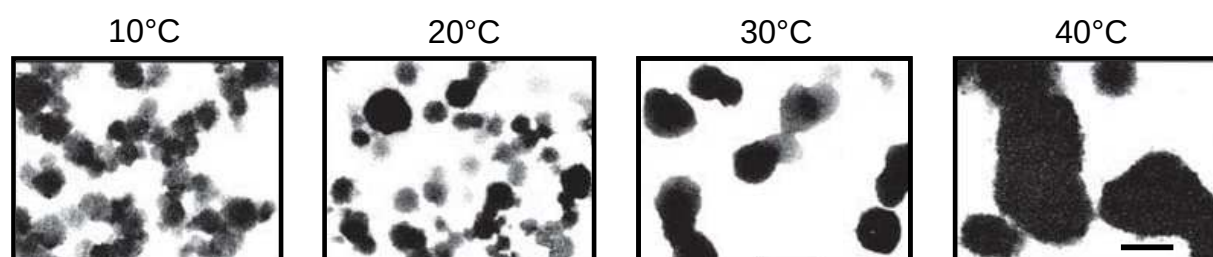


Figure 11 : Schémas issus d'observations en microscopie électronique de gels laitiers à pH 4,8 à base de lait acidifié à l'aide de GDL à différentes températures (de 10°C à 40°C). Les micelles de caséines natives sont représentées en noir et les agrégats de protéines enchevêtrées de manière lâche en gris. La barre représente 200 nm (d'après McMahon et al., 2009)

I.3.4. Traitement mécanique

Le passage du gel ferme au gel brassé aboutit à la formation d'une dispersion concentrée de morceaux de gel dans le sérum. Sous l'effet d'un cisaillement suffisant, le gel ferme se rompt puis les agrégats sont réduits en des fragments de plus en plus petits (Figure 12) (van Marle et al., 1999).

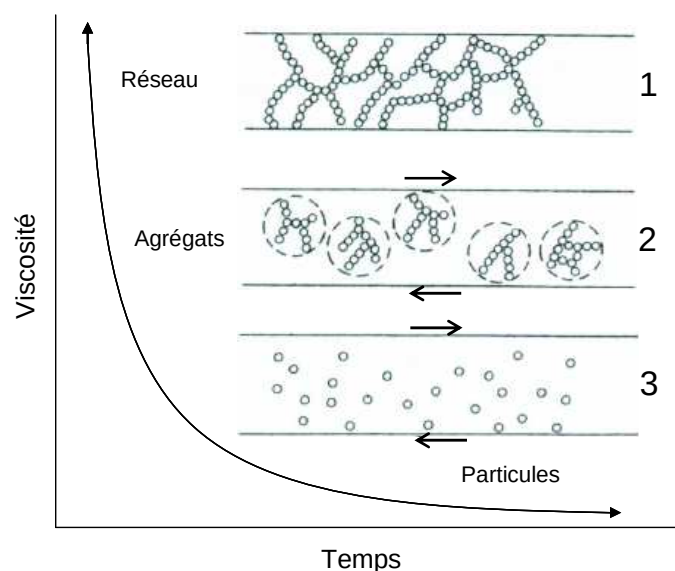


Figure 12 : Représentation schématique de la rupture des agrégats protéiques dans un champ de cisaillement. (1) Occupation de l'espace par le réseau ; (2) Ecoulement des agrégats ; (3) Ecoulement des particules (d'après van Marle et al., 1999)

L'intensité de la déstructuration dépend non seulement du cisaillement appliqué, mais aussi des propriétés du gel ferme initial dont son homogénéité (van Marle, 1998). Ainsi, la structure et les propriétés rhéologiques du gel ferme initial sont conservées au sein des fragments de gel après brassage (Cayot et al., 2003 ; Renan et al., 2009).

La viscosité d'un tel système dépend du volume total occupé par les morceaux de gel (fraction volumique), des propriétés des morceaux de gel (telle que la déformabilité sous écoulement) mais également de leur interaction (Zoon & van Marle, 1998 ; Zoon, 2003). Une restructuration du gel a lieu lors du stockage, ce qui contribue à une thixotropie partielle du gel brassé (Dejmek & Cuvelier, 1998 ; Ramaswamy & Basak, 1991). Cette reprise en texture juste après brassage s'explique par la diminution de la température lors du brassage, par une post-acidification ou une production d'exopolysaccharides par les bactéries, mais aussi par le pH auquel a lieu le brassage qui modifie l'intensité des interactions électrostatiques (Renan et al., 2009). Cependant, la relation entre les propriétés intrinsèques des morceaux de gel et leur interaction et les propriétés rhéologiques du gel brassé n'est pas encore élucidée, laissant ainsi le champ à de nouvelles recherches.

II. STABILITE DES MELANGES DE BIOPOLYMERES

II.1. Les phénomènes de séparation de phases

II.1.1. Interactions polymères / polymères

II.1.1.1. Aspects généraux

Le mélange de deux polymères dans un solvant aboutit généralement à une séparation de phases lorsque les concentrations sont suffisamment élevées, la miscibilité totale étant l'exception (Tolstoguzov, 1991 ; Syrbe et al., 1998). L'interaction entre les polymères produit principalement quatre types de systèmes (Figure 13) constitués d'une phase dans le cas de milieux extrêmement dilués ou de la formation de complexes solubles, ou de deux phases suite à une séparation de phases microscopique ou macroscopique (Tolstoguzov, 1991).

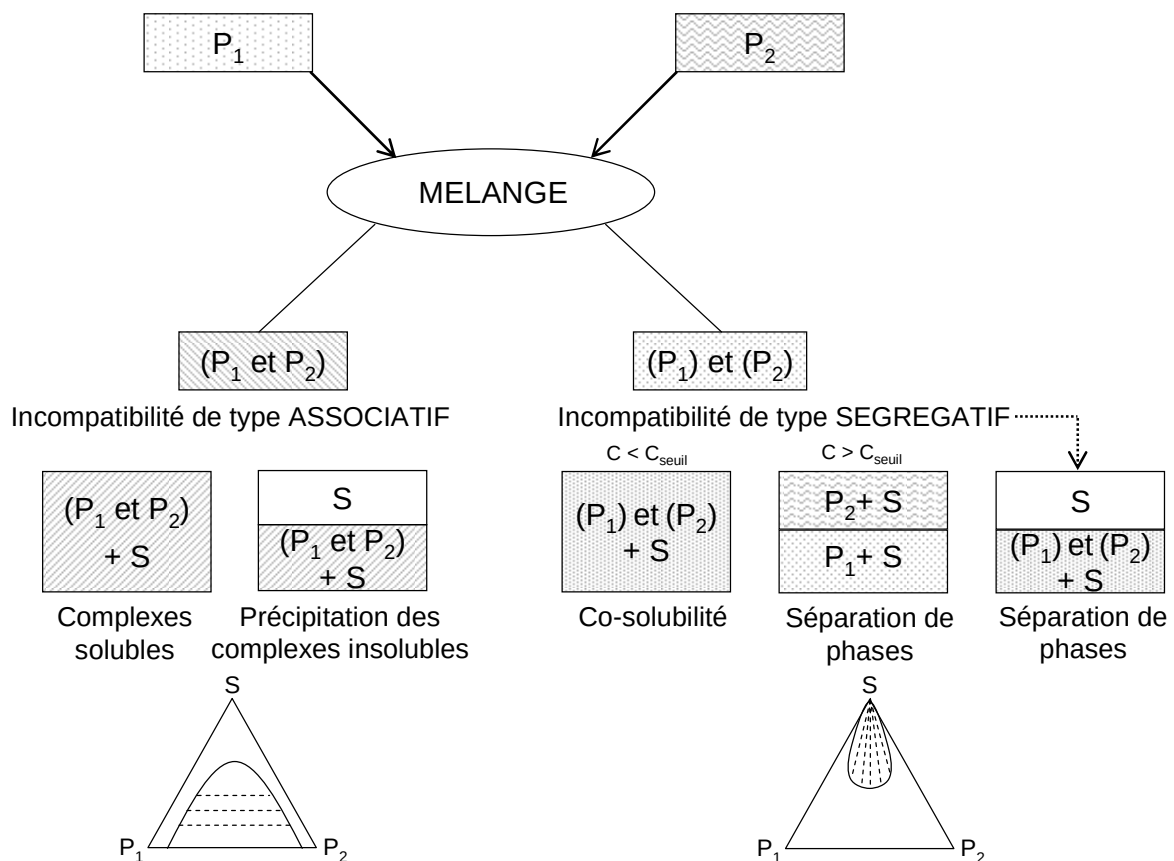


Figure 13 : Types de phénomènes de séparation de phases et représentation schématique des diagrammes de phases pour un mélange ternaire polymère (P_1) / polymère (P_2) / solvant S

Lors d'une séparation de phases, les deux polymères se répartissent inégalement dans le mélange en raison d'une répulsion ou d'une attraction entre les macromolécules. Deux types de séparation de phases peuvent alors se présenter :

- Séparation de phases de type ségrégatif ou incompatibilité thermodynamique

Dans ce cas, qui est le plus courant, les interactions solvant / polymères sont privilégiées au détriment des interactions polymères / polymères et solvant / solvant. Le système résulte en la formation de deux phases enrichies chacune en l'un des polymères, le solvant se répartissant plus ou moins équitablement entre ces deux phases. Dans certaines conditions, le système se présente sous la forme de gouttelettes et peut ainsi être considéré comme une émulsion eau dans eau (Tolstoguzov, 2003). Ce système biphasique se produit classiquement dans les mélanges de polymères non ioniques, les mélanges de polymères ioniques et non ioniques ou enfin lorsque les polymères sont chargés de la même manière (Grinberg & Tolstoguzov, 1997).

- Séparation de phases de type associatif ou coacervation complexe

En condition de compatibilité thermodynamique, une attraction électrostatique entre les polymères conduit à la formation de complexes solubles ou insolubles. Dans le cas de complexes insolubles, deux phases se forment suite à une différence de densité du complexe avec le milieu environnant, les deux polymères étant concentrés dans une phase alors que l'autre contient essentiellement le solvant. Ce type de séparation de phases se produit généralement au sein d'un mélange de polyélectrolytes de charges globales différentes, par exemple des mélanges entre des protéines à un pH inférieur à leur point isoélectrique et des polysaccharides anioniques.

A l'équilibre thermodynamique, les mélanges de polymères peuvent être décrits par leur diagramme de phases (Tolstoguzov, 1991). Toutefois il faut garder à l'esprit que la séparation de phases relève d'un phénomène cinétique. La Figure 13 correspond à deux diagrammes de phases en représentation triangulaire, relatifs à des systèmes respectivement associatifs et ségrégatifs. Néanmoins, la représentation en coordonnées cartésiennes (Figure 14) est plus courante puisque le solvant est le constituant majoritaire. La binodale délimite la frontière entre la zone monophasique de miscibilité et la zone biphasique d'incompatibilité. Les points situés sur la binodale sont reliés par des lignes de conjugaison. Tous les mélanges situés sur une même droite de conjugaison conduisent à des phases de même composition, mais avec des volumes respectifs différents. Enfin, il est possible d'identifier une zone supplémentaire située à l'intérieur de la zone biphasique d'incompatibilité. Elle

est délimitée par une ligne appelée spinodale. Les mélanges dont la composition se situe dans cette zone présentent une cinétique de séparation de phases particulièrement rapide.

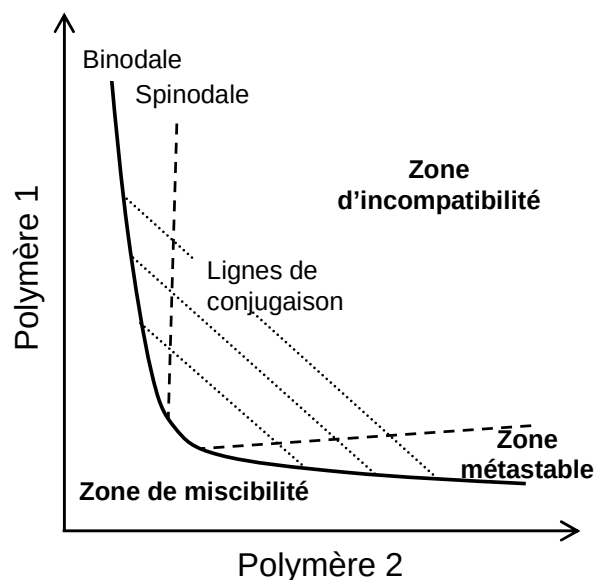


Figure 14 : Représentation schématisée d'un diagramme de phases de type ségrégatif en coordonnées cartésiennes d'un mélange polymère 1 / polymère 2 / solvant

Le tracé du diagramme de phases se fait en deux étapes complémentaires. D'une part, la détermination visuelle de la stabilité des mélanges permet d'accéder aux limites des zones stables et instables et ainsi à la binodale. Dans certains cas, la séparation de phases macroscopique des systèmes métastables peut être masquée par des viscosités élevées voire la gélification d'un des composés. D'autre part, les lignes de conjugaison peuvent être déterminées par une analyse de la composition de chaque phase appartenant au domaine biphasique, ce qui permet de confirmer le type d'interactions impliquées (Tolstoguzov, 1991 ; Michon et al., 1997).

De nombreux paramètres ont une influence sur les diagrammes de phases. Outre la concentration en polymères, la masse molaire, la force ionique, le pH ou encore la température modifient le comportement de phases des mélanges (Polyakov et al., 1997 ; Schmitt & Turgeon, 2011 ; de Kruif et al., 2004).

II.1.1.2. Aspect cinétique de la séparation de phases

Les phénomènes de séparation de phases dans les systèmes protéines / polysaccharides sont des procédés cinétiques qui évoluent dans le temps selon les systèmes. Ainsi, deux modèles généraux sont principalement utilisés pour décrire les cinétiques de séparation de phases : la décomposition spinodale et la nucléation et croissance (Sanchez et al., 2002 ; Turgeon et al., 2003).

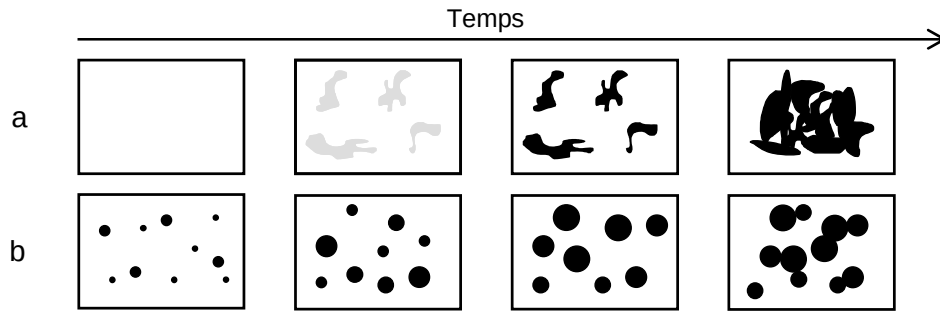


Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme de (a) décomposition spinodale et (b) nucléation et croissance en fonction du temps (d'après Turgeon et al., 2003)

La décomposition spinodale a lieu lors d'un passage rapide de la zone stable à une région suffisamment profonde de la zone instable, à l'intérieur de la spinodale (Figure 15a). De petites fluctuations de concentration entraînent la formation rapide et spontanée de zones de taille identique qui se concentrent sans évolution de taille, donnant lieu à un réseau biphasique interconnecté.

Le mécanisme de nucléation et croissance est observé dans la zone métastable située entre la binodale et la spinodale (Figure 15b). Dans cette région, les fluctuations de concentration doivent dépasser une taille critique pour franchir la barrière énergétique et pouvoir subsister. Au-delà de cette valeur seuil, les noyaux formés croissent en taille, bien que ce phénomène soit aléatoire et lent.

II.1.1.3. Approche thermodynamique

Pour comprendre les phénomènes d'incompatibilité thermodynamique, différents modèles ont été proposés (Edmond & Ogston, 1968 ; Flory, 1942). La théorie la plus largement admise, et considérée comme la pierre angulaire de la thermodynamique des polymères en solution, est celle de Flory-Huggins (1942). Elle permet de calculer l'enthalpie libre des mélanges en absence d'interaction spécifique entre les macromolécules, pour des systèmes peu concentrés en polymères et pour des polymères neutres (Flory, 1942).

D'un point de vue thermodynamique, l'enthalpie libre de mélange ΔG_m doit être minimale pour que les polymères soient compatibles.

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad \text{Eq. 1}$$

avec ΔH_m : enthalpie de mélange ; ΔS_m : entropie de mélange.

Dans le cas des polymères, l'entropie de mélange est relativement faible et la variation de ΔG_m dépend donc essentiellement de ΔH_m .

Le paramètre d'interaction de Flory-Huggins χ intervient dans l'expression de l'enthalpie et donc dans celle de l'enthalpie libre. Celui-ci permet de prévoir la compatibilité des deux polymères. Ainsi, la séparation de phases apparaît lorsque le paramètre d'interaction de Flory-Huggins dépasse une valeur critique qui dépend de la masse molaire des polymères.

Cette approche, appliquée à l'origine au cas de deux polymères dans un solvant organique, ne convient pas aussi parfaitement aux mélanges protéines / polysaccharides en milieu aqueux. De plus, le modèle est applicable uniquement dans le cas de protéines ayant une conformation en pelote statistique (Doublier et al., 2000). Partant de ce constat, d'autres auteurs ont proposé des alternatives à cette approche, notamment pour les systèmes contenant une molécule semi-flexible ou repliée comme les protéines globulaires. Pour ces systèmes, le modèle basé sur le développement du viriel (ou théorie de la déplétion-floculation) (Edmond & Ogston, 1968) est souvent utilisé.

II.1.2. Interactions polymères / particules colloïdales : les phénomènes de floculation

Contrairement aux protéines globulaires natives, les micelles de caséines possèdent une taille suffisamment élevée pour être considérées comme des colloïdes au sens classique du terme. Dans le cas de mélanges particules / polysaccharides, la thermodynamique relève de phénomènes de floculation générés soit par des interactions de déplétion (séparation de phases de type ségrégatif), soit par pontage entre les particules (séparation de phases de type associatif).

II.1.2.1. Déplétion-floculation : absence d'affinité des polymères pour la surface des particules

Le principe de la déplétion-floculation a été décrit pour la première fois par Asakura & Oosawa (1958) dans le cas théorique de sphères dures en présence de polymères de taille plus petite et non adsorbants (Figure 16). Chaque particule de diamètre σ est entourée d'une couche de déplétion d'épaisseur r_g correspondant au rayon de giration du polymère. Puisque l'espace entre les deux particules n'est plus accessible au polymère pour des raisons entropiques, le polymère se trouve exclu de la zone interparticulaire. Si deux particules se rapprochent du fait des mouvements browniens, leurs couches de déplétion s'interpénètrent et définissent un micro-volume dans lequel la pression osmotique π_1 est inférieure à celle du reste de la solution π_2 . Une force d'attraction générée par le gradient de pression osmotique s'exerce entre les particules et conduit à leur floculation.

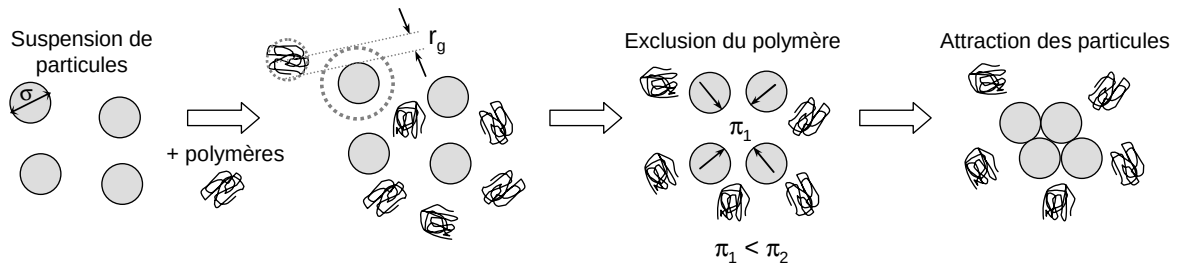


Figure 16 : Représentation schématique du mécanisme de déplétion-floculation (d'après Asakura & Oosawa, 1958)

Cette force attractive dépend non seulement des tailles et formes des polymères et particules, mais aussi de leurs concentrations respectives. Ainsi, la floculation par déplétion ne se produit qu'au-delà d'une concentration minimale en polymères libres et conduit à une séparation de phases (Figure 17a et b). Aux concentrations élevées en polymères, les effets de déplétion peuvent être masqués par des viscosités élevées qui ralentissent l'agrégation (Figure 17c), alors que de hautes concentrations en particules conduisent à une pseudostabilité due à la cohésion des particules entre elles qui forment un réseau (Figure 17b*). Cependant, il s'agit, dans ces deux cas, d'une stabilité relative à une échelle de temps considérée et variable selon le réarrangement des particules et chaînes de polymères (Syrbe et al., 1998).

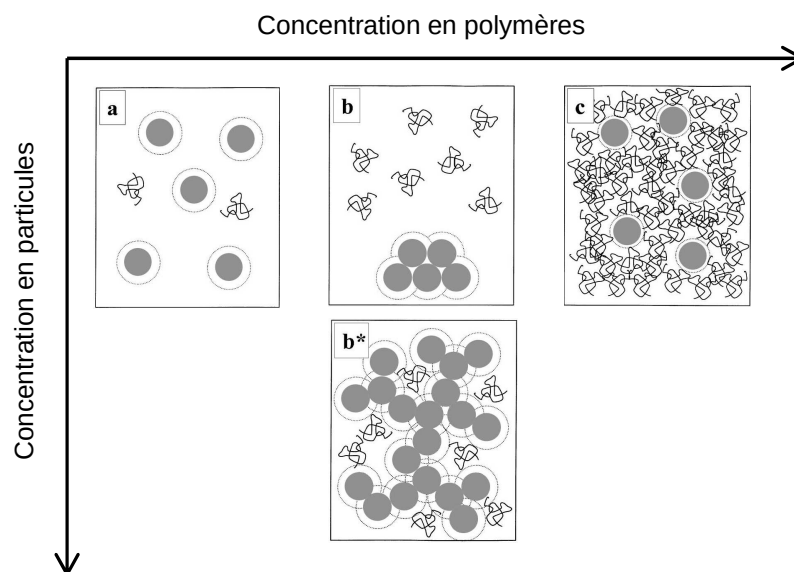


Figure 17 : Influence de la concentration en polymères et en particules sur la stabilité du mélange particules / polymères. Cas de l'absence d'affinité entre polymères et particules. Lors d'une augmentation de la concentration en polymères, le système passe par la transition d'un mélange (a) stable ; (b) à une déstabilisation du mélange par déplétion-floculation ; (c) à un mélange stable. Aux hautes fractions volumiques en particules, une région de pseudostabilité se forme (b*) (d'après Syrbe et al., 1998)

La réversibilité de la déplétion est rendue possible par la nature faiblement énergétique des liaisons entre les particules. D'une part, une dilution du système ou une modification des conditions du milieu permet de redisperser les particules floculées, et d'autre part, un ajout de polymères après dilution conduit de nouveau à la précipitation.

II.1.2.2. Floculation par pontage : affinité des polymères pour la surface des particules

La floculation par pontage se produit dans le cas d'un polymère adsorbant, c'est-à-dire présentant une affinité particulière pour la surface de la particule. Elle fait intervenir des interactions spécifiques, généralement de nature électrostatique, entre la surface de la particule et le polymère de charges opposées. En fonction de la concentration en polymères, le système peut aboutir à une floculation ou à une stabilisation stérique.

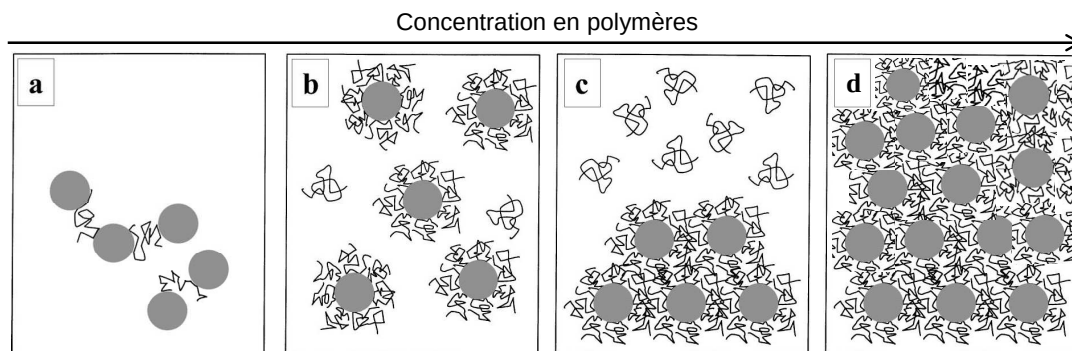


Figure 18 : Influence de la concentration en polymères sur la stabilité du mélange particules / polymères. Cas de la présence d'affinité entre polymères et particules. (a) Floculation par pontage ; (b) stabilisation ; (c) déstabilisation par déplétion-floculation ; (d) stabilisation par enchevêtrement des polymères (d'après Syrbe et al., 1998)

Dans le cas de très faibles concentrations en polymères, une chaîne de polymères peut s'adsorber sur plusieurs particules, formant ainsi un agrégat lâche qui sédimente le plus souvent par différence de densité avec le milieu (Figure 18a) (Dickinson, 1998 ; Syrbe et al., 1998). Cependant, le pontage ne peut se produire que dans des conditions d'extension suffisante de la chaîne du polymère dans le milieu, ce qui permet de limiter la répulsion électrostatique entre les particules. Par ailleurs, le maximum de floculation a lieu pour un recouvrement de 50% de la surface des particules (Marozienne & de Kruif, 2000).

Au-delà de ce taux de recouvrement de la surface des particules, les polymères adsorbés contribuent à une stabilisation stérique du système (Figure 18b). En effet, la saturation du recouvrement de la surface des particules provoque un recouvrement par une couche de polymères

dont la mobilité diminue et une répulsion entre les particules. Finalement, les particules sont immobilisées et stabilisées dans un réseau formé par les chaînes enchevêtrées de polymères (Figure 18d) (Dickinson, 1998).

Un troisième type de floculation, qui fait intervenir à la fois les phénomènes de déplétion et de pontage, peut se produire (Figure 18c). Lorsque le recouvrement de la surface des particules par les polymères est total, les polymères libres non adsorbés peuvent induire un phénomène de déplétion-floculation et donc une séparation de phases suite à la sédimentation des particules (Syrbe et al., 1998).

II.2. Les phénomènes de séparation de phases dans les mélanges lait / polysaccharides

Lors de l'étude du comportement de mélanges de protéines de lait et polysaccharides, le pH et la force ionique peuvent influencer de manière importante l'association des protéines. Par conséquent, seuls les systèmes en milieu neutre, se situant au-dessus du point isoélectrique des protéines, seront traités dans cette partie.

Puisque la nature des interactions entre les polysaccharides et les micelles de caséines (floculation par déplétion ou par pontage) fait intervenir ou non les charges des polymères, une distinction entre la catégorie des polysaccharides neutres et chargés a été effectuée. Ainsi, la densité de charges des différents polysaccharides étudiés en mélange avec les protéines de lait dans la littérature a été récapitulée dans la Figure 19.

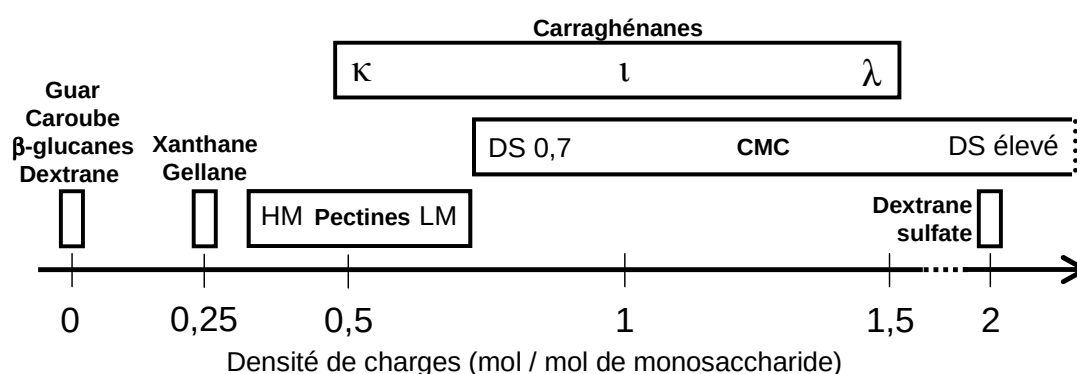


Figure 19 : Densité de charges de différents polysaccharides. DS : *degré de substitution* (d'après de Jong & van de Velde, 2007)

II.2.1. Séparation de phases de mélanges protéines de lait / polysaccharides neutres

De manière consensuelle, toutes les études portant sur les mélanges entre un polysaccharide neutre et les protéines de lait concluent à un phénomène de séparation de phases de type ségrégatif entre les deux composés en présence (Tableau 3). Une distinction peut toutefois être faite entre les systèmes en fonction de la nature des protéines. En effet, les systèmes contenant des micelles de caséines, pouvant être considérées comme étant de nature particulière, conduisent à une floculation des micelles par déplétion, alors que les caséinates, de taille nanométrique, sont décrits comme conduisant à une incompatibilité thermodynamique.

Lorsqu'un système mixte atteint l'équilibre thermodynamique et se sépare en deux phases distinctes, la composition en polymères de chaque phase peut être évaluée et représentée sous la forme d'un diagramme de phases (Figure 14). Cependant, à l'échelle microscopique et hors équilibre, ces systèmes protéines de lait / polysaccharides neutres peuvent être considérés comme une émulsion eau dans eau avant que la séparation de phases macroscopique intervienne. Au sein de cette émulsion, la phase ayant la plus grande fraction volumique à l'équilibre tend à former la phase continue (Frith, 2010 ; Tolstoguzov, 2003). A titre d'exemple, le mélange de concentrations initiales en lait écrémé de 41% et en caroube de 0,45% ayant un rapport volumique de 75/25 entre les micelles de caséines et la caroube conduit à la dispersion de la caroube sous forme de gouttelettes dans une phase continue enrichie en protéines ; les deux phases étant inversées dans le cas d'un rapport de 25/75 entre les micelles de caséines et la caroube. Au point d'inversion de phases, le mélange aboutit à un système bicontinu dans lequel les deux phases occupent chacune 50% du volume total (Figure 20) (Schorsch et al., 1999).

Tableau 3 : Récapitulatif des principales études effectuées sur les mélanges polysaccharides neutres / protéines de lait en milieu neutre. Le type de phénomène est donné tel que décrit par les auteurs.

Polysaccharide	Protéine de lait	Conditions	Phénomène	Références
Guar				
Non dépolymérisé	Micelles de caséines	pH 7, 20°C, 0,25 M NaCl	Déplétion-floculation	Bourriot et al., 1999b
		pH 6,86, 20°C, >0,15 M NaCl	Incompatibilité thermodynamique	Antonov et al., 1998
Dépolymérisé		pH 6,6 à 7, 20°C, 0,25 M NaCl	Déplétion-floculation	Bourriot et al., 1999b ; Tuinier et al., 2000
Non dépolymérisé	Caséinates de sodium	pH 6,86, 20°C, <0,01 M NaCl	Compatibilité	Antonov et al., 1998
		pH 6 à 6,86, 20°C, >0,01 M NaCl	Incompatibilité thermodynamique	Antonov et al., 1998 ; Spyropoulos et al., 2010
	Lait écrémé	pH 6,7, 25°C	Déplétion-floculation	Thaiudom & Goff, 2003
Caroube				
Non dépolymérisé	Micelles de caséines	pH 7, 20°C, 0,25 M NaCl	Déplétion-floculation	Bourriot et al., 1999c
		pH 6,8, 5°C, 0,08 M NaCl	Incompatibilité thermodynamique	Schorsch et al.,1999
	Caséinates de sodium	pH 6, 20°C	Incompatibilité thermodynamique	Spyropoulos et al., 2010
	Lait écrémé	pH 6,8, 5°C, 0,08 M NaCl	Incompatibilité thermodynamique	Schorsch et al., 1999
		pH 6,7, 25°C	Déplétion-floculation	Thaiudom & Goff, 2003
β-glucanes				
Non dépolymérisé	Lait écrémé	pH neutre	Incompatibilité thermodynamique (déplétion-floculation)	Lazaridou et al., 2008 ; Vasiljevic et al., 2007
Dextrane				
Non dépolymérisé	Micelles de caséines	pH 7, 20°C, 0,25 M NaCl	Déplétion-floculation	Bourriot, 1999

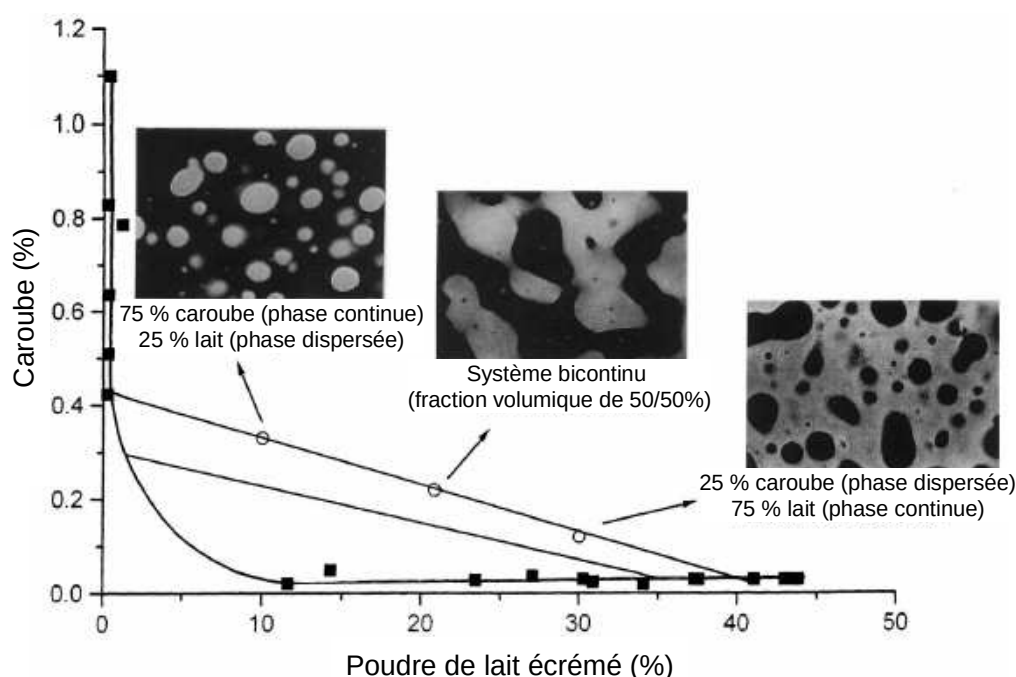


Figure 20 : Microstructure du système ternaire protéines de lait / caroube / sucre à 20% obtenue par microscopie confocale à 5°C en fonction de la proportion lait / caroube (d'après Schorsch et al., 1999)

Les émulsions eau dans eau sont gouvernées en grande partie par les mêmes principes physiques, incluant les mécanismes menant à la rupture et la coalescence des gouttelettes, que dans le cas des émulsions huile dans eau conventionnelles (Foster et al., 1997). Néanmoins, certaines caractéristiques spécifiques des émulsions eau dans eau peuvent être identifiées :

- une miscibilité partielle des deux phases en raison de la présence d'un solvant commun, l'eau. Ainsi plus de 90% du solvant peut se déplacer entre les deux phases, ce qui pose la question de la présence d'une interface dans ces systèmes et de la façon dont elle est stabilisée (Cullen, 2009) ;
- l'absence de positionnement préférentiel des tensio-actifs à l'interface. En effet, les molécules tensio-actives tendent davantage à rester dans les phases aqueuses sous forme micellaire en raison de l'absence de phase hydrophobe dans le système ;
- une très faible tension interfaciale, de 0,5 à 500 $\mu\text{N.m}^{-1}$, soit d'un ordre de grandeur deux à trois fois plus faible que dans les systèmes huile dans eau (Tolstoguzov, 2003 ; Ding et al., 2002) ;
- une différence de densité relativement faible entre les deux phases aqueuses.

L'ensemble de ces propriétés contribue d'une part à la déformabilité élevée des gouttelettes et d'autre part, à un ralentissement de la déstabilisation par sédimentation ou crémage (Tolstoguzov, 1991). Néanmoins, de manière générale, les facteurs qui déterminent la stabilité de ces gouttelettes en suspension sont définis par la loi de Stokes (Eq. 2).

$$v = \frac{2r^2 g \Delta\rho}{9\eta} \quad \text{Eq. 2}$$

avec v : vitesse de sédimentation (m.s^{-1}) ; r : rayon de la particule (m) ; g : accélération de la pesanteur (m.s^{-2}) ; $\Delta\rho$: différence de masse volumique entre les deux phases (kg.m^{-3}) ; η : viscosité de la phase continue (Pa.s).

Ainsi, de la même manière que les émulsions huile dans eau classiques, les émulsions eau dans eau sont soumises à des phénomènes de déstabilisation tels que la coalescence, le crémage ou la sédimentation (Foster et al., 1997). Hors équilibre thermodynamique, les séparations de phases des systèmes polysaccharides / protéines de lait relèvent donc d'un processus cinétique (Figure 21).

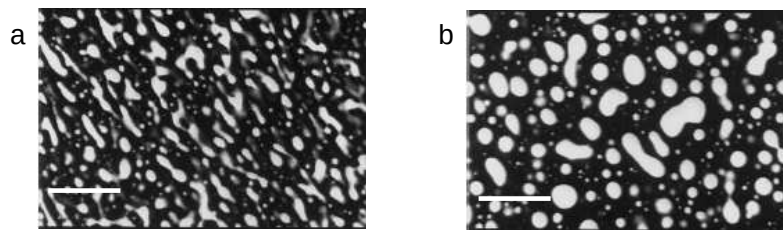


Figure 21 : Evolution de la microstructure du mélange 0,4% caroube / 40% de poudre de lait écrémé / 20% de sucre observée par microscopie confocale à 5°C et (a) juste après mélange ou (b) une minute après arrêt du mélange. La barre représente 50 μm (d'après Schorsch et al., 1999)

La vitesse de coalescence dépend donc de l'état des gouttelettes (déformabilité et forme), des forces de collision entre gouttelettes et du temps de contact (Foster et al., 1997 ; Schorsch et al., 1999). Ceci pourrait expliquer la tendance des gouttelettes enrichies en polysaccharides à coalescer dans le mélange contenant majoritairement des micelles de caséines (Figure 20). Ainsi, la faible viscosité de la phase continue protéique favorise la fusion des gouttelettes qui conservent alors une forme non parfaitement sphérique immédiatement après leur coalescence.

Les vitesses de sédimentation et de crémage sont largement influencées par la différence de densité entre les deux phases, la viscosité de la phase continue et la taille des gouttelettes. Lorsque la mobilité des gouttelettes est réduite, par exemple dans les cas d'une faible différence de densité entre les phases ou d'une viscosité de la phase continue élevée, la séparation de phases peut parfois ne pas

être visible sur l'échelle de temps considérée (Frith, 2010 ; Syrbe et al., 1998). Au contraire, une grande taille de gouttelettes accélère le phénomène de déstabilisation (Foster et al., 1997).

Certains facteurs, liés aux caractéristiques des protéines ou des polysaccharides ainsi que celles du solvant, peuvent moduler les phénomènes de séparation de phases. En comparaison avec la poudre de lait écrémé, l'utilisation de micelles de caséines augmente l'incompatibilité du système, ce qui met en lumière l'influence de la nature des protéines dans la stabilité des mélanges (Schorsch et al., 1999).

Plusieurs études menées sur différents mélanges guar / protéines de lait ont montré que l'incompatibilité est d'autant plus marquée que la masse moléculaire du polysaccharide est importante (Bourriot et al., 1999b ; Tuinier et al., 2000). Par ailleurs, en multipliant la concentration en galactomannane par la viscosité intrinsèque de chaque galactomannane, une courbe maîtresse est obtenue par Bourriot et al. (1997) (Figure 22), montrant ainsi que pour un polysaccharide donné, les phénomènes d'incompatibilité thermodynamique sont gouvernés par le volume occupé par les chaînes.

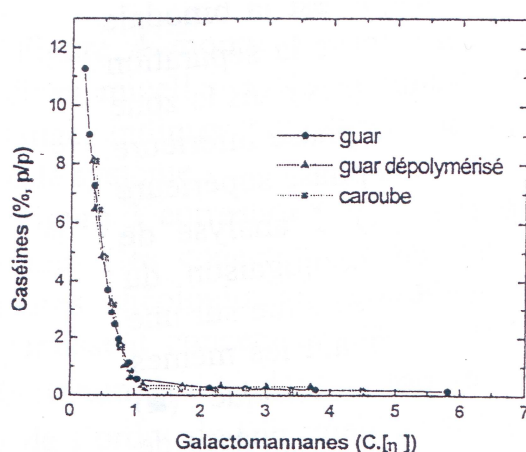


Figure 22 : Influence de la viscosité intrinsèque sur le comportement de séparation de phases de mélanges caséines / galactomannanes (Bourriot et al., 1997)

La compatibilité entre les polysaccharides et les protéines de lait est également affectée par la qualité du solvant. Ainsi, Antonov et al. (1998) se sont intéressés à l'influence de la force ionique sur le comportement de systèmes guar / caséinates, montrant une zone de compatibilité d'autant plus étendue que la force ionique du milieu est faible, ce qui est typique des mélanges présentant une incompatibilité thermodynamique. Par ailleurs, une augmentation de la miscibilité des systèmes caroube / protéines de lait a été observée après l'ajout d'une teneur en sucre inférieure à 15% dans le cas des caséinates et 20% pour les micelles de caséines (Schorsch et al., 1999 ; Spyropoulos et al., 2010).

La microstructure spécifique des mélanges lait / polysaccharides neutres confère à ces systèmes des propriétés rhéologiques particulières. Il est à noter que la caractérisation doit s'effectuer avant que la déstabilisation ne soit observée à l'échelle macroscopique. D'un point de vue rhéologique, un effet de synergie a été observé suite à l'ajout de polysaccharides aux micelles de caséines. Ainsi, la viscosité apparente du mélange est supérieure à la somme des viscosités des composés individuels aux mêmes concentrations en raison d'une surconcentration en guar dans la phase continue. Par ailleurs, la boucle d'hystérésis présente pour le mélange micelles de caséines / guar peut être vraisemblablement attribuée à la structure du système sous la forme d'une émulsion eau dans eau qui pourrait être modifiée par le cisaillement (Figure 23) (Bourriot et al., 1999c).

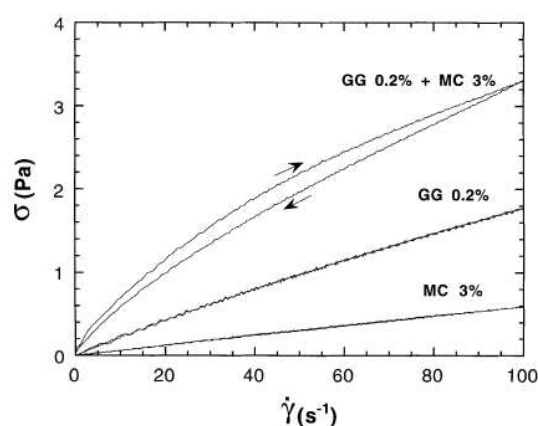


Figure 23 : Courbes d'écoulement d'une solution de guar à 0,2% (GG), d'une suspension de micelles de caséines à 3% (MC) et d'un mélange de 0,2% de guar et 3% de micelles de caséines dans 0,25 M NaCl (Bourriot et al., 1999c)

II.2.2. Séparation de phases de mélanges protéines de lait / polysaccharides chargés

A la différence des systèmes précédents qui faisaient intervenir des espèces neutres, il faut tenir compte des charges apportées par les polysaccharides. Lorsqu'un polysaccharide chargé est mélangé à des protéines de lait, la question d'une éventuelle interaction entre les deux composés se pose. Une des approches consiste à analyser les mécanismes intervenant dans le système mixte en fonction de la densité de charges des polymères. Cependant, quelle que soit la charge des polysaccharides, l'ensemble des mélanges polysaccharides chargés / protéines de lait décrits dans la littérature, à l'exception de ceux contenant du carraghénane (Tableau 5) et d'un cas particulier avec le xanthane (Tableau 4) est attribué à un phénomène de déplétion-floculation ou à une incompatibilité thermodynamique (Tableau 4 et Tableau 5). Par ailleurs, le type de charge portée par le polysaccharide est également susceptible de rendre possible ou non une association avec les protéines de lait.

Tableau 4 : Récapitulatif des principales études effectuées sur les mélanges polysaccharides chargés de type carboxylé / protéines de lait en milieu neutre. Le type de phénomène est donné tel que décrit par les auteurs (*DE* : degré d'estérification ; *DS* : degré de substitution ; *CMC* : carboxyméthylcellulose ; *HM* : hautement méthylées ; *LM* : faiblement méthylées ; *LMA* : faiblement méthylées et amidées ; *EPS* : exopolysaccharides).

Polysaccharide	Protéine	Conditions	Phénomène	Références
Xanthane	Densité de charges : 0,25 mol / mol de monosaccharide			
	Micelles de caséines	pH 6,8, 20°C	Déplétion-floculation	Bhat et al., 2006
	Caséinates de sodium	pH neutre, 20°C	Incompatibilité thermodynamique	Hemar et al., 2001
		pH 6,6	Association faible (interactions hydrophobes)	Kobori et al., 2009
	Lait écrémé	pH 6,5 à 6,7, 20 à 40°C	Déplétion-floculation	Thaiudom & Goff, 2003 ; Hemar et al., 2001 ; Aichinger et al., 2007 ; Antonov et al., 1994
Pectines	Densité de charges : pectines HM : 0,3 ; LM : 0,65 mol / mol de monosaccharide			
HM (DE 61%)	Micelles de caséines	pH 6,7 à 5, 20°C	Incompatibilité thermodynamique	Tuinier & de Kruif, 2002
HM (DE 68%)	Caséinates de sodium	pH > 6	Incompatibilité thermodynamique	Rediguieri et al., 2007
HM (DE 73%)	Lait écrémé	pH 6,7	Déplétion-floculation	Marozienne & de Kruif, 2000 ; Acero Lopez et al., 2009
LM (DE 35%)		pH 6,7	Déplétion-floculation	Marozienne & de Kruif, 2000
LMA (DE 35% et amidé à 20%)		pH 6,7	Déplétion-floculation	Marozienne & de Kruif, 2000
CMC	Densité de charges : variable selon DS			
CMC (DS 0,85)	Lait écrémé	pH 6,8, 20°C	Incompatibilité thermodynamique	Tolstoguzov, 1993
EPS	Densité de charges : variable			
EPS anionique	Micelles de caséines	pH 6,8, 0,08 M NaCl	Déplétion-floculation	Antonov et al., 1994
EPS anionique	Lait écrémé	pH neutre	Déplétion-floculation	Girard & Schaffer-Lequart, 2007
Non précisé	Lait écrémé	pH 6,6 à 6,7, 0,1 M NaCl	Déplétion-floculation	Tuinier & de Kruif, 1998 ; Hassan et al., 2003

Tableau 5 : Récapitulatif des principales études effectuées sur les mélanges polysaccharides chargés de type sulfaté / protéines de lait en milieu neutre. Le type de phénomène est donné tel que décrit par les auteurs.

Polysaccharide	Protéine	Conditions	Phénomène	Références
Carraghénane	Densité de charges : kappa : 0,5 ; iota : 1 ; lambda : 1,5 mol / mol de monosaccharide			
Kappa	Caséine κ	20°C	Association	Snoeren, 1976 ; Snoeren et al., 1975
	Caséine α et β		Déplétion-floculation	Snoeren, 1976
	Micelles de caséines	20°C, 50°C, 0,25 M NaCl	Déplétion- floculation	Bourriot et al., 1999a
		25°C / 60°C	Association / Déplétion-floculation	Schorsch et al., 2000
		25°C	Association	Spagnuolo et al., 2005
	Caséinates de sodium	20°C	Incompatibilité thermodynamique	Hemar et al., 2002 ; Nono et al., 2011
	Lait écrémé	25°C / 55 ou 60°C 25°C / 60°C	Association / Déplétion-floculation	Alexander & Dalglish, 2007 ; Langendorff et al., 1997 ; Langendorff et al., 2000
		20°C	Déplétion-floculation	Hemar et al., 2002 ; Drohan et al., 1997
		5 à 25°C	Association	Dalglish & Morris, 1988 ; Tziboula & Horne, 1999 ; Martin et al., 2006 ; Ji et al., 2008
Iota	Micelles de caséines	20 à 60°C	Association	Garnier et al., 2003; Michon et al., 2003
	Lait écrémé	25°C / 70°C	Association / Déplétion-floculation	Langendorff et al., 1997 ; Langendorff, 1998 ; Langendorff et al., 2000
		25°C	Association	Dalglish & Morris, 1988
Lambda	Lait écrémé	25°C / 60°C	Association / Déplétion-floculation	Langendorff et al., 2000 ; Dalglish & Morris, 1988
Dextrane	Densité de charges : 2 mol / mol de monosaccharide			
Sulfaté	Micelles de caséines	pH 7, 20°C, 0,25 M NaCl	Déplétion-floculation	Garnier et al., 1998 ; Bourriot, 1999

Il a été montré que les polysaccharides sulfatés tels que les carraghénanes interagissent davantage avec les protéines que les polysaccharides carboxylés tels que les pectines (Doublier et al., 2000). Partant de ce constat, les résultats obtenus avec deux polysaccharides carboxylés, le xanthane et les pectines, et deux polysaccharides sulfatés, le dextrane et les carraghénanes, en mélange avec les protéines de lait, sont plus particulièrement décrits ci-après.

II.2.2.1. Cas du xanthane

D'une manière générale, les études menées sur l'ajout de xanthane à du lait attribuent la séparation de phases de type ségrégatif à un mécanisme de déplétion-floculation (Figure 24) (Tableau 4) (Aichinger et al., 2007 ; Bhat et al., 2006 ; Hemar et al., 2001 ; Thaiudom & Goff, 2003 ; Antonov et al., 1994).

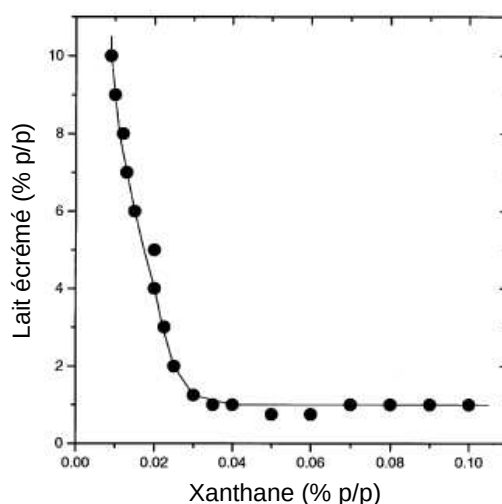


Figure 24 : Diagramme de phases de mélanges lait écrémé / xanthane (d'après Hemar et al., 2001)

Cependant, une différenciation du comportement de phases entre les mélanges lait / xanthane et caséinates de sodium / xanthane a été mise en évidence. Alors qu'une séparation de phases macroscopique est visible dans le lait à des concentrations bien inférieures à 0,1% de xanthane, le mélange xanthane / caséinates de sodium ne se sépare qu'à partir de 0,5% de polysaccharide ajouté (Figure 25a, c et d). A l'échelle microscopique, de petits domaines enrichis en protéines, de forme non parfaitement sphérique, ont été observés après un ajout de 0,5% de xanthane dans le lait (Figure 25a et b). Des petits filaments individuels uniformément distribués ont été mis en évidence par AFM (Kobori et al., 2009) et par microscopie confocale (Hemar et al., 2001) dans le cas de mélanges en présence de caséinates de sodium. Les opinions divergent quant à l'interprétation de ces structures. Selon Hemar et al. (2001), la présence de caséinates favoriserait l'auto-association des

molécules de xanthane en raison d'interactions répulsives entre les deux composés. La seconde explication est donnée par Kobori et al. (2009) qui émet l'hypothèse d'une liaison de particules individuelles de caséinates de sodium sur la chaîne de xanthane au travers d'interactions hydrophobes. Cependant, ces interactions hydrophobes seraient faiblement attractives en raison de la répulsion électrostatique. Il faut en outre noter que la caséine κ n'interviendrait pas dans la formation de ces structures.

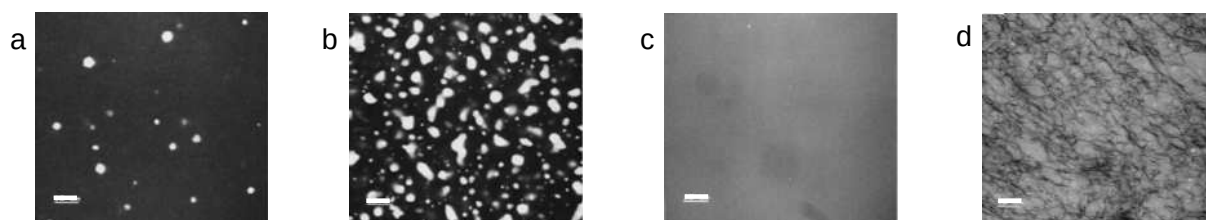


Figure 25 : Images obtenues en microscopie confocale de mélanges de (a) 5% poudre de lait écrémé / 0,1% xanthane ; (b) 5% poudre de lait écrémé / 0,5% xanthane ; (c) 5% caséinates de sodium / 0,1% xanthane ; (d) 5% caséinates de sodium / 1% xanthane. La barre représente 10 μ m (d'après Hemar et al., 2001)

II.2.2.2. Cas des pectines

Au pH du lait, un phénomène de déplétion-floculation est décrit pour toutes les études portant sur les mélanges lait / pectines (Tuinier et al., 2002 ; Marozienne & de Kruif, 2000 ; Acero Lopez et al., 2009). La compatibilité des pectines avec les protéines de lait dépend peu de leur degré d'estérification, qui est typiquement de 70% et 35% respectivement pour les pectines HM (hautement méthylées) et LM (faiblement méthylées). Néanmoins, la zone d'incompatibilité est légèrement plus étendue pour les pectines LM que dans le cas des pectines HM en raison d'un volume hydrodynamique plus élevé pour les pectines LM (Figure 26) (Marozienne & de Kruif, 2000).

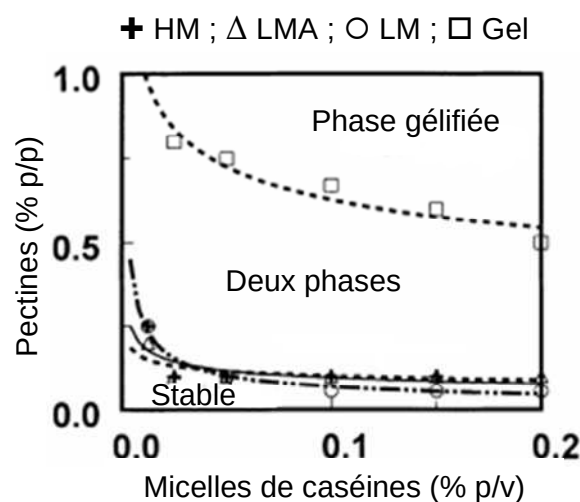


Figure 26 : Diagramme de phases de mélanges micelles de caséines / pectines. Aux concentrations en pectines LMA (faiblement méthylées et amidées) et HM (hautement méthylées) élevées, un réseau gélifié se forme (d'après Marozienne & de Kruif, 2000)

Enfin, il faut noter que bien que les pectines LM n'interagissent pas avec les micelles de caséines à pH neutre, elles sont sensibles aux ions calcium, ce qui peut aboutir à leur gélification. L'apport du calcium par les protéines du lait, notamment lors d'un début de solubilisation du phosphate de calcium micellaire en cas d'une légère diminution du pH, peut conduire à la formation d'un gel mixte (Harte et al., 2007).

II.2.2.3. Cas du dextrane sulfate

Les mélanges dextrane sulfate / protéines de lait n'ont que rarement été étudiés dans la littérature (Garnier et al., 1998 ; Bourriot, 1999) (Tableau 5) en raison des propriétés peu viscosifiantes et non gélifiantes du dextrane. Toutefois, la charge élevée de ce polymère, sous la forme de groupements sulfates, présente un intérêt tout particulier pour l'étude des mélanges en présence de polysaccharides chargés (Figure 19).

Un phénomène de déplétion-floculation serait à l'origine de la séparation de phases macroscopique. L'allure inhabituelle du diagramme de phases, c'est-à-dire que la binodale n'est pas asymptotique à l'axe des abscisses aux concentrations élevées en protéines, est attribuée à une compétition entre le phénomène de séparation de phases et l'augmentation de la viscosité du système dans cette zone (Figure 27).

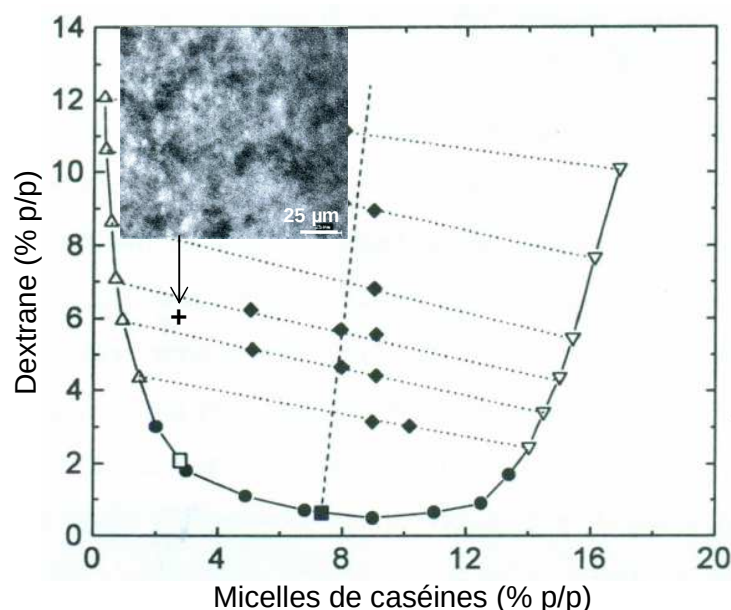


Figure 27 : Diagramme de phases de mélanges micelles de caséines / dextrane et image obtenue en microscopie confocale de la microstructure du mélange de 6% de dextrane / 3% de micelles de caséines à 20°C dans 0,25 M NaCl (d'après Bourriot, 1999)

A l'échelle microscopique, un système hétérogène présentant des zones diffuses de 10 à 100 µm concentrées en protéines est observé (Figure 27). A la différence des systèmes faisant intervenir des polysaccharides neutres, ces zones concentrées aux contours diffus n'ont pas l'apparence de gouttelettes sphériques, ce qui suggère l'existence de complexes formés entre le polymère chargé et les protéines de lait.

II.2.2.4. Cas des carraghénanes

Les mélanges entre les carraghénanes et les protéines de lait ont fait l'objet de nombreuses études en vue d'une meilleure compréhension des interactions intervenant entre les deux composés (Tableau 5). La principale question de divergence concerne l'adsorption des carraghénanes sur les micelles de caséines et les conditions dans lesquelles ce phénomène se produit.

La plupart des auteurs s'accordent sur le fait qu'à des températures inférieures à la température de transition pelote-hélice, le carraghénane s'associe avec les micelles de caséines au travers d'interactions électrostatiques entre ses groupes sulfates chargés négativement et une région chargée positivement de la caséine κ (Figure 28) (Snoeren, 1976 ; Dalgleish & Morris, 1988). Ce phénomène suppose que la zone positive de la caséine κ soit accessible et implique la pénétration des chaînes de carraghénanes dans la couche chevelue de la micelle de caséines, ce qui serait de prime abord difficile

à concrétiser pour des raisons stériques et électrostatiques (Bourriot et al., 1999a). Cependant, le mécanisme faisant intervenir l'adsorption des carraghénanes sur les protéines est celui qui prévaut aujourd'hui. Il est à noter que des interactions directes entre les ions calcium et les groupements sulfates portés par les chaînes de carraghénanes pourraient également intervenir.

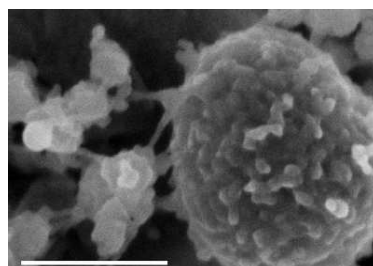


Figure 28 : Image obtenue en microscopie électronique à balayage d'un mélange de 11% de poudre de lait et de 0,015% de kappa-carraghénane. La barre représente 200 μm (Spagnuolo et al., 2005)

Les interactions associatives entre les iota et kappa-carraghénanes et les micelles de caséines ont lieu quelle que soit la température et donc la conformation du polysaccharide (Snoeren, 1976 ; Garnier et al., 2003). Néanmoins, ce mécanisme est couplé à un phénomène de séparation de phases. En effet, au-delà du recouvrement total des micelles de caséines par les chaînes de carraghénane, les agrégats pontés sont flocculés par les carraghénanes libres (Schorsch et al., 2000). Ainsi, à des concentrations faibles en micelles de caséines, les agrégats seraient dispersés dans la phase continue stabilisée par des liaisons carraghénane / carraghénane. Au contraire, à des concentrations élevées en micelles de caséines, un seul réseau stabilisé majoritairement par des liaisons carraghénane / micelles de caséines structurerait le système (Figure 29a et b) (Garnier et al., 2003).

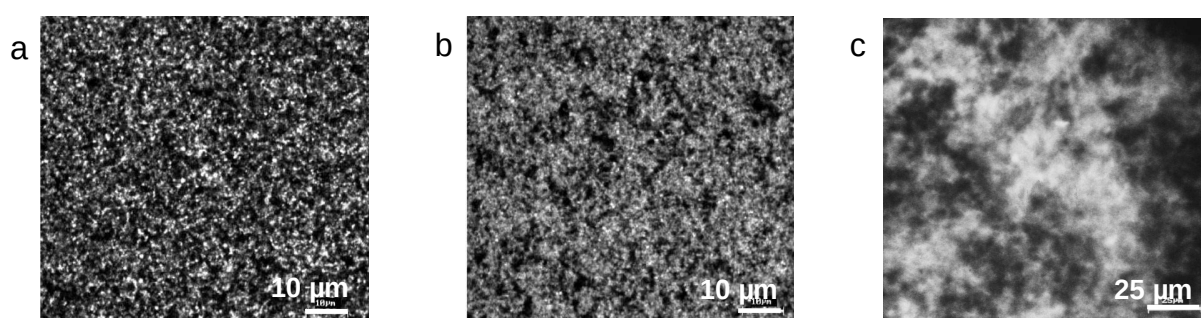


Figure 29 : Images obtenues en microscopie confocale de mélanges de 3% de micelles de caséines et de (a) 0,1% de iota-carraghénane (d'après Garnier et al., 2003) ; (b) 1% de iota-carraghénane à 0,1 M NaCl (d'après Garnier et al., 2003) ; (c) 1% de kappa-carraghénane à 0,25 M NaCl à 20°C (d'après Bourriot et al., 1999a)

Même si les trois types de carraghénanes (iota, kappa et lambda) s'adsorbent sur les micelles de caséines, leur différence de densité de charges semble intervenir dans les microstructures observées.

Pour un rapport identique en micelles de caséines et en carraghénane, le mélange obtenu en présence de iota-carraghénane apparaît granuleux (Figure 29b) alors que la microstructure du mélange kappa-carraghénane / micelles de caséines semble plus diffuse et grossière (Figure 29c). Puisque la densité de charges des carraghénanes est différente, la stœchiométrie des agrégats carraghénane / micelles de caséines est très probablement différente.

Différentes méthodes ont été utilisées pour mettre en évidence l'existence d'interactions attractives entre les carraghénanes et les micelles de caséines. Par des mesures de mobilité électrophorétique, Dalgleish & Morris (1988) ont montré une augmentation de la densité de charges des micelles de caséines suite à l'adsorption des chaînes de carraghénane. Par ailleurs, la taille des micelles de caséines augmente lorsque l'adsorption des carraghénanes a lieu (Langendorff, 1998 ; Spagnuolo et al., 2005 ; Dalgleish & Morris, 1988).

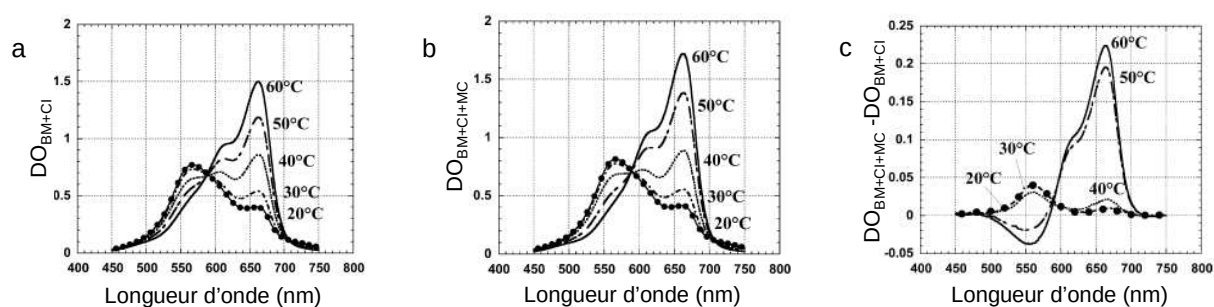


Figure 30 : Spectres de densité optique (DO) à différentes températures, de 20°C à 60°C, et 0,1 M NaCl de mélanges (a) bleu de méthylène (BM) / 0,002% iota-carraghénane (CI) ; (b) bleu de méthylène (BM) / 0,002% iota-carraghénane (CI) / 0,005% micelles de caséines (MC) ; (c) soustraction des deux spectres de densité optique ($\Delta DO = DO_{BM+CI+MC} - DO_{BM+CI}$) (d'après Garnier et al., 2003)

Une autre méthode consiste à étudier le comportement du spectre du bleu de méthylène suite à l'ajout de carraghénane ou d'un mélange de micelles de caséines et de carraghénane (Snoeren, 1976 ; Garnier et al., 2003). En effet, les interactions électrostatiques entre les chaînes de carraghénane sulfaté et les molécules de bleu de méthylène modifient le spectre du bleu de méthylène. Le pic de la solution de bleu de méthylène à 663 nm diminue au profit d'un épaulement à 554 nm correspondant aux complexes bleu de méthylène / carraghénane (Figure 30a). Lorsque des micelles de caséines sont introduites dans ce mélange, une compétition a lieu entre les plans cationiques du bleu de méthylène et les micelles de caséines pour les groupes sulfates du carraghénane. Si les molécules de bleu de méthylène sont déplacées des sites sulfates et libérées en solution, le pic à 663 nm augmente alors que l'épaulement à 554 nm diminue (Figure 30b). Une soustraction des spectres des mélanges micelles de caséines / carraghénane avec ceux obtenus sans ajout de protéines permet de mettre en évidence les

interactions associatives micelles de caséines / carraghénane (Figure 30c). Ainsi, l'association des micelles de caséines avec les groupes sulfates du carraghénane conduit à une libération des molécules de bleu de méthylène à des températures supérieures à la transconformation des carraghénanes. Cependant, l'adsorption des carraghénanes a également lieu en dessous de 40°C, bien que le pic à 663 nm ne soit pas modifié en raison d'une augmentation de la rigidité des chaînes de carraghénane (Garnier et al., 2003). Ces expériences confirment donc l'association des chaînes de carraghénane avec les micelles de caséines quelle que soit la conformation du carraghénane. Cette interaction est de nature électrostatique et s'opère au niveau de régions positives des caséines κ (Snoeren, 1976).

III. GELIFICATION EN PRESENCE D'UNE SEPARATION DE PHASES

III.1. Effet de la gélification d'au moins une des deux phases

III.1.1. Propriétés des gels en présence d'une séparation de phases

Lorsqu'une séparation de phases de type liquide-liquide entre deux polymères a lieu, la gélification a pour effet de diminuer voire de supprimer la mobilité de l'un ou des deux composants du mélange. Dans le cas des systèmes mixtes protéines de lait / polysaccharides, chacun des deux composés est susceptible de contribuer au réseau par gélification, seul ou en mélange. Il convient donc de distinguer trois cas (Figure 31 et Figure 32) :

- les gels **particulaires**, mettant en œuvre l'association de particules. Dans le cas des gels laitiers acides, les particules résultent de l'agrégation des micelles de caséines (paragraphe I.2 de ce chapitre) et peuvent être pontées par l'intermédiaire des protéines sériques lorsqu'un traitement thermique suffisant a été appliqué (paragraphe I.3.1 de ce chapitre) ;

- les gels mixtes de **polymères à chaîne étendue** (Morris, 1986). En considérant la participation de l'un ou des deux polymères à la formation du réseau, une distinction peut être faite entre les réseaux dits « simples », structurés par un seul composant, et les réseaux dits « composés » formés à partir des deux polymères ;

- Au sein des réseaux « simples », les phénomènes de volume exclu sont les plus fréquents, une miscibilité parfaite entre les deux polymères étant peu probable.

- L'organisation d'un réseau « composé » dépend notamment des interactions entre les polymères, des conditions de mélange ainsi que des cinétiques de formation du réseau. Plusieurs cas peuvent être envisagés :

- les réseaux *interpénétrés*, constitués de deux réseaux indépendants n'interagissant qu'au travers d'enchevêtrements. En raison de l'incompatibilité de la majorité des polymères entre eux, un effet de volume exclu est souvent mis en évidence.

- les réseaux *couplés*, qui nécessitent une interaction de type associatif entre les deux polymères. Trois cas peuvent alors se présenter :

- incapables de gélifier seuls, les polymères en mélange peuvent former un réseau couplé grâce à leur interaction ;

- seul un polymère est gélifiant, le réseau est partiellement couplé grâce aux interactions intrapolymères et interpolymères ;

- les deux polymères peuvent gélifier séparément, permettant de combiner à la fois les interactions individuelles de chaque polymère gélifiant et celles des deux polymères entre eux.

- les gels mixtes remplis mettant en œuvre des **particules** et **des polymères à chaîne étendue**. En fonction de la capacité à gélifier de chacun des composants, différents cas peuvent être distingués :

- les particules peuvent s'agréger alors que le polymère est non gélifiant. Cette situation conduit classiquement au phénomène de déplétion-floculation, en incluant toutefois l'effet de la gélification. Il sera traité en détail dans le paragraphe III.1 de ce chapitre ;

- le polymère est gélifiant alors que les particules sont inertes. Comme l'illustre la Figure 32, les particules ne gênent pas la mise en place du réseau et ont un rôle de remplissage du gel par occupation de l'espace si la fraction volumique des particules est suffisamment faible ;

- lorsque les particules s'agrègent en parallèle de la formation d'un gel par le polymère, deux réseaux se forment, ce qui relève du cas des réseaux interpénétrés ;

- aucun composant n'a la capacité de gélifier individuellement. Les interactions de nature associatives entre les particules et les polymères aboutissent à un mécanisme de pontage qui structure le système ;

- la combinaison de l'agrégation des particules et d'un phénomène de gélification additionné ou non de pontage du polymère sur les particules donne lieu à un système complexe. En effet, le pontage peut perturber l'agrégation des particules pour des raisons stériques.

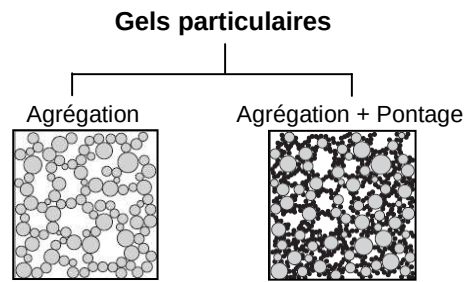


Figure 31 : Représentation schématique des types de gels particuliers, mettant en œuvre l'association de particules (adapté de Michon et al., 2010)

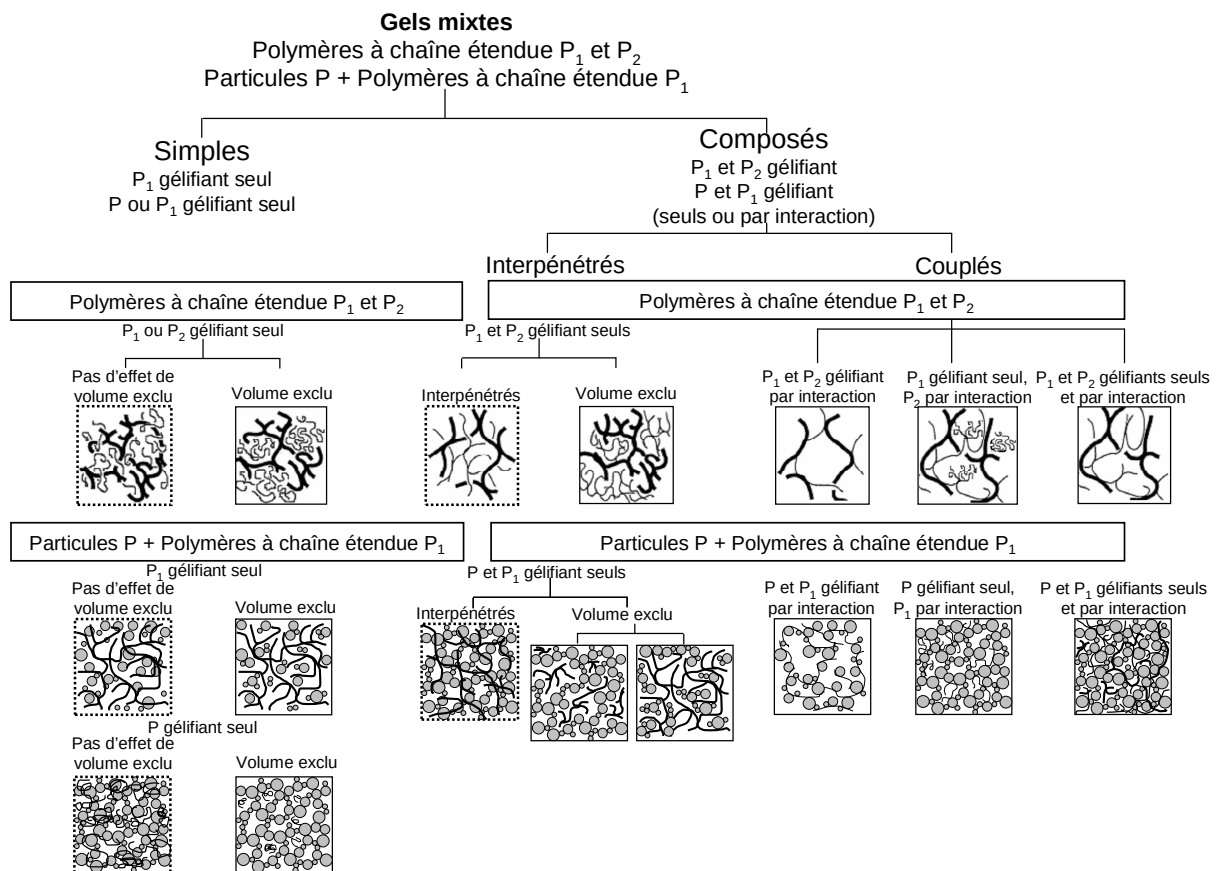


Figure 32 : Représentation schématique des différents types d'organisation des gels mixtes de particules et de polymères à chaîne étendue. Les échelles ne sont pas respectées. Les schémas entourés en pointillés représentent des cas rares et peu probables. P : particules ; P_1 et P_2 : polymères à chaîne étendue (adapté de Michon et al., 2010 ; Michon, 1995 ; Morris, 2006)

Seuls les travaux sur les gels formés à partir d'un polymère gélifiant et d'un second polymère non gélifiant seront décrits dans cette synthèse, puisque c'est le cas des mélanges étudiés dans ce travail.

Sur la base de la classification des gels mixtes, il convient de distinguer les gels protéiques des gels de polysaccharides à chaîne étendue. Alors que la grande majorité des gels protéiques sont produits par agrégation des protéines, par exemple au moyen d'un traitement thermique ou d'une acidification, la gélification des polysaccharides à chaîne étendue tels que les carraghénanes est souvent associée à un changement de conformation (Renard et al., 2006). Il est à noter que la gélatine, protéine d'origine animale, constitue un cas particulier. Elle subit une transition pelote-hélice qui permet l'association des chaînes entre elles et à ce titre, se comporte davantage comme un polysaccharide à chaîne étendue gélifiant.

Lorsqu'une seule phase du système mixte gélifie, la répartition des fractions volumiques de chacune des phases a un rôle déterminant sur les propriétés mécaniques. En effet, si le polymère gélifiant constitue la phase continue, des particules liquides enrichies par l'autre polymère seront dispersées dans une matrice solide. En revanche, si la phase dispersée est gélifiée, le système possédera des propriétés semblables à une suspension de particules solides (Frith, 2010 ; Foster et al., 1997).

De manière générale, l'ajout d'un polysaccharide à un gel produit un effet antagoniste ou de synergie sur les propriétés du gel résultant. L'effet antagoniste se traduit par un affaiblissement du gel obtenu à partir du mélange par rapport aux biopolymères pris individuellement. Une séparation de type ségrégatif peut limiter l'agrégation protéique ou plus spécifiquement la connexion entre les agrégats de protéines, ce qui aboutit à une diminution de l'élasticité des gels. En présence d'interactions associatives, une neutralisation des complexes peut favoriser leur insolubilité et donc la formation d'agrégats au détriment de la formation d'un réseau (Bertrand & Turgeon, 2007 ; Bertrand, 2008). Au contraire, l'effet de synergie aboutit à un renforcement du gel en raison d'une augmentation de la réticulation du gel et donc de la densité du réseau. Généralement, ce phénomène est lié à des effets d'exclusion de volume et de redistribution du solvant entre les deux phases (Tolstoguzov, 1995). En effet, la séparation de phases entre protéines et polysaccharides est accompagnée d'une répartition inégale du solvant, avec l'apparition d'une phase concentrée en protéines en équilibre avec une phase riche en polysaccharides. La concentration locale en protéines augmente ainsi la connectivité des particules protéiques (Zasyrkin et al., 1997 ; Tolstoguzov, 2007).

III.1.2. Effet de la gélification sur la séparation de phases

Au sein des systèmes mixtes, la gélification peut avoir deux types d'effet contradictoire sur la séparation de phases, soit en intensifiant l'apparition des deux phases, soit en ralentissant voire en

bloquant ce phénomène. Les limites de co-solubilité, c'est-à-dire la position de la binodale sur le diagramme de phases, peuvent ainsi être déplacées lors de la gélification d'un polymère.

Ainsi, dans certains cas, la séparation de phases a lieu à des concentrations plus faibles lorsqu'elle est accompagnée d'une gélification. A titre d'exemple, un mélange constitué de 2% de gélatine et 2% de dextrane est miscible en conditions non gélifiantes, alors qu'une séparation de phases apparaît consécutivement au changement de conformation de la gélatine (Tromp et al., 2004). Par ailleurs, il est à noter que la concentration critique de gélification diminue dans un système mixte par rapport à un système binaire polymères / solvant, ce qui est notamment le cas des mélanges gélatine / maltodextrine, dextrane ou alginate (Zasytkin et al., 1997).

Un décalage de la zone de compatibilité a été observé dans des mélanges gélatine / amidon et gélatine / maltodextrine suite à la gélification de la gélatine (Figure 33) (Lundin et al., 2000).

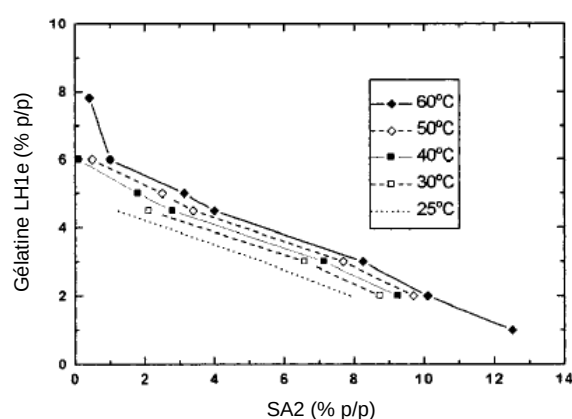


Figure 33 : Diagramme de phases du système gélatine « limed hide » (LH1e, type B) / maltodextrine (SA2) / eau dans 0,1 M NaCl à différentes températures obtenu à partir de mesures de turbidité à une vitesse de refroidissement de 1°C/min (d'après Lundin et al., 2000)

Lorsque la température diminue de 60°C à 25°C, la contribution de l'entropie du mélange diminue et à partir de 40°C, la gélatine subit une transition de la conformation pelote à la conformation hélice, chaque macromolécule de gélatine occupant un volume beaucoup plus grand lorsqu'elle est en conformation hélice. Ces deux facteurs entraînent une augmentation de l'incompatibilité de la maltodextrine vis-à-vis de la gélatine. Par ailleurs, la formation d'un gel influence non seulement le positionnement de la binodale, mais aussi la capacité du système à atteindre l'état d'équilibre. En effet, l'augmentation de la rigidité des chaînes diminue considérablement la mobilité des polymères, jusqu'à leur emprisonnement dans le réseau gélifié. Par conséquent, la gélification peut intervenir comme un événement perturbateur de la séparation de phases.

De nombreuses études ont décrit la structure des gels formés par les mélanges de gélatine et d'autres polysaccharides tels que la maltodextrine (Kasapis et al., 1993 ; Lorén, 2001 ; Lundin et al., 2000), le dextrane (Tromp et al., 2004 ; Pacek et al., 2003) ou encore les protéines de lait (Hermansson et al., 1998). Comme illustré sur la Figure 34, la vitesse de refroidissement a une influence sur la structure microscopique du gel. Plus le gel se forme rapidement, plus la taille des inclusions de maltodextrine diminue, mettant en évidence un phénomène de séparation de phases incomplet, frustré par la gélification de la gélatine.

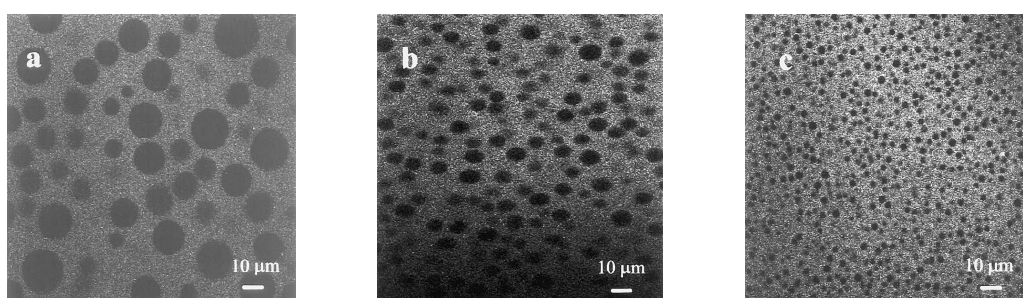


Figure 34 : Images obtenues en microscopie confocale montrant l'effet de la vitesse de refroidissement d'un mélange de 5% de gélatine « pig skin » (type A) et 4% de maltodextrine sur les microstructures. Les mélanges ont été chauffés à 60°C quelques minutes puis refroidis de 60°C à 10°C à des vitesses de refroidissement de (a) 0,2 ; (b) 1 ; (c) 10°C/min (d'après Lorén et al., 1999)

Une compétition a donc lieu entre la gélification qui tend à figer le système et la séparation de phases qui maintient le système en état de non équilibre (Frith, 2010 ; Lorén & Hermansson, 2000). Par conséquent, les cinétiques relatives de gélification et de séparation de phases ont un rôle clé sur les propriétés microstructurales du système (Figure 35).

Equilibre des cinétiques de séparation de phases et gélification	Phase gélifiante	
	Continue	Dispersée
$V_{sép} > V_{gél}$	a	b
$V_{sép} < V_{gél}$	c	d

Figure 35 : Influence des vitesses relatives de séparation de phases ($V_{sép}$) et de gélification ($V_{gél}$) sur la morphologie de gels mixtes à base d'un polymère gélifiant (avec quadrillage) et un autre polymère non gélifiant (sans quadrillage)

Lorsque la séparation de phases s'opère plus rapidement que la gélification, une structure sous la forme de gouttelettes, similaire à celle obtenue en absence de gélification, est obtenue (Figure 35a et b). Si les cinétiques de formation du gel et de séparation de phases sont proches, la séparation de phases se produit pendant la formation du gel, ce qui conduit à une compétition entre les deux phénomènes et à des microstructures variées. La dernière situation implique une gélification qui a lieu plus rapidement que la séparation de phases (Figure 35c et d). Dans ce cas, la séparation de phases est incomplète et le procédé de gélification a pour effet de stopper l'évolution de la structure biphasique dans un état intermédiaire de non équilibre. Si la phase continue est gélifiée, alors de petites inclusions liquides sont piégées dans le gel (Figure 35c). Au contraire, une suspension de petites particules gélifiées est observée lorsque la phase dispersée est gélifiante (Figure 35d). Il est à noter que pour l'ensemble de ces matrices, les gouttelettes peuvent sédimenter et/ou coalescer à différents degrés suivant le délai avant gélification et les paramètres déterminés par la loi de Stokes (Eq. 2).

Finalement, les facteurs clés qui déterminent les microstructures après gélification sont :

- le début de la séparation de phases et de la gélification ;
- les cinétiques relatives de séparation de phases et de gélification ;
- le contexte de gélification dans lequel la séparation de phases a lieu (notamment les concentrations en polymères, la viscosité des deux phases et la mobilité des polymères) (Lorén, 2001).

III.1.3. Gélification sous cisaillement de systèmes en présence d'une séparation de phases

De même que le blocage de l'évolution des structures suite à la formation d'un gel, l'application d'un cisaillement en présence d'une gélification constitue une seconde approche permettant de créer des structures bien définies.

III.1.3.1. Effet du cisaillement avant gélification

Lorsqu'un système présentant une séparation de phases est soumis à un cisaillement, il convient de distinguer différents cas en fonction de l'intensité du cisaillement appliqué.

D'une part, l'application d'une déformation suffisamment petite permet l'alignement des gouttelettes dans la direction du champ de cisaillement, sans engendrer de rupture des gouttelettes par instabilité de Rayleigh (Butler, 2002 ; Frith, 2010). Dans ce cas, l'intensité de déformation des gouttelettes est déterminée certes par la vitesse de cisaillement, mais aussi par la taille initiale des

gouttelettes, par le rapport de viscosité entre les deux phases et par la tension interfaciale. Ainsi, le degré d'asymétrie des particules dispersées augmente lorsque la vitesse de cisaillement est élevée. Cependant, si la vitesse de cisaillement reste constante, la déformabilité des particules dispersées est maximale lorsque la viscosité des deux phases est similaire, et augmente si la tension interfaciale diminue ou si le diamètre des gouttelettes augmente (Tolstoguzov, 1986).

D'autre part, au-dessus d'une vitesse de cisaillement critique, un équilibre entre la coalescence des gouttelettes et leur rupture par instabilité de Rayleigh conduit à une taille de gouttelettes stable tant que le cisaillement est mis en œuvre (van Puyvelde et al., 2003 ; Butler & Heppenstall-Bultler, 2003). Le système apparaît alors comme homogène macroscopiquement jusqu'à ce qu'il se déstabilise de nouveau après arrêt du cisaillement. A titre d'exemple, la binodale du mélange gélatine / dextrane déterminée en condition de repos et sous un cisaillement constant à 60 s^{-1} est montrée sur la Figure 36. Sous l'application d'un cisaillement, la zone de compatibilité monophasique s'agrandit, l'effet devenant plus significatif aux concentrations en polymères élevées (Antonov et al., 2012 ; Lundin et al., 2003).

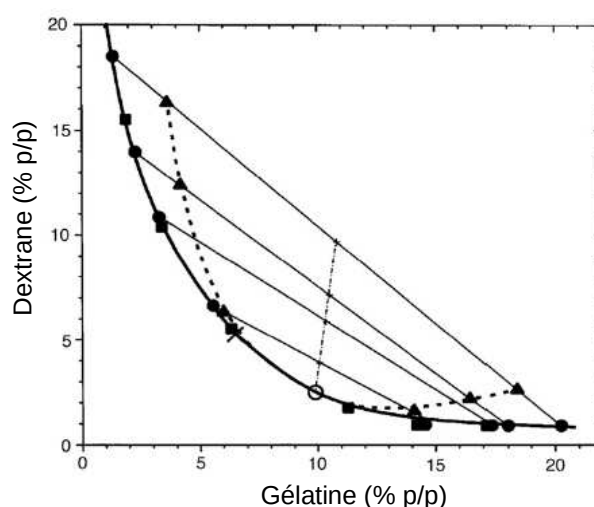


Figure 36 : Diagramme de phases du système gélatine / dextrane au repos (ligne entière) et sous un cisaillement constant de 60 s^{-1} (ligne en pointillés) à 45°C , avec une force ionique de $0,002 \text{ M}$ et à $\text{pH } 5$ (d'après Antonov et al., 2003)

III.1.3.2. Effet du cisaillement pendant la gélification

Lorsqu'un facteur de cisaillement se superpose à la combinaison des mécanismes de séparation de phases et de gélification, la considération des propriétés physiques des gouttelettes est essentielle pour prédire et interpréter les structures formées. En présence d'une gélification, les gouttelettes sous cisaillement deviennent plus résistantes à la rupture et se rétractent en raison d'une modification de la

rhéologie des gouttelettes et d'une augmentation de la tension interfaciale (Foster et al., 1997 ; Wolf et al., 2001).

Dans certains cas, l'effet combiné d'un cisaillement et d'une gélification peut conduire à une inversion de phases. En condition de repos, la phase continue est constituée par le polymère ayant la fraction volumique la plus élevée. Cependant, lorsque le mélange est soumis à un champ de cisaillement suffisamment élevé pendant la gélification, la phase continue constituée du polymère gélifiant devient la phase dispersée. Il est à noter que cette inversion de phases se produit pour des fractions volumiques de phase continue avant inversion atteignant 75% dans le cas de mélanges gélatine / amidon ou maltodextrine (Foster et al., 1996 ; Foster et al., 1997). Ce phénomène d'inversion de phases est en général associé à l'augmentation de la viscosité au cours de la gélification de la phase continue riche en gélatine. La viscosité devient ainsi supérieure à celle de la phase riche en amidon ou en maltodextrine.

La compréhension de la relation entre la morphologie des gouttelettes et l'histoire thermomécanique appliquée pendant le procédé de fabrication est d'un intérêt tout particulier. Les mélanges de biopolymères constituent des systèmes idéaux en raison de leur évolution structurale lente, qui permet au gel de se former dans un champ de cisaillement suffisamment faible pour éviter la rupture des gouttelettes ou la destruction de la structure biphasique (Norton & Frith, 2001 ; Turgeon et al., 2003). Néanmoins, la formation de morphologies variées implique des conditions à satisfaire et parmi elles, une faible différence de viscosité entre les deux phases, une faible tension interfaciale ainsi qu'une transition sol-gel rapide sous cisaillement. En effet, dans le cas extrême, une gélification lente conduit à une relaxation complète de la forme de la gouttelette et à la formation de particules sphériques gélifiées (Tolstoguzov, 1986 ; Wolf et al., 2001).

La déformation d'une émulsion eau dans eau au cours de la gélification de l'une ou des deux phases donne naissance à un matériau anisotrope possédant une structure fibrillaire ou lamellaire. La structure du matériau dépend certes des conditions de cisaillement, mais aussi de la fraction volumique de la phase gélifiante. Lorsque la phase continue gélifie, une structure capillaire remplie de fibres orientées liquides est formée (Tolstoguzov, 1986). En revanche, si le polymère gélifiant constitue la phase dispersée, trois cas sont à envisager en fonction de la concentration en gouttelettes dispersées (Figure 37) (Tolstoguzov, 1986 ; Tolstoguzov, 2003).

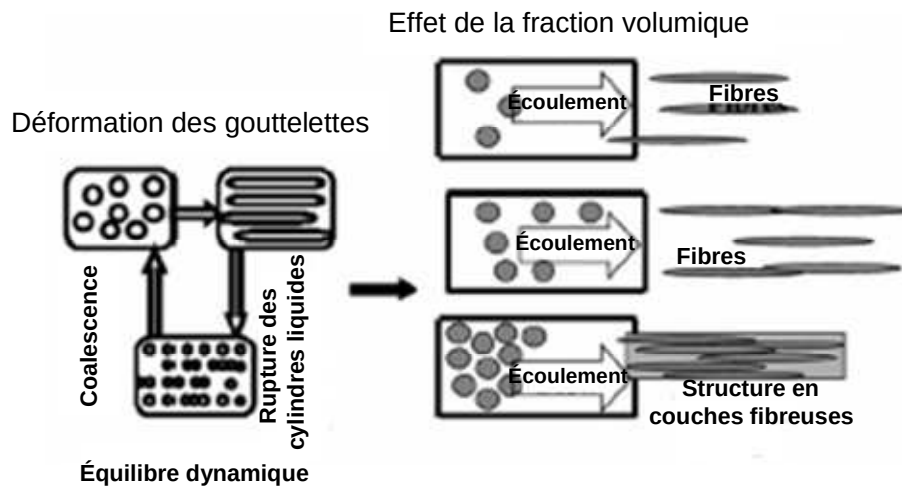


Figure 37 : Schéma général de la déformation de particules dispersées au sein d'une émulsion eau dans eau sous cisaillement (d'après Tolstoguzov, 2003)

Une faible fraction volumique de gouttelettes liquides dispersées résulte en des fibres individuelles de volume identique aux gouttelettes initiales. Lorsque la concentration en particules dispersées augmente, la coalescence des gouttelettes conduit à une élongation des fibres. Aux fractions volumiques en gouttelettes élevées, la coalescence des particules a lieu à la fois dans la direction du champ de cisaillement et celle perpendiculaire, ce qui aboutit à une structure en couches de structures fibreuses.

D'un point de vue rhéologique, la contribution des gouttelettes gélifiées à la viscosité du système est variable selon leur morphologie. Les suspensions de particules gélifiées allongées sont davantage rhéofluidifiantes et possèdent une viscosité aux faibles contraintes de cisaillement plus élevée que les solutions de particules sphériques. Ainsi, les particules sphériques gélifiées confèrent des propriétés liquides presque Newtoniennes alors que la présence de filaments gélifiés apporte un seuil d'écoulement important aux petites vitesses de cisaillement (Figure 38) (Norton & Frith, 2001). Par ailleurs, il est important de garder à l'esprit que les particules allongées sont flexibles, ce qui leur confère une possibilité d'alignement dans le champ de cisaillement aux vitesses de cisaillement élevées (Wolf et al., 2002 ; Norton & Frith, 2003).

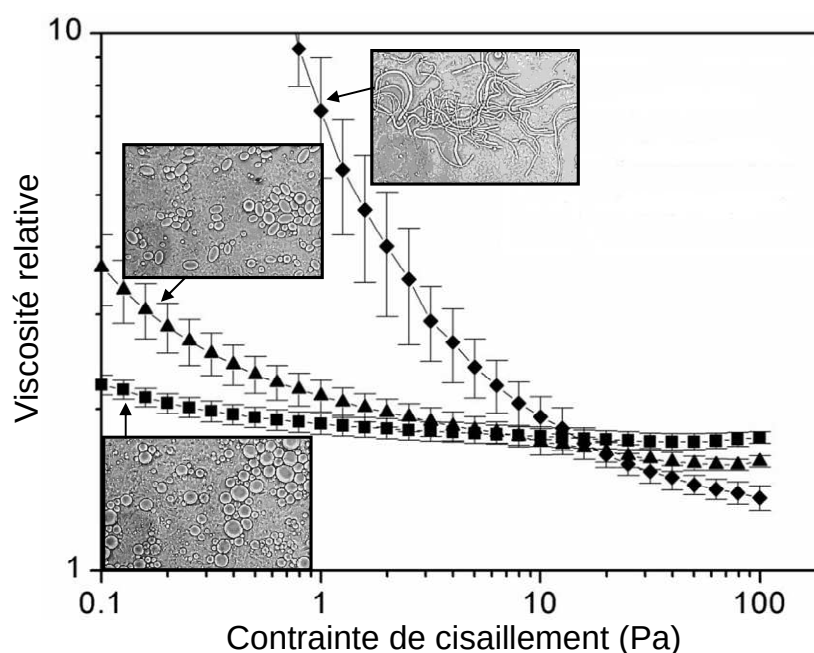


Figure 38 : Viscosité relative de suspensions de différentes particules de gels de fraction volumique constante en fonction de la contrainte de cisaillement. Les images au microscope montrent les trois types de particules de forme sphérique, ovoïde ou très allongée (d'après Norton & Frith, 2001)

III.1.3.3. Effet du cisaillement après la gélification

Sous l'application d'un cisaillement à la suite de la gélification des gouttelettes dispersées, les inclusions gélifiées peuvent s'agréger en des agrégats de plus grande taille ou se rompre. La taille des agrégats est contrôlée à la fois par un choix approprié de la vitesse de cisaillement, et des temps relatifs de début de gélification et de cisaillement (Pacek et al., 2003 ; Foster et al., 1997).

III.2. Gélification de mélanges protéines de lait / polysaccharides en présence d'une séparation de phases

A la différence des déstabilisations dans les mélanges protéines de lait / polysaccharides ou des mécanismes de la formation des gels acides, la combinaison d'une gélification acide en présence d'une séparation de phases a fait l'objet de moins d'études dans la littérature. En effet, la transformation du lait en gel est accompagnée d'un ensemble de changements physico-chimiques responsables d'une complexité supplémentaire, et notamment une solubilisation du phosphate de calcium ainsi qu'une modification de la charge et de la structure micellaire (paragraphe I.2 de ce chapitre).

III.2.1. Propriétés des gels acides en présence d'une séparation de phases

De la même manière que dans le cas des mélanges protéines de lait / polysaccharides en milieu non acidifié, une classification entre les polysaccharides neutres et chargés peut être effectuée (Figure 19) (Everett & McLeod, 2005).

III.2.1.1. Gélification acide des mélanges protéines de lait / polysaccharides neutres

Quel que soit le pH du milieu, les polysaccharides neutres tels que les galactomannanes ou les β -glucanes ne sont pas capables de s'associer avec les micelles de caséines (Tableau 3 et Tableau 6). Il s'ensuit qu'un phénomène de déplétion-floculation entre les protéines et les polysaccharides intervient, y compris lors de l'acidification.

Tableau 6 : Récapitulatif des principales études effectuées sur les mélanges polysaccharides neutres / protéines de lait en milieu acidifié. Le type de phénomène est donné tel que décrit par les auteurs.

Polysaccharide	Protéine	Conditions (méthode d'acidification, pH du gel, température d'acidification)	Phénomène	Références
Guar				
	Lait écrémé	Ferments, pH 4,25, 30°C	Déplétion-floculation	Everett & McLeod, 2005
Caroube				
	Lait écrémé	GDL, pH 4,6, 42°C	Déplétion-floculation	Sanchez et al., 2000
		Ferments, pH 4,25, 30°C	Déplétion-floculation	Everett & McLeod, 2005
	Caséinates de sodium	GDL, pH 4,6, 10°C	Incompatibilité thermodynamique	Perrechil et al., 2009
β-glucanes				
	Lait écrémé	Ferments, pH 4,5, 42°C	Incompatibilité thermodynamique	Vasiljevic et al., 2007
	Lait écrémé	GDL, pH 4,8, 42°C	Incompatibilité thermodynamique (déplétion-floculation)	Lazaridou et al., 2008

Sur la base d'observations microscopiques et de mesures rhéologiques, Sanchez et al. (2000) et Everett & McLeod (2005) ont montré que l'ajout de faibles concentrations en caroube ou guar (jusqu'à 0,1%) induit une structure spongieuse constituée d'agrégats protéiques compacts (Figure 39), aboutissant à une augmentation de la synérèse et à une diminution de la viscosité après brassage. La microstructure qui en résulte serait à l'origine d'un équilibre entre l'agrégation des protéines lors de la diminution de pH et les effets d'exclusion de volume provoqués par la floculation par déplétion des micelles de caséines (Sanchez et al., 2000).

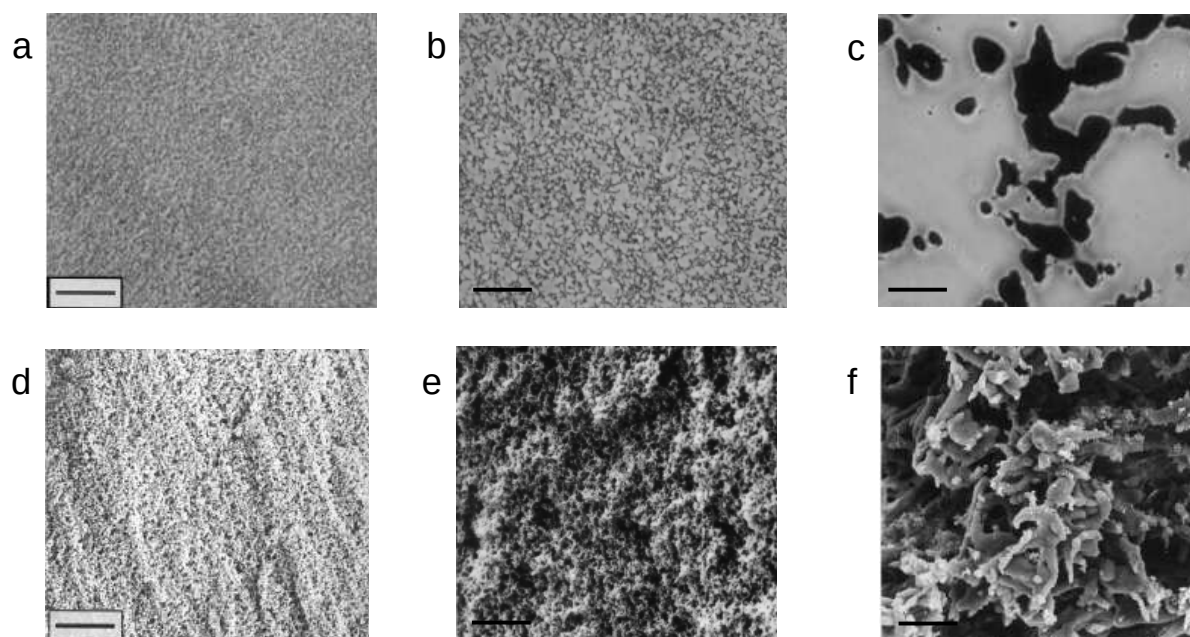


Figure 39 : Images obtenues en microscopie optique à contraste de phase (a, b, c) et en microscopie électronique à balayage (d, e, f) de gels laitiers à base de lait écrémé à pH 4,6 enrichis en caroube à (a et d) 0,001% ; (b et e) 0,02% ; (c et f) 0,1%. Les agrégats protéiques apparaissent en clair. Les barres représentent 40 μm (d'après Sanchez et al., 2000)

A des concentrations en polysaccharides élevées, des agrégats protéiques compacts sont piégés dans une phase continue enrichie en polysaccharides (Everett & McLeod, 2005 ; Perrechil et al., 2009). Ainsi, l'incorporation de 0,5% de guar ou de 2% de β -glucanes empêcherait la formation d'un réseau protéique tel que présent dans les gels laitiers acides classiques, en interférant avec le processus d'agrégation des micelles de caséines. Dans ce cas particulier, les propriétés rhéologiques du système sont proches de celles d'une solution enrichie en polysaccharides (Everett & McLeod, 2005 ; Perrechil et al., 2009 ; Lazaridou et al., 2008).

III.2.1.2. Gélification acide des mélanges protéines de lait / polysaccharides chargés

Malgré un phénomène de déplétion-floculation décrit pour la majorité des mélanges protéines de lait / polysaccharides chargés constaté au pH du lait (6,7), de nombreux auteurs observent des phénomènes d'association entre les deux composés lorsque la gélification acide conduit le système à un pH situé en dessous du point isoélectrique des protéines (Tableau 7).

Tableau 7 : Récapitulatif des principales études effectuées sur les mélanges polysaccharides chargés / protéines de lait en milieu acidifié. Le type de phénomène est donné tel que décrit par les auteurs.

Polysaccharide	Protéine	Conditions (méthode d'acidification, pH du gel, température d'acidification)	Phénomène	Références
Xanthane	Densité de charges : 0,25 mol / mol de monosaccharide			
	Lait écrémé	GDL, pH 4,6, 40°C	Déplétion-floculation	Aichinger et al., 2007
		Ferments, pH 4,25, 30°C	Déplétion-floculation	Everett & McLeod, 2005
		GDL, pH 4,6, 42°C	Interactions non spécifiques	Sanchez et al., 2000
	Caséinates de sodium	HCl, pH 2,7, 37°C	Interactions électrostatiques	Kobori et al., 2009
		HCl, pH 4,2, 37°C	Agrégation des caséinates le long du xanthane	Kobori et al., 2009
		GDL, pH 4,6, 10°C	Réseau principal de caséinates avec inclusions de molécules de xanthane regroupées	Braga & Cunha, 2004
Gellane	Densité de charges : 0,25 mol / mol de monosaccharide			
	Caséinates de sodium	GDL, pH 4, 10°C	Interactions électrostatiques	Franco Picone & Cunha, 2010
Pectines	Densité de charges : pectines HM : 0,3 ; LM : 0,65 mol / mol de monosaccharide			
HM (DE 73%)	Lait écrémé	HCl 5 mol.L ⁻¹ , pH 5,3	Adsorption	Marozienne & de Kruif, 2000
LM		GDL, pH 4,6, 25°C	Complexation	Harte et al., 2007
		Ferments, pH 4,25, 30°C	Adsorption	Everett & McLeod, 2005
LM (DE 35%)		HCl 5 mol.L ⁻¹ , pH 5,3	Adsorption	Marozienne & de Kruif, 2000
LMA (DE 35% et amidé à 20%)		HCl 5 mol.L ⁻¹ , pH 5,3	Adsorption	Marozienne & de Kruif, 2000
LMA (DE 28% et amidé à 18%)		GDL, pH 4,6, 30°C	Association	Kouame et al., 2010
HM (DE 68%)	Caséinates de sodium	Acide citrique 1 mol.L ⁻¹ , pH < 6	Complexation	Rediguiéri et al., 2007
LMA (DE 31% et amidé à 17%)		GDL, pH 4, 25°C	Complexation	Matia-Merino et al., 2004
EPS	Densité de charges : variable			
Non précisé	Lait écrémé	Ferments, pH 4,3, 40°C	Déplétion-floculation	Hassan et al., 2003
Neutre (dextrane)	Lait écrémé	Ferments, pH 4,6, 37°C	Déplétion-floculation	Mende et al., 2013
Anionique linéaire	Lait écrémé	Ferments, pH 4,6, 42°C	Interactions électrostatiques	Gentès et al., 2011
Anionique	Lait écrémé	Ferments	Interactions associatives	Girard & Schaffer-Lequart, 2007
Anionique	Caséinates	HCl 0,01 mol.L ⁻¹ , pH 4,5	Interactions associatives	Girard & Schaffer-Lequart, 2008
Carraghénane	Densité de charges : kappa : 0,5 ; lambda : 1,5 mol / mol de monosaccharide			
Kappa	Lait écrémé	Ferments, pH 4,6, 44°C	Interactions associatives	Kalab & Emmons, 1975
Lambda	Lait écrémé	Ferments, pH 4,25, 30°C	Adsorption	Everett & McLeod, 2005

III.2.1.2.1. Cas du xanthane

Etant donné la faible densité de charges du xanthane et la rigidité de sa chaîne, les mécanismes de déplétion-floculation observés pour les galactomannanes sembleraient, de prime abord, également applicables au xanthane dans les gels laitiers acides (Everett & McLeod, 2005 ; Aichinger et al., 2007). Cependant, une structure très organisée sous forme de fibres riches en particules de caséines a été observée lors de l'ajout de 0,02% et 0,1% de xanthane (Figure 40) (Sanchez et al., 2000).

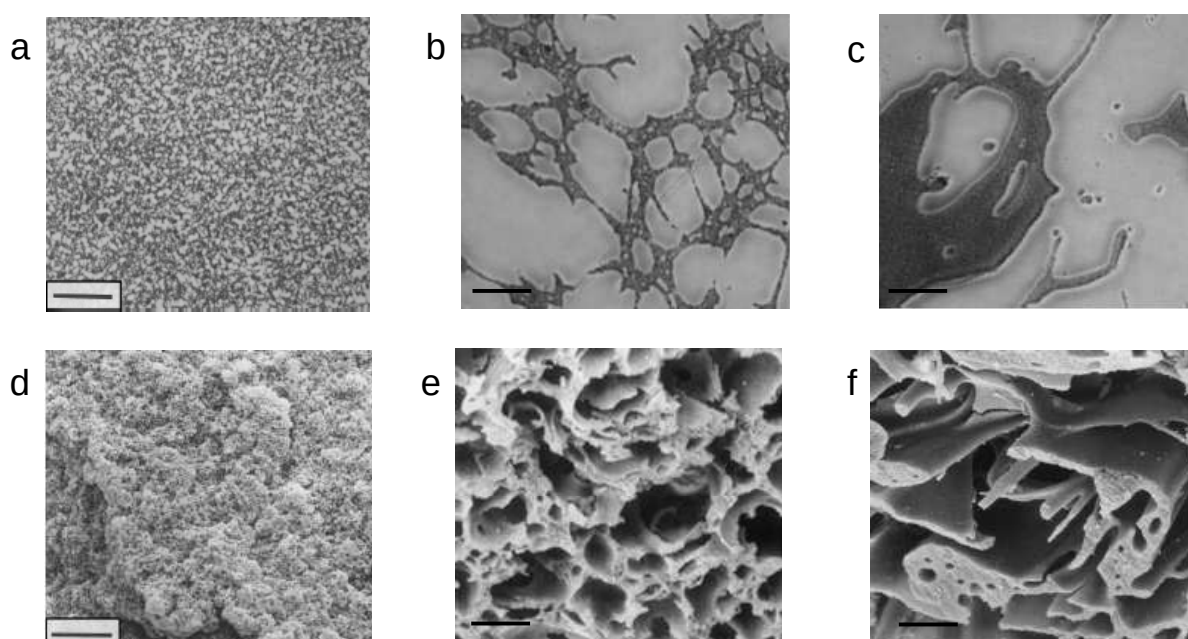


Figure 40 : Images obtenues en microscopie optique à contraste de phase (a, b, c) et en microscopie électronique à balayage (d, e, f) de gels laitiers à base de lait écrémé à pH 4,6 enrichis en xanthane à (a et d) 0,001% ; (b et e) 0,02% ; (c et f) 0,1%. Les agrégats protéiques apparaissent en clair. Les barres représentent 40 μm (d'après Sanchez et al., 2000)

L'origine de cette microstructure particulière pourrait être liée à la combinaison de deux phénomènes : un mécanisme de déplétion-floculation se produisant avant acidification et des interactions non spécifiques entre le xanthane chargé négativement et les micelles de caséines, de moins en moins chargées négativement au cours du procédé d'acidification (Sanchez et al., 2000 ; Laneuville et al., 2000). Par ailleurs, Kobori et al. (2009) ont constaté la présence d'interactions entre les caséinates de sodium et le xanthane à pH 2,7 mais leur absence à pH 5,1 et 6,6 (Figure 41).

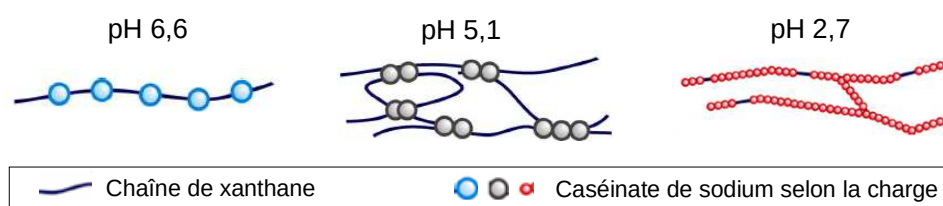


Figure 41 : Représentation schématique des interactions entre les caséinates de sodium et le xanthane en fonction du pH. A pH 6,6, les caséinates sont faiblement associés aux chaînes de xanthane au moyen d'interactions hydrophobes. A pH 5,1, une agrégation des caséinates le long de la chaîne de xanthane permet des interactions intra-chaînes. A pH 2,7, les caséinates se chargent positivement et s'associent au xanthane par des interactions électrostatiques. Les couleurs des caséinates de sodium représentent les charges électrostatiques en surface (bleu : charge négative ; gris : charge neutre ; rouge : charge positive). La taille plus petite des caséinates à pH 2,7 indique la modification des protéines par l'acidification (d'après Kobori et al., 2009)

Alors que les caséinates sont liés de manière individuelle au xanthane au travers d'interactions hydrophobes à pH neutre, une structure fibrillaire se forme à pH 2,7 suite à des interactions associatives entre les deux composés de charges opposées (Kobori et al., 2009).

III.2.1.2.2. *Cas des pectines*

A travers son rôle dans la modification des charges des protéines, le pH est un facteur clé responsable des interactions électrostatiques entre les protéines et les pectines. Ainsi, l'adsorption des pectines LM et HM est rendue possible lorsque le pH est inférieur à 5,3 (Marozienne & de Kruif, 2000 ; Tuinier et al., 2002), ce phénomène agissant comme une barrière stérique à l'agrégation des micelles de caséines. Comme illustré sur la Figure 18, un phénomène de floculation par pontage suivi d'une déstabilisation par déplétion-floculation et d'une stabilisation stérique se produit pour des concentrations en pectines croissantes. Par ailleurs, des études rhéologiques mettent en évidence un affaiblissement du gel lors de l'ajout de pectines, qui peut aboutir à une absence de la connectivité du réseau protéique lorsque le recouvrement des micelles de caséines par les chaînes de pectines est total (Matia-Merino et al., 2004 ; Everett & McLeod, 2005).

Contrairement aux pectines HM, la gélification des pectines LM est induite par les ions calcium. Au cours de l'acidification, une quantité croissante d'ions calcium migre des micelles de caséines vers le lactosérum, se rendant ainsi disponible pour se lier à la pectine et assurer sa gélification (Gaucheron et al., 2004 ; Harte et al., 2007 ; Arltoft et al., 2006). Ce réseau gélifié supplémentaire contribue à une augmentation de la fermeté du gel (Matia-Merino et al., 2004). Finalement, le réseau tridimensionnel résultant relève de la combinaison des interactions caséines-caséines suite à leur gélification acide, des interactions pectines-pectines à travers leur liaison avec le

calcium, ainsi que des complexes caséines-pectines formés au cours de l'acidification (Figure 42) (Matia-Merino & Singh, 2007 ; Harte et al., 2007).

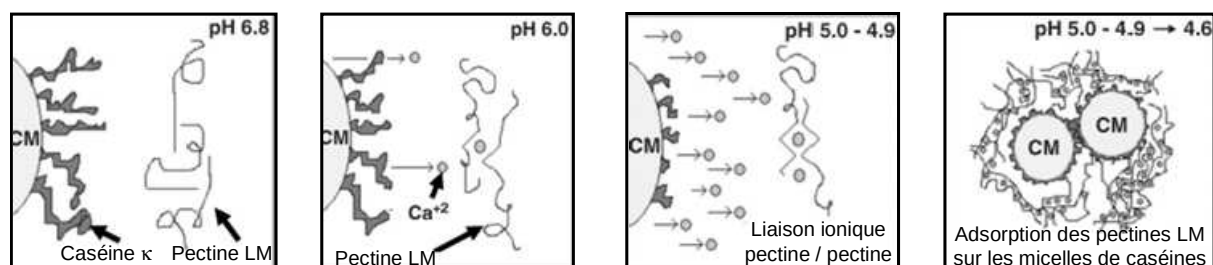


Figure 42 : Modèle d'interaction entre les micelles de caséines (CM) et la pectine LM lors de l'acidification du lait (d'après Harte et al., 2007)

III.2.1.2.3. Cas des carraghénanes

Bien que très étudiées dans les desserts laitiers neutres, les interactions entre les carraghénanes et les protéines de lait sont beaucoup moins abordées au sein des gels acides puisque les carraghénanes sont hydrolysées par dépolymérisation de la chaîne osidique lorsque le pH diminue. Ce polysaccharide n'est donc pas adapté à la formulation de gels acides. Cependant, il semble que la complexation des carraghénanes avec la caséine κ des micelles de caséines ayant lieu à pH neutre apparaît également après gélification acide et pourrait même s'accroître à mesure que le pH décroît. Une étude rhéologique des propriétés des gels acides brassés enrichis en lambda-carraghénane a mis en évidence l'implication de mécanismes d'interactions similaires à ceux de la pectine LM (Everett & McLeod, 2005). Lorsque la concentration en lambda-carraghénane augmente, un phénomène d'adsorption, de déplétion-floculation puis de stabilisation stérique partielle avec une faible agrégation des caséines a lieu, sans toutefois intégrer d'interactions carraghénane / carraghénane en raison de la conformation pelote de la chaîne (Everett & McLeod, 2005). Par ailleurs, des observations microscopiques de gels laitiers acides ont montré la formation de fibres longues et fines connectées avec des agrégats de micelles de caséines lors de l'ajout de kappa-carraghénane (Kalab & Emmons, 1975), confirmant la présence d'interactions associatives.

III.2.2. Effet de la gélification sur la séparation de phases de mélanges protéines de lait / polysaccharides

Aucune étude dans la littérature ne mentionne un effet d'intensification du phénomène de séparation de phases lors de la gélification acide des protéines de lait. Toutefois, il est probable que l'augmentation de la taille des micelles de caséines au cours de leur gélification accentue le mécanisme de déplétion-floculation dans les mélanges protéines / polysaccharides (Tan et al., 2007).

Dans les mélanges mixtes de biopolymères sujets à la fois à une séparation de phases et à une gélification, les vitesses relatives de ces deux événements contribuent aux macrostructures et microstructures finales. En effet, les phénomènes de séparation de phases sont susceptibles d'être bloqués par la prise en gel de la phase protéique (traitement thermique dans le cas des protéines sériques, gélification acide ou présure dans le cas des micelles de caséines) ou de la phase polysaccharidique si celui-ci est gélifiant. Une vitesse de séparation de phases rapide diminue les propriétés rhéologiques du gel, jusqu'à empêcher la formation du gel protéique et provoquer une inversion de phases dans le cas d'un rapport polysaccharides / protéines élevé (Rediguieri et al., 2007 ; Everett & McLeod, 2005 ; Aichinger et al., 2007 ; Acero Lopez et al., 2009 ; Perrechil et al., 2009). En revanche, si à une concentration en polysaccharides suffisamment faible, le procédé de gélification se produit plus rapidement que le mécanisme de séparation de phases, alors la gélification fige le système dans les premiers stades de la séparation de phases par une diminution importante puis une suppression de la mobilité des molécules. Cet effet aboutit à une structure présentant une micro-séparation de phases et contenant des inclusions de polysaccharides dispersées dans un réseau protéique continu (Perrechil et al., 2009 ; Acero Lopez et al., 2009 ; Syrbe et al., 1998).

Dans le cas d'interactions entre les polysaccharides chargés et les protéines, la microstructure dépend de la possibilité de complexation entre les composants et donc de leur densité de charges respective (de Jong et al., 2009 ; de Jong & van de Velde, 2007). Une complexité supplémentaire intervient alors en raison de la migration du polysaccharide chargé vers la phase protéique à mesure que le pH décroît. Lors d'un mélange pectines HM / caséinates, une acidification lente aboutit à la formation de particules sphériques, alors qu'elles perdent leur sphéricité lorsque le pH chute rapidement (Figure 43A) (Rediguieri et al., 2007). En effet, la diffusion des molécules de pectines au travers des deux phases puis leur adsorption sur les caséinates nécessite un certain temps pour s'établir. Par conséquent, seule une partie des caséinates est stabilisée par les pectines en condition d'acidification rapide. Cette situation se produit également lorsque la concentration en pectines n'est pas suffisante pour stabiliser l'ensemble des caséinates (Figure 43B et C).

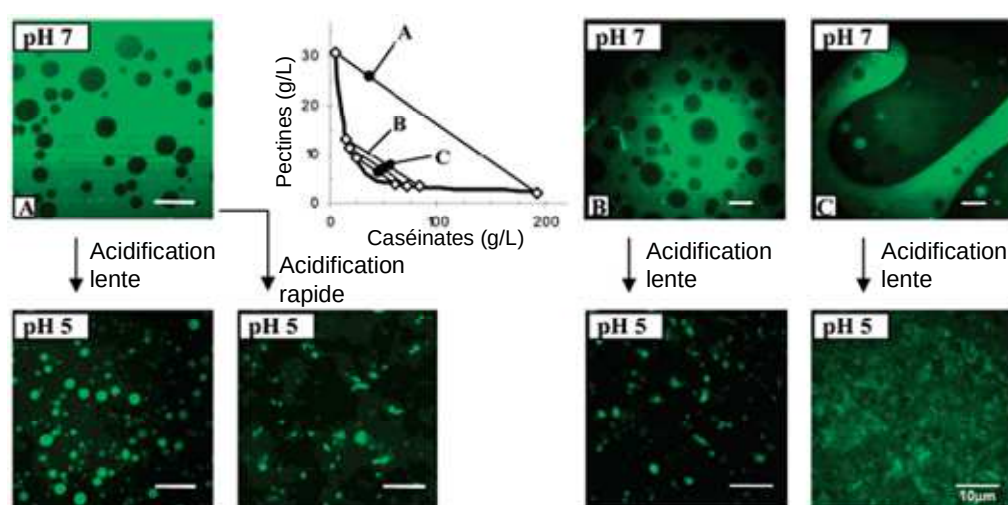


Figure 43 : Images obtenues en microscopie confocale de mélanges de pectines / caséinates à trois positions différentes du diagramme de phases (A, B et C), avant et après acidification. Les barres représentent 10 μm . Les zones claires correspondent aux phases riches en pectine (d'après Redigueri et al., 2007)

Une autre stratégie a permis également de moduler la vitesse de gélification, en modifiant soit la température d'acidification, soit la concentration en GDL de gels de protéines sériques obtenus après acidification à froid d'agréats prétraités thermiquement (de Jong et al., 2009).

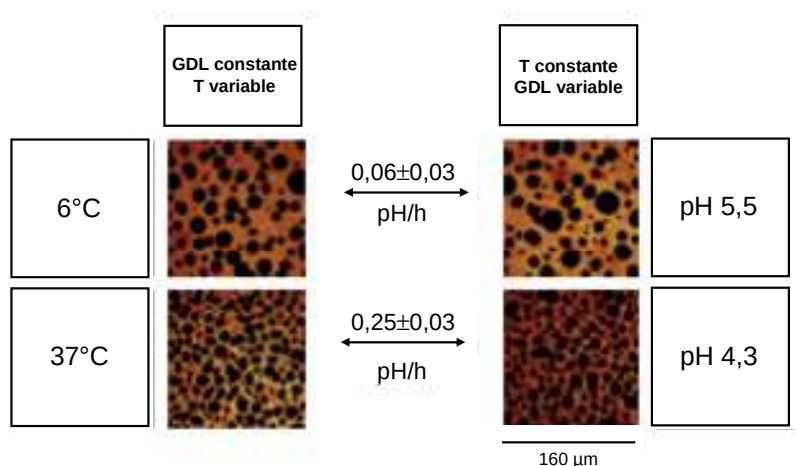


Figure 44 : Microstructure de gels mixtes de 3% d'isolat de protéines sériques et 0,1% de caroube obtenus à des vitesses d'acidification équivalentes soit par modification de la température d'incubation (T), soit en changeant la concentration en GDL (0,22 ou 0,36% p/p) (d'après de Jong et al., 2009)

Pour une vitesse d'acidification donnée, des microstructures comparables sont mises en évidence, et ce, quel que soit le procédé de fabrication des gels utilisé (Figure 44). Partant de ce constat, la morphologie du gel sera une conséquence des cinétiques relatives de séparation de phases et de formation du gel.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

I. FABRICATION DES GELS LAITIERS ENRICHIS EN POLYSACCHARIDES

I.1. Les matières premières

I.1.1. Le lait

L'ensemble de l'étude a été mené sur du lait reconstitué à partir de lait écrémé en poudre à faible taux de dénaturation des protéines (« low heat ») fourni par la société Ingredia (Arras, France). La composition chimique de cette poudre de lait est donnée dans le Tableau 8. Afin de s'affranchir de l'effet des variations saisonnières de la composition du lait, un même lot a été utilisé tout au long de l'étude. La poudre a été conditionnée en sachets de 200 g et stockée à température ambiante.

Tableau 8 : Composition chimique de la poudre de lait écrémé « low heat » Ingredia utilisée au cours de l'étude

	Concentration (g.kg ⁻¹ de poudre)
Matière sèche	963
Cendres	75
Protéines	333
Lactose	555

I.1.2. Les polysaccharides

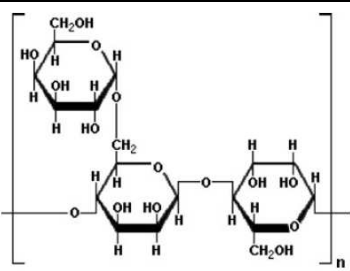
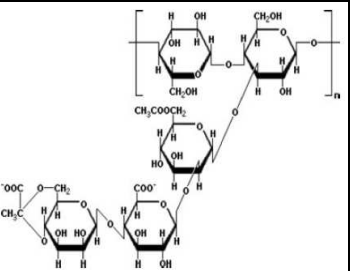
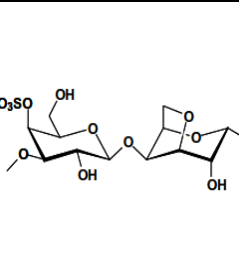
Les échantillons de guar Viscogum MP (Cargill, USA) et de xanthane Satiexane CX (Cargill, USA) ont été utilisés sans étape de purification complémentaire. Leur viscosité intrinsèque respective, déterminée selon le protocole décrit au paragraphe II.3.2 de ce chapitre, est d'environ 11 ± 2 et 70 ± 10 dL.g⁻¹ en solution dans 0,1 M NaCl.

Les solutions de guar et de xanthane ont été préparées par dispersion sous agitation magnétique des poudres dans de l'eau Millipore ultra pure en présence de 0,1 M NaCl à 60°C pendant 30 min.

Un échantillon de kappa-carraghénane (Cargill, Baupre, France) a été utilisé de façon ponctuelle afin de valider des hypothèses de mécanismes d'interaction entre micelles de caséines et polysaccharides. La viscosité intrinsèque de ce polysaccharide est d'environ $7 \pm 0,4$ dL.g⁻¹ (Matignon, 2013).

Les caractéristiques physico-chimiques des trois polysaccharides étudiés sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Structure chimique et propriétés physico-chimiques du guar, du xanthane et du kappa-carraghénane

	Guar	Xanthane	Kappa-carraghénane
Structure primaire	 Chawla & Patil, 2010	 Chawla & Patil, 2010	 van de Velde et al., 2005
Densité de charges (mol / mol de monosaccharide)	0	0,25	0,5
Type de groupements chargés		Carboxyles	Sulfates
Viscosité intrinsèque de l'échantillon (dL.g ⁻¹)	11 ± 2	70 ± 10	7 ± 0,4

I.1.3. Les agents acidifiants

Deux agents acidifiants ont principalement été utilisés pour la préparation des gels acides : la glucono- δ -lactone (GDL) et les ferments.

La glucono- δ -lactone (GDL) est un précurseur d'acide qui, en milieu aqueux, se décompose lentement en acide gluconique, ce qui conduit à une acidification progressive du milieu. La GDL utilisée se présente sous forme de poudre blanche cristallisée, commercialisée par la société Sigma Chemicals (St Louis, MO, USA).

Deux souches de ferments lactiques, constitués chacun d'une souche de *Streptococcus thermophilus* et d'une souche de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, ont été utilisées ponctuellement pour comparer les résultats avec ceux obtenus par acidification avec de la GDL. La souche « Ferment 1 » était conditionnée sous forme de pellets congelés et la souche « Ferment 2 », sous forme lyophilisée. Ces deux souches étaient peu productrices d'exopolysaccharides.

I.2. Préparation des mélanges lait / polysaccharides

L'ensemble des concentrations de solutions de polysaccharides, de polysaccharides en mélange dans le lait et de GDL ajoutée au mélange est exprimé en % p/p.

I.2.1. Reconstitution du lait

Le lait a été reconstitué à partir de la poudre de lait écrémé « low heat » par dispersion pendant 1 h à température ambiante dans de l'eau purifiée à l'aide d'un passage à travers successivement une résine à échange d'ions puis une membrane d'osmose et enfin un système d'électrodialyse (Elix 3, Millipore, France). La concentration en protéines de lait était de 46 g.kg^{-1} , ce qui correspond à un lait « poudré » tel qu'utilisé pour la fabrication des yaourts « maigres » permettant ainsi d'augmenter la force du gel acide obtenu après acidification tout en limitant la synérèse. Le lait ainsi reconstitué a ensuite été stocké à 4°C pendant une nuit de manière à assurer une bonne réhydratation de la poudre et un équilibre des ions.

I.2.2. Traitement thermique du lait

Le lait a été traité thermiquement à 80°C pendant 7 min à l'aide d'un bain-marie sous agitation magnétique. Le taux de dénaturation des protéines n'a pas été évalué, toutefois le traitement thermique a été réalisé de manière standardisée et était suffisant pour renforcer le réseau protéique. Après traitement thermique, le lait a été refroidi dans un bain d'eau froide jusqu'à la température souhaitée.

I.2.3. Solubilisation des polysaccharides

Les mélanges lait / polysaccharides ont été réalisés en incorporant la poudre de polysaccharides dans le lait préalablement chauffé à 60°C sous une agitation magnétique d'environ 700 rpm pendant 30 min. La température de mélange a été déterminée de manière à permettre la solubilisation des polysaccharides quels que soient la concentration et le type de polysaccharides utilisé tout en limitant la dénaturation des protéines du lactosérum durant cette étape. Après solubilisation des polysaccharides dans le lait, le mélange a été refroidi dans un bain d'eau froide sous agitation magnétique jusqu'à la température d'acidification.

I.3. Fabrication des gels acides

Dans le cadre de cette étude, le terme de « micro-gel » a été utilisé pour désigner les gouttelettes enrichies en protéines après leur gélification acide, obtenues par séparation de phases de systèmes enrichis en guar. Les « filaments » sont définis comme des micro-gels très allongés, d'une taille généralement comprise entre 100 et 400 μm .

Au sein des gels laitiers enrichis en xanthane, le terme de « structure fibreuse » a été utilisé pour désigner les micro-gels très allongés obtenus par un effet de compétition entre séparation de phases et gélification, et après fracturation du gel ferme par l'étape de brassage. De manière complémentaire, les « complexes fibreux » obtenus par acidification d'un mélange lait / xanthane à l'aide de HCl incluent la présence de xanthane au cœur des structures gélifiées.

I.3.1. Acidification

Deux méthodes d'acidification ont principalement été utilisées pour l'obtention des gels laitiers acides : ajout de GDL ou de ferments lactiques, l'acidification à l'aide de HCl ayant été utilisée ponctuellement. L'acidification du lait par la GDL permet de garantir une meilleure reproductibilité et de s'affranchir de la variabilité de l'activité bactérienne. Cependant, les gels obtenus à l'aide de GDL ne sont pas identiques à ceux obtenus par voie fermentaire du fait, notamment, de l'absence totale d'exopolysaccharide et de la non consommation de lactose (Lucey et al., 1998).

I.3.1.1. Acidification à l'aide de GDL

La GDL a été ajoutée dans le lait ou le mélange lait / polysaccharides préalablement chauffé à la température d'acidification sous une agitation magnétique d'environ 700 rpm pendant 2 min afin d'assurer sa dissolution. Le lait ou le mélange lait / polysaccharides additionné de GDL a ensuite été réparti dans des flacons stériles étanches de 40 mL (VWR, France) placés dans une étuve (Memmert, France). La température d'acidification était de 43°C dans la majorité des cas ; dans le cas contraire, ceci sera précisé lors de la description des résultats concernés. Les cinétiques d'acidification étaient fortement dépendantes de la concentration en GDL ainsi que de la température. En effet, des concentrations ou températures croissantes entraînent une hydrolyse de la GDL plus rapide. L'acidification était considérée comme terminée lorsque le pH de 4,6 était atteint. Le système était ensuite refroidi rapidement dans un bain d'eau froide afin de limiter toute post-acidification.

I.3.1.2. Acidification à l'aide de ferments

L'ensemencement a été effectué dans le lait ou le mélange lait / polysaccharides à 43°C au taux de 200g/1000L pour la souche « Ferments 1 » et 200U/1000L pour la souche « Ferment 2 ». Le lait ou le mélange lait / polysaccharides a ensuite été réparti dans des flacons stériles étanches de 40 mL (VWR, France) placés dans une étuve (Mettler, France) à 43°C. Lors de certaines expériences, une agitation magnétique a été appliquée à 700 rpm environ dans le flacon placé dans un bain-marie à 43°C pendant la diminution du pH et jusqu'à l'obtention du pH souhaité. Le mélange a ensuite été réparti dans les flacons et mis dans une étuve à 43°C jusqu'à l'obtention du pH 4,6. La fermentation a été considérée comme étant terminée lorsque la diminution de pH devenait lente aux environs de pH 4,6.

I.3.1.3. Acidification à l'aide de HCl

Préalablement à son acidification par un ajout de HCl, le lait enrichi en polysaccharides a été dilué à $1/10^{\text{ème}}$ à l'aide d'eau à 0,1 M NaCl, qui correspond à la force ionique du lait. Afin d'assurer une répartition homogène de l'acide ajouté, un cisaillement de 100 à 500 rpm selon les expériences a systématiquement été appliqué. L'acide chlorhydrique a été ajouté en petite quantité et à différentes concentrations (de 0,05 à 1 mol.L⁻¹) dans une quantité de 30 mL de lait enrichi en polysaccharides et sous agitation mécanique de manière à ce que le pH puisse s'équilibrer dans le milieu entre deux ajouts successifs.

I.3.2. Brassage des gels fermes acides

Après refroidissement à 20°C dans un bain d'eau froide pendant 1 h, les gels ont été cisailés. Pour la fabrication des gels acides brassés, un décaillage a été effectué à l'aide d'un test de rétro-extrusion. Une sonde s'enfonce dans le produit à 0,5 mm.s⁻¹ sur une profondeur de 30 mm. Le cisaillement du gel généré dans l'espace annulaire, situé entre le bord du flacon de 2,7 cm de diamètre et la sonde de 2 cm de diamètre, a permis une rupture grossière du gel, réalisée de manière parfaitement standardisée. Ensuite, le gel a été poussé avec un débit de 380 mL.min⁻¹ à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex®, Cole Parmer, Vernon Hills, USA) à travers deux tuyaux en plastique successifs (40 cm de longueur et 7 mm de diamètre interne ; 100 cm de longueur et 3 mm de diamètre interne) munis d'un filtre d'une taille de pores de 500 µm dans la partie terminale. Il est à noter que le filtre n'a pas pu être utilisé pour certains gels présentant des structures fibrillaires de taille trop élevée. Pour ces gels, l'étape de brassage a consisté en un passage au travers des deux

tuyaux successifs mais sans l'ajout de filtre ; ceci sera précisé lors de la description des résultats lorsque que tel aura été le cas. Les gels brassés ont ensuite été conservés un jour à 4°C avant analyse.

II. CARACTERISATION DES MELANGES ET DES GELS ACIDES ENRICHIS EN POLYSACCHARIDES PAR DES METHODES INSTRUMENTALES

II.1. Comportement de séparation de phases dans les mélanges lait / polysaccharides en milieux neutres et acidifiés

Une technique reposant sur la diffusion multiple de la lumière a été utilisée pour suivre les phénomènes de séparation de phases et de formation du gel. L'étude a été menée à l'aide de deux appareils, le Turbiscan Classic® et le Turbiscan Lab Expert® (Formulation, Toulouse, France) qui réalisent des mesures optiques basées sur l'analyse de la dispersion des photons au sein d'un produit contenu dans une cellule de verre cylindrique.

L'organe central des analyseurs optiques est la tête de lecture : elle effectue un balayage vertical de l'échantillon (jusqu'à 80 mm pour le Turbiscan Classic® et 55 mm pour le Turbiscan Lab Expert®) avec une diode électroluminescente dans le proche infrarouge (850 nm). Une mesure est effectuée tous les 40 µm grâce à deux détecteurs qui reçoivent les photons transmis et rétrodiffusés par l'échantillon, au travers de deux fentes placées respectivement à 180° et 45° du rayon incident. Les courbes obtenues donnent les flux lumineux de transmission et de rétrodiffusion en fonction de la hauteur de l'échantillon (en mm) exprimés en pourcentage par rapport à des références internes à l'appareil (étalon d'huile de silicone pour la mesure de la transmission, tube en téflon pour la rétrodiffusion) (Figure 45).

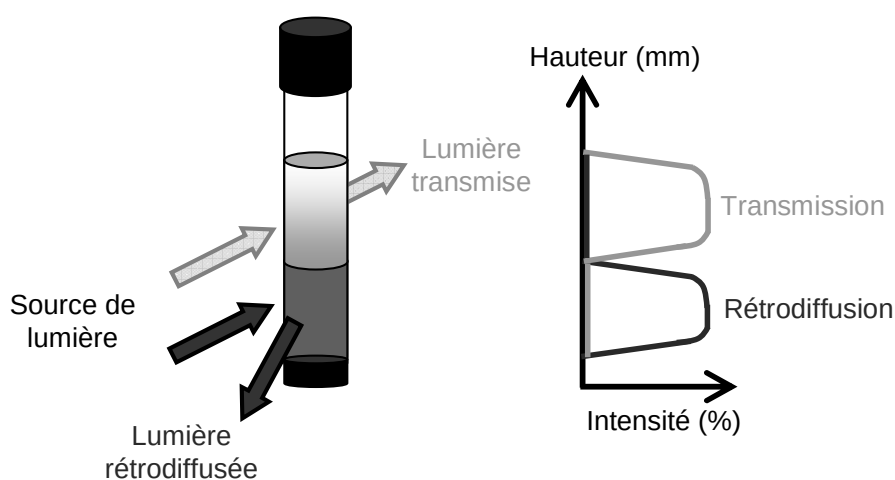


Figure 45 : Principe d'analyse du Turbiscan Lab Expert® et du Turbiscan Classic®

Les intensités des lumières rétrodiffusées et transmises par l'échantillon dépendent de trois paramètres : le diamètre des particules, leur concentration et l'indice de réfraction relatif entre les phases dispersée et continue. Ainsi, un changement dû à une variation de taille (floculation, coalescence) ou une variation locale de la concentration (phénomènes migratoires : sédimentation, crémage) sont détectés par les capteurs optiques.

Présentant la possibilité d'être thermorégulé de 25 à 60°C, le Turbiscan Lab Expert® a été utilisé pour l'analyse des cinétiques de séparation de phases ayant lieu dans les mélanges lait / polysaccharides et le suivi de la gélification des gels acides. Le comportement des mélanges lait / polysaccharides a été observé à température constante (de 25 à 60°C) au cours du temps dans des tubes en verre de diamètre 2,3 cm (20 g d'échantillon) pendant 1 h. Dans le cas des mélanges additionnés de GDL, la gélification a eu lieu in situ dans l'appareil préalablement chauffé à la température d'acidification jusqu'à l'obtention du pH 4,6.

Les analyses réalisées à l'aide du Turbiscan Classic® ont permis de calculer les hauteurs relatives (hauteur de sédiment ou de surnageant rapportée à la hauteur totale) à partir des courbes de rétrodiffusion et de transmission obtenues pour les systèmes mixtes acidifiés ou non. Après avoir laissé les mélanges lait / polysaccharides au repos dans un bain à sec thermorégulé à une température donnée pendant 4 h, les tubes ont été conservés une nuit à 4°C avant analyse. Les gels fermes acides ont été fabriqués dans les tubes in situ jusqu'à l'obtention du pH 4,6, conservés à 4°C puis analysés à J+1 après fabrication.

II.2. Mesure du pH

La mesure du pH a été réalisée directement lors de la formation du gel en étuve avec un pHmètre Consort D130 (Turnhout, Belgique) relié à un ordinateur. Le pHmètre a été calibré régulièrement au moyen des solutions tampon pH 7,00 et pH 4,00. Les mesures de pH ont permis de suivre les cinétiques d'acidification après ajout de GDL ou de ferments lactiques (Figure 46).

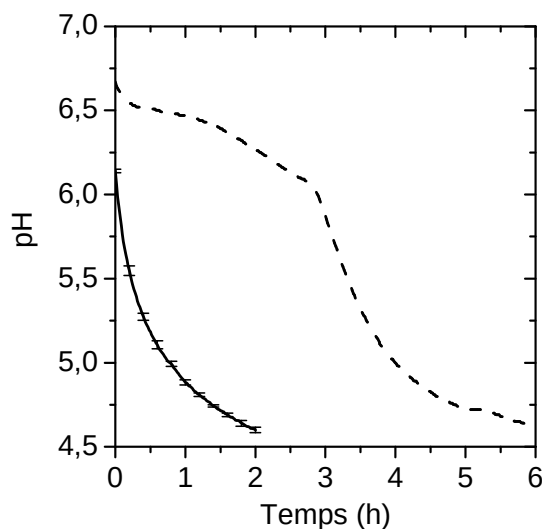


Figure 46 : Evolution du pH au cours de l'acidification à 43°C d'un lait écrémé à 46 g/kg de protéines par ajout de 1,5% de GDL (ligne pleine) ou de ferments lactiques « Ferment 1 » au taux de 200g/1000L (ligne en pointillés). Les barres d'erreur représentées correspondent à des mesures réalisées en triple sur des échantillons différents.

II.3. Mesures rhéologiques

La caractérisation rhéologique des mélanges lait / polysaccharides et des gels acides brassés a été réalisée aux grandes déformations pour caractériser les propriétés d'écoulement, ainsi qu'aux petites déformations, afin de caractériser les propriétés viscoélastiques.

II.3.1. Propriétés d'écoulement

Les mesures rhéologiques en écoulement permettent d'établir la relation entre la contrainte et la vitesse de cisaillement en régime laminaire. La viscosité apparente est définie comme le rapport entre la contrainte de cisaillement et la vitesse de cisaillement :

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad \text{Eq. 3}$$

où σ est la contrainte de cisaillement (Pa) et $\dot{\gamma}$ la vitesse de cisaillement (s^{-1}).

Le rhéomètre MCR 301 (Anton Paar, Autriche) piloté en contrainte et équipé d'une géométrie à double entrefer (Figure 47a) a été utilisé pour mesurer les propriétés d'écoulement du lait, des solutions de polysaccharides ainsi que des mélanges lait / guar. Le Carri-Med CSL²100 (TA Instruments, UK) piloté en contrainte et muni d'une géométrie cône-plan (6 cm de diamètre, 4° d'angle, 106 μm de troncature) (Figure 47b) a été utilisé pour caractériser les mélanges lait / xanthane

et les yaourts brassés enrichis en micro-gels. Pour les deux rhéomètres utilisés, une courbe d'écoulement a été réalisée de 1 à 100 s⁻¹ en 7,5 min à 43°C en utilisant une boucle de régulation contrainte-vitesse de cisaillement.

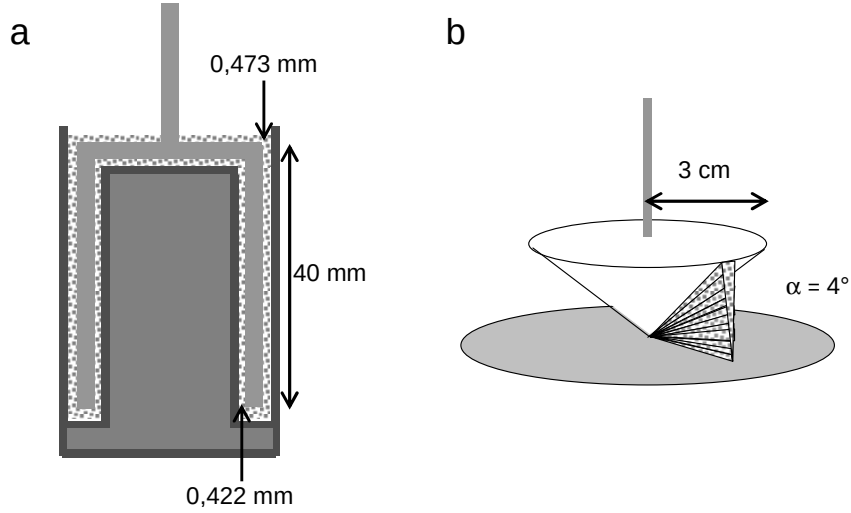


Figure 47 : Représentation schématique des géométries (a) à double entrefer (MCR 301) et (b) cône-plan (Carri-Med CSL2100)

II.3.2. Détermination de la viscosité intrinsèque des polysaccharides

La viscosité intrinsèque des chaînes de guar et de xanthane a été déterminée à différentes forces ioniques (de 0 à 0,3 M NaCl) à 43°C à pH 6,8 par des mesures de viscosimétrie en milieu dilué. Cette grandeur reflète le volume hydrodynamique occupé par une unité de masse de l'espèce étudiée et est définie pour un solvant et une température donnés. Elle est déterminée par une extrapolation à dilution infinie de la viscosité spécifique réduite η_{sp}/C :

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C} = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C} \quad \text{Eq. 4}$$

$$\text{avec : } \eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad \text{Eq. 5}$$

où C est la concentration en polymères (g.dL⁻¹), η la viscosité de la solution (Pa.s), η_0 la viscosité du solvant (Pa.s), η_{sp} la viscosité spécifique (sans unité).

L'équation de Huggins est appliquée aux résultats obtenus (Eq. 6) :

$$\text{Equation de Huggins : } \frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + \lambda_H [\eta]^2 C \quad \text{Eq. 6}$$

avec λ_H la constante de Huggins. Pour un bon solvant, $0,3 < \lambda < 1$.

L'appareil de mesure utilisé était un rhéomètre MCR 301 (Anton Paar, Autriche) équipé d'une géométrie à double entrefer (Figure 47a) qui présentait l'avantage d'apporter une sensibilité adaptée aux produits de faible viscosité. La viscosité a été déterminée en effectuant un balayage en vitesse de cisaillement de 10 à 500 s⁻¹. La viscosité spécifique a été calculée à partir des valeurs de la viscosité prises dans le plateau Newtonien, en faisant une moyenne sur trois valeurs de viscosité pour chaque concentration en polymères. A titre d'exemple, un comportement Newtonien a été relevé pour des concentrations comprises entre 0,0025 et 0,0075 g.dL⁻¹ pour le xanthane et entre 0,03 et 0,075 g.dL⁻¹ pour le guar. Ensuite, la viscosité intrinsèque du guar a été estimée en extrapolant la régression linéaire correspondant à l'équation de Huggins à concentration nulle (Figure 48a).

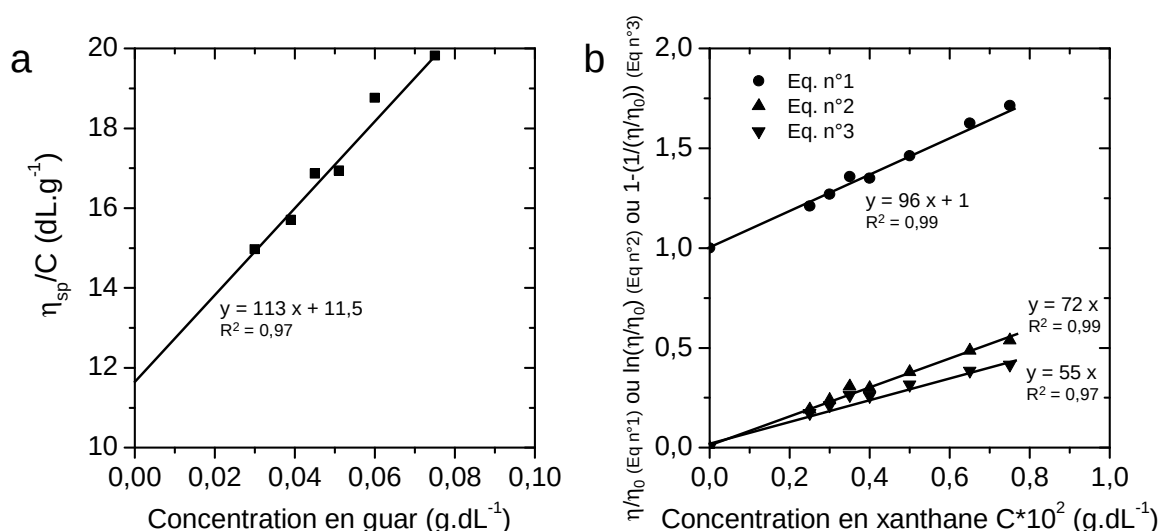


Figure 48 : Détermination de la viscosité intrinsèque dans de l'eau distillée à 0,1 M NaCl à 43°C (a) du guar à l'aide de l'équation de Huggins et (b) du xanthane à partir des trois équations de Tanglertpaibul et Rao (Tanglertpaibul & Rao, 1987)

La relation non linéaire entre $\frac{\eta_{sp}}{C}$ et la concentration en xanthane a rendu impossible la détermination de la viscosité intrinsèque par extrapolation. En effet, les polysaccharides non chargés tels que le guar présentent une pente linéaire (Figure 48a) alors qu'une forte augmentation de la pente aux faibles concentrations apparaît pour les polysaccharides chargés comme le xanthane. Cette spécificité serait due à la répulsion électrostatique entre les segments de chaîne (Higiro et al., 2007). Dans ce cas, trois équations données par Tanglertpaibul et Rao (1987) ont été utilisées (Eq. 7, Eq. 8 et Eq. 9) (Figure 48b).

$$\text{Equation de Tanglertpaibul et Rao n°1 : } \frac{\eta}{\eta_0} = 1 + [\eta]C \quad \text{Eq. 7}$$

$$\text{Equation de Tanglertpaibul et Rao n°2 : } \frac{\eta}{\eta_0} = e^{[\eta]C} \quad \text{Eq. 8}$$

$$\text{Equation de Tanglertpaibul et Rao n°3 : } \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{1}{1 - [\eta]C} \quad \text{Eq. 9}$$

II.3.3. Mesure des propriétés viscoélastiques en régime dynamique

Afin de déterminer les propriétés viscoélastiques des solutions de polysaccharides, des mélanges lait / polysaccharides et des gels acides brassés enrichis en polysaccharides, des mesures en régime dynamique ont été réalisées sur chaque échantillon. Ces mesures sont non destructives et déterminées aux petites déformations, dans le domaine des propriétés linéaires.

L'essai harmonique consiste à appliquer au système une déformation $\gamma^*(t)$ ou une contrainte $\sigma^*(t)$, fonctions sinusoïdales du temps, de pulsation ω (Figure 49).

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \cos(\omega t) \quad \text{Eq. 10}$$

La contrainte associée est alors de la forme :

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cdot \cos(\omega t + \delta) \quad \text{Eq. 11}$$

où δ désigne l'angle de déphasage entre la déformation et la contrainte (appelé également angle de perte), γ_0 et σ_0 sont respectivement les amplitudes maximales de la déformation et de la contrainte.

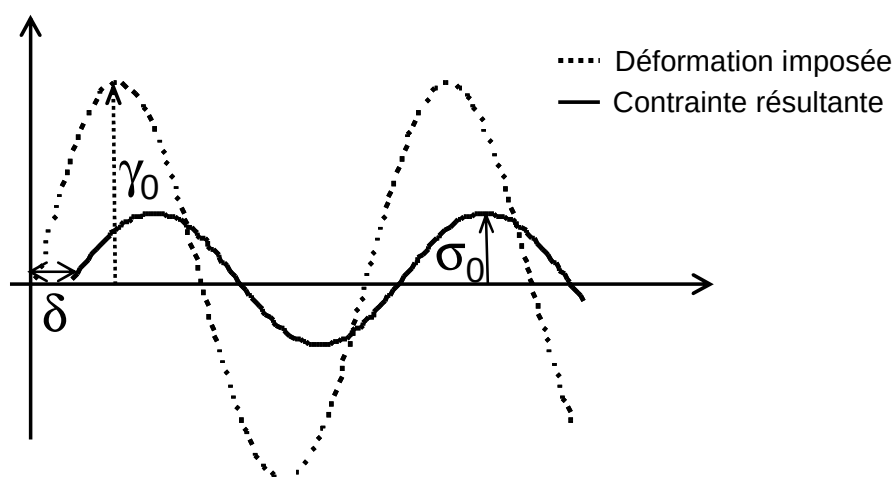


Figure 49 : Principe des mesures en régime dynamique

Elles permettent d'accéder à G' et G'' , composantes réelle et imaginaire du module complexe :

$$G^* = \frac{\sigma^*}{\gamma^*} = G' + iG'' = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad \text{Eq. 12}$$

$$\text{avec : } G' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0}\right) \cos \delta \quad \text{Eq. 13}$$

$$G'' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0}\right) \sin \delta \quad \text{Eq. 14}$$

G' , module conservatif, traduit la composante élastique du milieu ;

G'' , module dissipatif, prend en compte la dissipation d'énergie au sein du milieu et est relatif au caractère visqueux.

La tangente de l'angle de déphasage ou angle de perte, $\tan \delta$, traduit la part respective de ces deux composantes et donc les propriétés viscoélastiques du matériau :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Eq. 15}$$

Pour une fréquence donnée, la linéarité des propriétés est classiquement vérifiée en faisant varier l'amplitude du signal imposé (γ_0 ou σ_0) et en observant l'évolution de G' et G'' qui restent constants dans le domaine linéaire.

Le spectre mécanique peut être obtenu en faisant varier la fréquence dans le domaine linéaire. Il permet de caractériser le comportement viscoélastique du milieu et renseigne sur sa structure puisque G^* dépend des mouvements des segments de chaînes ou d'agrégats et de la durée de vie des enchevêtrements.

Les mesures ont été réalisées avec le rhéomètre Carri-Med CSL²100 (TA Instruments, UK) équipé d'une géométrie cône-plan (6 cm de diamètre, 4° d'angle, 106 μm de troncature) (Figure 47b). Un balayage en fréquence de 0,01 à 100 Hz a été effectué à 4°C en imposant une contrainte permettant de rester dans le domaine linéaire. Le Tableau 10 présente les amplitudes de contrainte imposées lors des mesures en régime dynamique pour différents types de structures de systèmes laitiers mixtes neutres ou acidifiés et permettant de se situer dans le domaine linéaire.

Tableau 10 : Contrainte imposée lors des mesures en régime dynamique permettant de se situer dans le domaine linéaire. Les concentrations en polysaccharides permettant d'obtenir ces structures sont données à titre indicatif et dépendent notamment des conditions de procédé utilisé.

Type d'échantillon	Concentration en polysaccharides (%)	Contrainte imposée (Pa)
Lait	0	0,03
Lait enrichi en xanthane	0-0,25	
Micro-gels sphériques à légèrement allongés dispersés dans une phase continue riche en guar	< 0,35	
Micro-gels sphériques dispersés dans une phase continue riche en guar	0,4-0,5	0,1
Longs filaments enchevêtrés dispersés dans une phase continue riche en guar	0,15-0,3	1
Gel protéique sans polysaccharides	0	
Gel protéique peu enrichi en guar	< 0,1	
Micro-gels dispersés dans une phase continue riche en xanthane	< 0,03 ou > 0,085	1 à 10
Micro-gels dispersés dans une phase continue riche en xanthane	0,05	50

Lors des tests en écoulement et en régime dynamique, il était essentiel de s'assurer que les systèmes étudiés ne sédimentent pas de manière sensible dans l'entrefer pendant la mesure. Sachant que les temps de mesure des tests en écoulement et en dynamique ont été respectivement inférieurs à 20 min et 15 min, la hauteur de sédiment s'étant formée dans le bas du tube de Turbiscan a été évaluée au terme de ce temps. A titre d'exemple, la hauteur de sédiment du mélange de lait enrichi à 0,3% de guar représente moins de 1% de la hauteur totale après 15 min à 43°C. De même, pour les particules d'un gel brassé enrichi en guar à 0,3% et acidifié à l'aide de GDL à 1,5%, la hauteur de sédiment est inférieure à 2% de la hauteur totale en fin de mesure en régime dynamique. Par conséquent, la décantation des particules lors de la mesure a été considérée comme négligeable pour ces deux systèmes.

II.4. Observation des systèmes par microscopie

II.4.1. Microscopie optique et à épifluorescence

La microscopie à épifluorescence est une technique utilisant un microscope optique qui permet, grâce à un marquage spécifique, de visualiser un ou plusieurs composés fluorescents. Pour fonctionner en fluorescence, le microscope comprend une source lumineuse adéquate constituée d'une lampe à vapeur de mercure dont le spectre est polychromatique. Des filtres d'excitation permettent de choisir la longueur d'onde incidente. Ce faisceau est ensuite réfléchi vers l'échantillon par un miroir dichroïque et le rayonnement émis par l'échantillon est sélectionné par un filtre barrière.

Les images de microscopie en fluorescence ont été réalisées avec un microscope optique Olympus BX51 (Olympus America, Lake Success, NY) équipé d'une lampe à vapeur de mercure (Olympus, France) avec un objectif x10.

Le marquage a été réalisé à l'aide d'une solution de rouge de Nil solubilisé dans 0,1% d'acétone (longueur d'onde d'excitation de 553 nm) ajoutée directement dans les gels acides brassés, de manière à obtenir une concentration en fluorochrome de $2,5 \mu\text{L.g}^{-1}$ d'échantillon. Une aliquote de chaque échantillon a été disposée entre lame et lamelle et laissée pendant 30 min à température ambiante pour permettre la diffusion du marqueur.

Les dimensions géométriques des gels acides brassés enrichis en polysaccharides présentant des structures gélifiées dispersées dans une phase continue riche en polysaccharides ont été quantifiées par analyse d'images. Les images ont été obtenues à l'aide du microscope optique Olympus BX51 (Olympus America, Lake Success, NY) et une attention particulière a été prise à ne pas endommager les particules lors de la préparation des lamelles. Les particules ont été mesurées manuellement, d'où un nombre limité de particules analysées (10 particules pour chaque échantillon). Selon l'agrandissement de l'image, la plus petite dimension des particules mesurée a été de 15 μm . Pour chaque particule, la longueur L et la largeur l ont été déterminées, L et l correspondant respectivement à la plus grande et la plus petite ligne droite. Lorsque la largeur l n'était pas constante sur toute la longueur de la particule, une moyenne a été effectuée. Pour la caractérisation de la forme, le rapport de la longueur L sur la largeur l a également été calculé.

II.4.2. Microscopie confocale à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser (MCBL) est une technique qui améliore la résolution de la microscopie optique et a permis, par fixation de marqueurs fluorescents spécifiques, de visualiser les protéines du lait ou des gels acides.

La lumière, apportée sous forme d'un rayonnement laser à une longueur d'onde donnée, est focalisée sur une zone d'un plan donné de l'échantillon, appelé plan focal. La présence d'un diaphragme permet de bloquer l'émission de fluorescence provenant des autres plans de l'échantillon. La lumière émise par les marqueurs fluorescents est filtrée en fonction de leur longueur d'onde, puis détectée par des photomultiplicateurs qui transforment le signal lumineux en signal électrique. L'image est ainsi construite point par point par balayage (X, Y) du champ analysé à l'aide des miroirs de déflexion de la source lumineuse. Des observations suivant l'axe Z permettent de renseigner sur la structure tridimensionnelle de l'échantillon en superposant les images obtenues (Figure 51).

Les images de MCBL ont été réalisées avec un microscope inversé Leica TCS SP2 AOBS (Leica, Allemagne) équipé de trois lasers regroupant six raies : 458, 476, 488, 514, 543 et 633 nm. Pour les observations, les objectifs de grossissement x10 et x40 à immersion dans l'eau ont été utilisés.

Contrôler la température et la hauteur d'échantillon entre lame et lamelle s'avère primordial pour observer les mélanges lait / polysaccharides, et plus particulièrement pour suivre la séparation de phases dans ces systèmes. Ainsi, une cellule d'observation adaptée à la microscopie confocale, la cellule RheOptiCAD[®] (CAD Instruments, France) (Boitte et al., 2013), a été utilisée. Cette cellule a été usinée de façon à s'adapter sur le bâti du microscope inversé utilisé tel que le porte-échantillon classique (Figure 50).



Figure 50 : Photographie de la cellule RheOptiCAD[®] positionnée sur le microscope confocal (Boitte et al., 2013)

Deux fonctions de la cellule ont permis une observation maîtrisée des systèmes :

- le contrôle de la température : un système Peltier combiné à la cellule d'observation permet de chauffer par le plateau supérieur l'échantillon à observer. Par ailleurs, l'insertion d'une sonde de température dans l'épaisseur du bâti supérieur permet son enregistrement lors des observations.
- le contrôle de l'entrefer : dans le cas de systèmes présentant une séparation de phases, il est important de pouvoir fixer une valeur d'entrefer, de manière à se localiser en Z de manière précise et reproductible au sein de l'échantillon et ensuite, à comparer différents échantillons entre eux. Le contrôle de l'entrefer est réalisé au moyen d'un moteur dont la résolution du pas est au micron près. Par ailleurs, la planéité des deux lamelles entre lesquelles se trouve l'échantillon est assurée par un système à dépression par aspiration via une pompe à vide (Figure 51).

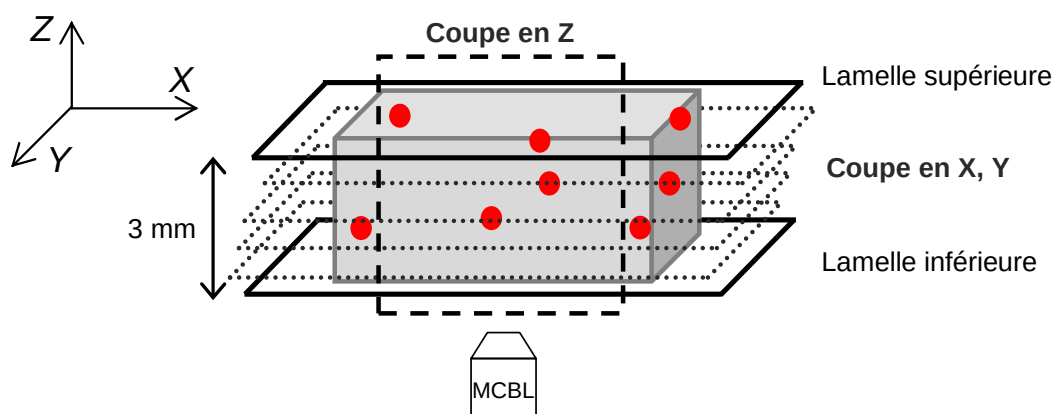


Figure 51 : Représentation schématique du dispositif d'observation des échantillons entre les deux lamelles

Les protéines ont été marquées par diffusion du DyLight 549 dont les maxima d'excitation et d'émission se situent respectivement à 562 et 580 nm. Le DyLight 549 se fixe de façon covalente aux protéines de lait. Le marquage des protéines a été réalisé par ajout direct de 20 μ L de marqueur dans 1 g d'échantillon de lait ou de gel acide brassé enrichi en polysaccharides.

II.4.2.1. Observation des mélanges lait / polysaccharides

La cellule d'observation RheOptiCAD[®] a été utilisée pour visualiser les mélanges lait / guar et lait / xanthane : une température de 43°C et un entrefer entre les deux lamelles de 3 mm ont ainsi été appliqués lors de l'observation (Figure 51). Les images ont été prises immédiatement après le dépôt de l'échantillon entre les lamelles, de façon à limiter les effets de coalescence et de sédimentation.

Le mélange lait / kappa-carraghénane a été déposé entre lame et lamelle avec un écarteur de 250 μ m d'épaisseur. L'observation a été faite à température ambiante (20°C), de manière à se situer en dessous de la température de gélification du kappa-carraghénane.

II.4.2.2. Suivi de la séparation de phases de mélanges lait / guar en début de gélification

Pour suivre les phénomènes de séparation de phases dans le mélange lait / guar, le mode XYZ a été choisi, de manière à sonder l'échantillon dans les trois dimensions. Ainsi, une série d'images en Z a été enregistrée par un balayage du bas vers le haut de l'échantillon à différents temps afin de suivre l'évolution des systèmes.

Avant observation, les mélanges lait / guar ont été additionnés de GDL à 1,5% à température ambiante. Ensuite, l'échantillon a été déposé dans la cellule d'observation RheOptiCAD[®] entre les

lamelles dont l'entrefer a été fixé à 3 mm. Deux températures ont été appliquées lors des observations : 43°C et 60°C. Les systèmes ont été observés immédiatement après leur mise en place, afin de limiter l'évolution des mélanges avant enregistrement des images, puis au cours de leur évolution.

II.4.2.3. Observation des gels acides brassés enrichis en polysaccharides

Les gels brassés enrichis en polysaccharides ont été déposés entre lame et lamelle avec un écarteur de 250 μm d'épaisseur, de manière à éviter l'écrasement de l'échantillon. Les observations ont été réalisées à température ambiante, après avoir laissé diffuser le marqueur dans l'échantillon pendant 30 min environ.

II.5. Autres caractérisations

II.5.1. Mesure du potentiel zêta de solutions de polysaccharides

Le potentiel zêta est la charge de la surface de la couche d'hydratation qu'une particule acquiert lorsqu'elle est mise en solution. Par conséquent, il ne correspond pas au potentiel de surface de la particule, mais à la charge de la particule enveloppée par une double enveloppe ionique. La mesure du potentiel zêta est basée sur une mesure de la vitesse des particules chargées soumises à un champ électrique. La mobilité électrophorétique correspondant à la vitesse divisée par l'intensité du champ électrique, est d'autant plus élevée que le potentiel zêta des particules est élevé en valeur absolue.

La mesure du potentiel zêta a été réalisée à l'aide du Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Ltd, UK). Les solutions de guar et de xanthane à 0,05% dans 0, 0,1 ou 0,3 M NaCl ont été analysées sans dilution préalable, le signal étant de bonne qualité.

II.5.2. Etude des interactions protéines de lait / polysaccharides par une méthode spectrophotométrique

Les interactions entre les protéines de lait et divers polysaccharides neutres ou chargés négativement ont été étudiées en utilisant une méthode spectrophotométrique à l'aide du bleu de méthylène. En solution aqueuse, le bleu de méthylène, colorant chargé positivement, présente un pic maximal d'absorption à 664 nm et un épaulement à 610 nm (Gurov et al., 1988 ; Tafulo et al., 2009). Dans le cas d'interactions associatives entre le bleu de méthylène et une molécule chargée négativement telle que certains polysaccharides, des forces impliquant des molécules d'eau et les molécules de bleu de méthylène interviennent, ce qui permet de maintenir les plans cationiques du

bleu de méthylène relativement proches les uns des autres (Figure 52). L'orientation particulière des molécules de bleu de méthylène provoque une modification du spectre d'absorption et la formation de complexes métachromatiques à 554 nm. La possibilité d'interaction dépend de la conformation et de la densité de charges de la molécule chargée négativement, mais également des conditions environnementales telles que la force ionique ou la température (Shirai et al., 1977).

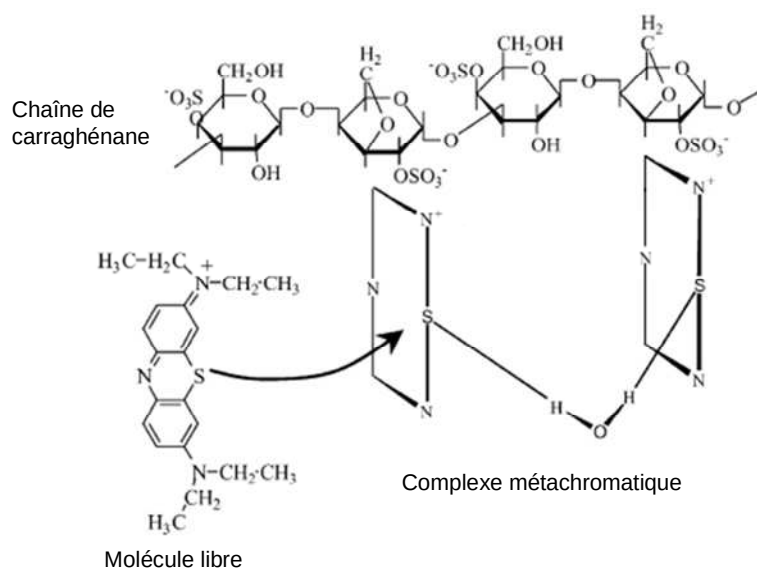


Figure 52 : Représentation schématique des interactions bleu de méthylène / carraghénane (d'après Michon et al., 2002)

Lorsque des protéines, interagissant de manière associative avec des polysaccharides chargés négativement, sont introduites dans un mélange bleu de méthylène / polysaccharide anionique, une compétition a lieu entre les plans cationiques du bleu de méthylène et les protéines pour les groupes chargés du polysaccharide. Par conséquent, les protéines se lient préférentiellement aux polysaccharides, ce qui entraîne la libération de molécules de bleu de méthylène en solution et ainsi une augmentation du pic d'absorption à 664 nm.

Les protocoles de préparation des échantillons et des mesures spectrophotométriques sont présentés dans le chapitre 4, I.

II.5.3. Détermination de la teneur en matière sèche des micro-gels

Pour la détermination de la teneur en matière sèche des micro-gels, 0,5 g de produit a été déposé dans des coupelles en acier inoxydable, puis les échantillons ont été placés à l'étuve à 105°C pendant 24 h jusqu'à poids constant.

II.5.4. Détermination de la concentration en protéines des micro-gels

Le dosage en azote total a été réalisé par la méthode de Kjeldahl. Cette méthode mesure la somme de l'azote protéique et de l'azote non protéique qui représente entre 5 et 6% des protéines. Le dosage se fait en deux étapes : la minéralisation de l'échantillon suivie de son dosage. Le coefficient de 6,38 a été utilisé pour passer de la quantité d'azote à celle de protéines (Jones, 1941).

II.5.4.1. Minéralisation

La minéralisation consiste à transformer la totalité de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, par action d'acide sulfurique bouillant en présence d'un catalyseur. L'ajout de sulfate de potassium K_2SO_4 permet d'augmenter la température de réaction et ainsi, de diminuer sa durée.

La minéralisation a été réalisée à l'aide d'un appareil de type BlockDigest 12 (J.P. Selecta, Espagne) équipé d'un thermostat. Les gels brassés enrichis en polysaccharides ont été centrifugés à 5000 g pendant 30 min (Centrifugeuse 3.18 K, Sigma GmbH, Allemagne) de manière à isoler les micro-gels enrichis en protéines du surnageant riche en polysaccharides. Le culot contenant les micro-gels a ensuite été récupéré pour analyse. 10 mL d'acide sulfurique ainsi qu'un mélange catalytique composé de sulfate de potassium, de sulfate de cuivre pentahydraté et de dioxyde de titane, ont été ajoutés à l'échantillon. Les tubes ont été chauffés sous une hotte 1 h à 190°C puis 4 h à 350°C.

II.5.4.2. Dosage indirect

L'ammoniac a été recueilli dans un volume connu et placé en excès d'une solution étalon de HCl. L'excès d'acide a ensuite été dosé à l'aide d'une solution étalonnée de NaOH, en présence d'un indicateur coloré.

Les tubes ont été refroidis à température ambiante et 20 mL d'eau distillée ont été ajoutés dans chaque tube. 25 mL d'eau distillée dans le tube à distiller, 25 mL de HCl et 6 gouttes de rouge de méthyle ont été introduits dans la fiole recueil du distillat. Après distillation à l'aide de l'appareil Pro-Nitro M (J.P. Selecta, Espagne), la quantité de HCl n'ayant pas réagi a été dosée par une solution de NaOH à 0,1 M de manière à déterminer la quantité d'ammoniac puis celle de protéines.

III. CARACTERISATION SENSORIELLE ET INSTRUMENTALE DES YAOURTS ENRICHIS EN MICRO-GELS

III.1. Préparation des yaourts enrichis en micro-gels

III.1.1. Milieu de dispersion

Un yaourt brassé commercial contenant 0% de matière grasse, 5,5 g de glucides et 5,5 g de protéines de lait (Cora, France) a été utilisé comme milieu de dispersion des micro-gels.

III.1.2. Micro-gels

Les micro-gels ont été fabriqués comme décrit dans le paragraphe I.3 de ce chapitre. Suite au brassage des gels acides, les micro-gels enrichis en protéines ont été séparés de la phase continue riche en guar ou xanthane et/ou lactosérum par centrifugation à 5000 g pendant 15 min à 20°C (Centrifugeuse 3.18 K, Sigma GmbH, Germany).

Les déterminations de la teneur en matière sèche des différents micro-gels n'ont pas montré de différences significatives entre les différents types de micro-gels qui contiennent $80 \pm 2\%$ de matière sèche. De même, peu de différences de concentration en protéines sont observées entre les différents micro-gels fabriqués à base des systèmes enrichis en guar acidifiés à l'aide de 1, 1,5 et 2,5% de GDL qui contiennent respectivement 20,1, $20,1 \pm 3,8$ et 21,4% p/p de protéines.

L'hypothèse selon laquelle la différence de densité entre les types de micro-gels ne serait pas significative a été émise. Partant de cette hypothèse, un même poids et non volume, de différents types de micro-gels, a été introduit en proportions différentes, de 2,5 à 10% p/p, au milieu de dispersion constitué de yaourt brassé à 0% de matière grasse. L'espace de produits était constitué de 14 yaourts enrichis en micro-gels de types et proportions variables.

III.2. Analyse sensorielle des yaourts enrichis en micro-gels

Afin d'établir un positionnement relatif de l'ensemble des produits, un profil flash a été réalisé. Ce test sensoriel permet en effet de pouvoir interpréter rapidement la position relative des produits, en apportant des éléments d'explication sémantique (Sieffermann, 2000). Par ailleurs, il ne nécessite pas de phase préalable de familiarisation avec l'espace de produits et le vocabulaire sélectionné par les juges n'est pas consensuel et défini.

Les produits ont été systématiquement présentés dans des pots en plastique transparents de 30 mL et codés. Le panel était constitué de 10 sujets (8 femmes et 2 hommes) recrutés au sein du personnel de l'école AgroParisTech (Massy, France) dont 5 experts en analyse sensorielle. Les dégustations ont eu lieu en cabines de dégustation individuelles au laboratoire de perception sensorielle d'AgroParisTech. Généralement, la séance durait entre trente minutes et une heure.

Face à l'ensemble des produits présentés simultanément, les juges avaient pour consigne de se limiter à l'évaluation de la texture, visuelle et en bouche, des produits. Ils ont alors généré les descripteurs les plus discriminants pour décrire spécifiquement l'espace de produits et classé de manière comparative les produits sur chacun des descripteurs.

Les produits classés ex-æquo étaient autorisés. Aucune contrainte n'a été donnée quant au protocole de dégustation et aucune limite de temps n'a été imposée, chaque sujet pouvant faire autant de pauses qu'il le désirait.

III.3. Caractérisation instrumentale des yaourts enrichis en micro-gels

III.3.1. Détermination de la distribution granulométrique

La distribution de taille des particules par diffraction de la lumière ou granulométrie laser est déterminée, d'après les théories de Fraunhofer et de Mie, à partir des intensités reçues par des détecteurs placés aux différents angles par rapport au rayon incident traversant l'échantillon de particules.

La distribution de la taille des particules du yaourt brassé témoin ou enrichi en micro-gels a été déterminée en utilisant un granulomètre laser MasterSizer 2000 (Malvern Instruments, Ltd, UK). Un gramme de yaourt brassé (indice de réfraction de 1,5) a été préalablement dilué dans 50 mL d'eau distillée environ. La mesure a été réalisée à température ambiante entre 4 et 12% d'obscurité sous une agitation de 400 tr/min. Trois mesures successives ont été effectuées à deux minutes d'intervalle. La distribution volumique a été caractérisée par la mesure du diamètre moyen $d_{(4,3)}$ (Figure 53).

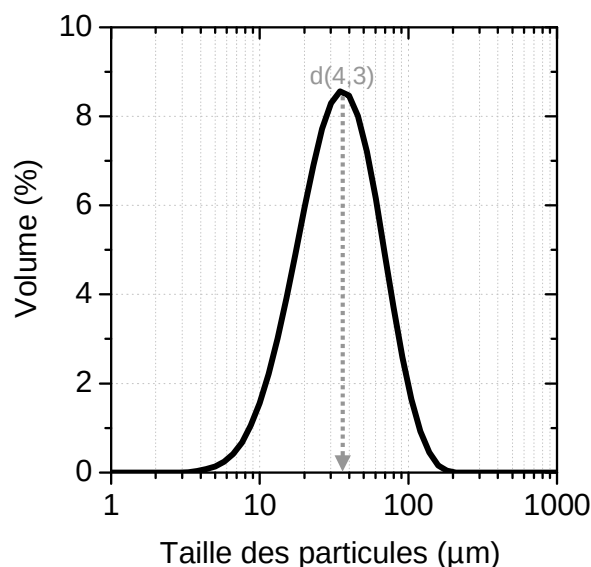


Figure 53 : Exemple de distribution granulométrique obtenue à partir du yaourt brassé témoin

III.3.2. Propriétés rhéologiques

Un test de rétro-extrusion, consistant à forcer le passage du produit dans l'espace annulaire entre un piston mobile et la paroi d'un récipient cylindrique, a été réalisé à l'aide du texturomètre TAX-T2i (TA Instruments, Stable Micro Systems, UK). Trente grammes de yaourt brassé témoin ou enrichi en micro-gels ont été préalablement introduits dans un récipient de 40 mL puis laissés 1 h à 4°C avant la réalisation du test. Un piston cylindrique en aluminium de 2 cm de diamètre et 2 mm d'épaisseur a été utilisé. Lors du test, la vitesse d'enfoncement a été de $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$ et la profondeur d'échantillon analysé de 30 mm. La valeur de la force a été calculée dans la zone de pseudo-plateau comprise entre 5 mm et 25 mm de distance d'enfoncement pour laquelle la force varie peu et de façon régulière. Dans cette zone, aucune évolution de la force en fonction de la distance d'enfoncement liée à un effet de fond n'est perceptible.

Les mesures en écoulement ont été réalisées à l'aide du rhéomètre Carri-Med CSL²100 (TA Instruments, UK) équipé d'une géométrie cône-plan de 6 cm de diamètre et 4° d'angle munie d'un piège à solvant (Figure 47b). Une courbe d'écoulement « aller-retour » a été réalisée à l'aide d'un balayage par paliers de 0,2 à 100 s^{-1} en 10 min à 4°C en mode logarithmique incluant 3 décades et 10 points par décade.

Le comportement à l'écoulement des yaourts brassés témoin et ceux enrichis en micro-gels a été modélisé selon une loi en puissance (Eq. 16) et selon le modèle de Herschel-Bulkley (Eq. 17) :

$$\text{Loi de puissance : } \sigma = k \dot{\gamma}^n \quad \text{Eq. 16}$$

où k est l'indice de consistance (Pa.sⁿ) et n est l'indice de comportement du fluide.

$$\text{Modèle de Herschel-Bulkley : } \sigma = \sigma_s + K \dot{\gamma}^n \quad \text{Eq. 17}$$

où σ_s est le seuil de contrainte (Pa), K est l'indice de consistance (Pa.sⁿ) et n est l'indice de comportement du fluide.

Par ailleurs, les yaourts brassés témoin ou enrichis en micro-gels présentant un caractère thixotrope plus ou moins prononcé, l'aire entre les courbes d'écoulement aller et retour a été calculée.

III.3.3. Observation microscopique

Les yaourts brassés témoin ou enrichis en micro-gels ont été observés entre lame et lamelle en microscopie optique à l'aide d'un microscope Olympus BX 51 (Olympus, Japon) en mode contraste de phase avec des objectifs de grossissement x10 et x40.

III.4. Analyses statistiques

L'ensemble des données sensorielles et instrumentales a été saisi et traité sous Microsoft Excel[®] et les traitements multidimensionnels ont été réalisés sous XLSTAT[®].

La répétabilité des juges a été vérifiée préalablement par une Analyse en Composantes Principales (ACP). Un juge, considéré comme peu répétable, c'est-à-dire pour lequel les deux répétitions de produits étaient positionnées de manière éloignée sur le plan 1-2 de l'ACP, a été écarté pour la suite de l'analyse des données.

De manière préalable, une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH), sur la base d'une matrice de distance euclidienne et du critère de Ward, a été réalisée à partir des données du profil flash dans l'objectif de constituer des groupes de produits et de termes générés par les juges. Une Analyse Procrustéenne Généralisée (APG) a également été appliquée aux données du profil flash pour établir une carte de consensus entre les juges. Les données instrumentales ont été analysées par une Analyse en Composantes Principales (ACP). Afin de comparer la carte de consensus des données sensorielles obtenue par APG et l'ensemble des données instrumentales, une seconde APG suivie d'une CAH a été utilisée.

Afin d'établir une relation entre une variable réponse Y et un ensemble de variables explicatives X_i indépendantes, une régression linéaire multiple a été utilisée. Le modèle s'écrit de la façon suivante :

$$Y = a + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1X_2 + e \quad \text{Eq. 18}$$

où Y est la variable dépendante ; X_1 et X_2 sont les variables indépendantes ; a est l'ordonnée à l'origine estimée ; b_1 , b_2 et b_3 sont les coefficients partiels de régression estimés et e est le terme d'erreur (résidu de régression).

Chapitre 3 : Mélanges lait / guar avant et après gélification

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les phénomènes de séparation de phases et de gélification acide au sein de systèmes laitiers enrichis en polysaccharides. En s'appuyant sur les cinétiques de séparation de phases, les propriétés rhéologiques et la microstructure des systèmes lait / guar en milieux neutres et acidifiés, une discussion pourra être initiée sur la base de la compétition entre les phénomènes de séparation de phases et de gélification. Pour réaliser cette étude, une large gamme de concentrations en guar, comprises entre 0 et 0,5% p/p, a été utilisée.

I. PROPRIETES DES MELANGES LAIT / GUAR AVANT ET APRES GELIFICATION

I.1. Propriétés des mélanges lait / guar avant gélification

Avant d'étudier les systèmes lait / guar en milieu acidifié, il paraissait nécessaire de considérer en premier lieu les mélanges à pH du lait. Ainsi, la microstructure et le comportement rhéologique des mélanges lait / guar ont été étudiés en milieu neutre et à 43°C, de manière à se placer dans les conditions de température de préparation des systèmes acidifiés.

Au-delà d'une certaine concentration en polymères, l'ajout de guar dans le lait donne lieu à la formation d'un système biphasique (Bourriot et al., 1999b ; Tuinier et al., 2000). Il s'ensuit que la caractérisation des systèmes lait / guar en milieu neutre doit être réalisée à différents stades d'évolution de la séparation de phases : lorsque la séparation s'opère à l'échelle microscopique, lors de l'évolution du système considéré comme étant hors équilibre, et en fin de séparation de phases dans un état proche de l'équilibre thermodynamique.

I.1.1. Propriétés des mélanges lait / guar avant séparation de phases

Dans le cas de systèmes subissant un processus cinétique tel qu'une séparation de phases, il est essentiel que la caractérisation, rhéologique notamment, s'effectue avant que la déstabilisation ne survienne à l'échelle macroscopique. En pratique, une agitation magnétique à 500 rpm environ ou manuelle a été appliquée avant analyse, de manière à ce que tous les mélanges, susceptibles ou non de conduire à une séparation de phases, soient bien homogènes à l'échelle macroscopique au moins pendant le temps de la mesure.

I.1.1.1. Microstructure des mélanges lait / guar avant séparation de phases

L'organisation d'un mélange de lait enrichi en guar à 0,3% a été étudiée par microscopie confocale à balayage laser (Figure 54). Il est à noter que l'observation a été réalisée moins de 5 min après la mise en place de l'échantillon, afin de limiter l'évolution de la structure dans le temps. Sur l'image, les zones claires correspondent à la fluorescence du DyLight 549 et révèlent ainsi la présence de protéines. Par contraste, les parties dépourvues de protéines sont localisées dans les zones sombres.

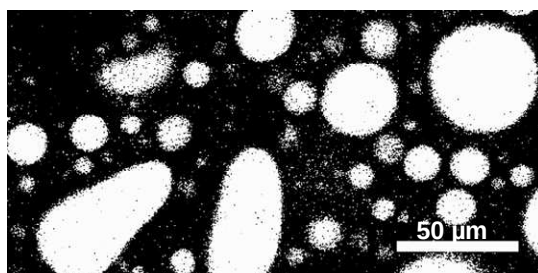


Figure 54 : Mélange lait / guar à 0,3% observé en microscopie confocale à balayage laser à 43°C immédiatement après la mise en place de l'échantillon. La barre représente 50 µm.

Les protéines apparaissent concentrées dans des zones bien définies sous la forme de gouttelettes sphériques de taille variable, comprise entre 10 et 100 µm. Puisque les protéines de lait, et plus particulièrement les micelles de caséines d'un diamètre de 180 nm environ, ne sont pas observables en tant qu'entités bien distinctes par cette technique, la concentration locale en protéines ferait suite à un regroupement des protéines dans ces gouttelettes. Par ailleurs, la forme non parfaitement sphérique des gouttelettes pourrait être attribuée à la coalescence des gouttelettes, d'autant plus que ce phénomène concerne principalement les gouttelettes de taille importante. Après leur coalescence, les gouttelettes ne se relaxeraient pas de manière instantanée sous une forme sphérique, ce qui laisse supposer qu'elles sont entourées d'une phase continue d'une viscosité élevée enrichie en guar (Bourriot, 1999).

Finalement, le mélange lait / guar à 0,3% aboutit à la formation de deux phases bien distinctes, l'une enrichie en protéines et l'autre appauvrie en protéines et probablement enrichie en guar. Il pourrait donc être intéressant d'étudier la cinétique d'évolution de ce système par l'intermédiaire d'une technique d'interaction lumière-matière par exemple. Lorsqu'une microstructure sous forme de gouttelettes liquides se forme, le système peut être considéré comme une émulsion eau dans eau (Norton & Frith, 2001). Cette organisation est typique d'un effet de volume exclu dû à une floculation par déplétion des caséines qui donne lieu à une séparation de phases de type ségrégatif. Ce

phénomène a précédemment été observé dans le cas de mélanges protéines de lait / galactomannanes (Bourriot et al., 1999c ; Schorsch et al., 1999). Bien que le système apparaisse stable à l'échelle macroscopique, la structuration en deux phases distinctes visibles à l'échelle microscopique pourrait contribuer aux propriétés rhéologiques et plus particulièrement à une augmentation de la viscosité.

I.1.1.2. Propriétés rhéologiques des mélanges lait / guar avant séparation de phases

Immédiatement après mélange, les propriétés d'écoulement du lait à 4,6% de protéines, d'une solution de guar à 0,3% ou d'un mélange lait / guar à 0,3%, ont été caractérisées à 43°C (Figure 55). Classiquement, la courbe reliant la vitesse de cisaillement à la contrainte pour le lait est typique d'un comportement Newtonien et sa viscosité particulièrement faible, de l'ordre de trois fois celle de l'eau mesurée dans les mêmes conditions de température. En revanche, le guar seul montre des propriétés rhéofluidifiantes typiques du comportement d'une solution macromoléculaire en régime non dilué. Bien que le mélange lait / guar soit également rhéofluidifiant, la viscosité du milieu est plus élevée que le guar seul sur toute la gamme de vitesse étudiée. Ainsi, la viscosité apparente du mélange est supérieure à la somme des viscosités des composés individuels aux mêmes concentrations, ce qui traduit un effet de synergie. Ce phénomène a précédemment été reporté par Bourriot et al. (1999c) pour des mélanges de 3% de micelles de caséines et 0,2% de guar.

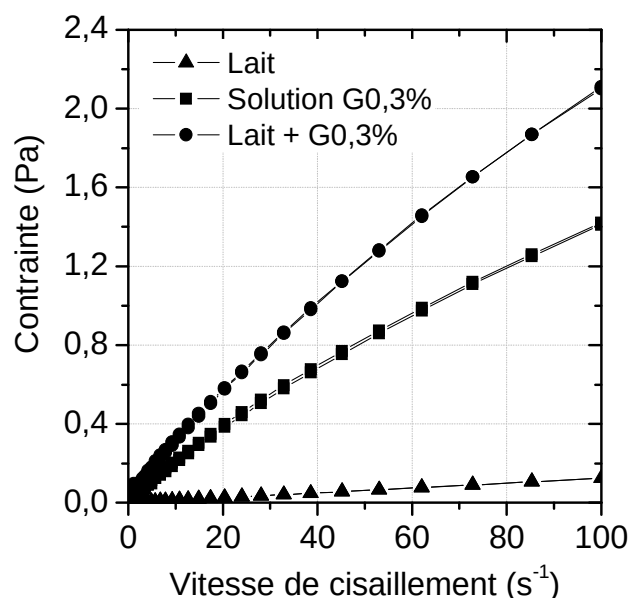


Figure 55 : Courbes d'écoulement du lait à 4,6% de protéines ($\blacktriangle$), d'une solution de guar à 0,3% dans 0,1 M NaCl ($\blacksquare$) et d'un mélange lait / guar à 0,3% ($\bullet$) réalisées à 43°C

La Figure 56 illustre la viscosité apparente à 100 s^{-1} de solutions de guar ou de mélanges lait / guar pour des concentrations en guar variables. La viscosité augmente de manière importante lorsque la concentration en guar augmente, aussi bien dans le cas d'une solution de guar dans 0,1 M de NaCl qu'en mélange dans le lait. Ce comportement est attribué au passage d'un régime dilué aux très faibles concentrations en polymères, à un régime semi-dilué pour lequel un recouvrement des chaînes de polymères a lieu puis à un enchevêtrement des chaînes en régime concentré à mesure que la concentration en guar croît (De Gennes, 1979).

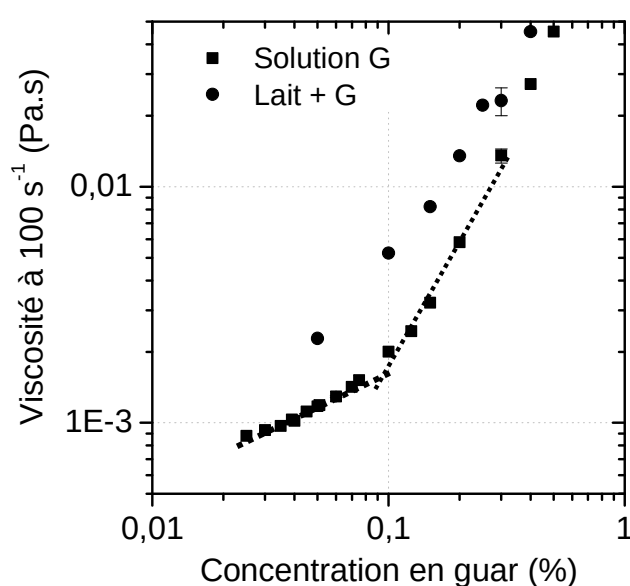


Figure 56 : Viscosité à 100 s^{-1} d'une solution de guar dans 0,1 M NaCl (■) et des mélanges lait / guar (●) en fonction de la concentration en guar à 43°C

De la même manière que dans le cas du système lait / guar à 0,3% (Figure 55), un effet de synergie à la suite du mélange des deux composés est constaté quelle que soit la concentration en polysaccharides. Toutefois, cet effet est d'autant plus marqué que la concentration en guar est importante. L'augmentation de la viscosité consécutive au mélange du lait et du guar correspondrait davantage à une surconcentration de la phase continue enrichie en guar plutôt qu'à une organisation particulière voire à une structuration du système. En effet, la faible viscosité de la phase riche en protéines ainsi que l'absence de connexion entre les gouttelettes (Figure 54) influenceraient de manière mineure la viscosité du système.

I.1.2. Suivi de la séparation de phases des mélanges lait / guar

Le système lait / guar à 0,3% est instable et une séparation de phases microscopique est observable immédiatement après mélange, puis elle devient macroscopique suite à la sédimentation des gouttelettes concentrées en protéines. De manière générale, les phénomènes de déstabilisation au sein des émulsions suivent la loi de Stokes. Néanmoins, cette théorie n'est valable que dans le cas de faibles fractions volumiques, généralement inférieures à 1%. Les particules peuvent alors être considérées comme sédimentant de manière individuelle, en excluant toute interaction entre les particules. Par ailleurs, l'hypothèse d'un phénomène de coalescence mis en évidence par microscopie confocale (Figure 54) induirait une évolution de la taille des particules au cours du temps. Par conséquent, dans le cas des mélanges lait / guar, une approche basée sur la théorie de la loi de Stokes pour le calcul des vitesses de sédimentation serait peu réaliste. Toutefois, une réflexion fondée sur les paramètres dictés par la loi de Stokes (viscosité de la phase continue, taille des gouttelettes, différence de densité entre les deux phases et accélération de la pesanteur) (Eq. 2) pour interpréter la vitesse de sédimentation a été réalisée.

Deux échelles d'observation ont été utilisées pour suivre le phénomène de séparation de phases dans les mélanges lait / guar :

- une échelle microscopique par l'intermédiaire d'observations en microscopie confocale ;
- une échelle macroscopique à l'aide d'une technique d'interaction lumière-matière.

I.1.2.1. Suivi de la séparation de phases par microscopie confocale

Le comportement du mélange lait à 4,6% de protéines / guar à 0,3% a été suivi au cours du temps à 43°C par microscopie confocale (Figure 57). Une coupe suivant l'axe Z a été réalisée à intervalles de temps réguliers après la mise en place de l'échantillon dans un entrefer contrôlé de 3 mm (Chapitre 2, II.4.2). L'approche est davantage qualitative que quantitative et les temps inscrits sur la Figure 57 sont donnés à titre indicatif en raison de la difficulté de maîtrise du temps entre la fin du mélange et le début des enregistrements des coupes en Z.

De la même façon que précédemment, les zones claires permettent de localiser les protéines sur les images. Sur le profil correspondant au temps initial, des domaines enrichis en protéines dans la partie inférieure se sont formés. L'excitation moins efficace du laser à mesure qu'il s'éloigne de la lamelle inférieure est responsable de la zone dépourvue de protéines en surface d'échantillon. Contrairement aux observations faites sur la Figure 54, les gouttelettes apparaissent en zones diffuses

et sont de taille inférieure à 50 μm . Il est à noter que l'enregistrement d'un profil complet suivant l'axe Z nécessite un temps d'environ deux minutes pendant lequel les structures peuvent évoluer. Or, Schorsch et al. (1999) ont montré que les mélanges lait / caroube relevaient d'un processus cinétique avec un phénomène de coalescence des gouttelettes détecté seulement une minute après mélange.

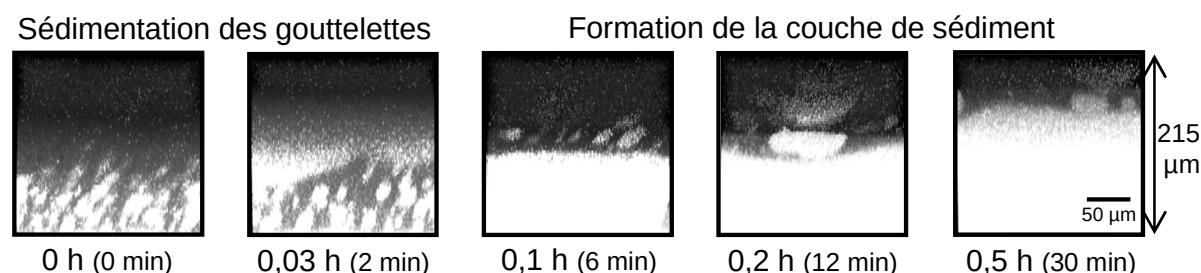


Figure 57 : Suivi de la microstructure du mélange lait / guar à 0,3% dans le temps, indiqué en heures et en minutes, en microscopie confocale à balayage laser à 43°C

Dès les premières minutes, des gouttelettes individualisées apparaissent dans la partie inférieure de l'échantillon puis fusionnent en entrant en collision ou lorsqu'elles atteignent la lamelle inférieure. Après 6 min environ, une couche de sédiment d'environ 100 μm riche en protéines se forme. Ainsi, les gouttelettes ne maintiennent pas leur forme individuelle lors de la formation du sédiment, signe d'une coalescence et vraisemblablement d'une faible tension interfaciale. Au fur et à mesure du temps, la concentration en gouttelettes dans la partie inférieure augmente, ce qui génère une augmentation de la probabilité de collision des gouttelettes, donc de leur coalescence, et par conséquent une augmentation de la couche de sédiment.

I.1.2.2. Suivi de la séparation de phases par une technique d'interaction lumière-matière

La deuxième approche utilisée pour suivre la séparation de phases de mélange lait / guar est basée sur une technique d'interaction lumière-matière. A la différence d'autres techniques de caractérisation, le Turbiscan® permet de déterminer des cinétiques de déstabilisation, aussi bien de suspensions diluées que concentrées, par un balayage régulier des échantillons sur toute leur hauteur. Sachant que le principe de mesure est basé sur la diffusion multiple de la lumière, toute modification de taille ou de concentration en particules est détectée. Ainsi, les suspensions stables sont caractérisées par des valeurs de rétrodiffusion et transmission constantes au cours du temps et sur toute la hauteur de l'échantillon. En revanche, les phénomènes de sédimentation ou crémage sont détectables suite à une variation du niveau de rétrodiffusion et/ou transmission par rapport au profil initial pris au temps de 0 h.

A titre d'exemple, les flux de rétrodiffusion et transmission du mélange lait / guar à 0,3% suivis à 43°C pendant 1 h sont présentés dans la Figure 58.

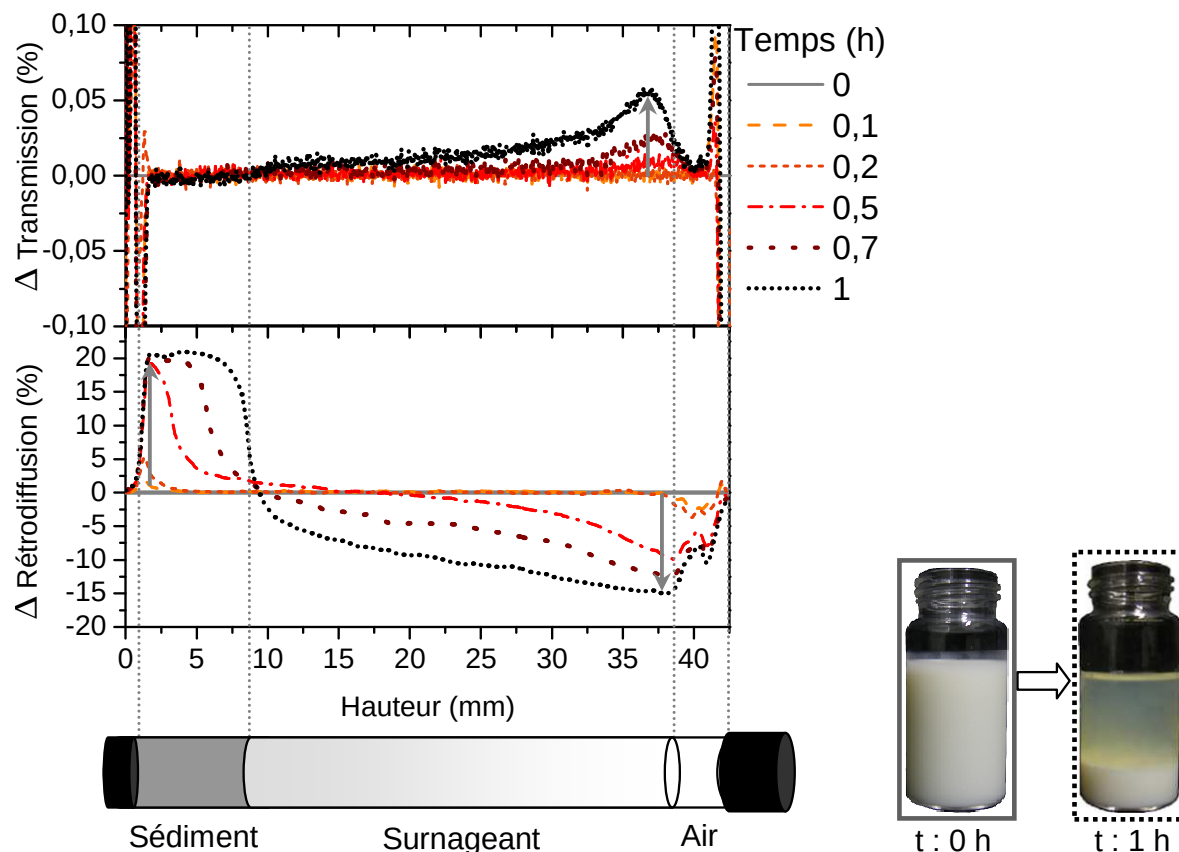


Figure 58 : Suivi des profils de Δ transmission et de Δ rétrodiffusion dans le temps en fonction de la hauteur d'un mélange lait / guar à 0,3% à 43°C. Les photos des tubes correspondent au temps initial et à 1 h. Les flèches grises indiquent le sens d'évolution des valeurs de Δ transmission et de Δ rétrodiffusion dans le temps.

En comparaison avec le profil initial correspondant au temps de 0 h, une modification du niveau de Δ rétrodiffusion apparaît dès les premières minutes après arrêt du mélange. Ce changement se traduit par une augmentation de la valeur de Δ rétrodiffusion dans le bas du tube alors qu'elle diminue dans la partie supérieure. Après 30 min, la valeur de Δ rétrodiffusion reste constante dans la partie inférieure mais un second phénomène intervient avec la formation d'une couche de sédiment. Au cours du temps, la hauteur de sédiment augmente jusqu'à atteindre environ 10 mm après 1 h. Parallèlement, le niveau de Δ transmission tend à augmenter dans le haut du tube, traduisant un début de clarification dans la partie supérieure de l'échantillon.

Un lien étroit entre les mesures de rétrodiffusion et les observations en microscopie confocale (Figure 57) peut être établi. En effet, l'augmentation du niveau de rétrodiffusion dans le bas du tube

correspond à une augmentation de la concentration et probablement de la taille des gouttelettes suite à leur coalescence et/ou leur sédimentation. Par la suite, les nombreuses gouttelettes tassées dans la partie inférieure fusionnent pour former une couche de sédiment qui augmente en hauteur jusqu'à ce que la concentration ou taille des gouttelettes soit insuffisante pour permettre leur sédimentation.

A partir des profils de rétrodiffusion, plusieurs cinétiques peuvent être calculées pour la détermination de la vitesse de sédimentation. Il est à noter que le calcul de la vitesse de sédimentation correspond en fait à une vitesse moyenne pour l'ensemble des gouttelettes. En effet, celle-ci ne tient pas compte de la hauteur initiale des gouttelettes dans le tube après mélange et donc de leur distance à parcourir avant d'atteindre le bas du tube. Deux cinétiques ont été sélectionnées comme étant les plus pertinentes en considérant les profils de rétrodiffusion pour décrire les phénomènes physiques (Figure 59) :

- la valeur maximale de Δ rétrodiffusion dans la partie inférieure de l'échantillon ;
- l'épaisseur relative du pic de rétrodiffusion, qui représente l'évolution du front de la couche de sédiment à un quart de la valeur maximale de Δ rétrodiffusion dans la partie inférieure de l'échantillon.

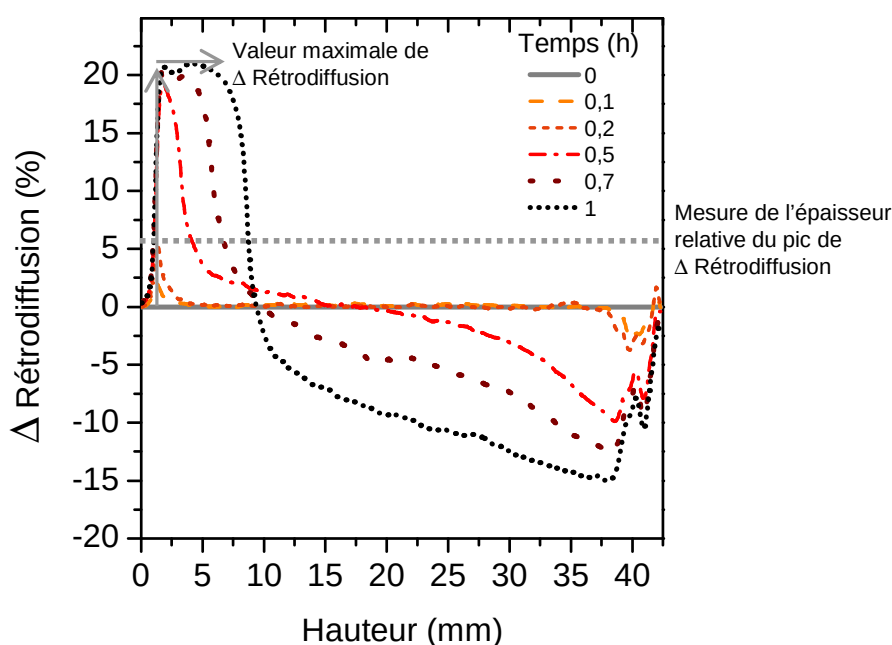


Figure 59 : Détermination de la valeur maximale de Δ rétrodiffusion (flèches grises) et du niveau de Δ rétrodiffusion pour lequel l'épaisseur relative en Δ rétrodiffusion est mesurée (ligne grise en pointillés) à partir des profils de Δ rétrodiffusion d'un mélange lait / guar à 0,3% à 43°C

La valeur de Δ rétrodiffusion dans le bas du tube reste constante jusqu'à 0,1 h après mélange. En revanche, une augmentation significative du signal de rétrodiffusion apparaît au fur et à mesure que les gouttelettes se concentrent au fond du tube. Par la suite, le plateau correspondant à une stabilisation de la valeur de Δ rétrodiffusion peut être relié à la formation de la couche de sédiment, pour laquelle la concentration et la taille de particules n'évoluent plus. Ainsi, deux paramètres peuvent être extraits de cette cinétique : le début de la sédimentation des gouttelettes, correspondant au temps pour lequel le signal de Δ rétrodiffusion au fond du tube augmente ; et le début de formation de la couche de sédiment, détecté par le début du plateau de Δ rétrodiffusion mesuré dans la partie inférieure de l'échantillon (Figure 60). Il est à noter que le début de sédimentation des gouttelettes concerne principalement celles situées dans la partie inférieure du tube, ce qui ne provoque pas de gradient de concentration en particules majeur dans la partie médiane de l'échantillon (Figure 58). Par ailleurs, le décalage du temps de début de formation de la couche de sédiment observé entre la microscopie confocale (Figure 57) et la technique d'interaction lumière-matière pourrait être dû à la mesure effectuée uniquement tous les 40 μm au Turbiscan et/ou au fait que les images ne sont acquises en microscopie confocale qu'après un temps d'environ 2 min correspondant à la mise en place de l'échantillon, le temps étant par conséquent moins bien maîtrisé.

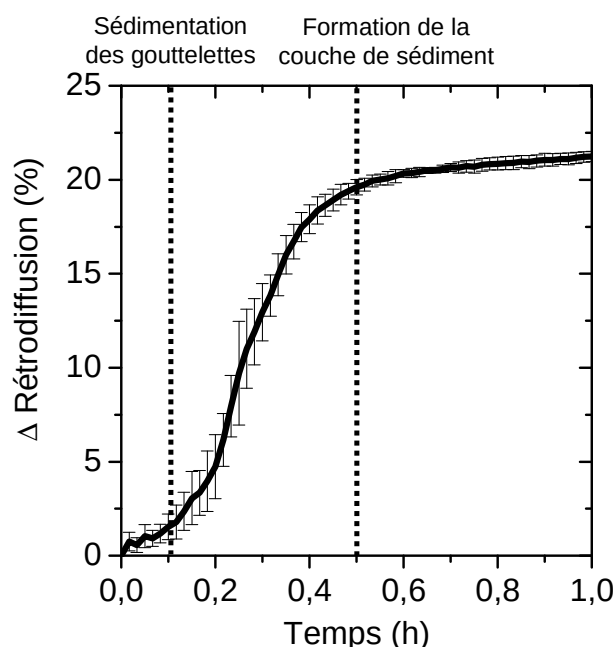


Figure 60 : Détermination du temps de début de sédimentation des gouttelettes et de formation de la couche de sédiment à partir du suivi de la valeur maximale de Δ rétrodiffusion d'un mélange lait / guar à 0,3% à 43°C dans le temps. Les barres d'erreur représentées correspondent à des mesures réalisées en triple sur des échantillons différents.

Les cinétiques d'épaisseur relative du pic de rétrodiffusion sont représentées sur la Figure 61a pour différentes concentrations en guar, de 0,1 à 0,4%. A partir de ces courbes de cinétique, la vitesse moyenne de sédimentation est déterminée par la valeur de la pente (Figure 61a), indicateur de la vitesse de formation du sédiment (Figure 61b).

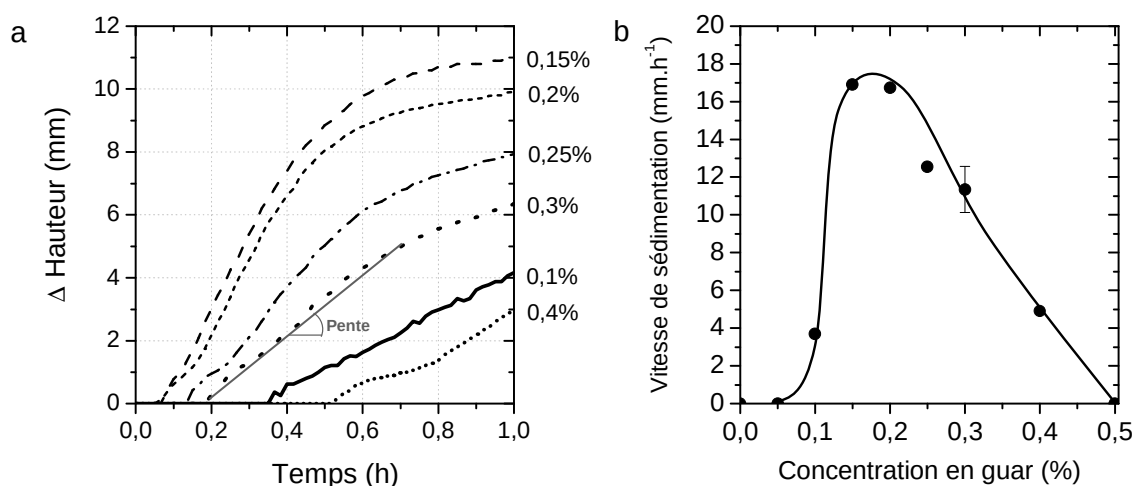


Figure 61 : (a) Cinétiques de l'épaisseur relative en Δ rétrodiffusion de mélanges lait / guar de 0,1% à 0,4% à 43°C. Les concentrations en guar sont indiquées sur la figure ; (b) Vitesses de sédimentation, issues des pentes des cinétiques de l'épaisseur relative en Δ rétrodiffusion, en fonction de la concentration en guar à 43°C

Deux comportements antagonistes sont observés lorsque la concentration en guar augmente. D'une part, la vitesse de sédimentation augmente pour une concentration en guar comprise entre 0,05% et 0,15%. A l'origine de ce phénomène se trouve un mécanisme de déplétion-floculation dont l'intensité s'accroît lorsque la concentration en polymères augmente (Asakura & Oosawa, 1958). D'autre part, une corrélation négative entre la vitesse de sédimentation et la concentration en guar intervient lorsque la concentration est supérieure à 0,2%. Dans ce cas particulier, les effets de déplétion sont considérablement ralentis du fait de la viscosité élevée de la phase continue riche en guar (Figure 56) (Syrbe et al., 1998), ce qui conduit même à une pseudo-stabilité sur l'échelle de temps de 4 h considérée dans l'expérience pour une concentration supérieure ou égale à 0,5%.

I.1.3. Propriétés des mélanges lait / guar à l'équilibre

Après l'étude des mélanges lait / guar avant et lors de la séparation de phases, une dernière approche consiste à étudier ces systèmes dans un état supposé proche de l'équilibre thermodynamique. Ainsi, la fraction volumique des deux phases présentes en fin de sédimentation a

été évaluée pour différentes concentrations en guar, sachant que la phase inférieure est riche en protéines alors que la phase supérieure est enrichie en guar (Figure 62).

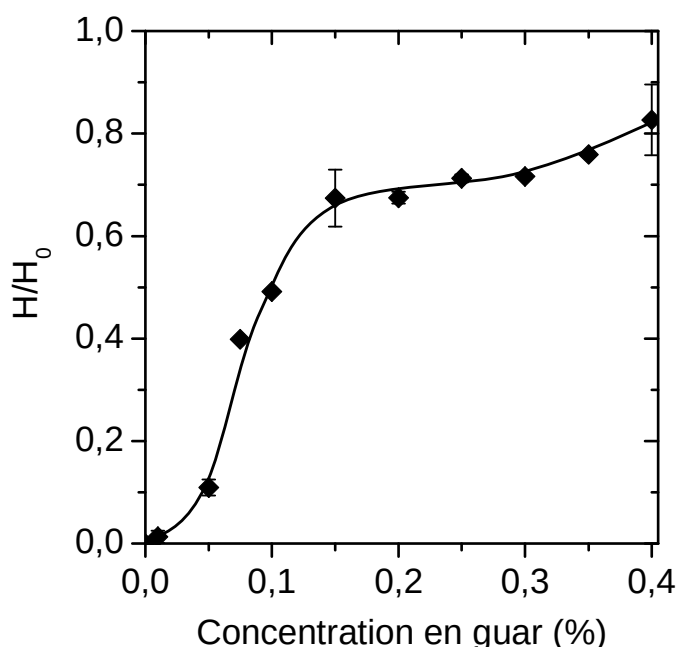


Figure 62 : Hauteurs relatives de surnageant des mélanges lait / guar de 0% à 0,4% après 4 h à 43°C. Les barres d'erreur représentées correspondent à des mesures réalisées en triple sur des échantillons différents.

Une concentration en guar aussi faible que 0,01% suffit à provoquer une séparation de phases. La fraction de surnageant augmente de manière importante pour des concentrations inférieures à 0,15% mais un plateau apparaît aux concentrations élevées. Ce comportement est à mettre en lien avec l'évolution de la vitesse de sédimentation en fonction de la concentration en guar (Figure 61b). En effet, les viscosités des systèmes contenant des concentrations en guar élevées peuvent retarder la séparation de phases de manière importante, voire l'empêcher sur l'échelle de temps considérée de 4 h.

En connaissant la viscosité des mélanges lait / guar ainsi que celle de solutions de guar de différentes concentrations (Figure 56 et Figure 63a), il est possible d'estimer la concentration en guar du surnageant par modélisation des courbes de viscosité de solutions de guar de différentes concentrations. Par la suite, la fraction volumique correspondante peut être calculée à partir du rapport de la concentration en guar dans le mélange initial sur celle de surnageant estimée. Ce calcul théorique implique que le surnageant contienne uniquement du guar ainsi que la distribution du solvant entre les deux phases se produise de manière égale.

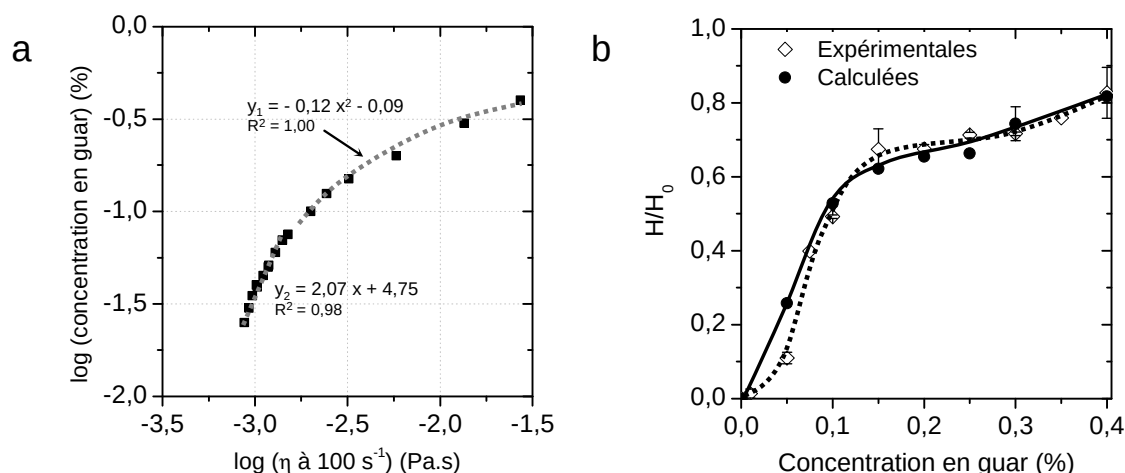


Figure 63 : (a) Courbe étalon entre la viscosité mesurée à 100 s⁻¹ et la concentration en guar d'une solution à 0,1 M NaCl à 43°C ; (b) Hauteurs relatives de surnageant des mélanges lait / guar de 0% à 0,4% obtenues expérimentalement après 4 h à 43°C (ligne en pointillés) ou calculées à partir du rapport de la concentration en guar dans le mélange initial sur celle de surnageant estimée à partir des gammes de concentrations d'une solution de guar à 0,1 M NaCl (ligne pleine)

Les valeurs calculées des fractions volumiques de surnageant en fonction de la concentration en guar sont reportées sur la Figure 63b, les valeurs obtenues expérimentalement étant rappelées en pointillés. Pour une concentration en guar supérieure à 0,1%, les valeurs des hauteurs de surnageant estimées à partir des gammes de concentrations sont superposées à celles déterminées en fin de séparation de phases. Si l'augmentation de viscosité des mélanges lait / guar par rapport aux solutions de guar seul est majoritairement due à un effet de concentration de la phase continue riche en guar, alors la répartition des phases n'évoluerait pas de manière importante entre le début de formation des gouttelettes et la fin de leur sédimentation. Dans ces conditions, la séparation des deux phases à l'échelle microscopique se produirait de manière presque immédiate. En revanche, une légère surestimation de la fraction volumique calculée est constatée pour des concentrations en guar inférieures à 0,1%. Dans ce cas, deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce décalage. D'une part, la sédimentation des zones enrichies en protéines peut s'avérer être lente lorsque la force de déplétion est peu importante, notamment en présence d'une faible concentration en polymères. Une seconde explication pourrait rendre compte de ce comportement : l'estimation de la fraction volumique par le calcul n'étant valable que dans le cas d'une phase continue enrichie en guar, les systèmes contenant moins de 0,1% de guar présenteraient une phase continue protéique avec des inclusions de guar. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'aucune augmentation de Δ rétrodiffusion

dans le bas du tube n'est constatée sur les profils obtenus au Turbiscan, alors qu'une clarification lente survient dans la partie supérieure du tube (résultats non montrés).

A partir de la fraction volumique correspondant à la phase protéique, il est possible d'estimer la concentration en protéines au sein des gouttelettes ou dans la couche de sédiment. Au-delà de 0,15% de guar, une surconcentration en protéines des systèmes mixtes proche d'un facteur quatre, soit près de 200 g/kg de protéines, s'établirait par rapport à la concentration du lait initial de 46 g/kg de protéines.

I.2. Propriétés des gels acides enrichis en guar

Les résultats précédents concernant les mélanges lait / guar à pH du lait peuvent servir de base à l'étude de ces systèmes après gélification. En effet, la gélification intervient comme un mécanisme supplémentaire à la séparation de phases mise en évidence au sein de ces systèmes mixtes. Dans ce cadre, la gélification des protéines de lait a été menée par acidification progressive des mélanges à 43°C à l'aide de GDL jusqu'à pH 4,6, mimant la gélification acide obtenue par l'action des ferments, mais avec un temps de gélification plus court. De la même manière que dans l'étude précédente, les propriétés macroscopiques et microscopiques ainsi que le comportement rhéologique des systèmes mixtes contenant de 0 à 0,5% de guar ont été étudiés.

I.2.1. Comportement macroscopique des gels fermes acides avant brassage

Les hauteurs relatives de surnageant des gels fermes en fonction de la concentration en guar ajoutée dans le lait avant acidification sont données dans la Figure 64, les valeurs obtenues dans les mélanges lait / guar non acidifiés étant reprécisées pour comparaison. Aussi bien pour les mélanges acidifiés que ceux à pH neutre, le surnageant se compose essentiellement de guar, de lactosérum ou d'un mélange des deux composants, les protéines étant minoritaires.

Dès l'ajout de 0,05% de guar, une légère séparation de phases se forme dans la partie supérieure du gel ferme, alors qu'une augmentation spectaculaire de la quantité de surnageant est observée pour 0,1% de guar. Des niveaux de synérèse élevés ont également été observés dans des systèmes lait / caroube à des concentrations inférieures ou égales à 0,1% en milieu acidifié (Sanchez et al., 2000). Ce phénomène a été attribué à une micro-séparation de phases dans le réseau protéique, contribuant à la porosité et à l'expulsion importante de lactosérum des gels acides mixtes.

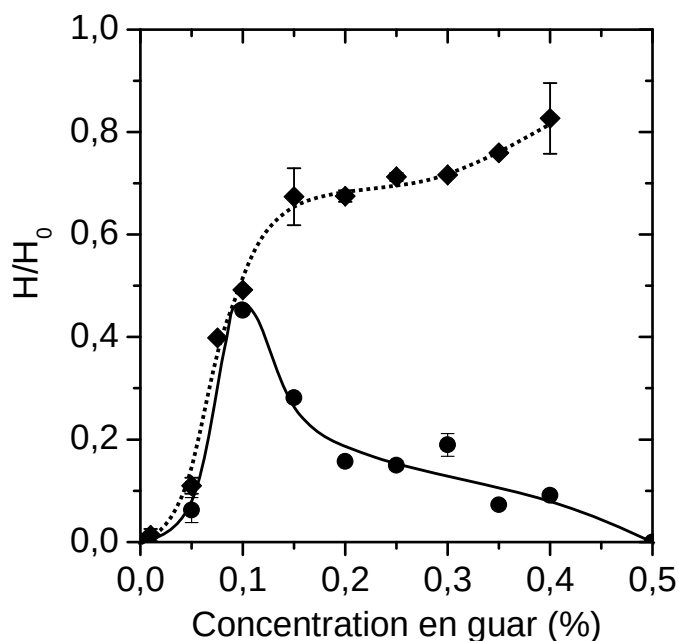


Figure 64 : Hauteurs relatives de surnageant des gels fermes contenant de 0% à 0,5% de guar acidifiés avec 1,5% de GDL à 43°C (ligne pleine) et des mélanges lait / guar de 0% à 0,4% non acidifiés après 4 h à 43°C (ligne en pointillés)

A la différence des gels enrichis en guar à des concentrations inférieures à 0,1%, une nette diminution de la hauteur de surnageant des gels, composé vraisemblablement d'un mélange de guar et de lactosérum, apparaît pour des concentrations en guar comprises entre 0,1 et 0,5%. Par ailleurs, le comportement de phases de ces gels mixtes acidifiés ne suit pas la même tendance que celui des mélanges non acidifiés. Alors que la quantité de surnageant des mélanges lait / guar à pH neutre reste sensiblement stable à partir de 0,15% de guar, les systèmes acidifiés tendent vers une absence de séparation de phases à mesure que la concentration en guar augmente.

Cette diminution de la phase de surnageant suite à la gélification des mélanges lait / guar peut s'expliquer par la combinaison de deux phénomènes : un effet de viscosité élevée de la phase continue ralentissant la séparation de phases et la présence du mécanisme de gélification. La première hypothèse est appuyée par le fait que la viscosité des mélanges lait / guar augmente de manière importante en fonction de la concentration en guar, notamment au-delà de 0,2% de guar, ce qui limiterait considérablement la sédimentation des gouttelettes (Figure 61b).

I.2.2. Microstructure des gels acides brassés

Les différences de comportement de phases observées entre les mélanges lait / guar à pH neutre ou acide peuvent être la conséquence de la mise en place d'une structure particulière suite à la gélification des protéines. De manière à compléter les résultats de séparation de phases macroscopique des gels mixtes acides, une étude de la microstructure de ces gels après brassage a été menée par microscopie confocale.

Les images de microscopie confocale des gels acides brassés contenant de 0 à 0,5% de guar sont présentées sur la Figure 65. Les zones claires correspondent à la fluorescence du DyLight 549 et révèlent ainsi la présence de protéines. En absence de guar, la distribution du réseau protéique est homogène. L'ajout d'une concentration en guar aussi faible que 0,05% modifie le réseau en le densifiant et en générant des pores de taille importante entre les mailles du gel caséique. Lorsque la concentration en guar est supérieure ou égale à 0,15%, un ensemble de morphologies très particulières apparaît, avec la formation de longs filaments enchevêtrés puis de micro-gels allongés et sphériques, à mesure que la concentration en polysaccharides augmente.

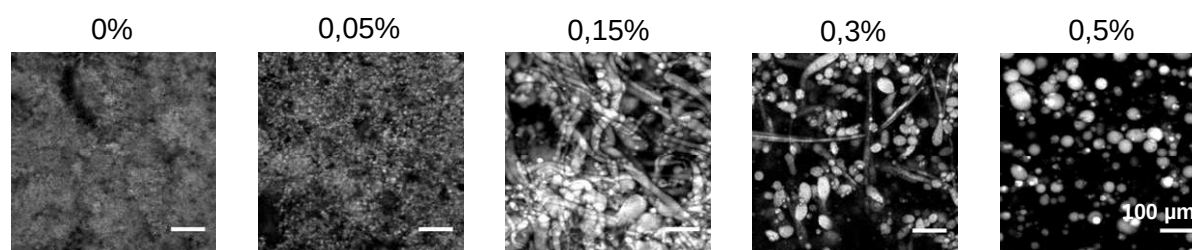


Figure 65 : Gels brassés contenant de 0% à 0,5% de guar et acidifiés avec 1,5% de GDL à 43°C observés en microscopie confocale à balayage laser à 20°C. Les concentrations en guar sont indiquées sur la figure. La barre représente 100 µm.

En s'appuyant sur les résultats obtenus par Sanchez et al. (2000), la densification du réseau, en présence d'une concentration en galactomannanes inférieure ou égale à 0,1%, serait attribuée à un équilibre entre la gélification de micelles de caséines concentrées et des effets de volume exclu. Une des conséquences de ce phénomène est un tassement du gel qui résulte en une expulsion de lactosérum et/ou de solution de guar importante. Ceci explique la quantité élevée de surnageant contenue dans les gels fermes à base de guar à 0,1% (Figure 64).

Lorsqu'une concentration importante en polysaccharides neutres tels que le guar est introduite dans le lait, le système se structure sous la forme d'une émulsion eau dans eau (Figure 54). Au sein de cette émulsion, la phase ayant la plus grande fraction volumique à l'équilibre tend à former la phase

continue. Puisque les micro-gels sont de nature protéique, la phase continue des systèmes contenant de 0,15 à 0,5% de guar est enrichie en guar. Au moment de l'agrégation acide au point isoélectrique des protéines de lait, les gouttelettes passent par une transition sol-gel et se figent. Ainsi, ce mécanisme aboutit à la formation de micro-gels compacts riches en protéines dispersés dans une phase continue enrichie en guar. Par ailleurs, la question de la sphéricité plus ou moins parfaite des micro-gels se pose. En effet, à notre connaissance, aucune étude portant sur les gels laitiers acides enrichis en polysaccharides neutres ne rapporte de morphologies sous la forme de filaments ou de micro-gels allongés. Ce point sera discuté plus largement dans le paragraphe II de ce chapitre.

I.2.3. Propriétés viscoélastiques des gels acides brassés

En complément des études du comportement de séparation de phases macroscopique et de la microstructure, les propriétés viscoélastiques des gels acides brassés ont été analysées. Les spectres viscoélastiques des gels brassés à base de lait additionné de 0 à 0,5% de guar sont représentés sur la Figure 66.

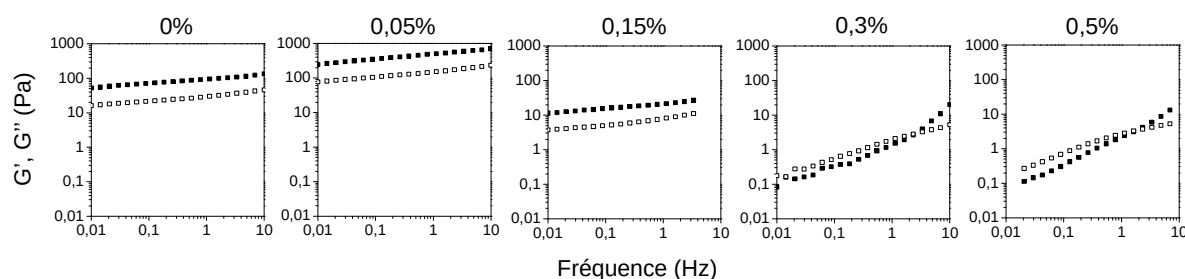


Figure 66 : Spectres viscoélastiques à 4°C des gels brassés contenant de 0% à 0,5% de guar et acidifiés avec 1,5% de GDL à 43°C ((■) G' , (□) G''). Les concentrations en guar sont indiquées sur la figure.

Une grande diversité de comportements est mise en évidence selon la concentration en guar. Aux concentrations en guar inférieures à 0,15%, le spectre a une allure semblable à celui du gel brassé sans guar, caractéristique d'un système structuré avec le module G' supérieur à G'' et peu de dépendance à la fréquence. Cependant, un renforcement notable des propriétés viscoélastiques a lieu pour une concentration en guar de 0,05% alors que les modules sont plus faibles dans le gel contenant 0,15% de guar. L'ajout d'une concentration supérieure ou égale à 0,3% de guar conduit à un changement radical des propriétés viscoélastiques. En effet, les propriétés « solides » des systèmes tendent à disparaître au profit des propriétés liquides. Celles-ci se manifestent par une dépendance des modules sur tout le domaine de fréquence ainsi qu'un module visqueux supérieur au module élastique aux faibles fréquences.

Une autre représentation des modifications rhéologiques spectaculaires ayant lieu pour ces gels est illustrée par l'évolution de $\tan \delta$ en fonction de la concentration en guar (Figure 67). Pour des concentrations inférieures à 0,2% de guar, une valeur de $\tan \delta$ stable d'environ 0,3, caractéristique de systèmes très structurés, est relevée. En revanche, lorsque la concentration en guar augmente, l'augmentation importante de $\tan \delta$ est un signe de la transition vers un système moins structuré typique d'une solution macromoléculaire. Cette transition se produit entre 0,25 et 0,3% de guar et est suivie d'une légère baisse de $\tan \delta$ pour des concentrations en guar supérieures à 0,35%.

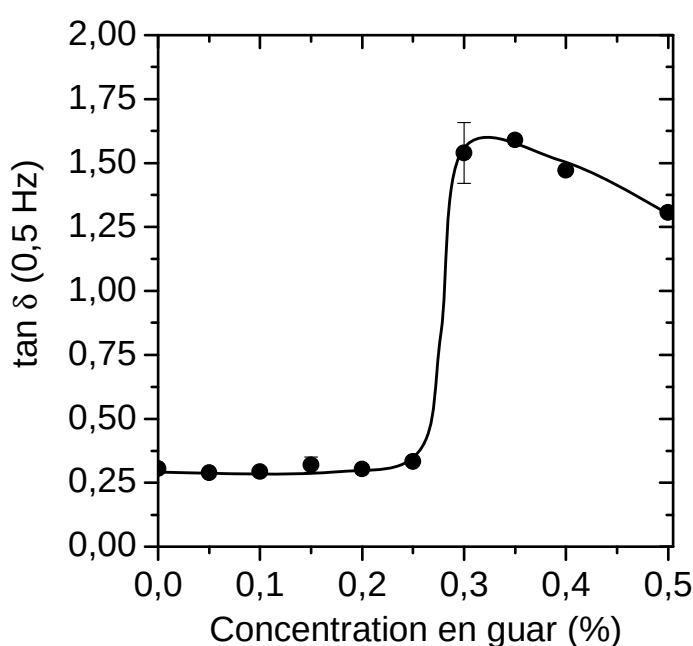


Figure 67 : Evolution de $\tan \delta$ à 0,5 Hz à 4°C des gels brassés contenant de 0% à 0,5% de guar et acidifiés avec 1,5% de GDL à 43°C

L'augmentation des modules viscoélastiques du gel à base de 0,05% de guar pourrait être liée à un effet de synergie suite à un renforcement du gel lié à des effets d'exclusion de volume. Dans ce cas, la concentration locale en protéines contribue à augmenter la connectivité du réseau caséique. Ce phénomène a été largement illustré dans le cas de gels mixtes protéines sériques / polysaccharides (Bryant & McClements, 2000 ; Ould Eleya & Turgeon, 2000 ; Simonet, 2000). A l'inverse, un effet antagoniste produisant un affaiblissement puis une absence de connectivité du gel sont mis en évidence pour une concentration en guar supérieure à 0,15%. Puisque les micro-gels riches en protéines constituent la phase dispersée (Figure 65), une solution enrichie en guar correspond à la phase majoritaire, à l'origine des spectres typiques d'une solution macromoléculaire observés dans

les gels à 0,3 et 0,5% de guar. La légère diminution de $\tan \delta$ observée à des concentrations en guar supérieures à 0,35% peut être attribuée à la haute viscosité de la phase continue et à la présence de nombreux micro-gels sphériques, agissant comme une suspension concentrée de particules. Le gel contenant 0,15% de guar constitue un cas particulier. Bien que la phase continue soit riche en guar, les enchevêtrements des longs filaments solides contribuent à la structuration du système.

II. EFFET DE LA GELIFICATION AU REGARD DE LA CINETIQUE DE SEPARATION DE PHASES

Lors d'une gélification en présence d'une séparation de phases, les mélanges faisant intervenir des polysaccharides et des protéines peuvent donner lieu à un phénomène antagoniste ou de synergie, se traduisant respectivement par un affaiblissement ou un renforcement des propriétés viscoélastiques. A l'origine de ces phénomènes se trouve le processus de séparation de phases de type ségrégatif qui n'aboutit pas à son stade ultime en raison de la formation du gel. Ceci met en lumière le caractère primordial de l'aspect cinétique des deux événements se produisant parallèlement : la séparation de phases et la gélification.

L'objectif de cette partie est en premier lieu de faire varier la cinétique de gélification lorsqu'un phénomène de séparation de phases se passe conjointement. Il s'agira ensuite d'étudier l'effet d'une accélération de la séparation de phases sur la structure des gels mixtes enrichis en guar.

II.1. Effet de la cinétique de gélification sur les propriétés des gels acides brassés

II.1.1. Effet de la concentration en GDL sur la cinétique de gélification

Dans le cas d'une acidification chimique, la cinétique de formation du gel laitier peut être contrôlée en faisant varier la concentration en GDL (Horne, 2001). La Figure 68 montre la diminution du pH dans le temps, consécutive à l'ajout d'une concentration variable de GDL (1, 1,5 ou 2,5%) dans le lait à 43°C.

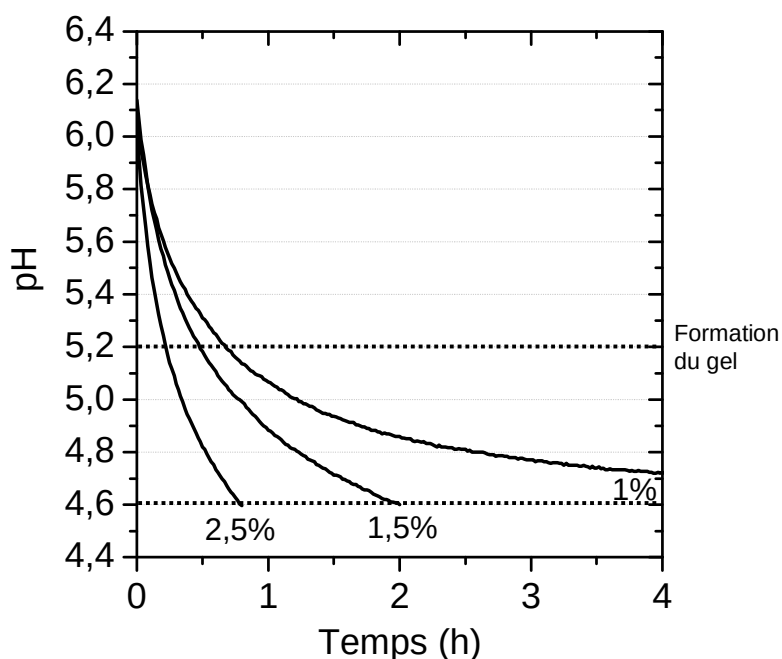


Figure 68 : Cinétiques de pH d'un lait acidifié avec 1%, 1,5% ou 2,5% de GDL à 43°C. Les concentrations en GDL sont indiquées sur la figure. Le pH de 5,2 correspond à la formation du gel.

Le pH initial du lait d'environ 6,7 diminue jusqu'au pH de 4,6 après 2 h ou 50 min suite à un ajout de 1,5% ou 2,5% de GDL respectivement, et jusqu'au pH de 4,7 après 4 h pour 1% de GDL. La diminution du pH est très fortement ralentie par l'abaissement rapide de la température de 43°C à 20°C. Lors de la baisse du pH, les protéines de lait subissent un ensemble de modifications physico-chimiques aboutissant à la mise en place d'un gel vers le pH 5,2 pour un lait ayant été traité thermiquement (Chapitre 1, I.2 et I.3) (Lucey et al., 2001). A partir des cinétiques de pH, il en ressort que la diminution de pH est plus rapide et le temps nécessaire à l'agrégation des protéines plus court pour l'ajout d'une quantité de GDL importante. Ceci implique que le temps de gélification diminue lorsque la concentration en GDL augmente. Comme l'illustre la Figure 68, le pH de 5,2 est atteint après 0,7, 0,5 et 0,2 h (soit 42, 30 et 12 min) pour l'ajout d'une concentration en GDL de 1, 1,5 et 2,5% respectivement.

McMahon et al. (2009) et Jacob et al. (2011) ont montré que le pH de gélification n'était pas modifié par la vitesse d'acidification. Cependant, le cas des mélanges protéines de lait / polysaccharides est plus complexe. Ainsi, un effet de concentration locale en protéines intervient en présence d'une séparation de phases, ce qui pourrait faciliter les points de connexion entre ces protéines concentrées et mener à un pH critique de gélification plus élevé. Un phénomène

d'accélération de la gélification des protéines a été illustré pour les mélanges entre protéines sériques et divers polysaccharides (Renard et al., 1998 ; Capron et al., 1999 ; Simonet, 2000). Celui-ci a été attribué à un processus de déplétion-floculation entre les agrégats de protéines et les polysaccharides, conduisant à des micro-séparations de phases et par conséquent à une surconcentration en protéines dans les micro-domaines ainsi formés. Le pH de début d'agrégation des protéines n'a pas été étudié de manière systématique pour les différents mélanges lait / guar de 0 à 0,5% dans le cadre de ce travail. Néanmoins, l'étude des mesures de rétrodiffusion en lien avec le suivi de gélification réalisé à l'aide d'un rhéomètre indique que le pH varierait de moins de 0,1 à 0,2 unité pH (résultats non montrés). Par conséquent, le pH de 5,2 est pris arbitrairement comme pH critique de gélification pour l'ensemble des systèmes.

II.1.2. Effet de la cinétique de gélification sur les propriétés des gels à 0,3% de guar

Dans un premier temps, les mélanges lait / guar à 0,3% acidifiés à l'aide de trois concentrations différentes en GDL ont été considérés. Ceci a permis d'examiner de plus près l'effet de la vitesse de gélification sur les propriétés des gels, tout en maintenant une cinétique de séparation de phases fixe. Dans le cas de systèmes mixtes gélatine / polysaccharides, un effet d'intensification de la séparation de phases a été montré suite à la gélification de la gélatine pour laquelle le passage de la conformation pelote à la conformation hélice augmente considérablement le volume hydrodynamique occupé par les chaînes (Lundin et al., 2000). En revanche, les micelles de caséines ne subiraient pas de changements suffisamment majeurs de leur volume hydrodynamique lors d'une acidification pour modifier le phénomène de déplétion-floculation.

La compréhension de l'interaction entre les cinétiques de séparation de phases et de gélification mérite d'être approfondie. Les deux paramètres issus de l'évolution de la Δ rétrodiffusion dans le bas du tube (début de sédimentation des gouttelettes et début de formation de la couche de sédiment, Figure 60) sont rappelés sur la Figure 69 dans laquelle les courbes d'abaissement du pH en fonction du temps sont représentées en échelle semi-logarithmique afin de bien distinguer les trois cinétiques.

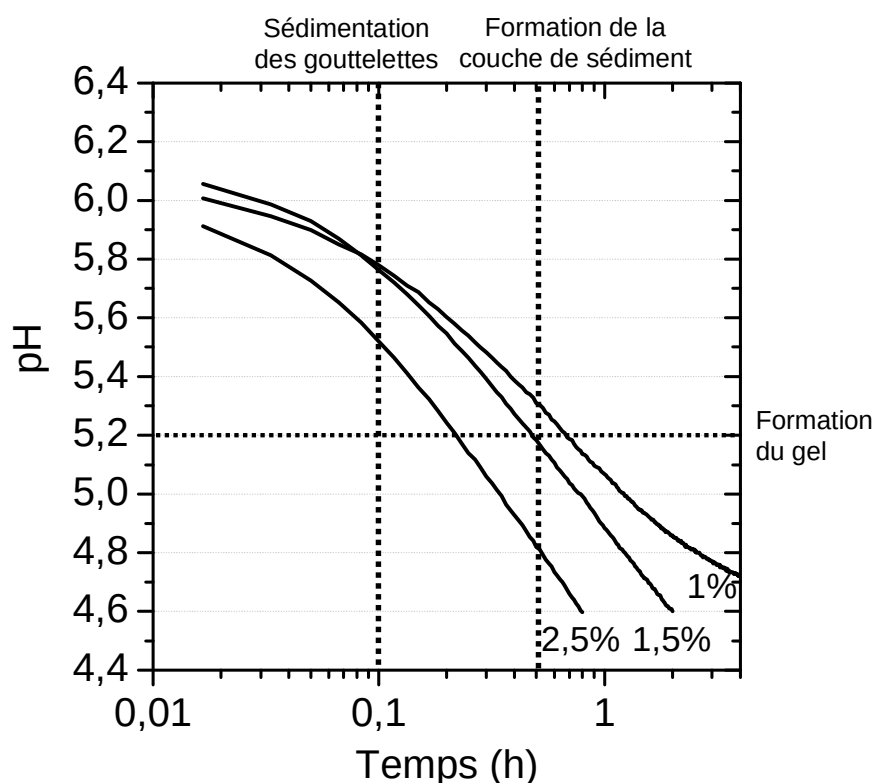


Figure 69 : Cinétiques de pH d'un mélange lait / guar à 0,3% acidifié avec 1%, 1,5% ou 2,5% de GDL à 43°C. Les concentrations en GDL sont indiquées sur la figure. Les lignes en pointillés correspondent au temps de début de sédimentation des gouttelettes (0,1 h), de la formation de la couche de sédiment (0,5 h) et au pH de formation du gel (pH 5,2).

La séparation de phases et la gélification des protéines à pH 5,2 constituent donc deux événements survenant à des intervalles de temps différents ou parfois simultanément. Par exemple, dans le cas du mélange acidifié avec 2,5% de GDL, seules quelques gouttelettes, probablement situées dans la partie inférieure de l'échantillon, ont commencé à sédimenter lorsque la gélification a lieu à pH 5,2. Le système contenant 1,5% de GDL constitue un cas particulier. En effet, la gélification intervient exactement en même temps que le début d'apparition de la couche de sédiment. En revanche, pour le mélange à base de 1% de GDL, il existe un intervalle de temps entre le moment auquel la couche de protéines sédimentées apparaît et la formation du gel. Dans cette situation, le début de la séparation de phases macroscopique a lieu avant la gélification.

Puisque les cinétiques relatives de gélification et de séparation de phases varient pour les systèmes étudiés, des propriétés de gels différentes peuvent être attendues selon la concentration en GDL. Les microstructures des gels mixtes brassés acidifiés à l'aide de 1, 1,5 ou 2,5% de GDL sont montrées sur la Figure 70a.

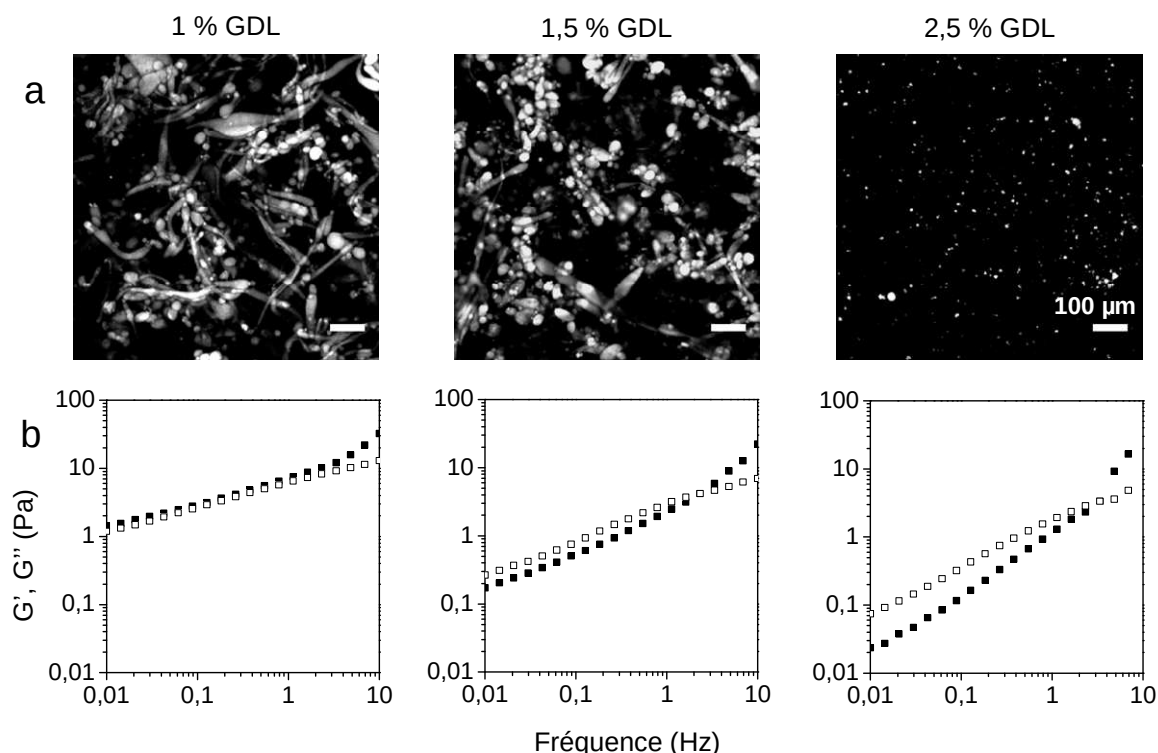


Figure 70 : (a) Microstructure observée en microscopie confocale à balayage laser à 20°C ; (b) Spectres viscoélastiques à 4°C des gels brassés contenant 0,3% de guar acidifiés avec 1%, 1,5% ou 2,5% de GDL à 43°C ((■) G' , (□) G''). Les concentrations en GDL sont indiquées sur la figure. La barre représente 100 μm . Pour l'étape de brassage, les gels acidifiés à 1% et 1,5% de GDL ont été brassés par passage à travers les deux tuyaux car ils présentaient des structures fibrillaires de taille trop élevée.

Le gel préparé avec 1,5% de GDL présente les mêmes caractéristiques microstructurales que celles de la Figure 65 : un mélange de micro-gels allongés et de filaments dispersés dans une phase continue enrichie en guar. Au contraire, des micro-gels de forme sphérique, enrichis en protéines et de faible taille apparaissent dans le système à base de 2,5% de GDL. Le mélange acidifié avec 1% de GDL diffère des deux systèmes précédents, avec la formation de longs filaments légèrement enchevêtrés. Particulièrement pour ce système, un gradient de concentration en protéines au sein des micro-gels les plus allongés s'est mis en place, avec le corps du filament très étiré légèrement moins riche en protéines que la zone terminale. Il est à noter que les morphologies de filaments et de micro-gels existaient dans le gel ferme toutes orientées verticalement. A l'issue de l'étape de brassage, ces structures n'ont pas été détruites et se trouvent non orientées.

Par ailleurs, les propriétés rhéologiques des gels sont à mettre en lien avec ces microstructures particulières (Figure 70b). Ainsi, le spectre viscoélastique du gel acidifié avec 2,5% présente un module visqueux supérieur au module élastique pour de faibles fréquences et une grande dépendance

à la fréquence, typique d'une solution macromoléculaire et cohérent avec la présence d'une phase continue concentrée en guar. La présence de filaments ou de micro-gels allongés augmente significativement les modules viscoélastiques dans les cas des systèmes préparés à l'aide de 1% et 1,5% de GDL, bien que comportant également une phase continue riche en guar. L'évolution des spectres en fonction de la concentration en GDL permet donc de rendre compte de l'allongement des micro-gels.

En s'appuyant sur la Figure 69 et sur la Figure 70, l'hypothèse selon laquelle les cinétiques relatives de séparation de phases et de gélification détermineraient les propriétés des gels peut être discutée. D'après les études du mélange lait / guar à 0,3% en milieu neutre, une structure sous la forme d'une émulsion eau dans eau instable apparaît dès les premières minutes après arrêt du mélange (Figure 54). Suite au mouvement brownien favorisant la collision des gouttelettes, celles-ci coalescent et commencent à sédimenter (Foster et al., 1997 ; Schorsch et al., 1999). Néanmoins, dans le système acidifié avec 2,5% de GDL, la gélification des protéines intervient avant le début de la séparation de phases macroscopique. De ce fait, les gouttelettes liquides de petite taille ont été figées par la formation du gel en une dizaine de minutes, avant que les phénomènes de coalescence et de sédimentation ne se produisent de façon trop importante.

Dans le cas des mélanges acidifiés avec 1% et 1,5%, la compétition entre les processus de gélification et de séparation de phases est à l'origine de la diversité de morphologies observées. Par exemple, les gouttelettes contenues dans les systèmes préparés avec 1% et 1,5% de GDL ont eu le temps de croître par coalescence avant que la gélification ait eu lieu. Le procédé de sédimentation dépend entre autres de la différence de densité entre les deux phases et de la taille des particules. En outre, les gouttelettes des émulsions eau dans eau sont facilement déformables en raison de leur faible tension interfaciale (Tolstoguzov, 2003). Ces éléments contribuent à l'hypothèse selon laquelle les gouttelettes seraient suffisamment grandes et denses pour sédimenter, mais se déformeraient simultanément, sous l'action de la gravité et/ou de l'agitation thermique. Cette explication est appuyée par le fait que la taille des filaments augmente lorsque le délai séparant le début de la sédimentation et la gélification est élevé, tel que dans le cas du mélange acidifié avec 1% de GDL. Finalement, cet intervalle de temps permet à la structure d'évoluer avant d'être figée au travers de la gélification des protéines.

II.1.3. Effet de la cinétique de gélification sur les propriétés des gels à 0-0,5% de guar

A partir de l'exemple du système lait / guar à 0,3% acidifié avec trois concentrations de GDL différentes, une réflexion concernant l'effet de la vitesse de gélification en présence d'un phénomène de séparation de phases a pu être initiée. Cette démarche a permis d'expliquer la mise en place de structures particulières et de les relier à leurs propriétés rhéologiques (Figure 70a et b). En complément, il convient de se questionner quant à l'éventuelle généralisation de ce phénomène à des systèmes présentant des cinétiques de séparation de phases différentes de cet exemple. Ainsi, l'influence de la vitesse de gélification a été étudiée dans les mélanges contenant différentes proportions de guar, la gamme variant de 0 à 0,5%.

Avant d'étudier les propriétés des systèmes mixtes après gélification, les temps de début de sédimentation des gouttelettes et de formation de la couche de sédiment sont précisés sur la Figure 71. Pour rappel, ceux-ci ont été obtenus dans les mélanges non acidifiés à partir de la cinétique de Δ rétrodiffusion dans le bas du tube (Figure 60). Par ailleurs, les temps correspondant à l'obtention du pH de 5,2, suite à l'ajout de 1, 1,5 ou 2,5% de GDL dans le lait, sont représentés en pointillés. De manière conjointe à ce qui avait été observé sur la Figure 61b, une nette diminution du temps de sédimentation se produit entre 0,1% et 0,15% de guar et est attribuée à une intensification de la force de déplétion-floculation. Cependant, les temps de sédimentation des gouttelettes et de formation de la couche de sédiment tendent à augmenter significativement lorsque la concentration en guar est supérieure à 0,2%. Ce résultat apparaît lui aussi en accord avec ce qui a été décrit auparavant et peut être interprété par une augmentation de la viscosité des mélanges, freinant la séparation de phases à mesure que la concentration en guar augmente.

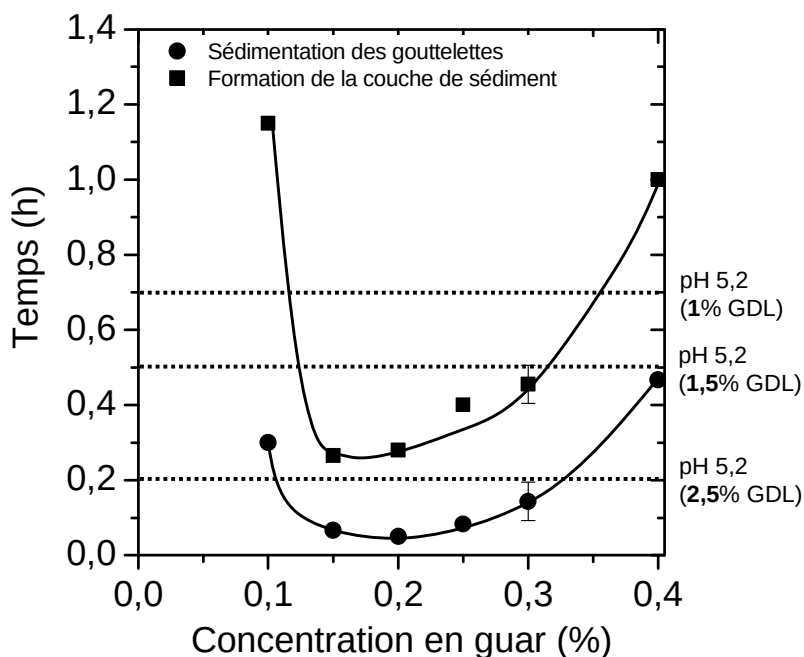


Figure 71 : Temps de début de sédimentation des gouttelettes et de formation de la couche de sédiment de mélanges lait / guar de 0,1% à 0,4%. Les temps de formation du gel à partir d'un lait acidifié avec 1%, 1,5% ou 2,5% de GDL à 43°C sont précisés en pointillés.

En fonction du temps de gélification et donc de la concentration en GDL ajoutée au mélange, trois cas sont à distinguer. La première situation concerne l'acidification menée avec 2,5% de GDL pour laquelle aucun des mélanges n'a la possibilité de former une couche de sédiment avant d'atteindre le pH critique de gélification. Seul un début de coalescence et de sédimentation de quelques gouttelettes se situant dans la partie inférieure du tube peut se produire avant leur gélification pour des concentrations comprises entre 0,15% et 0,3%. En revanche, l'acidification des systèmes avec 1,5% constitue un cas plus complexe. En effet, aux extrêmes de concentration en guar, la faible force de déplétion ou la viscosité élevée du mélange ne permettent pas la formation d'une couche de sédiment avant la gélification. Pour des concentrations en guar intermédiaires, comprises entre 0,15% et 0,3%, la sédimentation de nombreuses gouttelettes a débuté lorsque la gélification des protéines intervient. Le dernier cas à considérer est mis en œuvre lors de l'utilisation de 1% de GDL. Il conduit aux mêmes observations que le cas des mélanges acidifiés avec 1,5% de GDL, avec toutefois une ampleur de sédimentation bien plus importante, en raison du temps plus élevé nécessaire à la gélification.

De la même manière que dans le cas du mélange lait / guar à 0,3% acidifié à différentes vitesses, l'effet d'une variation de la cinétique d'acidification au regard de la cinétique de sédimentation peut conduire à des modifications des propriétés des gels fermes et brassés. La Figure 72 présente l'évolution de la fraction de surnageant dans les gels fermes acidifiés avec 1, 1,5 ou 2,5% de GDL en fonction de la concentration en guar, les valeurs obtenues dans les mélanges lait / guar non acidifiés étant rappelées en pointillés. Quelle que soit la concentration en GDL ajoutée et donc la vitesse de gélification, une augmentation importante de la hauteur de surnageant suivie d'un maximum local est mise en évidence dans les gels fermes contenant une concentration en guar inférieure ou égale à 0,1%. Toutefois, des différences apparaissent lorsque la concentration en guar est comprise entre 0,1 et 0,25%. D'une part, le maximum local de hauteur de surnageant observé pour 0,1% de guar est d'autant plus important que la concentration en GDL est faible. D'autre part, il s'étend sur une gamme de concentrations en guar plus large pour une faible vitesse de gélification. Aux concentrations en guar élevées, le comportement de séparation de phases est similaire pour les trois concentrations en GDL et se caractérise par une diminution importante de la fraction de surnageant à mesure que la concentration en polysaccharides augmente.

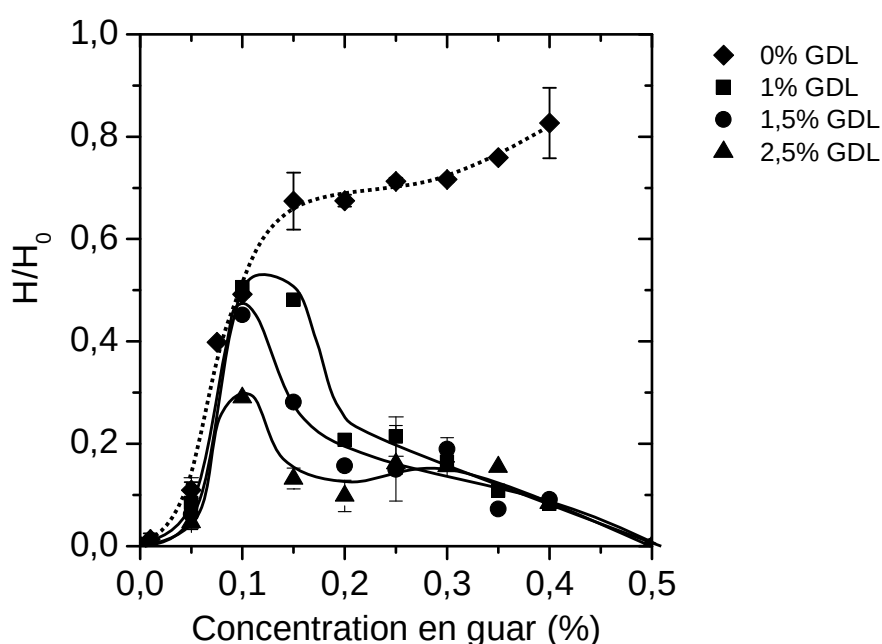


Figure 72 : Hauteurs relatives de surnageant des gels fermes contenant de 0% à 0,5% de guar acidifiés avec 1%, 1,5% ou 2,5% de GDL à 43°C. Les hauteurs relatives de surnageant des mélanges lait / guar de 0% à 0,4% obtenues après 4 h à 43°C sont rappelées en pointillés.

A partir de la Figure 71 indiquant les temps relatifs de séparation de phases et de gélification des systèmes contenant de 0 à 0,5% de guar, il convient de rappeler que plus la concentration en GDL augmente, donc plus le temps nécessaire à la gélification des protéines diminue, moins la sédimentation peut s'opérer au sein des mélanges. Ce phénomène peut expliquer les différences du pic de la fraction de surnageant à 0,1% de guar observées entre les diverses concentrations en GDL. Ainsi, la micro-séparation de phases à l'origine de la synérèse serait de plus grande ampleur lorsque la gélification interviendrait tardivement, tel que dans le cas des gels acidifiés avec 1% de GDL. En revanche, le blocage de la séparation de phases constaté dans les gels contenant de 0,2% à 0,5% de guar par rapport aux mélanges non acidifiés serait peu dépendant de la vitesse de gélification. Dans ce cas, l'effet de la vitesse de gélification peut être masqué par le ralentissement de la sédimentation des gouttelettes du fait de la viscosité importante de la phase continue riche en guar. Cette hypothèse mérite toutefois d'être validée par une étude complémentaire des microstructures et des propriétés rhéologiques des gels après brassage.

Les microstructures des gels brassés contenant de 0 à 0,5% de guar et acidifiés avec 1, 1,5 ou 2,5% de GDL sont montrées sur la Figure 73. Les protéines marquées avec le rouge de Nil apparaissent dans les zones claires. Par contraste, les zones sombres permettent de localiser le guar et/ou le lactosérum.

Les images correspondant aux systèmes acidifiés avec 1,5% de GDL peuvent être mises en lien avec les images de microscopie confocale obtenues pour cette même vitesse d'acidification (Figure 65). Elles constituent en effet une illustration de la transition, lorsque la concentration en guar augmente de 0 à 0,5%, d'un système homogène à un réseau plus poreux, puis à un ensemble de micro-gels allongés puis sphériques. Cette évolution des microstructures est également constatée dans les mélanges contenant 1% et 2,5% de GDL. Toutefois cette transition a lieu avec un décalage à des concentrations en guar de plus en plus faibles, lorsque la concentration en GDL augmente de 1% à 2,5%. A titre d'exemple, la morphologie sous forme de filaments apparaît dès l'ajout de 0,1% de guar pour une concentration en GDL de 2,5%, alors qu'elle n'est observée qu'à partir de 0,15% pour des concentrations en GDL plus faibles.

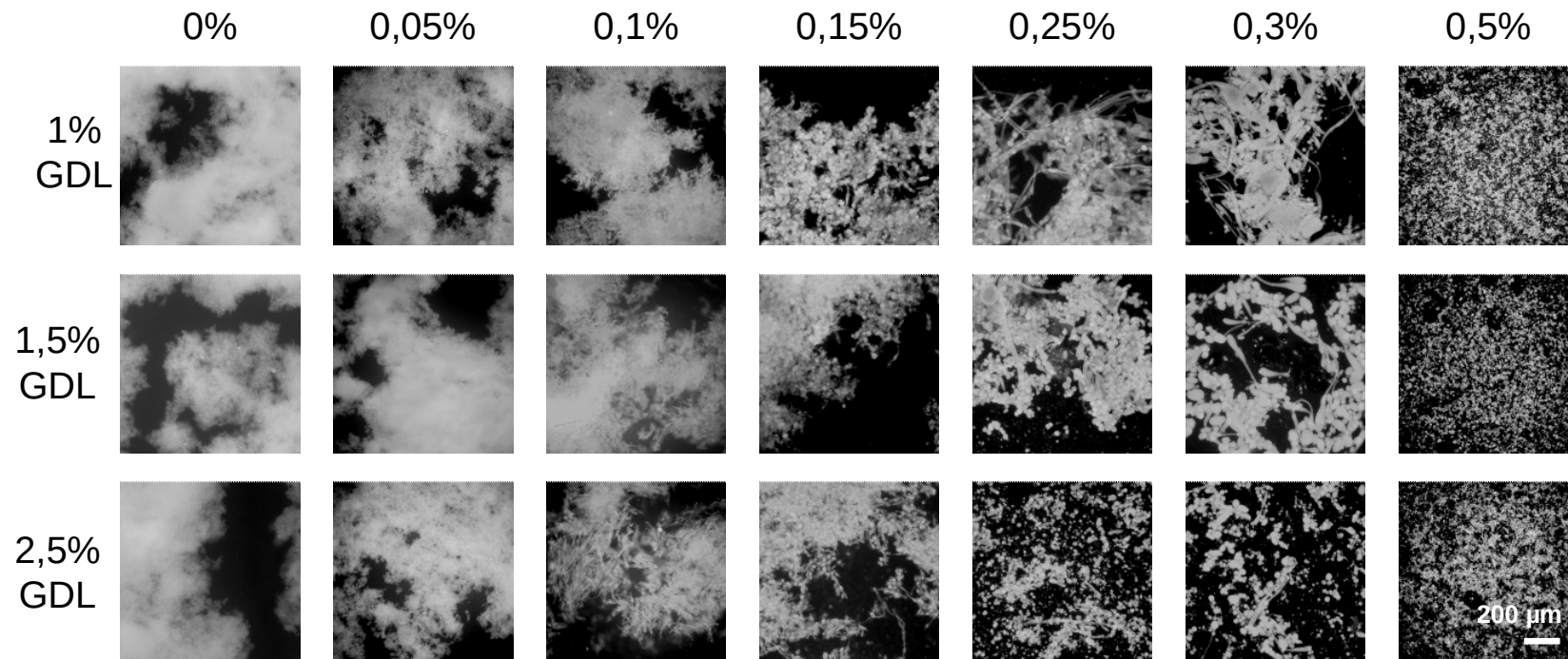


Figure 73 : Microstructure observée en épifluorescence à 20°C des gels brassés contenant de 0% à 0,5% de guar acidifiés avec 1%, 1,5% ou 2,5% de GDL à 43°C. Les concentrations en guar sont indiquées sur la figure. La barre représente 200 μm . Les gels présentant des structures fibrillaires de taille trop élevée ont été brassés par passage à travers les deux tuyaux.

Sur la base des images des gels acides brassés obtenues en microscopie optique, un calcul des dimensions géométriques des micro-gels enrichis en protéines a été effectué. La longueur et le rapport de la longueur sur la largeur ont ainsi été déterminés pour les systèmes acidifiés avec 1, 1,5 et 2,5% de GDL, présentant des micro-gels sous la forme de gouttelettes, en fonction de la concentration en guar (Figure 74a et b).

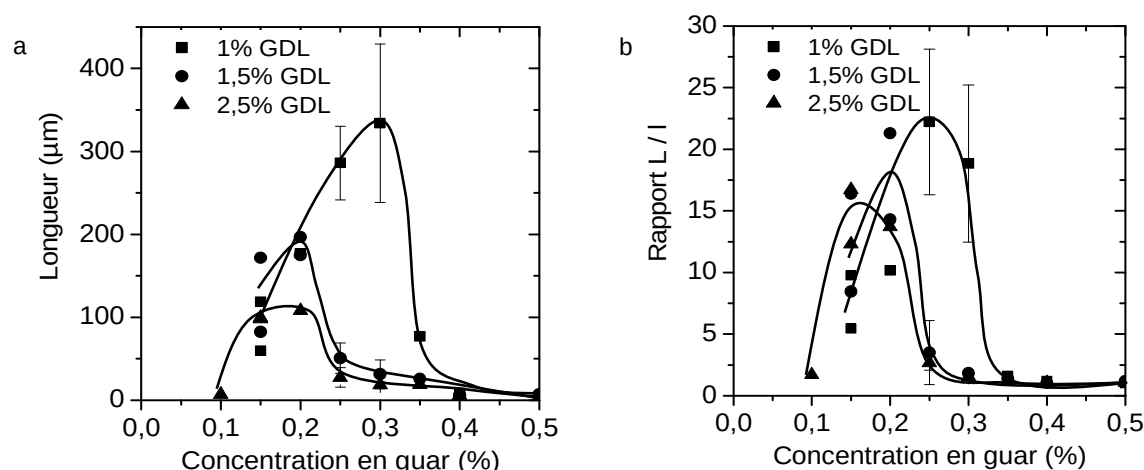


Figure 74 : (a) Longueurs ; (b) Rapports de la longueur L sur la largeur l des micro-gels au sein des gels brassés contenant de 0,1% à 0,5% de guar acidifiés avec 1%, 1,5% ou 2,5% de GDL à 43°C. Les barres d'erreur représentées correspondent à des mesures réalisées en triple sur des échantillons différents.

De manière générale, la longueur des micro-gels protéiques et le rapport de la longueur sur la largeur passent par un maximum (Figure 74a et b). Aux extrêmes de concentrations en guar, les structures tendent vers une forme sphérique caractérisée par un rapport de la longueur sur la largeur proche de 1 et ce, quelle que soit la concentration en GDL (Figure 74b). Entre 0,15% et 0,35% de guar, les dimensions des structures analysées montrent des comportements différents selon la quantité de GDL utilisée. Plus la vitesse de gélification est faible, plus la longueur maximale et le rapport L/l augmente, ceci étant particulièrement vrai pour les gels acidifiés avec 1% de GDL pour lesquels les micro-gels mesurent jusqu'à près de 350 μm . Par ailleurs, le décalage de la transition de micro-gels allongés à sphériques observé en microscopie à épifluorescence à des concentrations en guar de plus en plus faibles, lorsque la concentration en GDL augmente de 1% à 2,5%, est également constaté pour l'évolution de la taille des micro-gels. Alors que la longueur maximale est observée à une concentration en guar de 0,2% pour les gels acidifiés avec 1,5 et 2,5% de GDL, ce maximum apparaît vers 0,3% de guar lorsque la vitesse de gélification est plus lente. Il est à noter que les écart-types importants reflètent la grande polydispersité des micro-gels, ce qui est également observable sur les

images de microscopie confocale (Figure 70a). Au contraire, cet écart-type est très réduit aux extrêmes de concentration en guar lorsque les micro-gels ont une forme plus sphérique.

En modifiant la vitesse de gélification, des microstructures diverses peuvent être obtenues. D'une part, dans les systèmes pour lesquels un réseau protéique continu est maintenu, la micro-séparation de phases, générant une porosité et une synérèse, est d'autant moins importante que la gélification intervient rapidement. D'autre part, les phénomènes en jeu se complexifient lorsqu'une structuration sous la forme de gouttelettes apparaît pour des concentrations en guar supérieures ou égales à 0,15%. En effet, l'évolution des gouttelettes avant leur gélification dépend de plusieurs paramètres, le plus souvent difficilement mesurables et contrôlables : la force de déplétion, la viscosité de la phase continue ou encore la tension interfaciale. Ceux-ci dictent la taille et la déformabilité des gouttelettes en favorisant leur coalescence et/ou leur sédimentation. La gélification des protéines provoque un arrêt instantané de l'évolution des structures. Ce mécanisme suggère que les morphologies sont gouvernées par la vitesse de gélification du mélange. Cependant, ce phénomène n'est applicable que dans le cas de systèmes présentant une viscosité particulière, permettant une évolution des structures. Ainsi, aucun effet de la vitesse de gélification n'est mis en évidence dans les systèmes contenant des concentrations en guar supérieures à 0,4%.

De manière à compléter les observations microscopiques des gels mixtes acides, une étude des propriétés rhéologiques de ces gels après brassage a été menée. La Figure 75 présente l'évolution de $\tan \delta$ à 0,5 Hz de gels brassés acidifiés avec 1, 1,5 ou 2,5% de GDL en fonction de la concentration en guar. Pour les trois concentrations en GDL utilisées, la valeur de $\tan \delta$ est proche de 0,3 aux faibles concentrations en guar, mais augmente de manière significative entre 0,2% et 0,3% de guar, signe d'une transition d'un système structuré vers un système possédant majoritairement des propriétés liquides viscoélastiques. Lorsque la concentration en guar est supérieure à 0,3%, une légère diminution de la valeur de $\tan \delta$ est constatée. Il est à noter qu'aucune influence de la concentration en GDL ne se dégage pour les systèmes contenant moins de 0,2% ou plus de 0,4% de guar. Néanmoins, la transition de $\tan \delta$ se produit pour une concentration en guar plus faible, lorsque la concentration en GDL augmente de 1 à 2,5%.

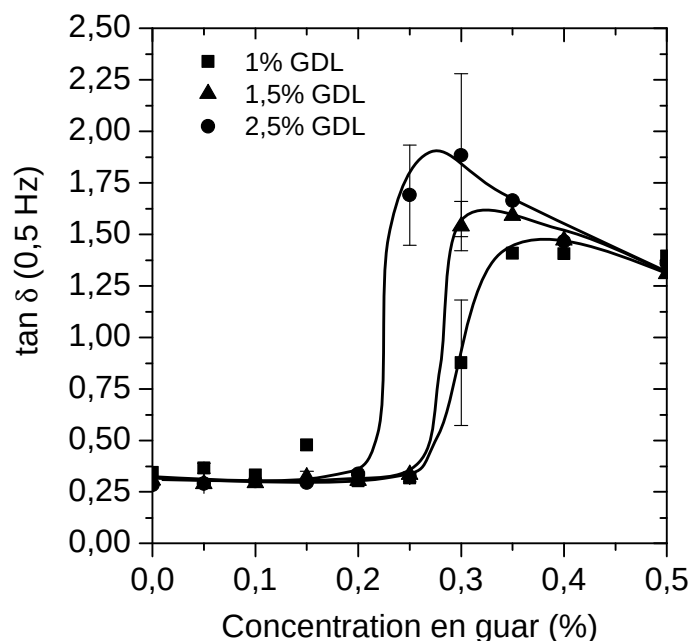


Figure 75 : Evolution de $\tan \delta$ à 0,5 Hz à 4°C des gels brassés contenant de 0% à 0,5% de guar acidifiés avec 1%, 1,5% ou 2,5% de GDL à 43°C

Ce décalage de $\tan \delta$ peut s'expliquer par le même phénomène précédemment décrit pour expliquer les évolutions des microstructures selon la vitesse d'acidification : la compétition entre la sédimentation des gouttelettes et leur gélification. L'augmentation du temps nécessaire à la gélification provoque un allongement des micro-gels contribuant, au travers de leur enchevêtrement, à la faible valeur de $\tan \delta$. Au contraire, le blocage de l'évolution des gouttelettes à un stade précoce génère la formation de petits micro-gels dispersés dans une phase continue riche en guar possédant essentiellement des propriétés liquides.

Finally, the variation of the gelification rate contributes to modify the properties of firm and stirred gels enriched in guar in two particular cases. When the protein network is continuous, the consequences of the depletion-flocculation phenomenon are all the more important as the gelification is delayed. This is translated by an increase in the micro-separation of phases at the origin of a syneresis in the protein matrix. The second case concerns structured systems under the form of water-in-water emulsions which undergo a gelification process. The conditions allowing the sedimentation of droplets are dictated by the parameters of Stokes' law, but also by the physical properties of droplets such as their interfacial tension. The resulting microstructure is the result of a subtle equilibrium between the sedimentation time of droplets and their gelification, the elongation of droplets being presumably realized through the forces of gravity and/or thermal agitation.

II.2. Effet de la cinétique de séparation de phases sur les propriétés des gels acides brassés

In resting conditions, droplets of water-in-water emulsions can relax spontaneously under a spherical form. Only the application of a controlled deformation allows the elongation of droplets without provoking their rupture (Frith, 2010 ; Tolstoguzov, 1986). In order to confirm the hypothesis according to which the formation of elongated micro-gels would essentially result from the effect of gravity, a milk / guar mixture at 0,3% was acidified in a centrifuge under a gravitational field of 2,5 g, the gelification thus taking place while maintaining the centrifugal force. The choice of the intensity of the centrifugal force was made in order to accelerate the sedimentation rate of the system while limiting the formation of a sediment layer.

The microstructure and the viscoelastic properties of the stirred gel made under a centrifugal force of 2,5 g were compared to those of the gel made without application of a supplementary gravitational field, the gels containing both 0,3% of guar and being acidified with 1,5% of GDL at 43°C (Figure 76a and b).

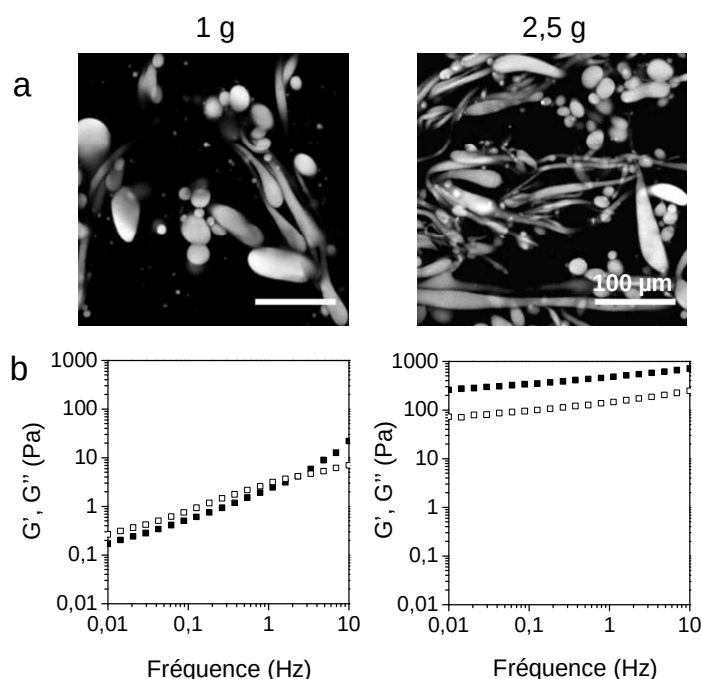


Figure 76 : (a) Microstructure observée en microscopie confocale à balayage laser à 20°C ; (b) Spectres viscoélastiques à 4°C des gels brassés contenant 0,3% de guar acidifiés avec 1,5% de GDL à 43°C sous une force centrifuge de 1 g ou 2,5 g ((■) G' , (□) G''). Les gels ont été brassés par passage à travers les deux tuyaux. La barre représente 100 μm .

De longs filaments compris entre 100 et 400 μm dispersés dans une phase continue enrichie en guar sont produits sous une centrifugation à 2,5 g alors que de plus petits filaments en mélange avec des micro-gels déformés sont observés en absence d'une accélération centrifuge supplémentaire (1 g). Par ailleurs, le gel brassé fabriqué sans force centrifuge additionnelle présente des propriétés intermédiaires entre un système liquide et solide. Au contraire, les propriétés viscoélastiques du gel brassé produit au sein de la centrifugeuse sont typiques d'un système structuré, avec le module G' supérieur au module G'' sur l'ensemble de la gamme de fréquence étudiée. Ainsi, la présence de longs filaments enchevêtrés contribue de manière significative aux propriétés viscoélastiques de ce système.

Puisque les systèmes fabriqués en présence ou absence d'une force centrifuge possèdent les mêmes concentrations en polymères, ces mélanges sont soumis à la même force de déplétion. En revanche, l'ajout d'un champ gravitationnel de 2,5 g accélère de manière importante la vitesse de sédimentation des gouttelettes avant leur blocage par gélification acide des protéines.

Lors de l'application d'un cisaillement, l'allongement des gouttelettes des émulsions eau dans eau dépend, outre l'intensité de la déformation, d'un équilibre entre la coalescence des gouttelettes et

leur rupture par instabilité de Rayleigh (van Puyvelde et al., 2003 ; Butler & Heppenstall-Bultler, 2003). Dans les systèmes étudiés en l'absence de force centrifuge supplémentaire, la rupture des gouttelettes semble minoritaire voire inexistante en raison de la viscosité élevée de la phase continue, mais surtout du cisaillement infime généré par la sédimentation des gouttelettes. Comme observé précédemment (Figure 65, Figure 70 et Figure 76), le corps des micro-gels les plus allongés apparaît plus sombre que leur zone terminale en raison d'une concentration en protéines moins élevée. Ce résultat appuie l'hypothèse selon laquelle chaque filament est issu d'une unique gouttelette originale qui s'est allongée à différents degrés sous l'action d'une force de gravité naturelle ou accélérée par centrifugation avant d'être figée en l'état par la gélification.

III. CONCLUSION

Le comportement des mélanges lait / guar a été étudié en premier lieu en conditions non acidifiées. Sur la base d'études microscopiques et rhéologiques, il a été montré que l'ajout d'une concentration en guar supérieure ou égale à 0,01% dans le lait conduit à un phénomène de déplétion-floculation des protéines. Ce processus induit une structuration du système sous la forme d'une émulsion eau dans eau, instable et conduisant à des systèmes à phases séparées macroscopiquement dans un délai de 4 h pour des concentrations en guar inférieures ou égales à 0,4%. En milieu acidifié, la gélification acide des protéines intervient comme un événement perturbateur de la séparation de phases. Ainsi, une succession de microstructures de gels mixtes acides brassés a été observée pour des concentrations en guar croissantes : un réseau protéique homogène qui se densifie, puis la formation de longs filaments enchevêtrés, des micro-gels allongés et sphériques de nature protéique et à l'état gélifié.

En outre, un mécanisme de compétition entre le phénomène de séparation de phases et de gélification a été mis en évidence en modifiant la vitesse de gélification. Accélérer ou ralentir le temps de gélification détermine la possibilité d'évolution des gouttelettes, avant que la gélification acide des protéines ne fige le système. A l'aide de cette démarche, une variété de morphologies de micro-gels avec des caractéristiques bien définies a pu être créée, allant de longs filaments d'une taille proche de 400 μm à des micro-gels sphériques d'environ 20 μm . Une expérience complémentaire de fabrication d'un gel au sein d'une centrifugeuse a permis de relier le degré d'allongement des micro-gels à un effet de gravité, toutefois un effet de l'agitation thermique pourrait également y contribuer. Ce point sera abordé en détail dans le chapitre 5.

Chapitre 4 : Mélanges lait / xanthane avant et après gélification

Les résultats précédents, concernant les systèmes lait / guar en milieu neutre ou acidifié, peuvent servir de base à l'étude d'un mélange incluant un autre polysaccharide d'intérêt dans les produits laitiers : la gomme xanthane. D'un point de vue physico-chimique, des différences fondamentales existent entre ces deux polymères qui présentent entre autres, une structure primaire, une masse moléculaire, mais également une densité de charges différentes (Tableau 9). L'ensemble de ces paramètres physico-chimiques influence de façon majeure les phénomènes de séparation de phases (Bourriot et al., 1999b ; Tuinier et al., 2000). Partant de ce constat, la Figure 77 illustre les potentiels zêta, représentatifs de la charge globale des molécules, de solutions de guar et de xanthane en fonction de la force ionique du milieu.

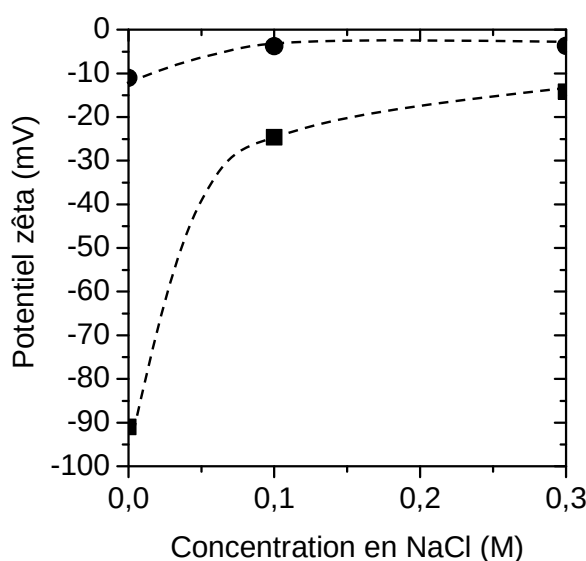


Figure 77 : Potentiel zêta de solutions à 0,05% de xanthane (■) et de guar (●) à pH 6,8 en fonction de la concentration en NaCl à 25°C

Contrairement au guar, proche de la neutralité quelle que soit la force ionique du milieu, la charge des molécules de xanthane dépend de la concentration en NaCl. En absence de sel, le xanthane est nettement chargé négativement en raison de la présence de groupements carboxyliques. Toutefois, une diminution importante du potentiel zêta de la solution de xanthane est mise en évidence lors de l'ajout de sel, traduisant un effet notable, mais partiel, d'écrantage des charges dès 0,1 M de NaCl qui correspond à la force ionique du lait. Ceci met en lumière le caractère anionique du xanthane qui pose

la question d'éventuelles interactions avec les protéines de lait, à la fois en milieu neutre et en milieu acidifié, mais également d'un effet d'écrantage par la présence d'ions.

Par ailleurs, le volume occupé par les chaînes des polysaccharides peut largement moduler les phénomènes de séparation de phases (Bourriot et al., 1999b ; Tuinier et al., 2000).

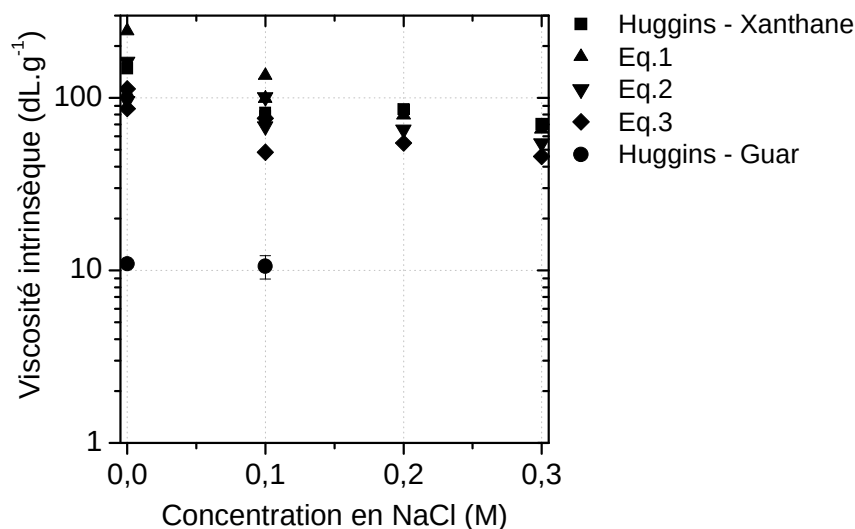


Figure 78 : Viscosité intrinsèque déterminée à l'aide de l'équation de Huggins d'une solution de xanthane (■) et de guar (●) à 43°C en fonction de la force ionique. Les viscosités intrinsèques des solutions de xanthane ont également été déterminées à l'aide des équations n°1, 2 et 3 de Tanglertpaibul et Rao (Figure 48b) (Tanglertpaibul & Rao, 1987)

L'échantillon de guar utilisé dans ce travail présente une viscosité intrinsèque d'environ 11 dL.g⁻¹ à 0 M et 0,1 M NaCl (Figure 78) ce qui est très cohérent avec la littérature (Bourriot et al., 1999b). La mesure de viscosité intrinsèque de l'échantillon de xanthane est plus compliquée à réaliser en raison d'une augmentation du volume hydrodynamique occupé par les chaînes lorsque la solution devient de plus en plus diluée. En utilisant l'équation de Huggins, une valeur d'environ 100 dL.g⁻¹ a été obtenue. Cependant, l'utilisation de l'équation de Huggins risque de conduire à une surestimation de la viscosité intrinsèque à très faible force ionique. Trois équations proposées par Tanglertpaibul & Rao (1987) ont donc été utilisées dans ces mêmes conditions de force ionique et donnent des valeurs du même ordre de grandeur et dans tous les cas de 5 à 10 fois supérieures à celle du guar. A forte force ionique, l'effet polyélectrolytique du xanthane est écranté et devient alors négligeable. La valeur moyenne de viscosité intrinsèque de l'échantillon de xanthane utilisé dans ce travail a néanmoins été calculée à 0,1 M NaCl afin de se placer dans les conditions de force ionique du lait. Elle est de 70 dL.g⁻¹ ± 10 à 0,1 M NaCl.

L'addition d'une faible quantité de sel provoque un effet d'écrantage des charges (Figure 77) et une légère contraction de la molécule qui adopte une conformation de type semi-étendu ('worm-like') (Higiro et al., 2007 ; Muller et al., 1986), ce qui explique cette diminution de viscosité intrinsèque. Il est à noter que certains auteurs constatent à l'inverse une augmentation de la viscosité intrinsèque quand la force ionique augmente, suite à la formation d'un grand nombre d'associations intermoléculaires (Jamieson et al., 1982 ; Southwick et al., 1980).

La viscosité intrinsèque du xanthane est donc au moins 5 fois supérieure à celle du guar et ce, quelle que soit la force ionique. Ces résultats, similaires à ceux rapportés dans la littérature pour des solutions de xanthane et de galactomannanes (Cuvelier, 1988 ; Launay et al., 1997), traduisent le grand volume hydrodynamique occupé par les chaînes de xanthane, conséquence de leur rigidité très élevée liée à la conformation en hélice qu'elles sont capables d'adopter.

Finalement, la présence de charges négatives ainsi que la grande rigidité de la chaîne de xanthane sont deux paramètres clés à prendre en considération pour la compréhension des phénomènes de séparation de phases entre les protéines de lait et le xanthane.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier le comportement de phases, la microstructure et les propriétés rhéologiques des mélanges lait / xanthane en milieu neutre et en milieu acidifié. L'ensemble des résultats présentés a fait l'objet de discussions sur la base de l'existence d'interactions associatives entre le xanthane et les protéines de lait. Dans ce cadre, les iota- et kappa-carraghénanes chargés négativement et le guar neutre ont été utilisés ponctuellement comme élément de comparaison (Tableau 9).

I. EXISTENCE D'INTERACTIONS ASSOCIATIVES ENTRE PROTEINES DE LAIT ET XANTHANE ?

Afin de mettre en évidence d'éventuelles interactions du xanthane avec les protéines de lait, une méthode spectrophotométrique à l'aide du bleu de méthylène a été utilisée (Figure 52). La comparaison du comportement des protéines en présence de deux autres polysaccharides, le guar non chargé et le carraghénane chargé négativement, a permis d'étayer les hypothèses d'interactions. Par ailleurs, l'intensité des interactions associatives dépend largement de certains facteurs tels que la force ionique ou la densité de charges respective de chaque polymère susceptible d'interagir. Par une modification du pH du milieu, un renforcement des attractions électrostatiques entre les protéines de lait et les polysaccharides chargés peut avoir lieu, notamment au voisinage du point isoélectrique des protéines.

Cette partie des résultats a fait l'objet d'un article soumis pour publication dans *Food Hydrocolloids*.

Spectrophotometric analysis of polysaccharide / milk protein interactions with methylene blue using Independent Components Analysis

Anne Rohart^{1,2,3}, Delphine Jouan-Rimbaud Bouveresse^{1,2,3}, Douglas N. Rutledge^{1,2,3}, Camille Michon^{1,2,3*}

¹ AgroParisTech, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 91300 Massy

² INRA, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 91300 Massy

³ CNAM, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 75003 Paris

*Corresponding author. AgroParisTech, 1 avenue des Olympiades, F-91300 Massy, France. Tel.: +33 169 935 127; fax: +33 169 935 005.

E-mail address: camille.michon@agroparistech.fr (C. Michon).

Abstract

Interactions between xanthan gum, carrageenan, guar gum and milk protein were studied under various conditions of ionic strengths, temperature and pH. The proposed methodology was to examine the associative interactions by using a methylene blue (MB) spectrophotometric method combined with data analysis by a chemometric method. Independent Components Analysis (ICA) simplified the interpretation of the spectrophotometric results by decomposing absorbance spectral data into “pure signals” that could be related to chemical compounds. Addition of milk protein to MB / xanthan gum or carrageenan solution gave rise to spectral changes indicating electrostatic interactions between positively charged regions of milk protein and anionic polysaccharides at neutral pH and low ionic strength. Thus, it has been shown that negative polysaccharides are able to interact with milk proteins only in absence of NaCl. On the other hand, it was shown that no attractive interactions were established in neutral guar gum / milk protein systems, which highlighted the contribution of the charge density to the interactions. Through acidification, associative interactions between xanthan gum and milk proteins were strongly enhanced as shown by changes in the IC proportions. Therefore, ICA proved to be an efficient tool to facilitate interpretation of spectrophotometric data and identify associative interactions.

Keywords: Chemical physics; Mixed systems; Independent Components Analysis; Methylene blue

1. Introduction

The control of interactions between the different ingredients involved in formulated foods is a key problem in regard to the overall texture and stability of the products. When proteins and polysaccharides are mixed, the normal tendency for the two polymers is to demix. Depending on the affinity between the different biopolymers and the solvent, the interactions can be segregative (the biopolymers repel each other) or associative (the biopolymers attract one another) (Tolstoguzov, 1995; Syrbe et al., 1998; Doublier et al., 2000; de Kruif & Tuinier, 2001; Corredig et al., 2011). Generally, associative interactions are the result of net electrostatic interactions between the polymers carrying opposite charges and thus are strongly affected by the charge density of the two biopolymers, the pH and the ionic strength (de Kruif, Weinbreck, & de Vries, 2004; Schmitt & Turgeon, 2007).

At neutral pH, repulsive interactions between the globally negatively charged casein micelles and negatively charged polysaccharides would be expected. However, associative interactions could exist between a “positive patch”, situated between residues 97 and 112 of the κ -casein and the negative sulphated groups of carrageenan (Snoeren et al., 1975; Snoeren, 1976; Garnier et al., 2003). In contrast, the mechanism classically described in the literature for low charged or neutral polysaccharides / casein micelles mixtures is a segregative phase separation, thus involving no electrostatic interactions (Bourriot et al., 1999b; Tuinier et al., 2000; Hemar et al., 2001; Bhat et al., 2006; Aichinger et al., 2007).

Upon lowering the pH, the electrostatic repulsion of the less negatively charged casein micelles is modified and their point of zero charge is reached close to pH 4.6. Therefore, adsorption of anionic polysaccharides on casein micelles strongly depends on pH, as has been shown in the case of pectin (Marozienne & de Kruif, 2000; Tuinier et al., 2002), carboxymethylcellulose (Du et al., 2007) or xanthan gum (Kobori et al., 2009). Recent studies have shown the formation of soluble complexes between whey proteins and anionic polysaccharides even when the pH is close to neutral (Benichou et al., 2007; Koupantsis & Kiosseoglou, 2009). However, electrostatic interactions between casein micelles and carboxylated polysaccharides such as xanthan gum above the isoelectric point of casein micelles remain undetermined.

The interactions of proteins with polysaccharides in solution have been previously investigated using visible absorption spectroscopy in a methylene blue (MB) solution (Snoeren, 1976; Michon et al., 2002). In dilute aqueous solution, the absorption spectrum of planar cationic MB is characterized

by a sharp peak at 664 nm and a slight secondary shoulder at 610 nm (Gurov et al., 1988; Tafulo et al., 2009). When an anionic polysaccharide is added to the MB solution, the peak at 664 nm decreases and a new absorption band appears, which corresponds to metachromatic complexes (Schoenberg & Moore, 1964; Shirai et al., 1977; Nandini & Vishalakshi, 2011). It should be noted that the spectral changes are a consequence of a precise orientation of neighboring dye molecules and reflect the steric arrangement of the polar residues on the macromolecule that are available for interaction with the dye. Therefore, the binding process depends on polysaccharide conformation and charge density as well as environmental conditions such as ionic strength or temperature (Shirai et al., 1977). When increasing the temperature, and thus the thermal agitation, the lifetime of the long-range force interactions with water molecules is higher, and statistically, a higher number of methylene blue molecules are aligned and form metachromatic complexes (Michon et al., 2002).

If a protein, interacting associatively with polysaccharides, is introduced into a MB / anionic polysaccharide solution, it will compete with the cationic MB molecules and bind preferably to anionic polysaccharides. As a consequence, the release of the free MB molecules increases the peak at 664 nm while the metachromatic peak decreases. Using this method, interactions between gelatin or casein micelles and carrageenan (Michon et al., 2000; Michon et al., 2002; Garnier et al., 2003), or whey protein / xanthan gum, carboxymethylcellulose or λ -carrageenan (Benichou et al., 2007; Koupantsis & Kiosseoglou, 2009; Perez et al., 2009) have well been demonstrated.

The interpretation of spectrophotometric data is sometimes complex and is often more qualitative than quantitative. Several chemometric tools can be used for the treatment of chemical data such as Principal Components Analysis (PCA) or Independent Components Analysis (ICA). Similarly to PCA, ICA is based on the construction of latent variables, called Independent Components (ICs), which are linear combinations of the original variables. The main advantage of this method compared with PCA is that it aims to extract “pure signals” and their proportions from mixtures which means that the resulting latent variables are easier to interpret (Hyvärinen & Oja, 2000; Stone, 2004; Rutledge & Jouan-Rimbaud Bouveresse, 2013).

The objective of the current study was to use a chemometric tool to examine the interactions between milk protein and different polysaccharides under various conditions on the basis of spectrophotometric analysis. The first part of this paper focuses on the detection of interactions depending on the type of polysaccharide. In the second part, ICA was performed to understand the effect of various factors on interactions such as type of milk protein, ionic strength, temperature or pH.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Xanthan gum (Satiexane), guar gum (Viscogum MP) and iota-carrageenan (HMR) were supplied by Cargill (Baupre, France). The samples were used without purification. Methylene blue was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and the glucono- δ -lactone (GDL) from Sigma (St Louis, MO, USA). A methylene blue (MB) solution with a concentration of about 0.0008 wt% was prepared by dissolving the correct amount in Milli-Q water (made by reverse osmosis followed by filtration through a Milli-Q apparatus) and stirring for 1 h at room temperature. Its concentration was adjusted so that its optical density at 664 nm was below 2. The same methylene blue solution was used for all the results described in this paper.

Casein micelles (CM) were purified by tangential ultrafiltration followed by purification through water diafiltration, and then freeze-dried (INRA Rennes, France). CM (1 wt%) was dispersed in 0.1 M NaCl at 20°C and pH 7 under stirring for 5 min and then sonicated for 8 min at 50 W.

Low-heat skim milk powder was kindly provided by Ingredia (Arras, France). Skim milk (3.3 wt% proteins) was prepared by dissolving skim milk powder in Milli-Q water using a magnetic stirrer for 1 h at room temperature. The reconstituted skim milk was then left to fully hydrate overnight in a refrigerator.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of biopolymer mixtures

Methylene blue (MB) / polysaccharide (xanthan gum (X), guar gum (G) or iota-carrageenan (C)) solutions were prepared by adding the polysaccharide (0.002 wt%) to MB solutions under stirring at 70°C for 30 minutes. The same thermal treatment was applied to the MB solution without polysaccharide. Then, the pH value was adjusted to 7 using a 1 M NaOH solution.

Methylene blue (MB) / polysaccharide / casein micelles (CM) or milk protein (MP) were prepared by adding casein micelles or milk protein to the MB / polysaccharide solutions at a final protein concentration of 0.005 wt%. Ionic strength of all the mixtures was adjusted at 25°C in the range of 0-0.1 M by addition of the required amount of NaCl under stirring for 5 minutes. Table 11 shows the experimental domain tested for each factor.

Glucono- δ -lactone (GDL) was added to some mixtures containing xanthan gum at 25°C to lower the pH gradually, so as to mimic the fermentation process. During the acidification process, the sample was transferred into a spectrophotometric cuvette and the pH of the sample was measured during the corresponding spectrophotometric measurement.

The spectrophotometric measurements were performed with a Carry 100 spectrophotometer (Varian, France) set at a spectral resolution of 2 nm and fitted with a multi-cuvettes Peltier block thermostated at $\pm 0.2^\circ\text{C}$. Optical density sweeps as a function of the wavelength in the range 450-750 nm were performed at 25, 43 or 70°C after stabilising for 30 minutes at the chosen temperature. All measurements were performed in the optical density range of 0-2 where a linear response was obtained. The accuracy of the optical density measurements was 0.001.

2.2.2. Experimental design

Two different studies were conducted and analyzed separately by ICA. Five experimental factors were evaluated for Study 1 and 2. Table 11 shows the experimental levels used for each factor and study considered.

Table 11. Experimental domains for all the studied factors and for Study 1 or 2.

Factors	Experimental domains	
	Study 1	Study 2
Type of polysaccharide	Guar gum (G); Xanthan gum (X); Iota-carrageenan (C)	Guar gum (G); Xanthan gum (X); Iota-carrageenan (C)
Ionic strength (M NaCl)	0; 0.02; 0.1	0; 0.1
Temperature ($^\circ\text{C}$)	25; 43; 70	25
Type of milk proteins	Casein micelles (CM); Milk protein (MP)	Milk protein (MP)
pH	7	4.3-7

2.2.3. Chemometric methods

The spectral data were analysed by Independent Components Analysis (ICA). This method aims at extracting the pure spectra from a set of mixture spectra, as well as the proportions in which they are mixed. It was developed in the field of signal treatment, but is now applied in other fields, such as the chemometric analysis of spectral data. In principle, each extracted independent component (IC) corresponds to the "pure signal" characterising an independent phenomenon. Therefore, the number of ICs to extract is a crucial and critical choice. Two methods have been proposed recently to determine the number of ICs in a given data set (Jouan-Rimbaud Bouveresse et al., 2012); The ICA-

by-Blocks method splits the data into 2 or more representative groups, and calculates several ICA models in each block, with different number of ICs. For each model, the correlations between all ICs of one block and all ICs of the other block(s) are calculated, and the model with the largest number of ICs where all ICs of one block are highly correlated to another IC in the other block(s) is considered as optimal; The method based on the *Durbin-Watson* criterion calculates different ICA model with the whole data set, and reconstructs the spectra with each of them. These are then used to calculate the residual matrices between the original data and the different reconstructed data sets. The largest number of ICs for which the signal-to-noise ratio, as determined by the Durbin-Watson criterion (Rutledge & Barros, 2002), in the residual matrices is high is considered as the optimal number. It was shown that the two methods yield similar results, but they bring different (and thus additional) information.

3. Results and discussion

3.1. Effect of type of polysaccharide on casein micelle / polysaccharide interactions

3.1.1. Type of polysaccharide and protein effects on methylene blue spectra

The absorption spectra of methylene blue (MB) and mixtures of MB with various polysaccharides solutions are shown in Figure 79a.

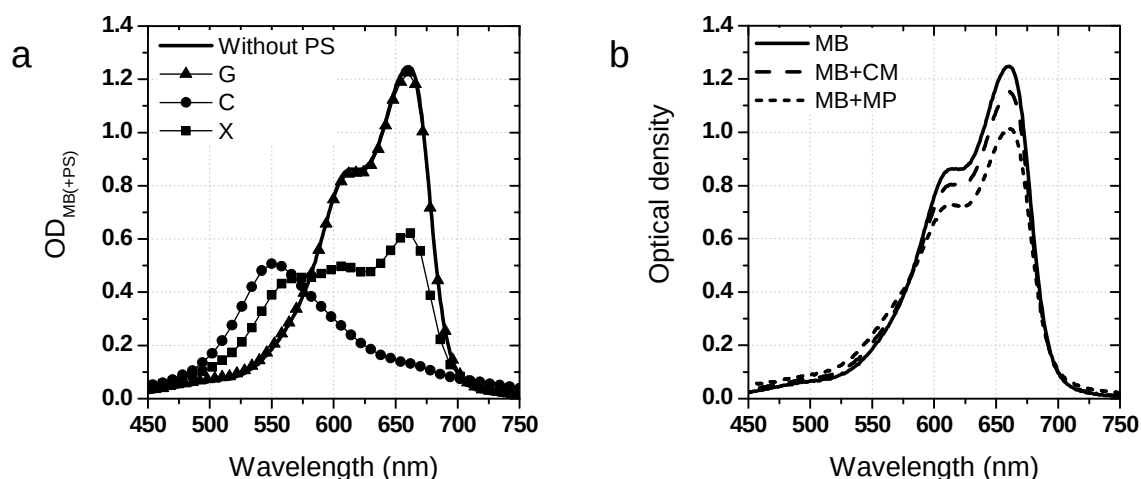


Figure 79. Spectra of methylene blue (MB) solution (0.0008 wt%) at 25°C, 0 M NaCl, pH 7. (a) Without addition of polysaccharides (Without PS), or effect of adding 0.002 wt% guar gum (G), carrageenan (C) or xanthan gum (X); (b) Effect of adding 0.005 wt% casein micelles (CM) or milk protein (MP).

Addition of guar gum to MB solution was not accompanied by any noticeable changes in the MB spectrum. It is clear that neutral guar gum did not interact with the cationic MB molecules. On

the contrary, when iota-carrageenan was introduced in the aqueous MB solution, the characteristic MB peak at 664 nm almost disappeared and a new distinct peak at 554 nm formed. Consistent with previous studies (Snoeren, 1976; Michon et al., 1997), the change in the spectra can be attributed to the association of MB molecules with iota-carrageenan sulphated groups and the formation of metachromatic complexes composed of bound dye molecules conjugated through links with surrounding water molecules. Xanthan gum constituted an intermediate case with a noticeable decrease of the absorbance peak at 664 nm and the presence of two shoulders at 567 nm and 610 nm. The shoulder at 567 nm can be related to the formation of MB metachromatic complexes which means that MB molecules may fix on xanthan gum chains through electrostatic interactions at this low ionic strength. The remaining peak at 664 nm corresponded to free MB molecules in the solution and/or non-conjugated bound MB molecules. As the saturation concentration of xanthan gum molecules by the dye was determined to be around 0.005 wt% (Benichou et al., 2007), it seems that the xanthan gum concentration was too low to fix all the MB molecules on the xanthan gum chains. Therefore, the presence of two MB spectral forms could be accounted for by the lower charge density of xanthan gum compared to carrageenan, but also by the different types of charge and the accessibility of the interacting groups (Doublier et al., 2000).

The effect of casein micelles or milk proteins on MB spectra was also studied (Figure 79b). The addition of 0.005 wt% casein micelles led to a decrease of 5% in the absorbance peak at 664 nm. The contribution of milk proteins composed of 80% casein micelles and 20% whey protein to the MB spectra was more important, with a significant decrease of absorbance at 664 nm and the appearance of a small metachromatic peak at 554 nm. Since milk proteins are globally negatively charged electrolytes at pH 7, they could therefore interact with the cationic MB molecules. Differences between spectral changes upon addition of casein micelles or milk protein may be due to the greater interaction of the whey proteins with MB compared to casein micelles which could be attributed to differences in charge distribution.

3.1.2. Milk protein effects on MB spectra in the presence of polysaccharides

In order to determine whether protein / polysaccharide interactions took place, 0.005 wt% casein micelles was introduced into a MB / 0.002 wt% polysaccharide solution as shown in Figure 80a.

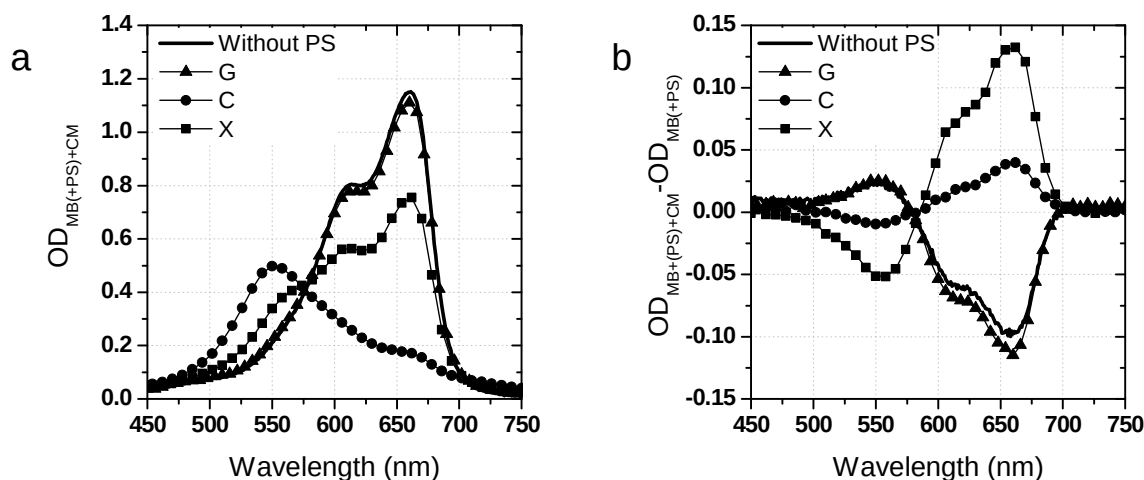


Figure 80. (a) Effect of CM addition on MB without polysaccharide (Without PS) or in mixture with 0.002 wt% guar gum (G), carrageenan (C) or xanthan gum (X); (b) ΔOD for MB / 0.005 wt% CM / without polysaccharide (Without PS) or 0.002 wt% guar gum (G), carrageenan (C) or xanthan gum (X) ($\Delta OD = OD_{MB(+Polysaccharide)+CM} - OD_{MB(+Polysaccharide)}$) at 25°C, 0 M NaCl, pH 7.

Addition of casein micelles caused an increase of the peak at 664 nm for the MB / CM / xanthan gum or carrageenan systems. However, spectral changes due to protein addition are difficult to discriminate. Thus, an alternative representation of these data can be given by subtracting the optical density spectrum obtained for MB / polysaccharides from that obtained upon addition of 0.005 wt% casein micelles (Michon et al., 2000; Garnier et al., 2003). ΔOD is defined as follows: $\Delta OD = OD_{MB(+Polysaccharide)+CM} - OD_{MB(+Polysaccharide)}$ (Figure 80b).

The presence of casein micelles in MB / xanthan gum solution led to a decrease of ΔOD_{554nm} corresponding to a disappearance of metachromatic complexes while ΔOD_{664nm} increased due to a release of free MB molecules. This behavior can be related to a dissociation of MB molecules from MB / xanthan gum complexes, resulting from the competitive binding of positive “patches” of kappa-casein to xanthan gum molecules. The same tendency was observed with carrageenan but to a smaller extent. Thus both xanthan gum and carrageenan interact with casein micelles through electrostatic interactions at this low ionic strength. It has to be noted that the difference spectra obtained for carrageenan are slightly different from those reported previously (Garnier et al., 2003) where an increase of the metachromatic complexes was observed, related to the increased rigidity of the carrageenan chains in the helical conformation when casein micelles are present. However, this may be explained by the temperature at which casein micelles were added to MB / polysaccharide systems in this study: 25°C instead of 70°C (Garnier et al., 2003). Therefore carrageenan chains bound to

casein micelles at 25°C where they were already under a helical conformation led to a lower stiffening effect and thus to a smaller number of metachromatic complexes. An opposite behaviour was found for the MB / CM / guar or without polysaccharide, with an increase of ΔOD_{554nm} while ΔOD_{664nm} decreased. This is in good agreement with results shown in Figure 80, indicating a binding of MB molecules on casein micelles. Moreover, this further supports the fact that the neutral guar gum did not interact with proteins.

3.2. Chemometric methods applied to examination of associative interactions

3.2.1. Study 1: conditions for establishment of milk protein / polysaccharide interactions

The optimal number of independent components (ICs) was first calculated by ICA-by-Blocks and the Durbin-Watson criterion. Two ICs were found to be optimal with those two methods. Independent Components Analysis with 2 ICs was performed on the analytical data set of 60 difference spectra corresponding to the experimental design of Study 1 indicated in Table 11.

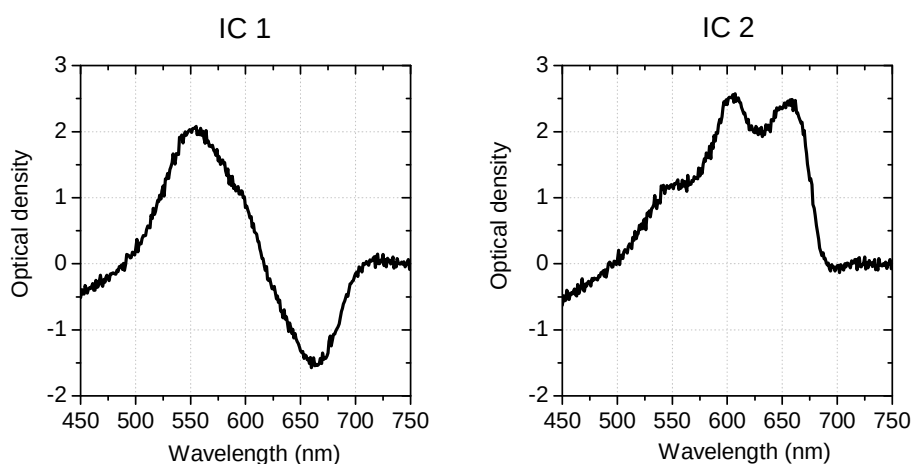


Figure 81. Signals corresponding to the 2 ICs of the ICA model obtained from difference spectra ($\Delta OD = OD_{MB(+Polysaccharide)+CM} - OD_{MB(+Polysaccharide)}$) of Study 1.

Figure 81 shows the 2 “pure signals” calculated by ICA. Each IC signal plot presents specific wavelength zones that could be associated with an individual chemical compound. It should be noted that those “pure signals” actually correspond to spectral subtractions, and so correspond to the effects of casein micelle addition to MB / polysaccharide mixtures. For example, IC1 reflects the presence of metachromatic complexes with a positive ΔOD peak at 554 nm corresponding to this compound. On the other hand, the IC2 signal is not well defined and shows two main peaks at 664 nm and 605 nm but also a shoulder at 554 nm. IC2 would correspond to MB molecules either bound to the polysaccharides or free in solution.

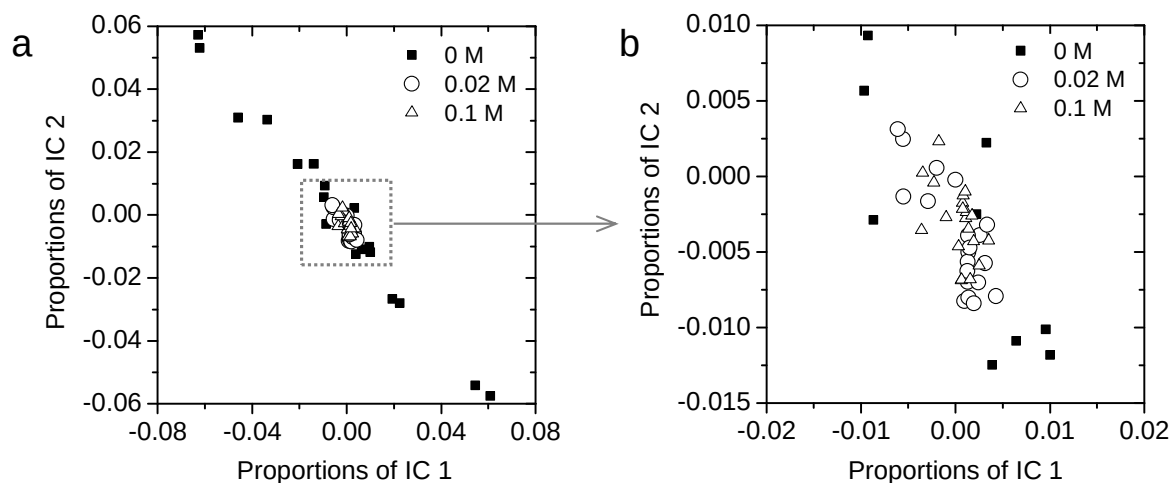


Figure 82. (a) Projection of the proportions of the Independent Components of the difference spectra showing the influence of ionic strength (0; 0.02 or 0.1 M NaCl); (b) Focus on the proportions corresponding to 0.02 and 0.1 M NaCl (Study 1).

A strong negative linear correlation between IC1 and IC2 is observed (Figure 82a). This phenomenon may correspond to the conversion of one chemical compound into another. Indeed, addition of casein micelles to the mixtures led either to the formation of metachromatic complexes or to the release of free MB molecules (Figure 79b). Therefore, the interaction of casein micelles with MB or polysaccharide would be likely to increase respectively either IC1 or IC2, and decrease either IC2 or IC1.

In order to discuss the effects of the ionic strength on polysaccharide / milk protein interactions, ICs proportions obtained for the 60 difference spectra were plotted (Figure 82a and b). It is noticeable that projections of the IC proportions for the systems containing no added salt were far more spread out than those obtained after addition of 0.02 M and 0.1 M, which were clustered near 0 values (Figure 82b). Thus, interactions between casein micelles and MB or polysaccharides could only take place when no salt was added. It is well established that the addition of NaCl has a strong screening effect on charged groups such as those carried by anionic polysaccharides or milk proteins (Shirai et al., 1977; Perez et al., 2009; Michon et al., 2000), which considerably reduces or even suppresses electrostatic interactions.

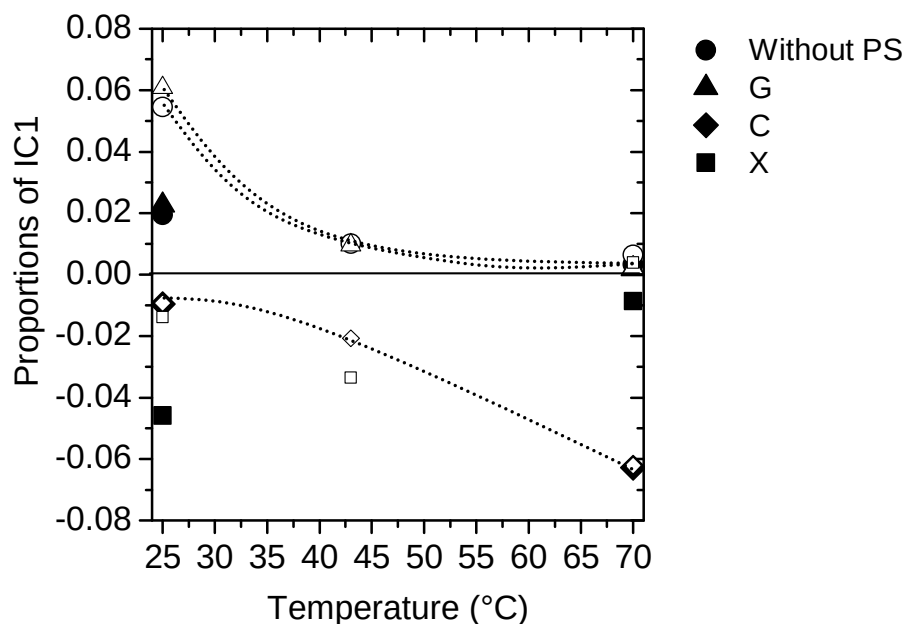


Figure 83. Proportions of IC1 of the difference spectra at 0 M NaCl and pH 7 as a function of type of polysaccharide and temperature (casein micelles: filled symbols; milk protein: empty symbols) (Study 1).

Since electrostatic interactions only occurred near to 0 M NaCl, proportions of IC1 and IC2 were investigated more thoroughly at that very low ionic strength for each polysaccharide, temperature and type of proteins (Figure 83). There is a clear separation as a function of the type of polysaccharides: MB and guar gum showed positive proportions on IC1 similar to those from difference spectra obtained without polysaccharides, whereas negative ones were found for xanthan gum and carrageenan. This behavior is consistent with results shown in Figure 80a since the positive ΔOD peak at 554 nm, which is related to IC1, was detected only in the difference spectra of guar or without polysaccharide. Moreover, it should be noted that temperature seems to have an effect on interactions involving casein micelles with carrageenan or methylene blue molecules. Thus, the values on IC1 decreased while IC2 increased with increasing temperature. For the carrageenan, this behavior may be attributed to the helix to coil transition when temperature increased from 25°C to 70°C where the carrageenan chain is less rigid and a smaller number of metachromatic complexes are formed for a given bound methylene blue molecules (Garnier et al., 2003). Therefore increasing the temperature reduced the number of metachromatic complexes with carrageenan due to coil conformation and thermal agitation. In MB / casein micelles or MB / casein micelles / guar gum systems, thermal agitation may contribute to the displacement of MB molecules from the casein micelles at 70°C. It should be pointed out that milk proteins interacted more strongly with MB

molecules than casein micelles at 25°C, as shown in Figure 79b. In contrast, no significant difference in the interaction of carrageenan with casein micelles could be observed with respect to the type of proteins. As 80% of milk proteins are casein micelles, these results confirmed that most of the interactions between carrageenan and milk proteins took place with casein micelles. The evolution of the proportions of IC1 and IC2 as a function of temperature for xanthan gum was more complex to interpret, even if electrostatic interactions were identified at 25°C and 43°C. It has been demonstrated that attraction between milk protein and polysaccharide could take place in solution depending strongly on factors including ionic strength and charge density. Changes in pH could modify the overall charge carried by one or both polymers, thus drastically influencing the strength of the interactions.

3.2.2. Study 2: pH effects on milk protein / xanthan gum interactions

An Independent Components Analysis with 6 ICs, as determined by ICA-by-blocks and the Durbin-Watson criterion, was applied to all the spectra and including data based on pH factor (Study 2 in Table 11). Due to the impossibility to subtract spectra corresponding exactly to the same pH value, ICA was performed on the spectra without subtraction for Study 2.

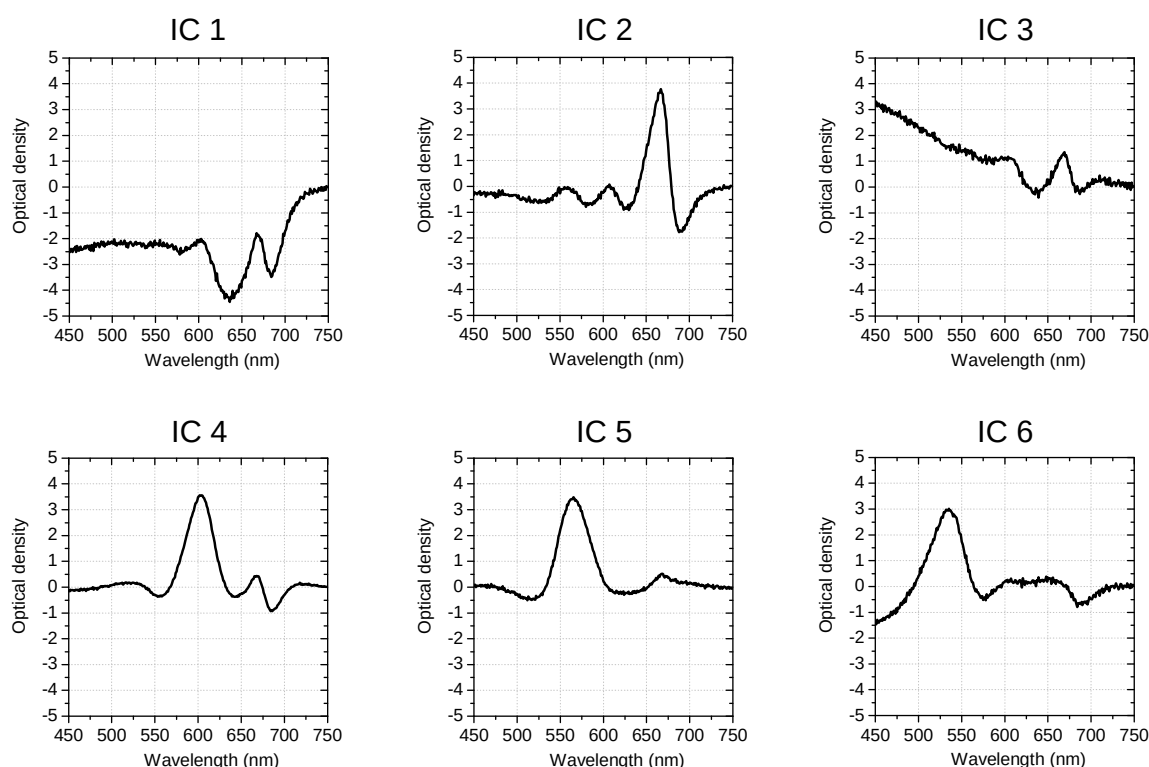


Figure 84. Signals corresponding to the 6 ICs of the ICA model of Study 2.

By examining the IC signals (Figure 84), it was possible to relate the “pure spectra” to signals of known chemical compounds corresponding to specific wavelengths (Table 12) identified from spectra in Figs. 1a and 2b. Most of the ICs were associated with the presence of free MB molecules as detected by a peak near 610 nm and/or 664 nm (Gurov et al., 1988). Nevertheless, it may be assumed that the main peak at 567 nm in the IC5 signal corresponds to metachromatic complexes formed by association of xanthan gum to MB molecules, as seen in Figure 79a. Therefore IC5 was chosen to interpret specifically xanthan gum / milk proteins interactions.

Table 12. Chemical compounds corresponding to specific wavelength zones identified on IC signals (wavelength zones between parentheses are not well represented).

IC	Wavelength zone (nm)	Chemical compound
1	610; 664	Free MB molecules
2	610; 664; (554)	Free MB molecules (metachromatic complexes)
3	664	Free MB molecules
4	610; (664)	Free MB molecules
5	567; (664)	Metachromatic complexes (free MB molecules)
6	534	Not well defined

The interactions between anionic polysaccharides such as xanthan gum and milk protein are expected to be minimal at neutral pH (de Kruif et al., 2004). However, the analysis of MB absorption spectra does show some significant interactions at low ionic strength conditions. Assuming that electrostatic interactions are charge-dependent, and thus pH-dependent, experiments were carried out by decreasing the pH. Figure 85 shows the effects of pH and milk protein addition on MB / xanthan gum systems at various ionic strengths. Proportions of IC5 for MB / xanthan gum solution at 0 M NaCl were not significantly affected by the pH decrease. Thus, metachromatic complexes formed between cationic MB molecules and anionic xanthan gum were stable whatever the pH. Indeed, it is well known that xanthan gum is stable over a wide range of pH, from 2 to 12 (Katzbauer, 1998).

When ionic strength was adjusted to 0.1 M NaCl, proportions of IC5 of mixtures of MB / xanthan gum / milk protein solutions were very low compared to systems without NaCl addition and did not evolve over the studied pH range. It seems reasonable to suggest that no metachromatic complexes were formed upon pH decrease in MB / xanthan gum mixtures and *a fortiori* in MB / xanthan gum / milk proteins solutions at 0.1 M NaCl because of charge screening, as shown in Figure 82a, occurring both at neutral and acidic conditions.

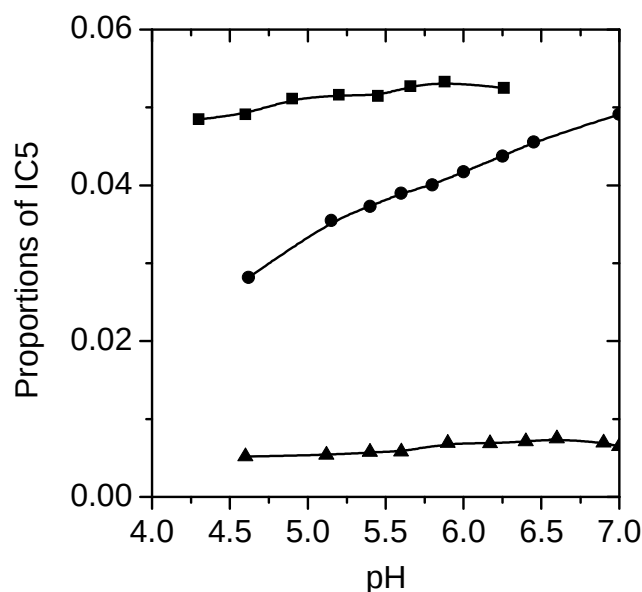


Figure 85. Proportions of IC5 of a MB / 0.0002 wt% xanthan gum at 0 M NaCl (■), or MB / xanthan gum / MP at 0 (●) or 0.1 M NaCl (▲) at 25°C as a function of pH for Study 2.

On the contrary, a strong decrease in proportions of IC5 when decreasing the pH was observed after addition of milk protein to MB / xanthan gum solution without NaCl, which could be attributed to a drastic decrease in the number of metachromatic complexes. A decrease in pH could produce a progressive release of the MB molecules due to fixation of milk protein on xanthan gum chains. In consequence, interactions between milk protein and xanthan gum increased when acidification proceeded. At pHs below 4.6 which is the casein isoelectric point, positively charged milk protein can strongly interact with anionic polysaccharide, which could explaining the change in slope between 5.2 and 4.6. These results are consistent with those reported for whey protein / carboxymethylcellulose interactions studied at pH 6.8 and 5.5 (Koupantsis & Kiosseoglou, 2009). Thus, milk protein / xanthan gum electrostatic association could only take place at a very low ionic strength and an important strengthening of the interactions was highlighted as the pH approached the protein isoelectric point.

Conclusion

Electrostatic interactions between neutral or charged polysaccharides and milk protein were studied by applying ICA to MB visible absorption spectra. ICA was shown to be an effective tool to identify the specific chemical phenomena related to the detection of associative interactions and to characterise the strength of these interactions. At neutral pH, xanthan gum and carrageenan appeared

to interact with milk protein whereas neutral guar gum did not associate with milk proteins. However, these interactions could only take place under specific conditions, *i.e.*, at very low ionic strength. Investigation of the proportions obtained by ICA highlighted the enhancement of electrostatic interactions between xanthan gum and milk protein when acidification proceeded. Knowledge of associative interactions is crucial to formulate low pH foods, so further work should be carried out to elucidate precise conditions for the establishment of such interactions.

Acknowledgements

The results were obtained in the context of Satiarome project which is supported by Vitagora pole, DGCIS and local authorities with the financial support of Bpifrance and FEDER.

References

- Aichinger, P.A. et al., 2007. Xanthan gum in skim milk: designing structure into acid milk gels. In *Food Colloids: Self-Assembly and Material Science*, Eds E. Dickinson and M. Leser, RSC, Cambridge. pp. 283–296.
- Benichou, A. et al., 2007. Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocolloids*, 21, pp.379–391.
- Bhat, S., Tuinier, R. & Schurtenberger, P., 2006. Spinodal decomposition in a food colloid – biopolymer mixture: evidence for a linear regime. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18, pp.339–346.
- Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.L., 1999. Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein-guar gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 13, pp.43–49.
- Corredig, M., Sharafbafi, N. & Kristo, E., 2011. Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocolloids*, 25, pp.1833–1841.
- Doublier, J.L. et al., 2000. Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloids and Interface Science*, 5, pp.202–214.
- Du, B. et al., 2007. The stabilization mechanism of acidified milk drinks induced by carboxymethylcellulose. *Lait*, 87, pp.287–300.
- Garnier, C. et al., 2003. Iota-carrageenan / casein micelles interactions: evidence at different scales. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, pp.177–184.
- Gurov, A.N. et al., 1988. Equilibrium and non-equilibrium complexes between bovine serum albumin and dextran sulfate - III. Methylene blue binding by equilibrium complexes. *Food Hydrocolloids*, 2(4), pp.297–310.
- Hemar, Y. et al., 2001. Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 15, pp.565–574.
- Hyvärinen, A. & Oja, E., 2000. Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural Network*, 13, pp.411–430.

- Jouan-Rimbaud Bouveresse, D. et al., 2012. Two novel methods for the determination of the number of components in Independent Components Analysis models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 112, pp.24–32.
- Katzbauer, B., 1998. Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, 59, pp.81–84.
- Kobori, T., Matsumoto, A. & Sugiyama, S., 2009. pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), pp.719–723.
- Koupantsis, T. & Kiosseoglou, V., 2009. Whey protein–carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 23, pp.1156–1163.
- De Kruif, C.G. & Tuinier, R., 2001. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15, pp.555–563.
- De Kruif, C.G., Weinbreck, F. & de Vries, R., 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, pp.340–349.
- Maroziene, A. & de Kruif, C.G., 2000. Interaction of pectin and casein micelles. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.391–394.
- Michon, C. et al., 2002. Gelatin/carrageenan interactions in coil and ordered conformations followed by a methylene blue spectrophotometric method. *Food Hydrocolloids*, 16, pp.613–618.
- Michon, C. et al., 2000. Gelatin/iota-carrageenan interactions in non-gelling conditions. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.203–208.
- Michon, C. et al., 1997. Interactions in mixtures of gelatin and iota-carrageenan. In *Food Colloids - Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Eds E. Dickinson & B. Bergenstahl, RSC, Cambridge. pp. 316–325.
- Nandini, R. & Vishalakshi, B., 2011. Spectrophotometric study of interaction between sodium carrageenate and cationic dyes. *E-Journal of Chemistry*, 8, pp.253–265.
- Perez, A.A. et al., 2009. Interactions between milk whey protein and polysaccharide in solution. *Food Chemistry*, 116, pp.104–113.
- Rutledge, D.N. & Barros, A.S., 2002. Durbin-Watson statistic as a morphological estimator of information content. *Analytica Chimica Acta*, 454, pp.277–295.
- Rutledge, D.N. & Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., 2013. Independent Components Analysis with the JADE algorithm. *Trends in Analytical Chemistry*, 50, pp.22–32.
- Schmitt, C. & Turgeon, S.L., 2007. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167, pp.63–70.
- Schoenberg, M.D. & Moore, R.D., 1964. The conformation of hyaluronic acid and chondroitin sulfate C: the metachromatic reaction. *Biochimica Acta*, 83, pp.42–51.
- Shirai, M., Nagaika, Y. & Tanaka, M., 1977. Interaction between dyes and polyelectrolytes. IV. Metachromatic behavior of methylene blue induced by poly(vinylphenol). *Journal of Polymer Science*, 15, pp.1021–1025.
- Snoeren, T.H.M. et al., 1975. Electrostatic interaction between kappa-carrageenan and kappa-casein. *Milchwissenschaft*, 30, pp.393–395.

- Snoeren, T.H.M., 1976. Kappa-carrageenan. A study of its physico-chemical properties, sol-gel transition and interactions with milk. *PhD Thesis, Wageningen, The Netherlands*.
- Stone, J.V., 2004. Independent Component Analysis – A Tutorial Introduction. In *A Bradford book, Cambridge (MA)*.
- Syrbe, A., Bauer, W.J. & Klostermeyer, H., 1998. Polymer science concepts in dairy systems - An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8, pp.179–193.
- Tafulo, P.A.R., Queiros, R.B. & Gonzalez-Aguilar, G., 2009. On the “concentration-driven” methylene blue dimerization. *Spectrochimica Acta Part A*, 73, pp.295–300.
- Tolstoguzov, V.B., 1995. Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. *Food Hydrocolloids*, 9(4), pp.317–332.
- Tuinier, R., Grotenhuis, E. & de Kruif, C.G., 2000. The effect of depolymerised guar gum on the stability of skim milk. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.1–7.
- Tuinier, R., Rolin, C. & de Kruif, C.G., 2002. Electrosorption of pectin onto casein micelles. *Biomacromolecules*, pp.632–638.

Sur la base d’une méthode spectrophotométrique associée à une analyse des données par un outil chimiométrique, les interactions associatives entre divers polysaccharides et les protéines de lait ont été étudiées sous différentes conditions de force ionique, température et pH. Une analyse en composantes indépendantes (ACI) a permis de simplifier l’interprétation des données spectrophotométriques par décomposition des spectres en « signaux purs », pouvant être directement reliés à des composés chimiques connus. Par une modification du spectre d’absorption suite à un ajout de protéines de lait à un mélange de bleu de méthylène et de polysaccharides, des interactions électrostatiques ont pu être mises en évidence. A la différence du guar, polysaccharide neutre, les molécules de xanthane et de carraghénane chargées négativement s’associent aux micelles de caséines par l’intermédiaire de régions positives situées sur les protéines. Cependant, ces interactions n’interviennent qu’à faible force ionique. Dans ces conditions précises, un renforcement des interactions associatives entre le xanthane et les protéines de lait a été mis en lumière lors d’une acidification du milieu.

II. PROPRIETES DES MELANGES LAIT / XANTHANE AVANT GELIFICATION

II.1. Microstructure des mélanges lait / xanthane

Dans un premier temps, les mélanges lait / xanthane ont été étudiés au pH du lait. La microstructure de mélanges lait / xanthane a été examinée par microscopie confocale et comparée à celle de mélanges lait / guar ou carraghénane (Figure 86). Le choix des polysaccharides a été effectué en fonction de leur densité de charges, allant d'un polysaccharide neutre pour le guar, à des polymères de plus en plus chargés pour le xanthane puis les carraghénanes. Il est important de relever que la concentration en polysaccharides des différents mélanges n'est pas identique puisque l'intensité de la séparation de phases est fonction des caractéristiques physico-chimiques des polymères, notamment de leur viscosité intrinsèque lorsqu'un phénomène de déplétion intervient et de la charge lorsque qu'une association a lieu. Sur l'ensemble des images, les zones claires permettent de localiser les protéines et par contraste, les zones sombres correspondent à des parties dépourvues de protéines.

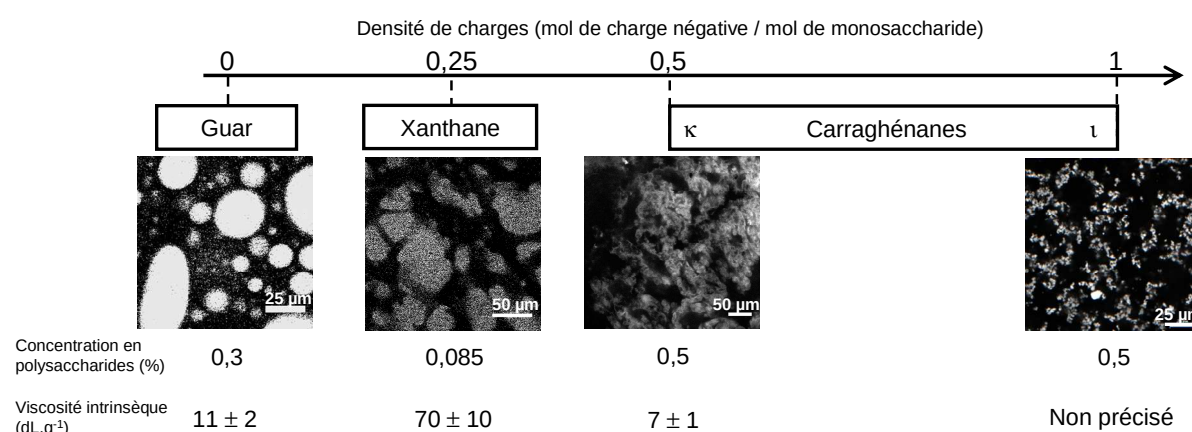


Figure 86 : Effet de la densité de charges sur la microstructure de différents mélanges lait / polysaccharides (4,6% protéines / 0,3% guar à 43°C ; 4,6% protéines / 0,085% xanthane à 43°C ; 4,6% protéines / 0,5% kappa-carraghénane à 25°C). L'image du mélange 3% micelles de caséines / 0,5% iota-carraghénane est issue de Garnier et al. (2003)

L'effet de l'ajout de guar dans le lait sur la microstructure a été détaillé dans le chapitre 3 et conduit à la formation de gouttelettes protéiques sphériques dispersées dans une phase continue riche en guar. Contrairement au guar non chargé, les molécules de kappa- et iota-carraghénanes portent des charges négatives grâce à leurs groupements sulfates (Tableau 9). Des microstructures variées apparaissent dans les mélanges contenant 0,5% de carraghénane. Alors que le système lait / kappa-carraghénane présente des zones irrégulières enrichies en protéines, une structure plus granuleuse prédomine après un ajout de iota-carraghénane. L'absence d'une morphologie de gouttelettes

sphériques est attribuée à l'association du carraghénane avec les micelles de caséines au travers d'interactions électrostatiques associatives entre ses groupes sulfates chargés négativement et une région chargée positivement de la caséine κ (Snoeren et al., 1975 ; Dalgleish & Morris, 1988 ; Langendorff et al., 1999 ; Garnier et al., 2003).

Dans le cas de polysaccharides légèrement chargés tels que le xanthane, la phase protéique se structure sous la forme de domaines non sphériques, mais de taille comparable aux gouttelettes obtenues pour le système à base de guar. Toutefois, les propriétés rhéologiques particulières de la phase continue enrichie en xanthane pourraient ralentir la relaxation des domaines protéiques après la coalescence de deux gouttelettes adjacentes et ainsi contribuer à l'absence de sphéricité. Par ailleurs, l'étude spectrophotométrique (Chapitre 4, I) et les mesures du potentiel zêta de solutions de xanthane (Figure 77) ont montré un effet d'écrantage des charges très important dès l'ajout de 0,02 M NaCl, et *a fortiori* de 0,1 M NaCl, qui correspond à la force ionique du lait, limitant ainsi les éventuelles interactions associatives entre le xanthane et les protéines de lait. Ainsi, de la même manière que pour les mélanges lait / guar, et malgré la densité de charges non nulle de la molécule de xanthane en absence de sel, un mécanisme de déplétion-floculation serait majoritairement à l'origine de la microstructure des systèmes lait / xanthane (Hemar et al., 2001 ; Aichinger et al., 2007 ; Bhat et al., 2006).

II.2. Propriétés rhéologiques des mélanges lait / xanthane

II.2.1. Propriétés d'écoulement

Compte tenu de la différence microstructurale entre les mélanges à base de guar ou de xanthane, la question de la contribution de ces microstructures aux propriétés rhéologiques de ces mélanges se pose. Les courbes d'écoulement du mélange lait / xanthane et de chaque composé individuel sont présentées sur la Figure 87a.

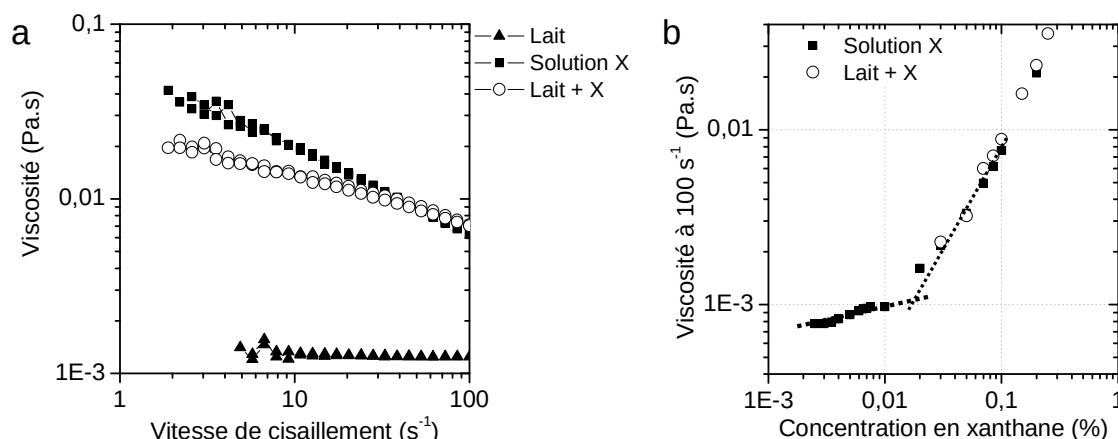


Figure 87 : (a) Courbes d'écoulement du lait à 4,6% de protéines ($\blacktriangle$), d'une solution de xanthane à 0,085% dans 0,1 M NaCl ($\blacksquare$), du mélange lait / xanthane à 0,085% ($\circ$) ; (b) Viscosité à 100 s^{-1} d'une solution de xanthane dans 0,1 M NaCl ($\blacksquare$) ou du mélange lait / xanthane ($\circ$) en fonction de la concentration en xanthane. Les mesures ont été réalisées à 43°C .

A la différence du lait caractérisé par un comportement parfaitement Newtonien et une valeur de viscosité légèrement supérieure à celle de l'eau dans les mêmes conditions de température, le xanthane seul montre un caractère rhéofluidifiant marqué. Ces propriétés particulières peuvent s'expliquer par la grande rigidité de la molécule de xanthane et la rupture des zones d'association des chaînes sous l'effet du cisaillement (Rochefort & Middleman, 1987 ; Cuvelier, 1988). Le mélange lait / xanthane présente également un comportement rhéofluidifiant mais moins prononcé que la solution de xanthane. De plus, bien que la valeur de viscosité à 100 s^{-1} du mélange soit très proche de celle de la solution de xanthane seule (Figure 87b), les viscosités aux faibles vitesses de cisaillement sont très différentes. Ce résultat est surprenant puisque sur la base d'une hypothèse de la formation d'une émulsion eau dans eau, la concentration en xanthane de la phase continue devrait être supérieure à celle de la solution de xanthane seule et donc présenter un plateau Newtonien avec une viscosité plus importante et un caractère rhéofluidifiant plus marqué. Un comportement similaire a été décrit pour différents mélanges de protéines de lait et de xanthane par Hemar et al. (2001). Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer ce phénomène. Une destruction locale des gouttelettes formerait une couche enrichie en protéines de lait au contact du corps de mesure, contribuant ainsi à une baisse de la viscosité aux faibles vitesses de cisaillement. Une seconde explication serait la présence de gouttelettes enrichies en protéines de lait jouant le rôle d'éléments perturbateurs vis-à-vis des propriétés rhéologiques de la phase continue riche en xanthane, notamment aux faibles vitesses de cisaillement.

Il est à noter qu'un ordre de grandeur de la concentration critique C^* peut être déterminé au niveau de la zone de transition du domaine dilué à semi-dilué pour une solution de xanthane ou de guar dans 0,1 M NaCl (Figure 56 et Figure 87b). Bien que ces valeurs soient à prendre avec prudence en raison de la viscosité prise dans la zone non Newtonienne aux hautes concentrations en polysaccharides, la concentration critique C^* de la solution de xanthane est environ 5 fois inférieure à celle de la solution de guar, ce qui est très cohérent avec les mesures de viscosité intrinsèques calculées (Figure 78).

II.2.2. Propriétés viscoélastiques

L'étude des propriétés viscoélastiques permet de fournir des éléments complémentaires par rapport aux propriétés d'écoulement sur l'organisation des mélanges. Ainsi, des mesures en régime harmonique ont été réalisées sur des mélanges contenant de 0% à 0,25% de xanthane (Figure 88).

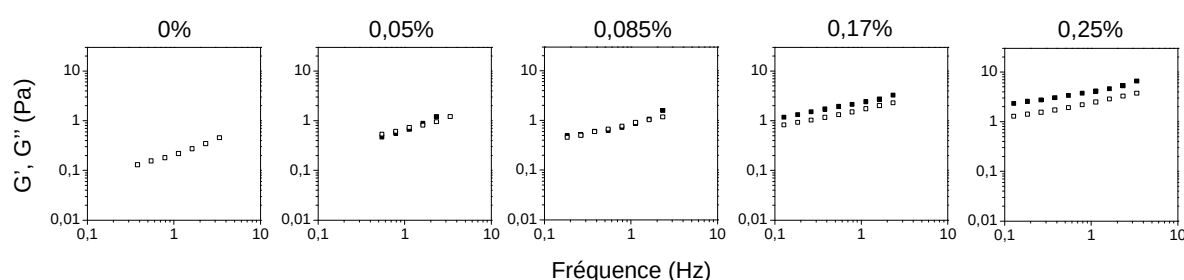


Figure 88 : Spectres viscoélastiques à 4°C de mélanges lait / xanthane ((■) G' , (□) G''). Les concentrations en xanthane sont indiquées sur la figure.

Le spectre du lait présente une dépendance à la fréquence, caractéristique de solutions macromoléculaires. Il est à noter que le module élastique n'a pas pu être mesuré pour le lait seul puisqu'il est Newtonien. L'ajout de xanthane provoque un changement progressif des propriétés viscoélastiques, avec l'apparition d'un plateau élastique lorsque G' devient supérieur à G'' sur une partie de plus en plus importante du domaine de mesure. L'évolution des spectres viscoélastiques des mélanges en fonction de la concentration en xanthane est comparable à celle qui pourrait être obtenue à partir d'une solution de xanthane (Cuvelier & Launay, 1986). Par conséquent, le comportement du xanthane domine au sein des différents mélanges. Un phénomène d'association des chaînes de xanthane stabilisées par de nombreuses liaisons hydrogène contribuerait aux propriétés viscoélastiques remarquables du xanthane et au pseudo-plateau élastique visible sur un large domaine de fréquence (Morris et al., 1983). Par un effet d'exclusion de volume, les inclusions de protéines de lait constitueraient une phase dispersée peu visqueuse dont la morphologie serait dominée par les

propriétés de la phase continue riche en xanthane et notamment par des temps de relaxation très élevés.

L'analyse des propriétés rhéologiques a permis d'émettre des hypothèses complémentaires quant à l'organisation particulière de la microstructure des mélanges lait / xanthane en milieu neutre. Ainsi, sur la base des observations microscopiques et des mesures rhéologiques, et en s'appuyant sur la connaissance des caractéristiques physico-chimiques des chaînes de xanthane, les domaines enrichis en protéines du fait d'un phénomène de déplétion-floculation seraient contrariés par les propriétés viscoélastiques remarquables de la phase continue constituée de xanthane. Une acidification du milieu pourrait toutefois modifier ce comportement de manière majeure.

III. PROPRIETES DES GELS ACIDES BRASSES ENRICHIS EN XANTHANE

Etant donné que le pH contrôle la charge nette des polymères, une modification de pH peut avoir un impact important sur la possibilité d'association. Ainsi, l'analyse des propriétés des gels enrichis en xanthane obtenus à l'aide de deux méthodes d'acidification, l'une permettant une acidification instantanée à l'aide de HCl et l'autre une acidification progressive à l'aide de GDL, pourrait fournir des indications sur d'éventuelles interactions associatives.

III.1. Acidification à l'aide de HCl

Malgré une vitesse d'acidification très rapide s'éloignant des conditions de fabrication des gels laitiers acides fermentés, l'utilisation de HCl permet de diminuer le pH du milieu en dessous du point isoélectrique des protéines. Cependant, un cisaillement doit systématiquement être appliqué conjointement à l'ajout d'acide afin de limiter une surconcentration locale en acide qui entraînerait un abaissement du pH très localement. Par ailleurs, la protonation rapide des groupes phosphates ne permet pas à la micelle de caséines de se réorganiser, ce qui empêche la formation d'un réseau gélifié tel que présent dans les gels laitiers.

L'acidification à l'aide de HCl à 1 mol.L^{-1} d'un mélange lait / xanthane à 0,1% dilué à $1/10^{\text{ème}}$ a donné lieu à la formation de complexes fibreux (Figure 89). Détectables à l'échelle macroscopique et de l'ordre de quelques centimètres en moyenne, les complexes se présentent sous une forme fibreuse avec une partie opaque et un voile translucide en périphérie, probablement majoritairement constitué de xanthane.

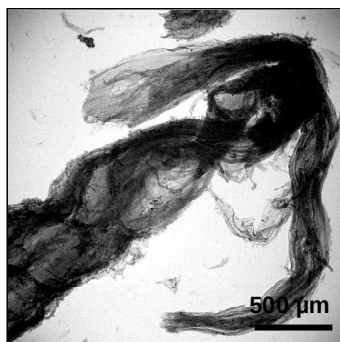


Figure 89 : Complexe fibreux obtenu à partir d'un mélange lait / xanthane à 0,1% dilué à $1/10^{\text{ème}}$ acidifié à l'aide de HCl à 1 mol.L^{-1} jusqu'à pH 4,6 sous un cisaillement continu de 100 rpm observé en microscopie optique. La barre représente 500 μm .

Ces observations sont à mettre en lien avec les structures fibreuses obtenues par acidification à l'aide de HCl de mélanges de protéines sériques et de xanthane par Laneuville et al. (2000). A pH neutre et à force ionique du lait, des interactions de répulsion semblent principalement mises en œuvre entre les protéines globalement chargées négativement et le xanthane polyanionique. A mesure que l'acidification du milieu se produit, une interaction électrostatique peut être initiée entre des régions des protéines chargées de plus en plus positivement et les groupements carboxyles du xanthane. Par ailleurs, un second phénomène contribuerait à la mise en place de ces structures fibreuses. Outre les capacités d'auto-association de la chaîne de xanthane, jouant un rôle de support pour la formation du complexe fibreux, un phénomène de fixation coopérative des protéines semble intervenir (Tolstoguzov, 1986). A l'approche du point isoélectrique des protéines, pour lequel les interactions protéines-protéines sont maximales, les protéines se lieraient préférentiellement à d'autres protéines déjà fixées sur le polysaccharide. Par conséquent, les interactions protéines-protéines seraient favorisées aux dépens de la complexation protéines-polysaccharides.

Lors de l'acidification à l'aide de HCl, l'existence d'interactions associatives serait largement dépendante du pH. Ainsi, dans les mélanges β -lactoglobuline / polysaccharides chargés, deux pH critiques ont été définis : un pH_c correspondant à la formation de complexes primaires solubles et un pH_ϕ pour lequel les complexes primaires s'agrègent en complexes interpolymères insolubles, marquant ainsi le début d'une séparation de phases macroscopique (Girard et al., 2004 ; Sanchez et al., 2006 ; Laneuville, 2004). Au sein du mélange lait / xanthane, seul le pH_ϕ a été détecté par la présence visuelle et macroscopique de complexes fibreux. Puisque la formation de complexes fibreux nécessite la complexation rapide des protéines, l'effet d'un ajout en petite quantité de HCl de différentes concentrations, et donc de la vitesse d'acidification locale, a été étudié (Figure 90).

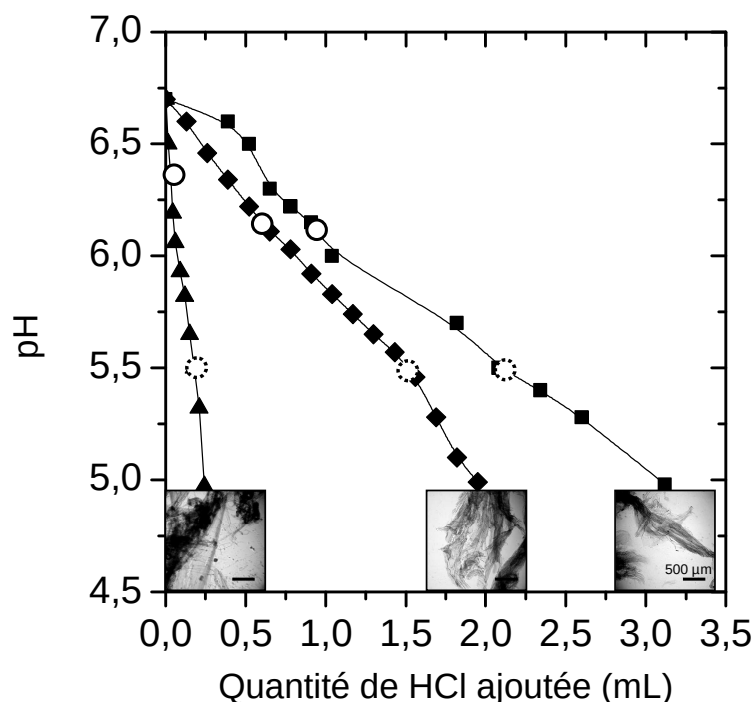


Figure 90 : Effet d'un ajout de HCl de différentes concentrations ((■) 0,05, (◆) 0,1, (▲) 1 mol.L⁻¹) sur la vitesse d'acidification de mélanges lait à 4,6% de protéines / 0,2% de xanthane dilués à 1/10^{ème} acidifiés sous un cisaillement continu de 200 rpm. Les cercles pleins représentent le pH auquel les premiers complexes fibreux sont détectables visuellement mais resolubilisés sous cisaillement en quelques secondes alors que les cercles en pointillés indiquent les complexes fibreux résistant au cisaillement. Images des complexes fibreux à pH 4,8 observés en microscopie optique correspondant aux concentrations en HCl utilisées. Les barres représentent 500 µm.

Au cours de l'ajout progressif de HCl, deux pH clés ont été identifiés : le pH auquel les premiers complexes fibreux sont ponctuellement détectables visuellement et disparaissent sous agitation, et le pH à partir duquel la réversibilité des complexes devient impossible quel que soit le temps de cisaillement appliqué. Alors que les premiers complexes fibreux apparaissent dès le pH de 6,4 pour un ajout de HCl à 1 mol.L⁻¹, ils ne sont visibles qu'à partir de pH 6,15 et 6,1, respectivement après un ajout d'une concentration en HCl de 0,1 et 0,05 mol.L⁻¹. Il est important de noter que la formation de ces structures semble réversible à ce pH puisqu'elles disparaissent visuellement après un mélange. Ce comportement peut être attribué à une surconcentration locale en acide qui permet l'augmentation immédiate de la charge des protéines en dessous de leur point isoélectrique et la formation de complexes faiblement liés, qui se redispersent ensuite rapidement par une réhomogénéisation du pH du milieu sous l'action du cisaillement (Laneuville, 2004). Cette hypothèse est appuyée par le fait que ces complexes apparaissent à un pH plus élevé lorsque la concentration en

HCl augmente. Par ailleurs, la concentration en HCl n'a pas d'effet significatif sur la taille et sur la forme des complexes, ainsi que sur le pH auquel se forment des complexes fibreux résistant au cisaillement. De ce fait, ce pH d'environ 5,5 et donc proche du point isoélectrique des protéines de lait, correspondrait au pH global de début de fixation des protéines sur la chaîne de xanthane qui serait indépendant de la vitesse d'acidification locale.

A partir de ces résultats, il apparaît clairement que le cisaillement joue un rôle primordial sur la formation des complexes fibreux. Partant de ce constat, des complexes fibreux ont été fabriqués sous des conditions de vitesse de cisaillement variables (Figure 91). Globalement, la microstructure des complexes formés sous un cisaillement inférieur ou égal à 300 rpm présente peu de différences en fonction de la force de cisaillement appliquée, avec la présence d'une partie opaque et d'un voile translucide. En revanche, une structure sous la forme d'un fil fin et dépourvu du voile translucide en périphérie apparaît pour une vitesse de cisaillement de 500 rpm.

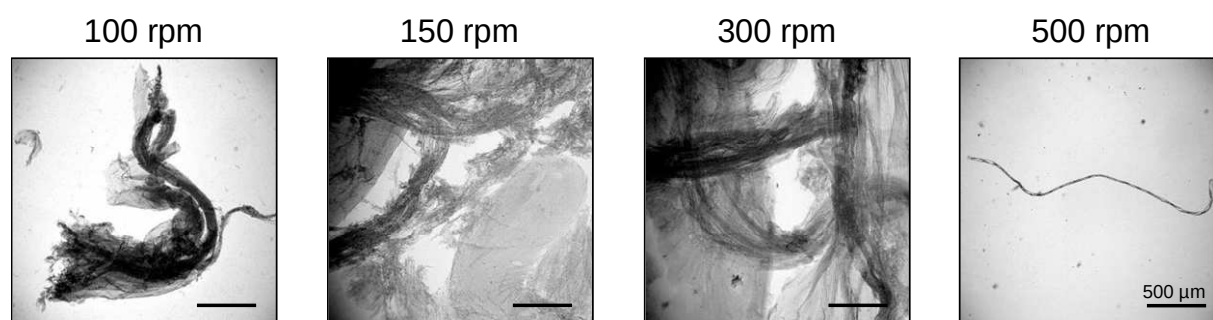


Figure 91 : Effet de la vitesse de cisaillement (de 100 à 500 rpm) sur la microstructure des complexes fibreux obtenus à partir d'un mélange lait / xanthane à 0,1% dilué à $1/10^{\text{ème}}$ acidifié à l'aide de HCl à 1 mol.L^{-1} jusqu'à pH 4,6 et observés par microscopie optique. La barre représente 500 μm .

Deux forces antagonistes semblent intervenir lors de la formation des complexes sous cisaillement. D'une part, l'augmentation des interactions associatives entre le xanthane et les protéines de moins en moins chargées négativement à mesure que le pH décroît, favorise une compaction progressive de la structure. D'autre part, les collisions générées par le cisaillement provoquent des réarrangements protéiques et des ruptures sélectives et irréversibles de parties de complexes plus faibles (Laneuville, 2004), probablement à l'origine de la diminution de taille importante des complexes formés à 500 rpm. Finalement, la structure et la taille des complexes fibreux sont déterminées par des processus de restructuration gouvernés par une compétition entre les forces électrostatiques attractives et les forces de rupture générées par le cisaillement.

L'existence d'interactions associatives entre les protéines de lait et le xanthane en milieu acidifié semble donc être confirmée par la formation de complexes fibreux incluant a priori les deux polymères. Toutefois, ces structures fibreuses témoignant d'attractions électrostatiques n'ont été mises en évidence que sous certaines conditions :

- un ratio protéines / xanthane particulier. En effet, il n'a pas été possible d'observer la formation de complexes fibreux dans les mélanges dilués à 1/10^{ème} à base de 4,6% de protéines de lait et contenant moins de 0,05% de xanthane ;
- une diminution rapide et locale du pH par ajout d'acide concentré en présence d'un mélange de protéines de lait et de xanthane. A titre d'exemple, l'ajout des protéines sous cisaillement à une solution de xanthane préalablement acidifiée en dessous du point isoélectrique des protéines ne conduit pas à la formation de complexes fibreux ;
- l'application d'un cisaillement adéquat, permettant l'orientation des chaînes de xanthane dans le champ de cisaillement, tout en évitant des forces de rupture des complexes trop importantes.

La discussion des microstructures obtenues par acidification à l'aide de HCl a permis d'approfondir la réflexion autour de la question des interactions associatives entre le xanthane et les protéines de lait. Puisqu'une acidification rapide et locale favoriserait les pontages protéiques par fixation coopérative des protéines, la structuration des systèmes acidifiés plus lentement et sans l'action du cisaillement pourrait être différente.

III.2. Acidification à l'aide de GDL

A la différence des structures formées par acidification à l'aide de HCl sous cisaillement, l'utilisation de GDL comme agent acidogène du lait permet la mise en place d'un réseau gélifié. Il a été montré qu'un ajout de 0,085% de xanthane dans du lait conduit à la formation de domaines enrichis en protéines dispersés dans une phase continue riche en xanthane (Figure 86). En considérant à la fois les phénomènes de séparation de phases et de gélification, les propriétés microstructurales et rhéologiques de gels enrichis de 0 à 0,2% en xanthane ont été étudiées. Par ailleurs, les aspects cinétiques de la déstabilisation du système et de la formation du gel ont été approfondis par l'étude de l'effet de la vitesse d'acidification sur les microstructures des micro-gels formés.

Cette partie des résultats a fait l'objet d'un article accepté pour publication dans *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.

Designing microstructure into xanthan gum-enriched acid milk gels

Anne Rohart^{1,2,3} and Camille Michon^{1,2,3*}

¹ AgroParisTech, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 91300 Massy

² INRA, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 91300 Massy

³ CNAM, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 75003 Paris

*Corresponding author. Tel.: +33 169 935 127; fax: +33 169 935 005.

E-mail address: camille.michon@agroparistech.fr (C. Michon).

Abstract

Designing various microstructures through the interplay between phase separation and acid-induced gelation processes was investigated. Acid skim milk / xanthan gum mixed gels were prepared at different xanthan gum and glucono- δ -lactone (GDL) concentrations in order to modulate the extent of phase separation and the gelation rate, respectively. A gradual change in acid milk gel microstructure was found by increasing xanthan gum concentration, from homogeneous protein network, to fibrous structures and finally to isolated protein-rich aggregates. Addition of xanthan gum in the milk led to an apparent depletion-flocculation with protein-rich domains dispersed in a continuous phase enriched in xanthan. The sedimenting denser protein-rich domains could be trapped by protein gelation, forming specific fibrous structures at 0.05 wt% xanthan gum. Manipulating the microstructure through modification of the gelation rate resulted in a design of a broad range of fibrous morphologies varying from 20 to 400 μ m long, which could be used to generate novel textures for food products.

Keywords: Microstructure; Mixed system; Acid milk gel; Xanthan; Food design; Fibrous structure.

1. Introduction

The last two decades have witnessed growing interest in developing novel acid milk gels with different sensory properties or nutritional benefits. To improve the texture and increase the functional properties of acid milk gels, polysaccharides such as xanthan gum, pectin or guar gum can be used in acid milk gels (Sanchez et al., 2000; Everett & McLeod, 2005; Doublier et al., 2000).

At neutral pH, caseins exist in the form of micelles, which are stabilized by steric repulsion due to the extended conformation of κ -casein present mainly on the surface of micelles (de Kruif, 1998; Tuinier et al., 2002). Acid milk gels are produced by decreasing the pH of the milk from 6.8 to 4-4.5 using either bacterial cultures, which ferment lactose into lactic acid, or glucono- δ -lactone (GDL), which mimics the bacterial fermentation. This process leads to the aggregation of casein micelles mainly because of the collapse of the extended conformation of κ -caseins (Holt, 1992). A network of three-dimensional casein strands is formed and can be broken apart by shearing, providing stirred acid milk gels (Tamine & Robinson, 1999). Different acidification rates can be produced by varying the GDL amount (Horne, 2001).

Xanthan gum is an anionic hetero polysaccharide produced by the microorganism *Xanthomonas campestris*. Xanthan's main backbone consists of (1-4) β -D-glucopyranosyl units and is substituted at C-3 on every other glucose residue with a charged trisaccharide side chain (Jansson et al., 1975). The negative charge is brought in the form of a carboxylic acid group and the charge density of the molecule is relatively low (0.25 mol negative charge/mol of monosaccharide) compared to the higher charged pectins and carrageenans (de Jong & van de Velde, 2007).

As xanthan gum is negatively charged in the usual range of pH of food, it could therefore present electrostatic associative interactions with proteins at low pH (Narchi et al., 2009), as in the case of pectin (Tuinier et al., 2002; Marozienne & de Kruif, 2000) or carboxymethylcellulose (Du et al., 2007). At neutral pH, casein micelles being globally negatively charged, repulsive interactions are suspected between anionic polysaccharides and casein micelles. Previous studies showed that an addition of xanthan gum to skim milk resulted in the formation of two phases, one protein-rich and another one xanthan-rich. The mechanism proposed was a segregative phase separation between the casein micelles and xanthan gum which is described as depletion-flocculation (Hemar et al., 2001; Aichinger et al., 2007; Bhat et al., 2006).

Whereas mixtures of milk and polysaccharides at the neutral pH have been frequently studied, there is a limited number of studies in the literature concerning the use of polysaccharides such as xanthan gum during the acid-induced gelation. When acidified with a low xanthan gum concentration (typically around 0.01 wt%), the acid mixed systems showed a more compact structure and were highly organized into fibrous structures at increasing xanthan gum concentration (Sanchez et al., 2000). With higher concentrations, aggregated caseins are trapped within a viscous polysaccharide solution (Everett & McLeod, 2005). Moreover, the acidification rate plays a major role in the final

macro- and microstructure in biopolymer mixtures that undergoes both phase separation and gelation process (Lorén & Hermansson, 2000; Perrechil et al., 2009).

The main objective of this work was to improve the understanding of the respective effect of phase separation and acid gelation kinetics on microstructure morphologies of stirred acid milk gels containing xanthan gum. This was then used to design a wide range of microstructures, considering the competition between phase separation and gel formation.

2. Material and methods

2.1. Mixed Gels Manufacture

Skim milk at 46 g.kg⁻¹ of proteins was prepared with low-heat skim milk powder (33 wt% protein) (CH low heat, Ingredia, Arras, France) dispersed in Milli-Q water using a magnetic stirrer for 1 h at room temperature. Higher protein content than conventional milk was used as it is mostly applied for industrial low fat yoghurts in order to avoid syneresis. The reconstituted skim milk was then left to fully hydrate overnight in a refrigerator. The milk was heat-treated at 80°C during 7 min using a thermostatically-controlled water bath in order to partially denature whey proteins. The level of whey protein denaturation was not measured but the milk preparation was standardized and it must be noted that the total pre-heat-treatment of the milk was medium. Milk was cooled down to 60°C and xanthan gum (Satiexane, Cargill, USA) was dispersed under stirring. The mixture was stirred 30 min at 60°C and finally cooled down to 43°C. Xanthan gum concentrations from 0 to 0.2 wt% were studied.

Different amounts (1, 1.5 or 2.5 wt%) of GDL (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) were added to preheated skim milk that was then incubated at 43°C until a pH of 4.60 (± 0.05) for 1.5 and 2.5 wt% GDL and pH of 4.7 (± 0.05) for 1 wt% GDL, respectively, was obtained. The change in pH with time was monitored with a pH-meter Consort D130 multiparameter analyzer (Turnhout, Belgium). The acidified milk, in the form of a gel, was then immediately cooled down in cold water bath to 20°C in order to slow down drastically the pH decrease.

All the set gels were maintained at 20°C for one hour before to be sheared with a standardized process. During this step, a Masterflex[®] peristaltic pump (Cole Parmer, Vernon Hills-USA) (380 mL.min⁻¹) pushed the gel through two successive plastic pipes (length: 40 cm and internal diameter: 7 mm; length: 100 cm and internal diameter: 3 mm) with a mesh of 500 μ m holes at the end. This shearing process was applied to all gels excepted the strongest ones, typically those with

fibrous-like structure containing 0.05 wt% xanthan (1, 1.5, 2.5 % GDL), 0.085 wt% xanthan (1, 1.5 % GDL) and 0.1 wt% xanthan (1 % GDL), that were mechanically sheared by passing through the two pipes to obtain a homogeneous gel in a standardized shearing process but without the mesh at the end of the second pipe in order to not break the separated micro-gels. Stirred acid milk gels were immediately stored at 4°C during 1 day before analysis to avoid extensive post-acidification (a variation of pH lower than 0.1 was estimated).

2.2. Instrumental characterization

The phase separation process was observed using a Turbiscan LAB (Formulaction, France). A non-acidified skim milk / xanthan gum mixture was poured in glass tubes (diameter 27.5 mm). Backscattering values at 880 nm were acquired along a 40 mm height of tube with one acquisition every 40 μm . Scans were carried out at different time intervals.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and epifluorescence microscopy were used to visualize the microstructure of the stirred mixed gels. CLSM was performed using a Leica TCS AOBS SP2 microscope (Leica, Germany). Proteins were stained by addition of DyLight 549 (20 μL in 1 g of sample) that was excited using a helium-neon laser with wavelength 543 nm and the fluorescence was detected with a photomultiplier. Epifluorescence microscopy was performed using an Olympus BX51 microscope (Olympus America, Lake Success, NY). Proteins were stained with Nile Red that was dispersed in the samples (25 μL in 1 g of sample). The samples were placed on a microscope slide with a glass coverslip on the surface.

To characterize the morphology of the structures obtained, their lengths and widths were measured manually and repeated 10 times for each image. Depending on the image magnification, the smallest particle dimension in the measurements was 15-20 μm . Along the particle length short straight lines were drawn, each length was then individually measured and summed up to give a value for the length.

A stress-controlled rheometer (Carri-Med CSL²100, TA Instruments, UK), fitted with a stainless steel plate and cone (diameter 60 mm, 4° angle) geometry, was used to characterize the rheological properties of stirred acid milk gels. Frequency sweep tests were performed within the linear domain in the range of 0.01-10 Hz. All measurements were carried out 1 day after mixed gels manufacture.

3. Results and discussion

3.1. Phase separation in xanthan gum / milk mixtures

When mixing 0.05 wt% xanthan gum into the milk, a visual phase separation was observed with the formation of two phases, one top phase enriched in xanthan gum and a bottom white phase enriched in proteins. As the evolution of the phase separating system is a kinetic process (Schorsch et al., 1999; Turgeon et al., 2003), the phase separation kinetics of a 0.05 wt% xanthan gum / skim milk mixture was studied using a light multi-scattering technique. Figure 92a shows the variation of the delta backscattering for this non-acidified mixture over different times compared to the control (time = 0 h).

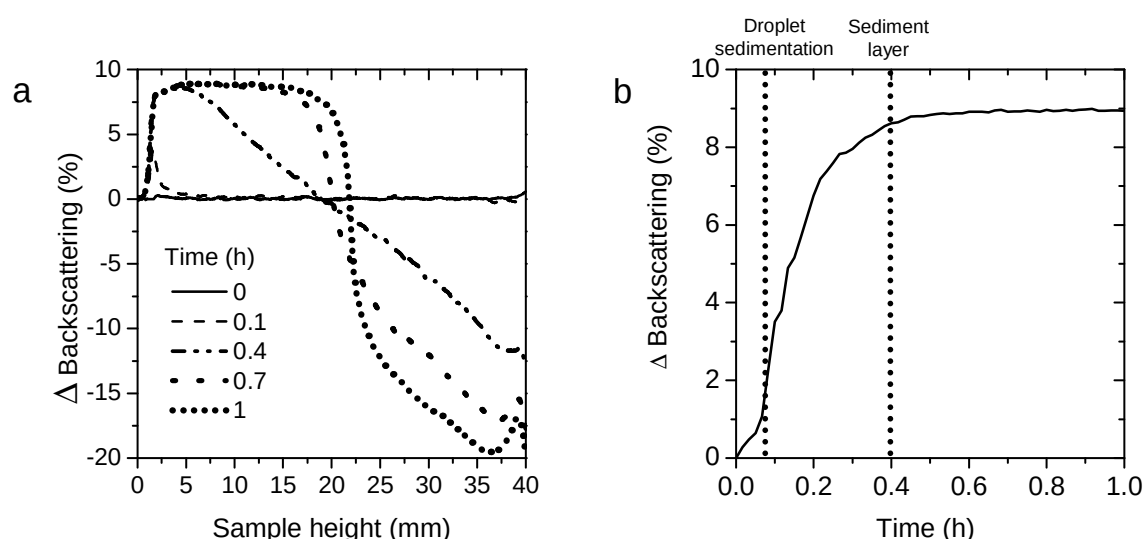


Figure 92. (a) Delta backscattering values of non-acidified 0.05% xanthan gum / skim milk mixture along its height in a glass tube over the time at 43°C; (b) Maximum value of delta backscattering at the bottom of the tube as a function of time. Dotted lines correspond to the time of the beginning of the sedimentation of the protein-rich domains (0.1 h) and apparition of continuous sediment layer (0.4 h).

A modification of backscattered intensity profiles appeared from 0.1 h (Figure 92a). An increase of delta backscattering level was observed at the bottom of the tube corresponding to an increase in protein concentration (Figure 92a and b). The first sedimented protein-rich domains have reached the bottom of the tube. The backscattering signal measured at the bottom of the tube (0-5 mm) increased continuously to reach a maximum level after 0.4 h. This maximum of delta backscattering corresponded to the formation of a continuous protein-rich layer at the bottom of the tube. Then the height of the sedimented layer increased continuously up to 23 mm after 1 h (Figure 92a).

The phase separation process occurring in milk protein / xanthan gum mixtures is now widely recognized and is attributed to a depletion-flocculation mechanism (Hemar et al., 2001; Aichinger et al., 2006; Bhat et al., 2006). Demixing of systems is caused by the formation of a depleted layer around the casein micelles excluding the xanthan molecules which gives rise to an osmotic pressure gradient and drives the casein micelles to attract one another (Asakura & Oosawa, 1958). However, very few researches have focused on the study of the demixing kinetics. In the case of a combined phase separation and gelation process, knowledge of the phase separation kinetics is required.

3.2. Influence of xanthan gum concentration on microstructure and rheological properties of the xanthan gum / acid milk gels

The microstructure of stirred acid milk gels with fixed amount of GDL (1.5 wt%) and increasing concentrations of xanthan gum is shown in Figure 93a. Proteins stained by DyLight 549 were represented in white. The dark areas corresponded to zones devoid of protein, thus containing mostly xanthan gum.

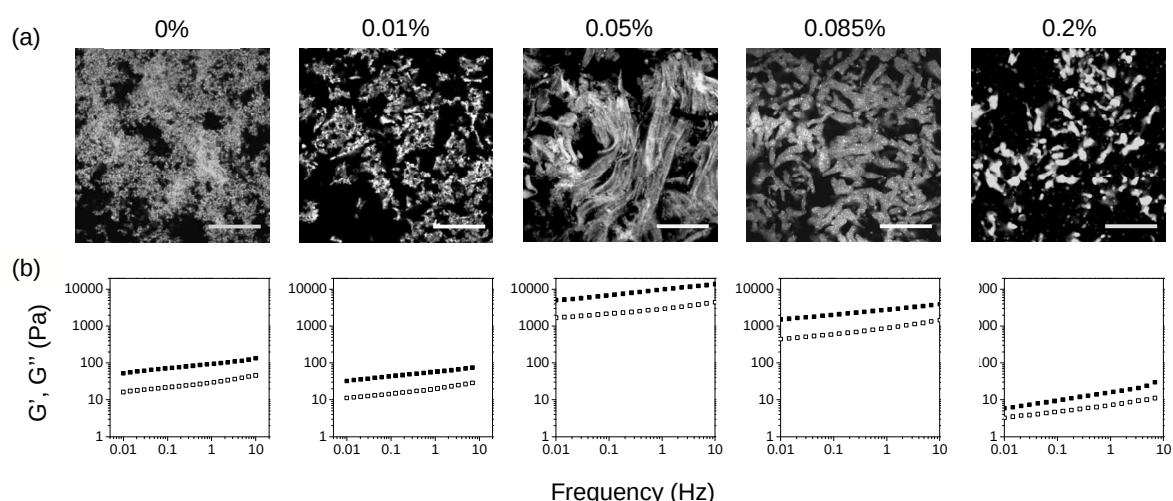


Figure 93. (a) Confocal micrographs; (b) Mechanical spectra of acid milk / xanthan gum gels with 1.5 wt% GDL and containing various xanthan gum concentrations (0-0.2 wt%) indicated in the figure (G' , filled symbols; G'' , empty symbols). Scale bars indicate 100 μm .

Acid milk gels without xanthan gum displayed a homogeneous casein network. However, with addition of only 0.01 wt% xanthan gum, the network tended to form denser casein aggregates with large dark voids, indicating a microscopic phase separation (Figure 93a). This evolution of the casein aggregates morphology when a very small concentration of xanthan gum was added is in good accordance with the hypothesis of local electrostatic associations that were reinforced while decreasing the pH. Those gels exhibited a solid-like behavior: G' values were higher than G'' ones

and both dynamic moduli showed little dependence on frequency (Figure 93b). For 0.05 and 0.085 wt% xanthan gum, the gel structures changed drastically with the formation of fibrous structures exhibiting a macroscopic aspect similar to mozzarella cheese one. Interestingly the high connectivity of the fibrous structures increased by 100 to 1000 times the elastic response of the system (Figure 93b). It should be noted that oriented fibrous structures existed before stirring the set gels and were not oriented after stirring. At high xanthan gum concentration (0.2 wt%), isolated protein-rich aggregates dispersed in a xanthan gum-rich continuous phase appeared, resulting in the complete loss of the network-like structure. This was supported by the rheological data, which showed the weakening of the network in the presence of high xanthan gum concentrations (Figure 93a and b).

Increasing amounts of xanthan gum into acid skim milk gels induced the creation of different microstructures. At low xanthan gum concentrations the stirred gel microstructures were characterized by a micro-phase separation into the protein network. During milk acidification, the combination of acid-induced aggregation of casein micelles and volume exclusion effects resulted in a compaction of the casein network (Sanchez et al., 2000; Aichinger et al., 2007; Everett & McLeod, 2005).

At high xanthan gum concentrations (*i.e.* 0.2 wt%), casein aggregates were trapped within the increasingly viscous xanthan gum-rich solution (Everett & McLeod, 2005) that slowed down considerably the phase separation phenomenon. In this case, the mechanical properties were dominated by the xanthan gum continuous phase. Therefore small protein aggregates were frozen by protein gelation before coalescence and sedimentation occurred.

However, for intermediate xanthan gum concentrations (between 0.05 and 0.085 wt%), the viscosity of the continuous phase was not sufficient to inhibit protein-rich aggregates' mobility (Figure 92a and b). Specific fibrous-like structures were already observed in the case of acidic skimmed milk / xanthan gels at pH 4.6 (Sanchez et al., 2000) and β -lactoglobulin / native xanthan acidified with HCl while applying a shear (Laneuville et al., 2000). The fibrous complexes formation was attributed to non-specific interactions between the polyanionic xanthan gum and the less negatively charged proteins near their isoelectric point. Therefore, a side-by-side aggregation of concentrated casein micelles domains along the xanthan gum chains could occur when acidification proceeds towards pH 4.6 and thus lead to fibrous complexes (Kobori et al., 2009). Meanwhile both gravitational force and thermal agitation contributed to the sedimentation of the mixed aggregates, thus orienting vertically the sedimenting structures. Then the gelation process froze the sedimentation

of the aggregates at an intermediate state, depending on the gelation rate, which made it possible to form the protein-enriched fibrous structures.

3.3. Influence of gelation rate on microstructure of the xanthan gum / acid milk gels

The pH decrease of skim milk as a function of time is shown in Figure 94 for three amounts of GDL. The initial pH of the sample was 6.8. It reached a value of 4.6 after 2 h or 50 min with addition of 1.5 or 2.5 wt% GDL, respectively and a value of 4.7 after 4 h with addition of 1 wt% GDL. With a decrease in pH, the casein micelles became unstable and flocculation took place around pH 5.2 for heated milk (Horne, 2001). With an increase of the GDL concentration, the pH decreased faster and the gelation time was shorter. Indeed the pH value of 5.2 was reached after 0.7 h, 0.5 h and 0.2 h with addition of GDL amount of 1, 1.5 and 2.5 wt%, respectively.

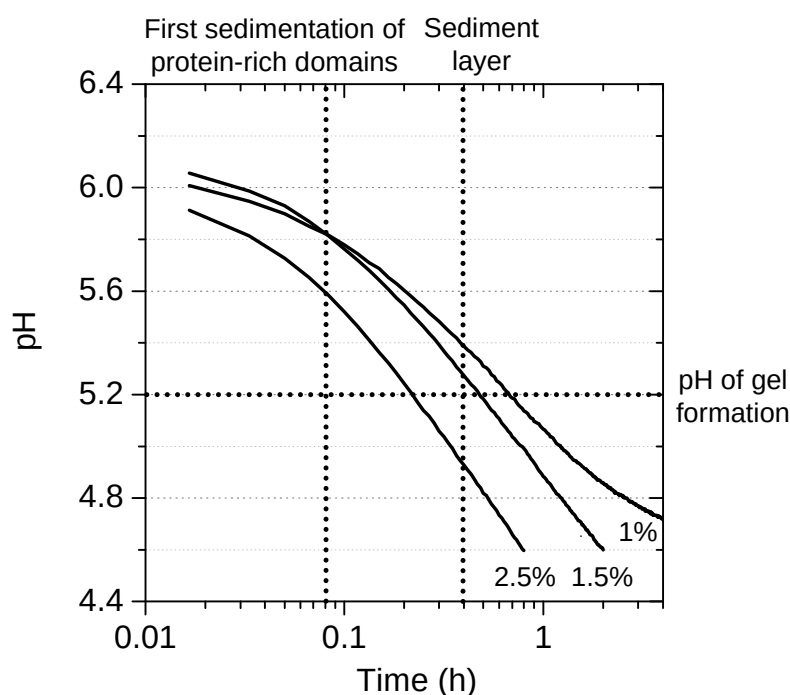


Figure 94. Effect of GDL concentration on pH kinetic after various amounts of GDL addition (1, 1.5, 2.5 wt%). Values are means from triplicate experiments. Dotted lines correspond to the pH of gel formation (pH 5.2) and the time of the beginning of protein-rich domains sedimentation (0.1 h) and apparition of continuous sediment layer (0.4 h) for the non-acidified 0.05% xanthan gum / skim milk mixture as determined from Figure 92b.

By reporting the time of first sedimentation of protein-rich domains and the time of continuous sediment layer formation obtained for the non-acidified mixture (Figure 92b) in Figure 94, it is possible to point out the importance of the interplay between phase separation and gelation kinetics. For instance, in the case of 0.05% xanthan gum / skim milk mixture acidified with 2.5 wt% GDL,

some protein-rich domains began to sediment before pH of gel formation was reached but no continuous layer was formed at the bottom of the tube. With addition of 1.5 wt% GDL the gelation occurred nearly at the same time as the apparition of the continuous sediment layer. On the contrary, using 1 wt% GDL, gelation occurred after 0.8 h whereas a continuous sediment layer began to form only after 0.4 h. In that case the phase separation kinetics was quicker than the network formation kinetics.

Figure 95 illustrates the change in microstructure with increasing levels of xanthan gum at three different GDL concentrations (1, 1.5 and 2.5 wt%). Epifluorescence micrographs at 1.5 wt% GDL revealed the same features as CLSM for increasing xanthan gum concentration, *i.e.* a transformation of the structure from homogeneous to fibrous structures and finally to isolated aggregates dispersed in a xanthan gum-rich continuous phase. Microstructures of the gels acidified with 1 or 2.5 wt% GDL were comparable to those observed for 1.5 wt% GDL concentration, although they were shifted from fibrous structures to isolated protein-rich aggregates at higher xanthan gum concentration with increasing GDL concentration. For instance isolated aggregates appeared from 0.2 wt% for low GDL concentrations whereas it was observed from 0.1 wt% xanthan gum for 2.5 wt% GDL.

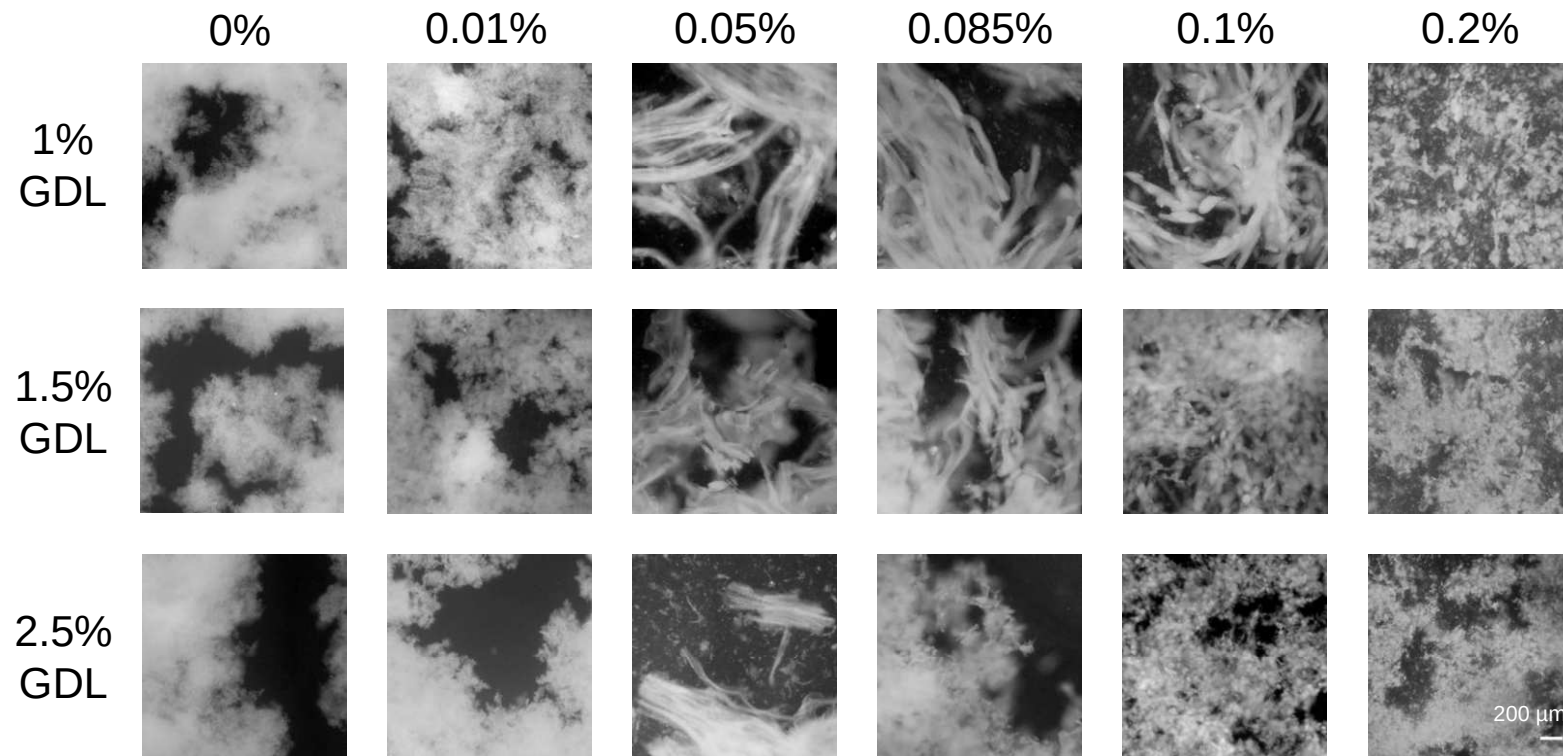


Figure 95. Microstructure of acid milk/xanthan gum gels at pH 4.6 containing various xanthan gum concentrations (0-0.2 wt%) as determined by epifluorescence microscopy at three different GDL concentrations (1, 1.5, 2.5 wt%). Scale bar indicates 200 μm .

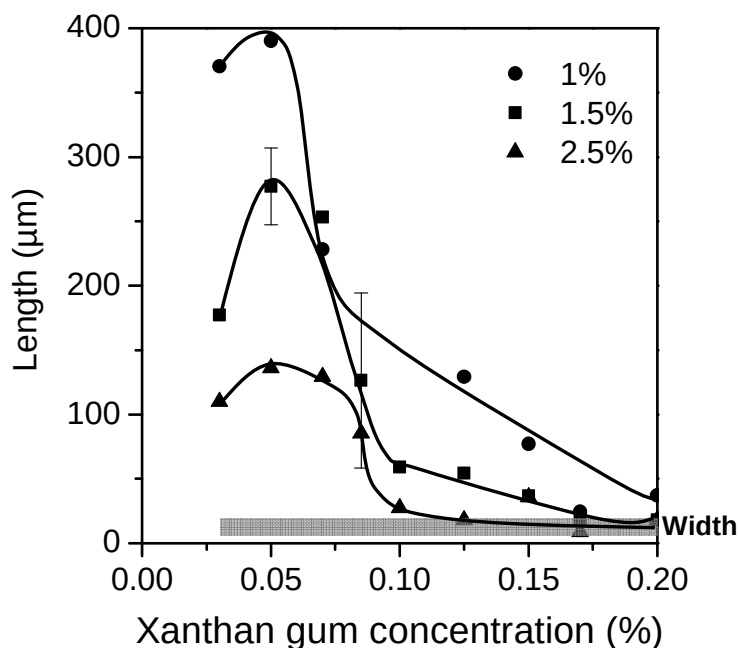


Figure 96. Lengths of the protein-enriched structures as a function of xanthan gum concentration for three GDL concentrations (1, 1.5 and 2.5 wt%). The mean width of the structures is represented in the grey zone. The lines are drawn to guide the eye.

Based on microstructure observations, the various morphologies of protein-enriched structures were characterized (Figure 96). An addition of a very low xanthan gum concentrations (<0.03 wt%) changed the protein network microstructure (Figure 93a and Figure 95) but no separated protein-rich micro-gels could be identified. In those cases, no length and width of separated protein-rich micro-gels determination could be done. At 0.05 wt% xanthan gum, the length of protein-rich micro-gels reached a maximum value, which corresponded to the elongated fibrous structures (Figure 93a and Figure 96). However, the length decreased significantly when microstructure shifted to isolated protein-enriched aggregates, with presence of structures with a length about 5 times smaller than the fibrous one. It is worth noting that at high xanthan gum concentrations the length of the structures tended to reach the width value, meaning that no structure elongation was obtained for the isolated protein-enriched aggregates that became more spherical.

The trend of an initial increase and a subsequent decrease in structures length with increasing xanthan gum concentration appeared whatever the GDL concentration. However, stirred gels acidified with 1 wt% GDL had the most elongated fibrous structures whereas 4 times smaller structures were found in systems prepared with 2.5 wt% GDL, *i.e.* with the highest gelation rate.

These differences in microstructures could be attributed to the time delay for milk protein gelation (Figure 95) which allowed the microstructure to evolve before triggered freezing through protein gelation. As a consequence, for lower gelation rate, the structures were sedimenting to a large extent before being kinetically trapped by gelation. On the contrary, smaller fibrous structures were found in the system containing 2.5 wt% GDL where sedimentation of protein-rich domains competed drastically with the gelation process.

Finally, understanding the interplay between phase separation and gelation made it possible to design a wide range of morphologies with lengths varying from 20 to 400 μm .

Conclusion

The present study showed how various gel microstructures could be designed by acquiring a better understanding of the combined xanthan gum / milk protein phase separation and gelation process. Microscopy in combination with rheological experiments was used to understand the mechanisms involved in acidified milk containing varying concentrations of xanthan gum and GDL. Starting with a casein network, the microstructure transformed into a fibrous structure and isolated protein-rich aggregates dispersed in a xanthan gum-rich continuous phase, depending on xanthan gum concentration. Although a depletion-flocculation phenomenon in xanthan gum / skim milk mixture was described, a side-by-side aggregation of concentrated casein micelles domains along the xanthan gum chains could occur when acidification proceeded leading to a reinforcement. Gelation can then be used to trap kinetically the sedimenting aggregates, leading to specific fibrous structures. The potential to design different types of morphologies by controlling the gelation rate gives a way to manipulate textures. Therefore this study could be complemented by sensory analysis in order to see if interesting novel textures could be created by addition of such microgels with various shapes.

Acknowledgements

The results were obtained in the context of Satiarome project which is supported by Vitagora pole, DGCIS and local authorities with the financial support of OSEO and FEDER. The authors would like to thank Gabrielle Moulin for her assistance with the confocal microscopy experiments.

References

- Aichinger, P.A. et al., 2007. Xanthan gum in skim milk: designing structure into acid milk gels. In *Food Colloids: Self-Assembly and Material Science*, Eds E. Dickinson and M. Leser, RSC, Cambridge. pp. 283–296.
- Asakura, S. & Oosawa, F., 1958. Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *Journal of Polymer Science*, 33, pp.183–192.
- Bhat, S., Tuinier, R. & Schurtenberger, P., 2006. Spinodal decomposition in a food colloid – biopolymer mixture: evidence for a linear regime. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18, pp.339–346.
- Doublier, J.L. et al., 2000. Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloids and Interface Science*, 5, pp.202–214.
- Du, B. et al., 2007. The stabilization mechanism of acidified milk drinks induced by carboxymethylcellulose. *Lait*, 87, pp.287–300.
- Everett, D. & McLeod, R.E., 2005. Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 15(11), pp.1175–1183.
- Hemar, Y. et al., 2001. Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 15, pp.565–574.
- Holt, C., 1992. Structure and stability of the bovine casein micelle. In *Advances in protein chemistry*, Eds C.B. Afinsen, J.D.E.D. Sall, F.K. Richards, & D.S. Eisenberg. pp. 63–151.
- Horne, D.S., 2001. Factors influencing acid-induced gelation of skim milk. In *Food Hydrocolloids: Fundamental of Formulation*, Eds E. Dickinson and R. Miller, RSC, Cambridge. pp. 345–351.
- Jansson, P., Kenne, L. & Lindberg, B., 1975. Structure of the extracellular polysaccharide from xanthomonas campestris. *Carbohydrate Research*, 45(1), pp.275–282.
- De Jong, S. & van de Velde, F., 2007. Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 21, pp.1172–1187.
- Kobori, T., Matsumoto, A. & Sugiyama, S., 2009. pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), pp.719–723.
- De Kruif, C.G., 1998. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *Journal of Dairy Science*, 81(11), pp.3019–3028.
- Laneuville, S.I., Paquin, P. & Turgeon, S.L., 2000. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein-xanthan gum complexes. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.305–314.
- Lorén, N. & Hermansson, A.M., 2000. Phase separation and gel formation in kinetically trapped gelatin/maltodextrin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(4), pp.249–262.
- Marozienne, A. & de Kruif, C.G., 2000. Interaction of pectin and casein micelles. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.391–394.

- Narchi, I., Vial, C. & Djelveh, G., 2009. Effect of protein-polysaccharide mixtures on the continuous manufacturing of foamed food products. *Food Hydrocolloids*, 23, pp.188–201.
- Perrechil, F.A., Braga, A.L.M. & Cunha, R.L., 2009. Interactions between sodium caseinate and LBG in acidified systems: Rheology and phase behavior. *Food Hydrocolloids*, 23, pp.2085–2093.
- Sanchez, C. et al., 2000. Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. *International Dairy Journal*, 10, pp.199–212.
- Schorsch, C., Jones, M.G. & Norton, I.T., 1999. Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 13, pp.89–99.
- Tamine, A.Y. & Robinson, R.K., 1999. Yoghurt: science and technology. 2nd edition. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- Tuinier, R. & de Kruif, C.G., 2002. Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics*, 117(3), pp.1290–1295.
- Tuinier, R., Rolin, C. & de Kruif, C.G., 2002. Electrosorption of pectin onto casein micelles. *Biomacromolecules*, pp.632–638.
- Turgeon, S.L. et al., 2003. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloids and Interface Science*, 8, pp.401–414.

La compréhension de la compétition entre les phénomènes de séparation de phases et de gélification a conduit à formuler une large gamme de morphologies de gels acides enrichis en xanthane. La microscopie associée à des mesures rhéologiques a permis d'interpréter les mécanismes impliqués dans la formation des gels acides contenant différentes concentrations en xanthane et en GDL. Ainsi, une modification progressive de la microstructure en fonction de la concentration en xanthane, en évoluant d'un réseau gélifié homogène à des structures fibreuses et enfin à des microgels riches en protéines dispersés dans une phase continue enrichie en xanthane, a pu être mise en évidence. Bien que l'ajout de xanthane dans le lait aboutisse à un phénomène de déplétion-floculation, les domaines riches en protéines pourraient s'agréger le long des chaînes de xanthane lors de l'acidification, formant ainsi des structures fibreuses à 0,05% de xanthane. Modifier la vitesse d'acidification constitue une approche particulièrement intéressante pour créer une large gamme de microstructures variant de 20 à 400 μm , et pour générer de nouvelles textures.

III.3. Mécanismes de formation des structures fibreuses

A partir des observations microscopiques des structures obtenues après acidification d'un lait enrichi en xanthane à l'aide de HCl ou GDL, il apparaît clairement que les deux méthodes d'acidification utilisées conduisent, sous certaines conditions, à la formation de structures fibreuses (Figure 89 et Figure 93a). Dans le cas de l'utilisation de HCl sous cisaillement, un phénomène d'association semble intervenir, tout au moins partiellement, dans la mise en place de ces structures. En revanche, il n'a pas été possible de confirmer la présence de xanthane dans les structures gélifiées par l'action de la GDL sur la base des observations microscopiques et rhéologiques.

Une approche par dosage indirect basé sur des mesures viscosimétriques a permis d'estimer la quantité de xanthane contenue dans les structures fibreuses. La concentration en xanthane des surnageants après centrifugation a été calculée à partir de courbes étalon reliant la viscosité apparente à 100 s^{-1} et la concentration d'une solution de xanthane (Figure 97a). En connaissant les fractions volumiques des deux phases en présence, la quantité de xanthane incorporée dans les structures fibreuses a été déduite (Figure 97b). Une valeur de 1 correspondrait donc à un emprisonnement de la totalité des chaînes de xanthane dans les structures gélifiées alors qu'une exclusion du xanthane des complexes fibreux serait caractérisée par une valeur proche de 0.

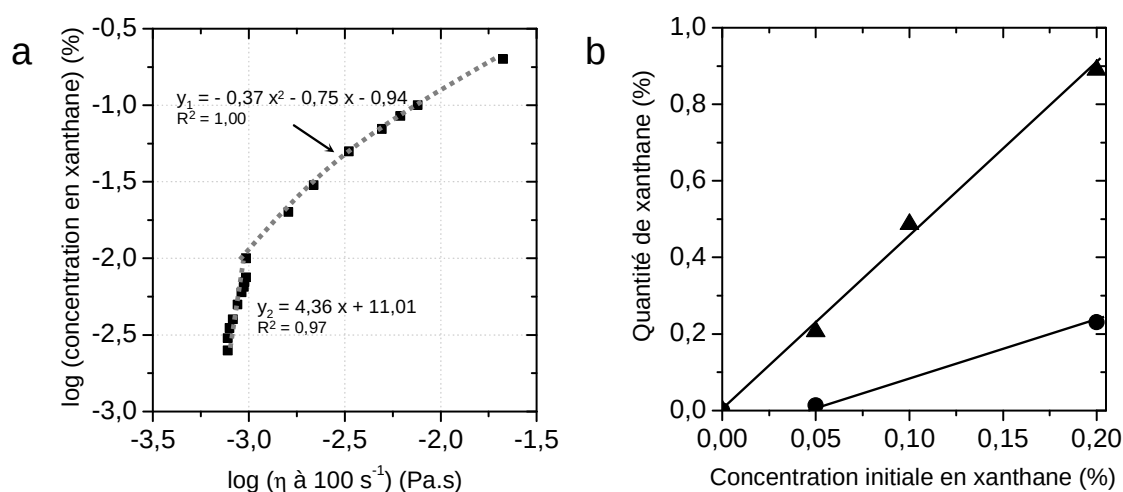


Figure 97 : (a) Courbe étalon entre la viscosité à 100 s^{-1} et la concentration en xanthane d'une solution de xanthane à 0,1 M NaCl à 43°C ; (b) Evolution de la quantité de xanthane dans les structures gélifiées à l'aide de HCl à 1 mol.L^{-1} à 25°C sous cisaillement (▲) ou de GDL à 1,5% à 43°C (●) en fonction de la concentration en xanthane initialement présente dans le lait

Les complexes fibreux formés suite à une acidification à l'aide de HCl contiennent du xanthane à partir d'un ajout initial supérieur ou égal à 0,05% de xanthane, et ce phénomène s'accroît à

mesure que la concentration initiale en xanthane dans le lait augmente. Ce résultat tend non seulement à confirmer des phénomènes de formation de complexes entre le xanthane et les protéines de lait, mais aussi le rôle des propriétés rhéologiques particulières du xanthane. En effet, l'augmentation de la quantité de xanthane dans les structures fibreuses aux concentrations élevées en xanthane peut être interprétée comme la conséquence de l'alignement d'un nombre croissant de chaînes de xanthane dans le champ de cisaillement, permettant des interactions et un piégeage plus efficace des protéines. Dans le cas d'une acidification lente à la GDL, une exclusion presque totale du xanthane et partielle du xanthane dans les structures gélifiées a été observée pour une concentration initiale en xanthane respectivement de 0,05% et 0,2%. Ainsi, l'effet éventuel des interactions entre le xanthane et les protéines de lait dans ces conditions d'acidification ne semble pas être prédominant lorsque le système a été acidifié à l'aide de GDL.

IV. CONCLUSION

Une distinction au niveau de la structuration des gels en fonction de la méthode d'acidification utilisée doit être envisagée (Figure 98). D'une part, les complexes fibreux créés suite à une acidification à l'aide de HCl sous cisaillement sont structurés par un support à base de xanthane, détectable par un voile translucide en microscopie, sur lequel se fixeraient les protéines. D'autre part, l'acidification lente à base de GDL favorise certes la formation d'un réseau gélifié, mais permet également à la séparation de phases par déplétion-floculation entre le xanthane et les micelles de caséines de s'opérer. Dans cette situation, les molécules de xanthane auraient le temps de se regrouper dans une même phase en début d'acidification, limitant ainsi les possibilités d'interaction avec les protéines de lait lorsque le pH s'approche du point isoélectrique des protéines. Cette hypothèse est appuyée par le phénomène d'exclusion presque totale du xanthane des micro-gels. Toutefois, quelques chaînes de xanthane pourraient interagir de manière isolée avec les protéines de lait en milieu acidifié, même si ce phénomène reste à confirmer par des expériences complémentaires.

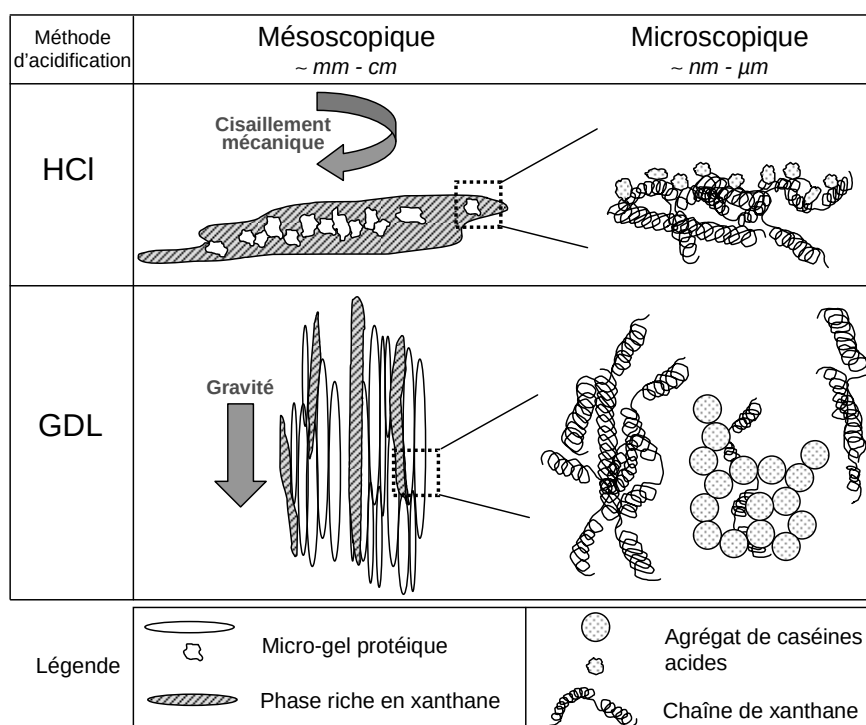


Figure 98 : Représentation schématique des structures fibreuses formées par acidification à l'aide de HCl ou GDL aux échelles mésoscopique et microscopique

Hormis d'éventuelles interactions associatives entre le xanthane et les protéines de lait, les analyses rhéologiques et microscopiques ont permis de mettre en évidence l'intervention d'autres forces dans la structuration des gels acidifié à l'aide de HCl ou de GDL sous une forme fibreuse (Tableau 13).

Tableau 13 : Niveau de contribution des différentes forces à la microstructure des gels acides enrichis en xanthane à pH inférieur ou égal au point isoélectrique des protéines et acidifiés à l'aide de HCl ou GDL

Interactions macromoléculaires	Acidification par HCl	Niveau de contribution	Acidification par GDL	Niveau de contribution
Interactions protéines-xanthane	Complexation	+	Complexation	(+/-) ?
Interactions protéines-protéines	Gélification acide Fixation coopérative	+++	Gélification acide Regroupement dû à la déplétion	+++
Interactions xanthane-xanthane	Liaisons inter-chaînes rompues par le cisaillement	-	Association des chaînes stabilisées par des liaisons hydrogène Temps de relaxation des enchevêtrements important	++
Forces externes	Cisaillement mécanique	++	Cisaillement lié à la gravité	+++

Dans le cas d'une acidification brutale à l'aide de HCl, les chaînes de xanthane orientées par l'action du cisaillement forment un support fortifié par la fixation électrostatique et coopérative des protéines. Il est à noter qu'une gélification acide par GDL, ayant lieu dans des conditions identiques à celles permettant la formation des complexes fibreux par HCl, conduirait à la formation de complexes particuliers et non fibreux (Laneuville, 2004). Même si la présence d'interactions associatives n'a pas été confirmée au sein des gels acidifiés par la GDL, les analyses rhéologiques des laits enrichis en xanthane et l'étude des cinétiques relatives de la séparation de phases et de gélification ont permis d'apporter certaines clés de compréhension vis-à-vis des forces mises en jeu dans la formation des structures fibreuses. Un parallèle entre la possibilité d'allongement des gouttelettes contenues dans les systèmes lait / guar acidifiés sous l'action de la gravité (Chapitre 3, II.2) et les structures fibreuses observées après acidification par la GDL peut être établi. En effet, l'orientation verticale des structures fibreuses laisse supposer que les domaines enrichis en protéines ont été figés par la gélification alors qu'ils sédimentaient sous une forme non sphérique, ceci en raison des propriétés de la phase continue riche en xanthane, et notamment des temps de relaxation très élevés. Augmenter ou diminuer l'intensité des forces externes, dont le cisaillement mécanique ou la gravité, constituerait donc une stratégie intéressante pour jouer sur le degré d'allongement des structures fibreuses.

Chapitre 5 : Effet de l'histoire thermomécanique sur les propriétés des gels acides enrichis en polysaccharides

Dans le cas des mélanges lait / guar ainsi que lait / xanthane acidifiés à l'aide de GDL, des structures filamenteuses ont été obtenues. L'allongement des micro-gels au sein de systèmes enrichis en guar ou la formation de structures fibreuses des systèmes riches en xanthane semblent être majoritairement attribués à un effet de sédimentation des domaines enrichis en protéines par gravité. L'hypothèse d'un rôle de l'agitation thermique dans la mise en place de ces structures reste en question. Par ailleurs, l'action d'un cisaillement constitue un paramètre clé pour la création de complexes fibreux élaborés à partir de mélanges lait / xanthane acidifiés par HCl. L'ensemble des résultats décrits dans les chapitres 3 et 4 conduit à l'hypothèse selon laquelle les concentrations en polymères seraient certes à prendre en considération dans l'obtention de morphologies variées de gels, mais les paramètres de procédé y contribueraient également de manière significative.

L'objectif de ce chapitre est de modifier les traitements thermiques et mécaniques de systèmes lait / guar avant et pendant la gélification acide. A partir des observations macroscopiques, microscopiques et rhéologiques, il s'agira ensuite de relier les conditions de procédé appliquées aux propriétés des gels acides brassés.

I. EFFET DE L'HISTOIRE THERMIQUE

Dans un premier temps, la température a été maintenue constante avant et pendant la gélification du système. Ensuite, les mélanges lait / guar ont subi des histoires thermiques variées, construites à l'aide de différentes étapes de température avant que la formation du gel n'ait lieu. Afin de pouvoir mieux généraliser les phénomènes observés en fonction des modifications des paramètres de procédé, la composition initiale en polymères des systèmes lait / guar a été fixée à un enrichissement de 0,3% de guar et celle en GDL à 1,5%.

I.1. Effet de la température d'acidification

Lorsqu'une séparation de phases au sein d'un système mixte a lieu, la gélification intervient comme un événement perturbateur en ralentissant voire en bloquant ce phénomène. Par conséquent, la compréhension de l'aspect cinétique de ces deux événements se produisant conjointement est cruciale. Modifier la température d'acidification de systèmes lait / guar additionnés de GDL permet à

la fois de moduler la vitesse de séparation de phases et celle de la gélification acide. Un suivi de la séparation de phases a tout d'abord été réalisé par microscopie confocale et par une méthode d'interaction lumière-matière. Ensuite, les différentes microstructures des gels brassés acidifiés à des températures variant de 30°C à 60°C ont été discutées en s'appuyant sur la connaissance des cinétiques respectives de séparation de phases et de gélification acide des protéines.

Cette partie des résultats a fait l'objet d'un article publié dans *Biopolymers*.

Interplay between phase separation and gel formation in stirred acid milk/guar gum gels: effect of acidification rate

Anne Rohart^{1,2,3}, Gabrielle Moulin^{1,2,3} and Camille Michon^{1,2,3*}

¹ AgroParisTech, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 91300 Massy

² INRA, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 91300 Massy

³ CNAM, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 75003 Paris

*Corresponding author. AgroParisTech, 1 rue des Olympiades, F-91300 Massy. Tel.: +33 169 935 127; fax: +33 169 935 005.

E-mail address: camille.michon@agroparistech.fr (C. Michon).

Abstract

The possibility of designing various microstructures through the interplay between phase separation due to depletion mechanisms and acid-induced protein gelation was investigated. In order to modify the phase separation and gelation kinetics, guar gum / acid milk mixtures were acidified using glucono- δ -lactone (GDL) at temperatures varying from 30°C to 60°C. The microstructures of the stirred mixed gels were then discussed in light of the knowledge of the phase separation and gelation timescales. Small spherical protein-enriched micro-gels dispersed in a guar gum-enriched continuous phase were found at high acidification temperatures, suggesting that the protein acid gelation kinetics was quicker than an extensive droplet growth through phase separation. For lower acidification temperatures, a region where droplet coalescence and sedimentation competed with gel formation was identified. Thus, depending on the residence time in that temperature domain, the resulting microstructures varied from spherical to extended filaments of more than 100 μm length. The results demonstrated that a broad range of defined microstructures can be created by triggered arrest through gelation of the phase-separating structure.

Keywords: Chemical physics; Microstructure; Mixed systems; Interaction; Biopolymers

1. Introduction

Polysaccharides and proteins are present together in many kinds of food systems and are largely responsible for the texture and stability due to their own functional properties but also to their interactions. Actually, these two macromolecules are usually incompatible, showing spontaneous phase separation (Doublier et al., 2000; de Kruif & Tuinier, 2001; Corredig et al., 2011). Exceeding a certain polysaccharide concentration, the phase-separating system can be considered as a water-in-water emulsion with some particularities (Frith, 2010; Turgeon et al., 2003): (1) owing to their low interfacial tension, droplets can greatly deform, orient and coalesce (Tolstoguzov, 1991; Tolstoguzov, 2007; Norton & Frith, 2001) and (2) the emulsion destabilization follows Stokes' law (Foster et al., 1997; Foster et al., 1996; Schorsch et al., 1999) only with small density differences resulting in slow creaming or sedimentation rates.

Previous studies have shown that mixtures of milk proteins and galactomannan such as guar gum result in a segregative phase separation attributed to a depletion-flocculation mechanism (Bourriot et al., 1999; Tuinier et al., 2000). Depending on the mixture composition position in the phase diagram, phase volume ratios can be changed as well as the type of polymer constituting the continuous and the dispersed phases (Schorsch et al., 1999; Spyropoulos et al., 2010). Under non-equilibrium conditions, droplets behave as conventional emulsions and can evolve through coalescence and sedimentation (Foster et al., 1997). For instance, it has been established that in the case of 10 wt% skim milk powder/0.32 wt% locust bean gum, demixing occurs only 1 minute after ending stirring at the microscopic scale (Schorsch et al., 1999).

A second event that can interfere with phase separation is the gelation of one or both phases. Generally gelation is governed either by temperature as for example in the case of heat-treated whey proteins or cold setting gels of carrageenan and gelatin, or by acidification of the proteins (Renard et al., 2006; Michon et al., 2010). In that specific case, the process of protein acid-induced gelation leads to a network of casein strands aggregated through iso-electric precipitation. The pH kinetics decrease can be controlled by GDL addition, the progressive hydrolysis of which highly depends on temperature (Heertje et al., 1985; Lucey et al., 1997; Lee & Lucey, 2004) and mimics the acidification kinetics obtained by a bacterial culture.

Recently, emphasis has been put on the understanding of the interplay that occurs between the thermodynamic driving force of the phase separation and the kinetics of gelation (Norton & Frith, 2003; Lundin et al., 2000). Indeed, most of the systematic studies concerning kinetical trapping of

phase separation by gelation process have involved whey protein (de Jong et al., 2009; Redigueri et al., 2007; Syrbe et al., 1998) or gelatin or carrageenan gelation (Lorén & Hermansson, 2000; Lorén & Hermansson, 2003; Wolf et al., 2001). Working on gelatin / maltodextrin mixtures, Lorén et al. (1999) and Lundin et al. (2000) showed that the residence time in the temperature domain where the phase separation competed with the gel formation determined the morphology of the resulting microstructure.

On the contrary, relationship between acid-induced gelation and phase separation processes going on in a neutral polysaccharide / casein mixture, and the ultimate morphology of the gelled phase, has received less attention. While concentrations of polysaccharides as low as 0.1 wt% affected the microstructure of mixed acid milk gels with a compaction of the network (Sanchez et al., 2000; Aichinger et al., 2007), addition of high concentrations led to trapped compact micellar aggregates dispersed in a polysaccharide-enriched continuous phase (Everett & McLeod, 2005; Perrechil et al., 2009). To our knowledge, the effects of the combined phase separation and gelation kinetics on stirred guar gum / acid milk gels have so far never been investigated and therefore merit further attention.

The objective of the current study was to illustrate how, by changing the acidification temperature, and thus the acidification rate, it is possible to play on the relative phase separation and gelation kinetics which led to design a wide range of morphologies in stirred guar gum / acid milk gels. For this purpose, phase separation process was followed using confocal microscopy and a light backscattering technique. Moreover, gels prepared at various acidification temperatures were characterized based on microstructure. The morphologies were discussed on the basis of the understanding of the interplay between phase separation and gelation.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of the mixed gels

Skim milk with 46 g.kg⁻¹ protein was reconstituted by dispersing low-heat skim milk powder (CH low heat, Ingredia, Arras, France) in Milli-Q water under continuous stirring for 1 h at room temperature. Higher protein content than conventional milk was used as it is mostly applied for industrial low-fat yoghurts in order to avoid syneresis. To ensure complete hydration, skim milk was kept overnight at 4°C. Then, milk was heated at 80°C for 7 min in water baths. After cooling down to 60°C, dry powdered guar gum (Viscogum MP, Cargill, USA) was added to the milk to a final concentration of 0.3 wt%. The mixture was stirred for a further 30 min at 60°C in order to completely

solvate guar gum. Then, the temperature was adjusted to the acidification temperature, ranging from 30°C to 60°C. Before acidification, all the mixtures were at a pH of around 6.7.

Gelation of the mixed systems was induced by the addition of glucono- δ -lactone (GDL) (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA). This lactone hydrolyses slowly in aqueous solution and thereby gradually reduces the pH of the milk. Skim milk was acidified by addition of 1.5 wt% GDL to the milk while kept at a temperature of 30°C to 60°C. Immediately after the GDL addition, 30 mL of the mixture was poured into plastic cylinders (30 mm diameter X 65 mm height) and placed in an incubator. The pH was measured in the meantime with a pH-meter Consort D130 multiparameter analyzer (Turnhout, Belgium). When a pH value of 4.6 (± 0.05) was obtained, the set acid milk gels were immediately stored at 4°C overnight until required analysis. For stirred acid milk gels preparation, the set gels were quickly cooled down in cold water bath to 20°C in order to slow down drastically the pH decrease. Then, the gels were sheared by passing through two successive plastic pipes (length: 40 cm and internal diameter: 7 mm; length: 100 cm and internal diameter: 3 mm) with a mesh of 500 μm holes at the end while pushed by a Masterflex[®] peristaltic pump (Cole Parmer, Vernon Hills, USA) at 380 mL.min⁻¹. Gels containing large particles were stirred in the two pipes without the final mesh to obtain a homogeneous stirred gel but to avoid the disruption of big protein-enriched micro-gels. After stirring, stirred gels were immediately stored at 4°C overnight to avoid post-acidification.

2.2. Instrumental characterization

The phase separation was followed using a Turbiscan LAB[®] (Formulaction, France). A non-acidified 0.3 wt% guar gum / skim milk mixture was poured in glass tubes (diameter 27.5 mm) at a temperature varying from 30 to 60°C. Backscattering values at 880 nm were acquired every 40 μm along a 40 mm height of sample at different time intervals.

For phase separation observations, milk samples (4 mL) were poured in glass tubes (inner diameter 6.1 mm). The milk was either left to phase separate for 5 h for the non-acidified mixture, or it was acidified at temperature ranging from 30°C to 60°C until a pH of 4.60 (± 0.05). Then the samples were stored at 4°C overnight before analysis. The values of height fractions of supernatant were calculated as the ratio of the height of top layer (H) to the total height of the sample (H₀). Sample heights were detected using a Turbiscan Classic MA 2000[®] (Formulaction, France).

Confocal microscopy was used to observe the phase separation process along the time in a 0.3 wt% guar gum / milk mixture at 60°C after addition of 1.5 wt% GDL. A rheo-optical device

(RheOptiCAD[®], CAD Instruments, France) (Boitte et al., 2013) was fitted on an inverted confocal laser scanning microscope (CLSM) (Leica TCS AOBS SP2 (Leica, Germany)). By using this device, parallelism and planarity of the slides were ensured, as well as a defined gap width of sample of 3 mm. Stacks in the Z direction were performed at different time intervals and an image profile was then reconstituted from each stack. It allowed observing settling droplets with elongated profiles. Proteins were stained by addition of DyLight 549 (20 μ L in 1 g of sample) which was excited using a helium-neon laser with wavelength 543 nm and the fluorescence was detected with a photomultiplier ranging from 570 to 620 nm.

Epifluorescence microscopy was used to visualize the microstructure of the stirred mixed gels. Nile Red was dispersed in the samples (25 μ L in 1 g of sample) in order to stain the proteins. Then the samples were placed on a microscope slide with a glass coverslip on the surfaces. Images were acquired using an Olympus BX51 microscope (Olympus America, Lake Success, NY).

To characterize the morphology of the structures obtained, their length and width were measured manually from optical microscopy images and repeated 10 times for each image. Depending on the image magnification, the smallest particle dimension in the measurements was 15-20 μ m. When the width was not constant along the whole particle length, mean was performed. Care was taken to ensure that the preparation of the microscope slides had not damaged the particles.

3. Results

3.1. Phase separations in guar gum / milk mixtures at neutral pH and depending on temperature

A 0.3 wt% guar gum / milk mixture was examined prior to acidification, with the aim of characterizing the phase separation kinetics and the resulting phase volumes. The phase diagram established by Bourriot et al. (1999) showed that addition of 0.3 wt% guar gum in casein micelles dispersions induced phase separation by depletion-flocculation effects. Consistent with this study, our visual observations indicated that, at this concentration of guar gum, a two-phase system formed, one top phase enriched in guar gum while the bottom phase was enriched in proteins.

To examine the microstructure during the demixing process confocal microscopy was used. Previous studies have shown the rapid evolution of phase separation of a mixture of two incompatible biopolymers just after the mixing of the system (Nono et al., 2011; Schorsch et al., 1999; Foster et al.,

1997). However, images were performed in the X and Y plane which means that the coalescence process could be followed but not the sedimentation phenomenon.

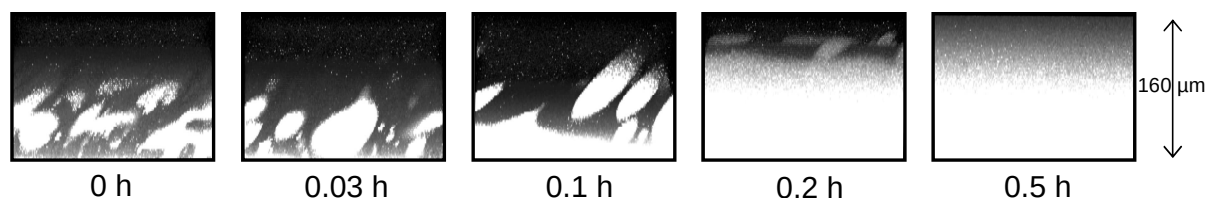


Figure 99. CLSM images profiles in Z-direction along a 160 μm height from the bottom slide of a 0.3 wt% guar gum / milk mixture just after GDL addition at 60°C. The evolution of the system from left to right took around 0.5 h. Times given on the figure are indicative.

Figure 99 depicts the sedimenting process of a 0.3 wt% guar gum / milk mixture with 1.5 wt% GDL at 60°C during 30 min after ending stirring. Proteins appear in white owing to the fluorescence of DyLight 549 while the dark areas correspond to zones devoid of protein, thus containing mostly guar gum. The laser excitation decreased as it got away from the bottom cover slide, which was responsible for the appearance of a protein-depleted zone at the top of the sample. Therefore, emphasis has been put on the description of the lower part of the sample. As previously reported in the case of skim milk / guar gum systems (Bourriot et al., 1999b; Tuinier et al., 2000; Spyropoulos et al., 2010), a water-in-water emulsion system was observed with protein-enriched droplets dispersed in a guar gum continuous phase. At initial time, rather small droplets are concentrated near the bottom slide while the top of the sample is much less concentrated in protein. However, after few minutes, noticeable signs of coalescence appeared as the droplet sizes strongly increased to reach around 100 μm . Moreover, the non-spherical shape of the droplets provides evidence of a non-equilibrium state resulting from recent coalescence. Then, the concentrated packed bed of protein-enriched droplets are coalescing to form a sediment layer, thus not maintaining their individual droplet shapes. As new droplets approached the packed sediment layer, they collided and coalesced which contributed to increase the sediment layer along the time. Therefore, microstructural observations during sedimentation of protein-enriched droplets confirmed that phase separation is a kinetic process and that it could be followed in experimental time scale.

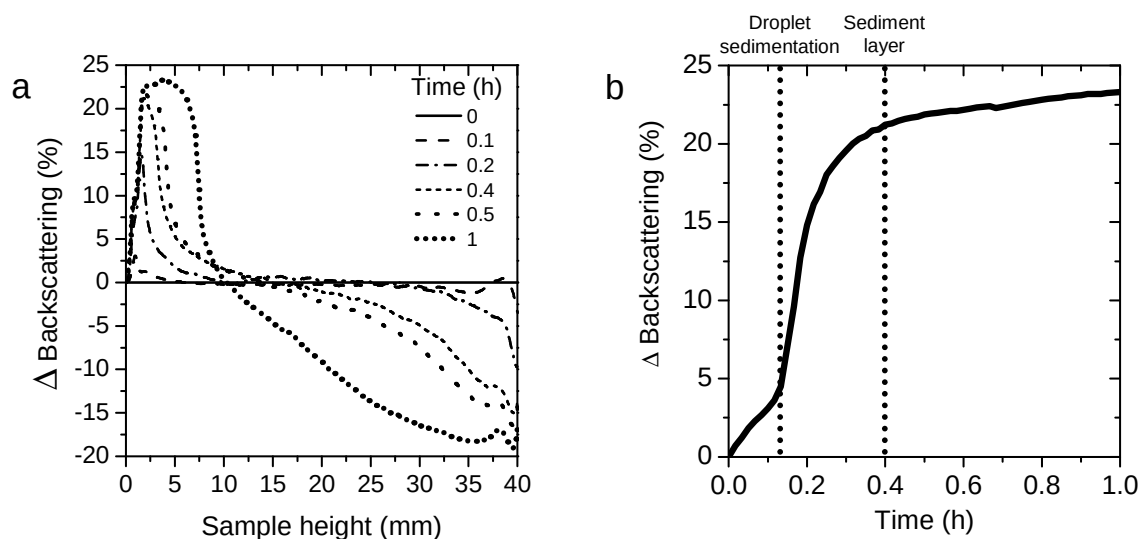


Figure 100. (a) Δ Backscattering values of a non-acidified 0.3% guar gum / skim milk mixture along its height in a glass tube over the time at 60°C; (b) Maximum value of Δ Backscattering at the bottom of the tube as a function of time. Dotted lines correspond to the time of the beginning of droplet sedimentation (0.12 h) and appearance of continuous sediment layer (0.4 h).

Another way of studying the phase separation kinetics is to use a light backscattering technique. Figure 100 shows the variation of Δ Backscattering for a non-acidified 0.3 wt% guar gum / skim milk with 46 g.kg⁻¹ of protein mixture along the height of the sample, at 60°C, over different times. Profiles were compared to the control corresponding to time 0 h. From the first minutes of measurements, the Δ Backscattering level decreased at the top of the sample (right part of the graph) while it increased drastically at the bottom of the sample (left part of the graph) (Figure 100a). However, after 0.4 h, the Δ Backscattering intensity at the bottom reached a maximum value of approximately 23% and remained constant with time (Figure 100b). This steady value can be attributed to the formation of a sediment layer at the bottom of the sample, the height of which increased up to 7.5 mm after 1 h.

By using multi-scale techniques, the macroscopic phase separation kinetics can be related to a microstructural change. It should be noted that a modification in backscattering may be due to either a change in droplet size or protein concentration. It seems reasonable to suggest that the increase in backscattering intensity at the bottom may be consecutive to a protein concentration increase due to droplet sedimentation and coalescence. This is in good agreement with the confocal images profiles showing a gradient of protein-enriched droplet concentration a few minutes after mixing. The sedimentation process follows Stokes' law and therefore depends on droplet size and density and on continuous phase viscosity. Moreover the formation of the sediment layer is driven by the possibility

of coalescence of the droplets (Foster et al., 1997). Due to the very low interfacial tension of the water-in-water emulsion systems (Frith, 2010; Tolstoguzov, 2003) and the high probability of collision of the packed droplets, the droplets can easily coalesce to form the sediment layer. Consequently, two key times for phase separation process can be identified: the beginning of the droplet sedimentation (time 1) and the beginning of the formation of the sediment layer defined at the time where the Δ Backscattering level varied less than 10% (time 2), that is to say 0.12 h and 0.4 h, respectively, in the example presented in Figure 100b.

3.2. Interplay between phase separation and gelation

Although the phase separation process in guar gum / milk mixture has received attention in the last years (Bourriot et al., 1999b; Tuinier et al., 2000), little is known about the use of polysaccharides such as guar gum during the acid-induced gelation. Indeed, gelation could interfere with the ongoing phase separation process and produce different microstructures depending on their relative kinetics. Acid milk gels were prepared at temperatures ranging from 30°C to 60°C in order to modify the gelation kinetics for a given guar gum / milk mixed system.

The effects of the temperature on phase separation were studied by determining the Δ Backscattering variations of a 0.3 wt% guar gum / milk mixture at neutral pH and during gel formation (Figure 101). For the non-acidified mixtures, the Δ Backscattering kinetics showed the same profiles for temperatures varying from 35°C to 60°C with a sharp increase in Δ Backscattering intensity followed by a constant value (thin black curves, Figure 101a-d). As shown in Figure 100b, the phase separation kinetics was defined with the times where the first signs of droplet sedimentation and formation of a sediment layer were observed. Those two times determined for the non-acidified mixtures at various temperatures were reported in Figure 101 (arrows 1 and 2, respectively). When increasing the temperature from 35°C to 60°C (Figure 101a to d, respectively), a shift of the phase separation kinetics to shorter times was detected. One explanation of this behavior could be the decrease in viscosity of the mixture at higher temperatures. Moreover, it is likely that the increasing thermal agitation from 35°C to 60°C may also accelerate the frequency of droplet collision and therefore promoted coalescence and sedimentation. Thus, it is important to note that following Stokes' law, the sedimentation rate depends on the viscosity of the continuous phase as well as the droplet size.

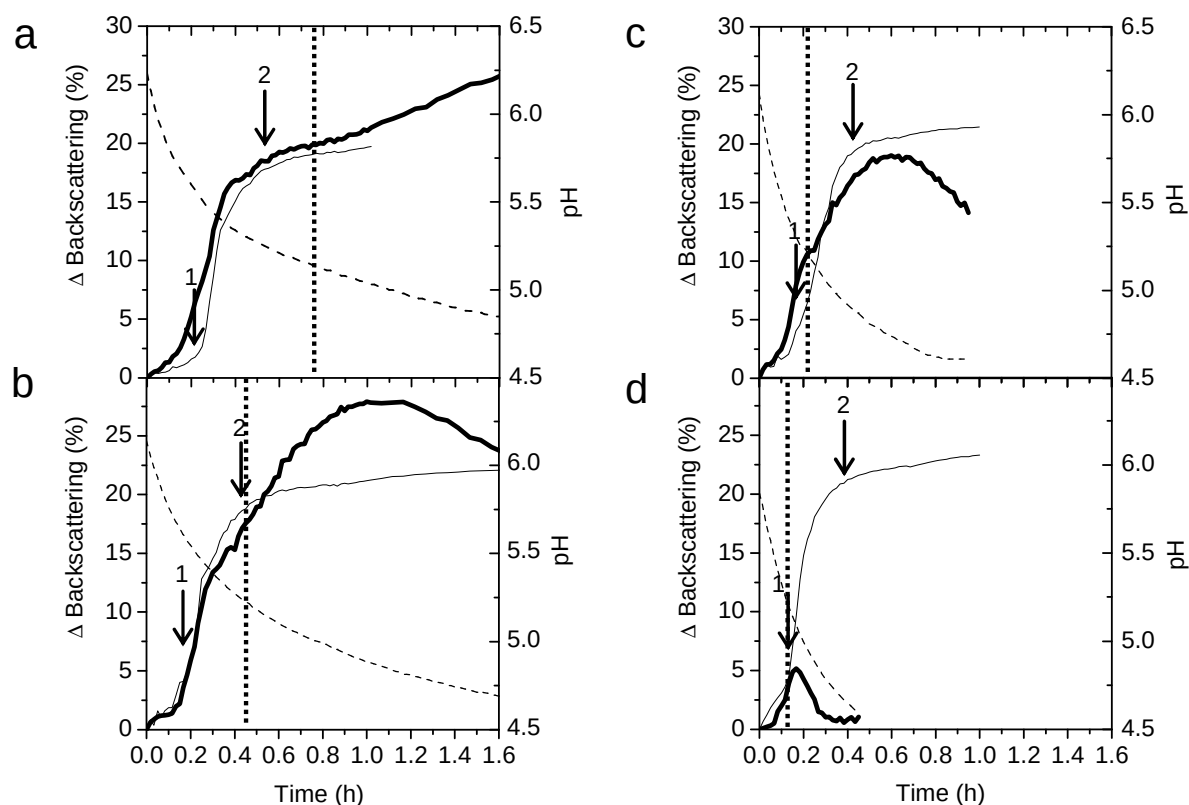


Figure 101. Variation of maximum value of Δ Backscattering at the bottom of the tube as a function of the time in guar gum / milk mixtures at neutral pH (thin curves) or after GDL addition (bold curves) and pH kinetics (dotted curves) at (a) 35°C; (b) 43°C; (c) 47°C; (d) 60°C. The first arrow indicates the time of beginning of droplet sedimentation and the second one the beginning of the formation of the sediment layer referring to the mixture at neutral pH. The dotted line corresponds to the time of gel formation at pH 5.2.

On addition of GDL to the milk, the pH decreased progressively (dotted curves, Figure 101a-d), which led to a destabilization of the casein micelles in the form of a continuous gel network classically defined around $\text{pH } 5.2 \pm 0.1$ (Lucey et al., 1997). Dotted lines in Figure 101a-d exhibit the time needed for the mixture to reach this pH and thus to gel. A clear decrease in gelation time was observed when the acidification temperature increased from 35°C to 60°C. For instance, the pH of gel formation was reached after 0.8 h at 35°C while gelation needed only 0.12 h to occur at 60°C. It is well established that GDL hydrolysis strongly depends on temperature and that the rate of hydrolysis increases at higher temperatures (Lucey et al., 1997).

The values of Δ Backscattering at the bottom of the sample were acquired during acidification of a 0.3 wt% guar gum / milk mixture at temperatures ranging from 35°C to 60°C (bold curves, Figure 101a-d). Though initial Δ Backscattering profile of the guar gum / milk system acidified at

35°C shows similar features as the same mixture at neutral pH, a progressive increase in intensity appeared after 0.8 h (Figure 101a). On the contrary, the profiles acquired for the mixtures acidified at 43°C, 47°C and 60°C were only superimposed to the non-acidified mixture at the initial stages of the phase separation process (Figure 101b, c and d). For those three acidification temperatures, a maximum of Δ Backscattering intensity followed by a subsequent decrease was observed. The higher the acidification temperature, the lower the increase of Δ Backscattering values. At all studied temperatures, a clear modification of the Δ Backscattering slope appeared at the gel point indicated by the dotted lines corresponding to pH 5.2. Thus, gelation is responsible for the alteration of the Δ Backscattering intensity. The subsequent decrease in Δ Backscattering values after the onset of gelation may be due to the presence of a guar gum-enriched continuous phase surrounding the microgels during and/or after the network formation, resulting in a different interaction of the system with light and therefore contributing to a decrease in backscattering value.

In order to discuss the variation of Δ Backscattering obtained for various acidification temperatures, it is important to understand the interplay between phase separation and gelation process. Therefore, the key times corresponding to the beginning of phase separation and gel formation were reported in Figure 102 as a function of the acidification temperature. Using the relative timescales for phase separation and gel formation, three kinetic zones were determined.

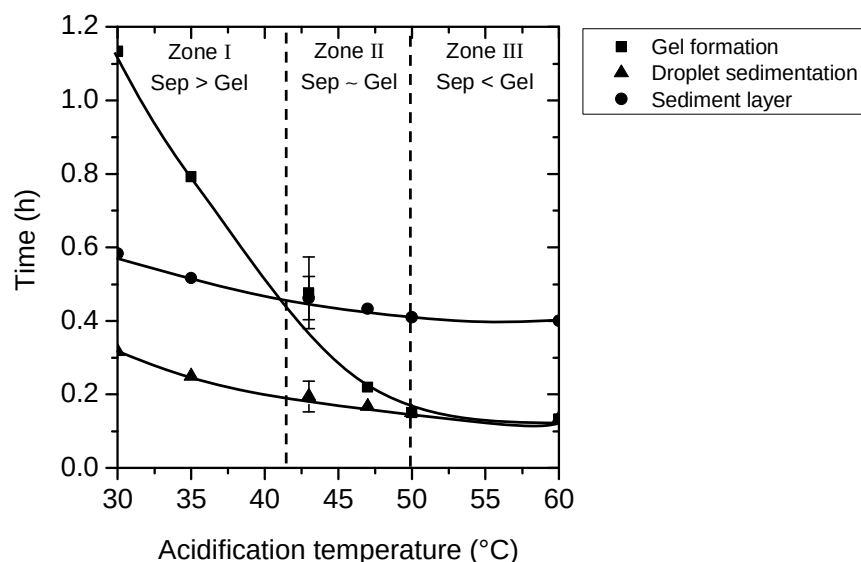


Figure 102. Kinetics of gel formation, droplet sedimentation and formation of the sediment layer of a 0.3 wt% guar gum / milk mixture acidified at acidification temperature varying from 30°C to 60°C. Dotted lines delimited the three different zones of kinetics of phase separation in connection with gel formation. Lines are drawn to guide the eyes. Standard deviations are obtained from triplicate.

The first zone comprises mixtures acidified at temperatures below approximately 43°C. From the Δ Backscattering profiles at 35°C (Figure 101a), it is possible to notice that in case of addition of GDL or at neutral pH, a sediment layer formed after 0.5 h as illustrated by a stationary Δ Backscattering level. As a consequence, the phase separation occurs long before and independently of the gel formation. On the contrary, in the third zone above 50°C, gelation proceeds faster than extensive droplet sedimentation and sediment layer formation. However, a slight increase in Δ Backscattering intensity up to 0.12 h was observed in the mixture acidified at 60°C (Figure 101d). Therefore, there was a short time delay for the droplets to begin to coalesce and sediment before the gelation occurred. This is consistent with the confocal microscopy observations (Figure 99), since only some droplets located on the lower part of the sample could coalesce and sediment. The very beginning of the sediment layer formation was detected earlier at the microscopic scale due to the 40 μ m accuracy of the light backscattering technique. In between, an intermediate temperature zone including mixtures prepared from 43°C to 50°C can be defined. Acidification at 43°C constituted a particular case where the time of gel formation corresponded exactly to the beginning of the apparition of the sediment layer (Figure 101b and Figure 102). Then, as the acidification temperature went up, the increase in Δ Backscattering was arrested at different stages by the onset of gelation (Figure 101b and c). As a result, for the systems belonging to this second zone, the sedimentation of the droplets competes with the gel formation.

3.3. Properties of set and stirred guar gum / acid milk gels

3.3.1. Phase separation behavior

Evidence of phase separation at the macroscopic level was clearly seen in non-acidified mixtures and gels prepared at different temperatures. Figure 103a and b report the phase volume of the different phases. Using a light backscattering technique, sample heights could be detected more precisely than with visual observations with an accuracy of 0.5 mm. In the case of non-acidified mixtures, two distinct phases were formed after 4 h at temperatures varying from 30°C to 60°C (Figure 103a). The top guar gum-enriched phase occupied a significantly higher volume than the bottom protein-enriched one. It is important to state that the temperature had only a slight effect on the height fraction of supernatant. Thus, similar values of top phase around 0.7 were found for all the temperatures which shows that all the systems had reached their thermodynamic equilibrium after 4h. Whatever the temperature, depletion effects between non-acidified milk proteins and guar gum gave

rise to the formation of a protein-enriched sediment layer near the equilibrium conditions (Bourriot et al., 1999b; Tuinier et al., 2000).

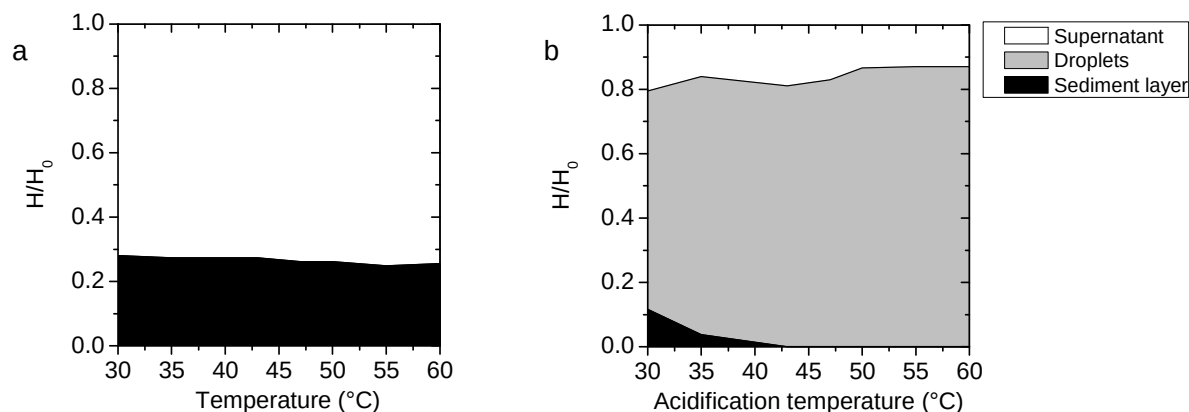


Figure 103. Height fraction of the phases analyzed after storage at 4°C overnight of (a) a non-acidified 0.3 wt% guar gum / milk mixture; (b) 0.3 wt% guar gum / milk acid milk gels acidified at temperatures varying from 30°C to 60°C. The three different zones of kinetics of phase separation in connection with gel formation are shown.

Figure 103b shows the different phase volume fractions of set guar gum / acid milk gels acidified at temperatures ranging from 30°C to 60°C. In comparison to the systems at neutral pH, three distinct phases were detected in systems acidified at temperatures below 43°C. Moreover, set mixed gels prepared above 43°C were biphasic with a mix of whey and guar gum-enriched top phase and a bottom phase corresponding to the gelled protein-enriched phase. However, it should be noted that this bottom phase exhibited a different aspect from the sediment layer detected in the non-acidified mixtures. Those phase behaviors have to be related to the phase separation phenomenon observed during acidification in non-equilibrium conditions (Figure 101a-d and Figure 102). For the acidified mixtures belonging to the first zone at temperatures below 43°C (Figure 102), a large number of droplets had time to grow by coalescence and sediment to form a bottom protein-enriched layer before gelation occurred. In contrast, the formation of the sediment layer was prevented by the early gelation of the protein-enriched droplets in set gels acidified at temperatures above 43°C. This result is clearly consistent with the sudden arrest of the increase of Δ Backscattering at gel point previously shown in Figure 101b, c and d. Therefore, gelation had the effect of stopping the formation of the sediment layer and the droplet sedimentation and thus froze the evolving system at an intermediate stage.

3.3.2. Microstructures of stirred acid skim milk / guar gum gels

The knowledge of the relative kinetics of gelation and phase separation is of critical importance for the determination of the microstructure of mixed systems (Doublier et al., 2000; Lorén & Hermansson, 2000; de Jong et al., 2009). Figure 104 illustrates the changes in microstructure of stirred guar gum / acid milk gels acidified at temperatures ranging from 30°C to 60°C to a final pH of 4.6. The bright areas correspond to the protein phases whereas the dark background is enriched in a mix of guar gum and whey. At low acidification temperatures (*i.e.* 30°C and 35°C), long protein-enriched filaments of around 400 µm were dispersed in a guar gum continuous phase. However, as the temperature of gel preparation increased, the sizes of the filaments decreased and small spherical droplets appeared. High acidification temperatures such as 55°C and 60°C produced significant changes in the morphology of the stirred gels with the aggregation of small droplets, giving an aspect of a connected organization at this observation scale. It should be noted that micro-gels morphologies were already formed in set gels and the subsequent stirring did not break or orient specifically the micro-gels.

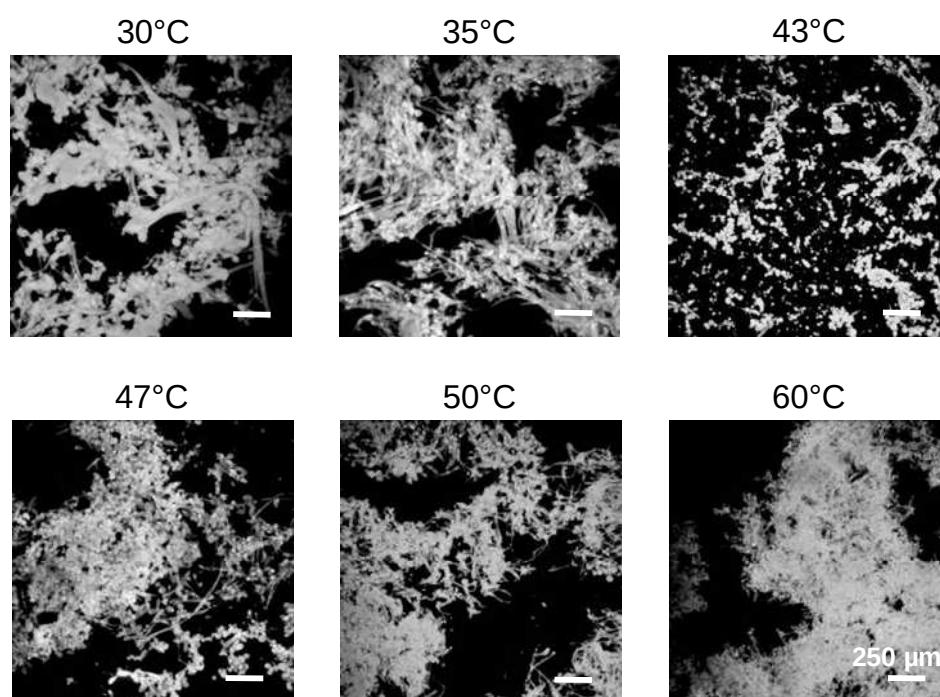


Figure 104. Epifluorescence micrographs of stirred guar gum / acid milk gels acidified at various temperatures as indicated in the figure until a pH of 4.6 and stored at 4°C overnight after stirring. Bars represent 250 µm.

To go further into detail, the droplet size characteristics expressed as mean length and width were analyzed for stirred guar gum / acid milk gels prepared at temperatures varying from 30°C to

60°C (Figure 105). There was a clear tendency towards a decrease in droplet dimensions with increasing acidification temperature, the length going from ca. 100 μm at 30°C and 35°C, to 50 μm at temperatures higher than 47°C. The droplet geometry of the gel acidified at 43°C constituted an intermediate case with a wide variety of micro-gels shapes, which is further supported by the error bars reflecting the high variation of the particle lengths.

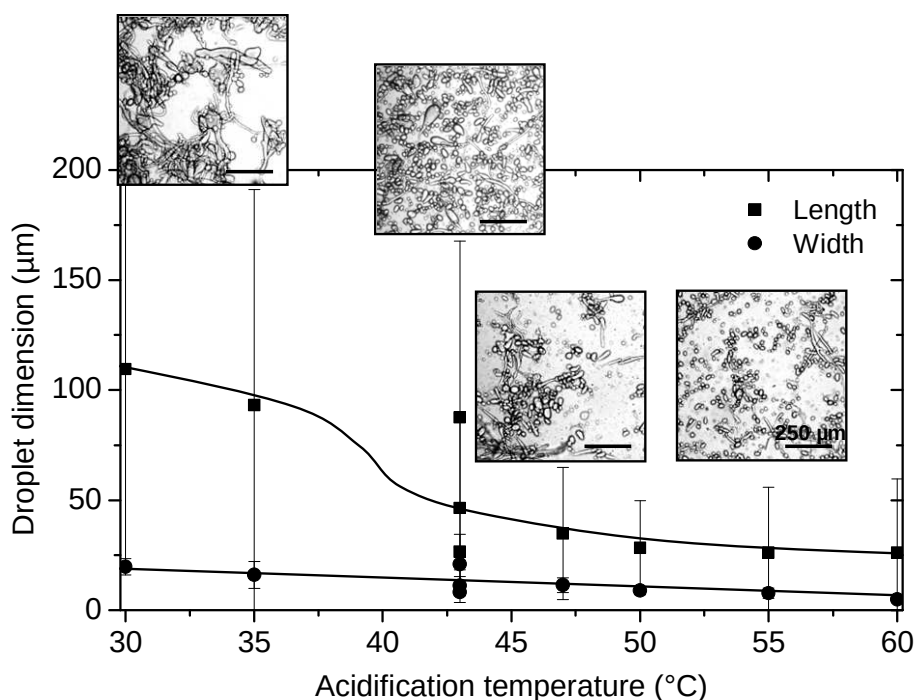


Figure 105. Droplet length and width of guar gum / stirred acid milk gels acidified at temperatures varying from 30°C to 60°C to a final pH of 4.6 and morphology of the droplets as determined by optical microscopy. Error bars represent the repeatability over the analysis of a number of 10 particles. Experiments at 43°C were performed in triplicate. Bars represent 250 μm .

This result, however, should not be over interpreted since the underlying image analysis data are based on a limited number of particles. Therefore, the morphology of gelled droplets acidified at different temperatures is visualized in Figure 105. Consistent with the high variation of the droplet dimensions, it became clear that several categories of particle morphologies, from spherical to filamentous, were identified. As the acidification temperature increased, smaller but much more abundant spherical droplets appeared. This evolution of the spherical droplet dimension with the acidification temperature is in good agreement with the time delay for the gelation to occur (Figure 102). Indeed, the early gelation of the systems acidified at high temperatures prevented an extensive droplet growth and coalescence.

Another droplet population comprises long filamentous morphology but a distinction

depending on the acidification temperature can be made. At high acidification temperatures (47°C and 55°C), the elongated droplets appeared very thin but with a uniform width along the particle length. On the contrary, the microstructures detected at 30°C showed larger gelled droplets with asymmetric morphologies, *i.e.* rather thin main droplet bodies with a very large protein-enriched end.

High temperatures promoted thermal agitation and thus increased coalescence rates which probably made the droplets spin more easily. In fact, creation of anisotropic gel structures including ellipsoidal morphologies and long extended fibres in water-in-water emulsions has previously been reported (Tolstoguzov, 1991; Wolf et al., 2001; Norton & Frith, 2001). However, in those studies, deformation was obtained by applying a controlled shear flow superimposed on gelation of the dispersed phase. In the 0.3 wt% guar gum / milk mixtures studied here, dispersed protein-enriched droplets can greatly deform to an extent which depends on the stresses such as thermal agitation, the properties of the two phases and the interface, as illustrated by the non-spherical droplets in Figure 99.

The asymmetry of the droplet morphologies produced at low acidification temperatures may be mainly attributed to the effect of gravity. For those systems, the droplet evolution through coalescence and sedimentation prior to protein gelation is evident (Figure 101a). Thus, if droplet gelation occurs in a non-equilibrium state, the unstable morphology is kinetically trapped while maintaining its shape. Moreover, it has been shown that increasing the gravitational force produced enough energy to distort the droplets, which had the effect of making the droplets spin by increasing particle deformation, without promoting break-up or coalescence (Rohart & Michon, 2014). Finally, heterogeneity of the droplet morphologies for different acidification temperatures originates not only from the relative timescale of phase separation and gelation, but also probably from the effect of thermal agitation and/or gravitational forces.

Conclusion

The present study was undertaken to gain a better understanding of the combined effects of phase separation and gelation on the structure of a water-in-water emulsion. Confocal microscopy and a light backscattering technique were found to be useful in determining the kinetics of phase separation and gel formation. By changing the acidification temperature, and thus acidification rate of a guar gum / milk mixture, three kinetic zones were defined based on a comparison of time between phase separation and gelation. High acidification temperatures gave rise to small protein-enriched droplets that were trapped by the early acid-induced protein gelation. On the contrary, there was a

time delay for the droplets in the systems acidified at low temperatures to coalesce and sediment. Then, gelation can stop the sedimentation process in a non-equilibrium state. However, a gradient in the vertical direction is formed and long protein-enriched filaments can be created. The two mechanisms inferred to explain the droplet extension are thermal agitation and the effect of gravity. Knowledge of the relative phase separation and gelation kinetics allows the design of a wide range of morphologies, from spherical to elongated, which could be linked to sensory perception.

Acknowledgements

The results were obtained in the context of Satiarome project which is supported by Vitagora pole, DGCIS and local authorities with the financial support of OSEO and FEDER.

References

- Aichinger, P.A. et al., 2007. Xanthan gum in skim milk: designing structure into acid milk gels. In *Food Colloids: Self-Assembly and Material Science*, Eds E. Dickinson and M. Leser, RSC, Cambridge. pp. 283–296.
- Boitte, J.B. et al., 2013. A novel rheo-optical device for studying complex fluids in a double shear plate geometry. *Review of Scientific Instruments*, 84, p.13709.
- Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.L., 1999. Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein-guar gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 13, pp.43–49.
- Corredig, M., Sharafbafi, N. & Kristo, E., 2011. Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocolloids*, 25, pp.1833–1841.
- Doublier, J.L. et al., 2000. Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloids and Interface Science*, 5, pp.202–214.
- Everett, D. & McLeod, R.E., 2005. Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 15(11), pp.1175–1183.
- Foster, T.J. et al., 1997. Emulsion behaviour of non-gelled biopolymer mixtures. In *Food Colloids - Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Eds E. Dickinson and T. Van Vliet, RSC, Cambridge. pp. 346–355.
- Foster, T.J., Brown, C.R.T. & Norton, I.T., 1996. Phase inversion of water-in-water emulsions. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 8*, Eds G.O. Phillips, P.A. Williams and D.J. Wedlock, RSC, Cambridge. pp. 297–308.
- Frith, W.J., 2010. Mixed biopolymer aqueous solutions – phase behaviour and rheology. *Advances in Colloid and Interface Science*, 161, pp.48–60.
- Heertje, I., Visser, J. & Smits, P., 1985. Structure formation in acid milk gels. *Food microstructure*, 4, pp.267–277.
- De Jong, S., Klok, H.J. & van de Velde, F., 2009. The mechanism behind microstructure formation in mixed whey protein-polysaccharide cold-set gels. *Food Hydrocolloids*, 23, pp.755–764.

- De Kruif, C.G. & Tuinier, R., 2001. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15, pp.555–563.
- Lee, W.J. & Lucey, J.A., 2004. Structure and physical properties of yogurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. *Journal of Dairy Science*, 87, pp.3153–3164.
- Lorén, N. & Hermansson, A.M., 2000. Phase separation and gel formation in kinetically trapped gelatin/maltodextrin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(4), pp.249–262.
- Lorén, N. & Hermansson, A.M., 2003. Structure evolution during phase separation and gelation of biopolymer mixtures. In *Food Colloids - Biopolymers and Materials*, Eds E. Dickinson and T. van Vliet, RSC, Cambridge. pp. 298–308.
- Lucey, J.A. et al., 1997. Properties of acid casein gels made by acidification with glucono-delta-lactone. 1. Rheological properties. *International Dairy Journal*, 7, pp.381–388.
- Lundin, L. et al., 2000. Phase separation in mixed biopolymer systems. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 10*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 169–180.
- Michon, C., Bosc, V. & Cuvelier, G., 2010. Gels de biopolymères naturels pour formulation agroalimentaire. *Techniques de l'Ingénieur*.
- Nono, M. et al., 2011. Cluster formation and phase separation in mixtures of sodium kappa-carrageenan and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 25, pp.743–749.
- Norton, I.T. & Frith, W.J., 2001. Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), pp.543–553.
- Norton, I.T. & Frith, W.J., 2003. Phase separation in mixed biopolymer systems. In *Food Colloids - Biopolymers and Materials*, Eds E. Dickinson and T. van Vliet, RSC, Cambridge. pp. 282–297.
- Perrechil, F.A., Braga, A.L.M. & Cunha, R.L., 2009. Interactions between sodium caseinate and LBG in acidified systems: Rheology and phase behavior. *Food Hydrocolloids*, 23, pp.2085–2093.
- Rediguieri, C.F. et al., 2007. Thermodynamic incompatibility and complex formation in pectin/caseinate mixtures. *Biomacromolecules*, 8(11), pp.3345–3354.
- Renard, D., van de Velde, F. & Visschers, R.W., 2006. The gap between food gel structure, texture and perception. *Food Hydrocolloids*, pp.423–431.
- Rohart, A. & Michon, C., 2014. Phase separation and gel formation in kinetically-trapped guar gum/acid milk gels. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 17*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 205–213.
- Sanchez, C. et al., 2000. Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. *International Dairy Journal*, 10(3), pp.199–212.
- Schorsch, C., Jones, M.G. & Norton, I.T., 1999. Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 13, pp.89–99.
- Spyropoulos, F., Portschi, A. & Norton, I.T., 2010. Effect of sucrose on the phase and flow behaviour of polysaccharide protein aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloids*, 24, pp.217–226.

- Syrbe, A., Bauer, W.J. & Klostermeyer, H., 1998. Polymer science concepts in dairy systems - An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8, pp.179–193.
- Tolstoguzov, V.B., 1991. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4(6), pp.429–468.
- Tolstoguzov, V.B., 2007. Ingredient interactions in complex foods: aggregation and phase separation. In *Understanding and controlling the microstructure of complex foods*, Eds D.J. McClements, pp. 185–206.
- Tolstoguzov, V.B., 2003. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17(1), pp.1–23.
- Tuinier, R., Grotenhuis, E. & de Kruif, C.G., 2000. The effect of depolymerised guar gum on the stability of skim milk. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.1–7.
- Turgeon, S.L. et al., 2003. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloids and Interface Science*, 8, pp.401–414.
- Wolf, B., Frith, W.J. & Norton, I.T., 2001. Influence of gelation on particle shape in sheared biopolymer blends. *Journal of Rheology*, 45, pp.1141–1157.

Par un effet combiné d'une séparation de phases et de la gélification acide des protéines de lait, différentes morphologies de gels brassés ont pu être créées. Sur la base d'une variation de la température d'acidification, la cinétique de sédimentation de gouttelettes riches en protéines a pu être modifiée et a été suivie au moyen de la microscopie confocale et d'une technique de rétrodiffusion de la lumière. En confrontant les temps respectifs de sédimentation des gouttelettes et de formation du gel acide, trois zones cinétiques ont été délimitées en fonction de la température d'acidification. La morphologie des gels brassés acidifiés à différentes températures a été discutée en fonction de ces cinétiques relatives. Ainsi, des micro-gels sphériques d'une taille inférieure à 50 μm dispersés dans une phase continue riche en guar ont été obtenus aux températures d'acidification élevées, ce qui laisse supposer que la gélification a eu lieu avant que les phénomènes de coalescence et de sédimentation des gouttelettes ne prennent de l'ampleur. Au contraire, de faibles températures d'acidification favorisent une coalescence et une sédimentation des gouttelettes et donnent naissance à de longs filaments d'environ 100 μm . A l'origine de l'allongement des structures se trouve vraisemblablement un effet de gravité, mais aussi d'agitation thermique. Un ensemble de microstructures composées de micro-gels de forme sphériques à filamenteuses a été élaboré par un effet de compétition entre les phénomènes de séparation de phases et de gélification. Ces morphologies originales pourraient non seulement générer des propriétés rhéologiques particulières, mais également modifier de façon majeure la perception sensorielle de ces produits.

I.2. Modification de l'histoire thermique avant gélification

Les résultats précédents ont permis d'illustrer la manière dont la température et le procédé de gélification modifient le comportement de séparation de phases de biopolymères. En effet, l'influence de la température est à prendre en considération lors de l'évaluation de la vitesse de sédimentation des gouttelettes avant leur gélification. Par ailleurs, il est important de rappeler que la vitesse d'hydrolyse de la GDL est très dépendante de la température du milieu.

L'élaboration de différents cycles thermiques permet d'une part de modifier la vitesse de séparation de phases et d'autre part, de décaler le moment de formation du gel acide. Dans ce cadre, des mélanges lait / guar à 0,3% additionnés de 1,5% de GDL ont subi une succession d'étapes de températures différentes. A titre d'exemple, la Figure 106a présente les cycles thermiques appliqués à un système donné : après ajout de la GDL à 22°C, la température a rapidement été diminuée jusqu'à 8°C puis le mélange non acidifié a été maintenu à cette température de 0 h à 4 h. Suite à ce stockage à faible température d'une durée variable, la température des mélanges a été augmentée jusqu'à 43°C.

Parallèlement aux transitions de température, le pH des mélanges a évolué. Lors du maintien des systèmes à 8°C, la chute du pH a été considérablement ralentie avec moins de 0,5 unité pH de variation en près de 4 h. En revanche, le passage de 8°C à 43°C a contribué à une diminution soudaine du pH, responsable de la formation du gel vers le pH de 5,2. Les profils de température et d'acidification indiquent que le stockage des systèmes à basse température constitue une approche particulièrement intéressante pour décaler le point de gélification. Ainsi, la formation du gel se produit après un peu plus d'une heure lors d'un maintien de 30 min à 8°C alors que plus de 4 h 30 sont nécessaires pour atteindre le pH critique de gélification du système ayant séjourné 4 h à 8°C.

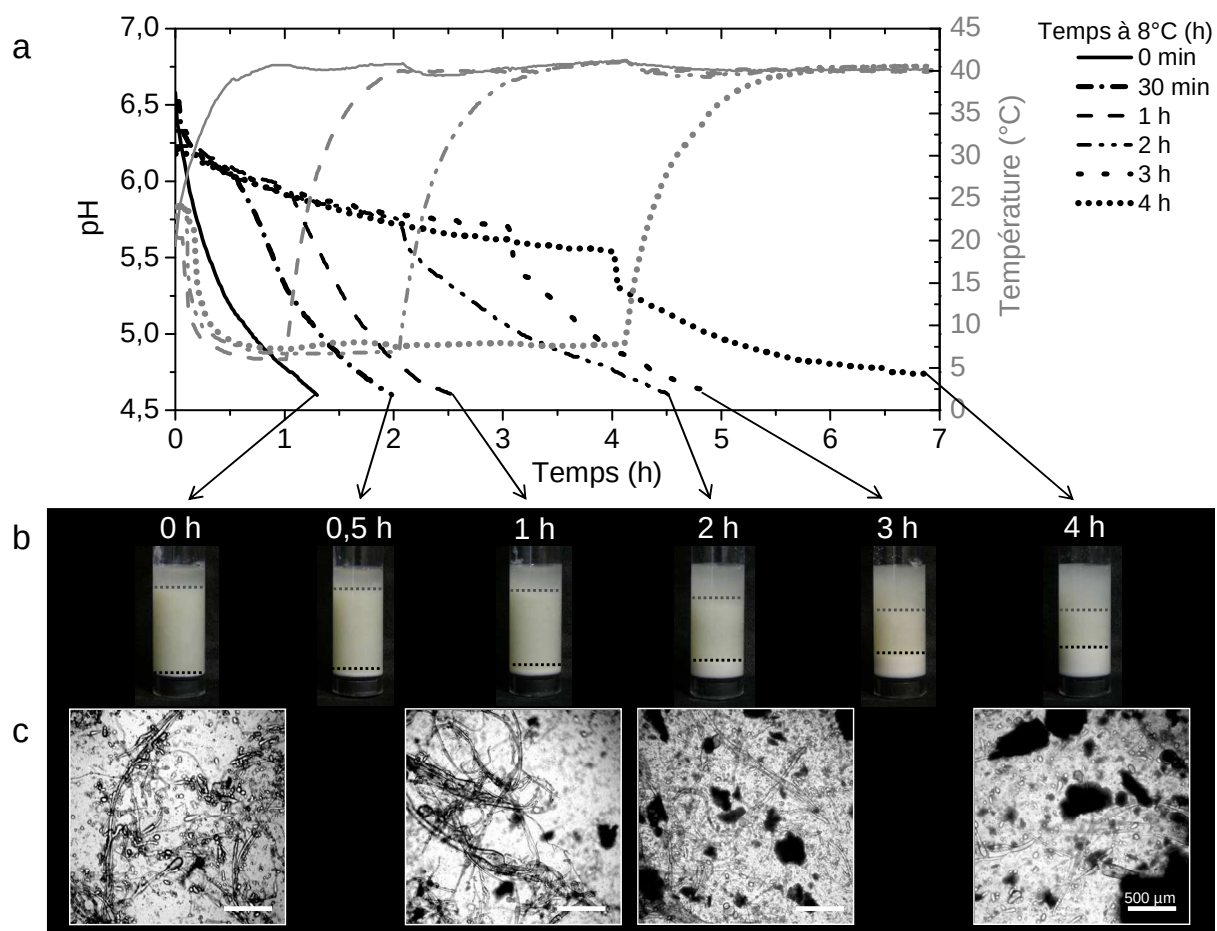


Figure 106 : (a) Cinétiques de pH (en noir) et cycles de température (en gris) de mélanges lait / guar à 0,3% additionnés de 1,5% de GDL ; (b) Aspects macroscopiques des différentes phases des gels à pH 4,6 avant leur brassage (les pointillés gris délimitent la zone riche en guar de la zone riche en micro-gels, les pointillés noirs, la zone riche en micro-gels de la couche de sédiment) ; (c) Gels brassés acides enrichis en guar à 0,3% à pH 4,6 correspondant à un temps de 0, 1, 2 ou 4 h passé à 8 °C observés en microscopie optique. Les barres représentent 500 µm. Les gels présentant des structures fibrillaires de taille trop élevée ont été brassés par passage à travers les deux tuyaux.

En fonction des cinétiques de température et de pH appliquées aux différents systèmes, les propriétés des gels acides avant et après leur brassage varient. A l'échelle macroscopique, l'ensemble des gels non brassés est composé de trois phases : une phase inférieure riche en protéines, une phase supérieure riche en guar et une phase intermédiaire constituée principalement de micro-gels enrichis en protéines (Figure 106b). Cependant, une évolution de la fraction des phases en présence peut être mise en évidence en fonction du cycle thermique appliqué. Alors que la phase intermédiaire riche en micro-gels protéiques tend à diminuer, le sédiment riche en protéines et le surnageant de guar

augmentent de manière importante, lorsque le temps passé à 8°C avant gélification est élevé. L'ensemble des mélanges ayant subi la même étape d'augmentation de la température jusqu'à 43°C, les différences observées s'expliqueraient donc par le temps de maintien des mélanges à 8°C. Quelle que soit l'histoire thermique, la coalescence et la sédimentation des gouttelettes n'ont pas pu être évitées, en raison de l'évolution de l'émulsion eau dans eau et de la séparation de phases microscopique très rapide. Puisque le temps de formation du gel a été décalé du fait du stockage à 8°C, l'intervalle de temps entre le début de la séparation de phases et la gélification a été augmenté. Dans cette situation, un nombre plus important de gouttelettes a eu la possibilité de sédimenter et de former la couche de sédiment avant que la gélification acide ne fige le système.

La morphologie des gels acides brassés obtenus après les différents cycles thermiques est présentée sur la Figure 106c. De longs filaments mélangés à des micro-gels sphériques de taille plus petite sont visibles dans les systèmes ayant séjourné de 0 à 1 h à 8°C. Néanmoins, plus le temps de stockage à basse température augmente, plus l'allongement des structures semble s'atténuer et des zones sombres, correspondant au sédiment riche en protéines, apparaissent. Deux explications peuvent rendre compte de ces observations microscopiques. D'une part, la vitesse de gélification détermine le moment auquel les microstructures ont été piégées par la formation du gel. D'autre part, malgré une mobilité des constituants réduite par une haute viscosité et une faible agitation thermique, le maintien à 8°C pendant un temps long a contribué à la coalescence des gouttelettes riches en protéines. Ensuite, l'étape de montée en température à 43°C a conduit à une diminution de la viscosité du milieu avant la formation du gel, favorisant la sédimentation des gouttelettes de grande taille sous la forme de filaments par un effet de gravité et d'agitation thermique. Ainsi, la possibilité d'évolution des microstructures avant leur gélification dépend non seulement de l'intervalle de temps disponible entre le début de la séparation de phases et de la formation du gel, mais également de l'histoire thermique subie par le système.

Afin d'illustrer de manière plus exhaustive l'effet de l'histoire thermique sur le comportement de phases, un ensemble de gels mixtes acidifiés à l'aide de 1,5% de GDL a subi différentes étapes thermiques : soit un stockage à 8°C ou 22°C pendant un temps allant de 0 h à plusieurs heures puis une montée à 43°C permettant la formation du gel, soit un maintien pendant toute la durée de l'acidification à une température fixe d'une gamme comprise entre 30°C et 60°C. Les hauteurs relatives des phases de ces différents gels ont été regroupées sur la Figure 107a et b.

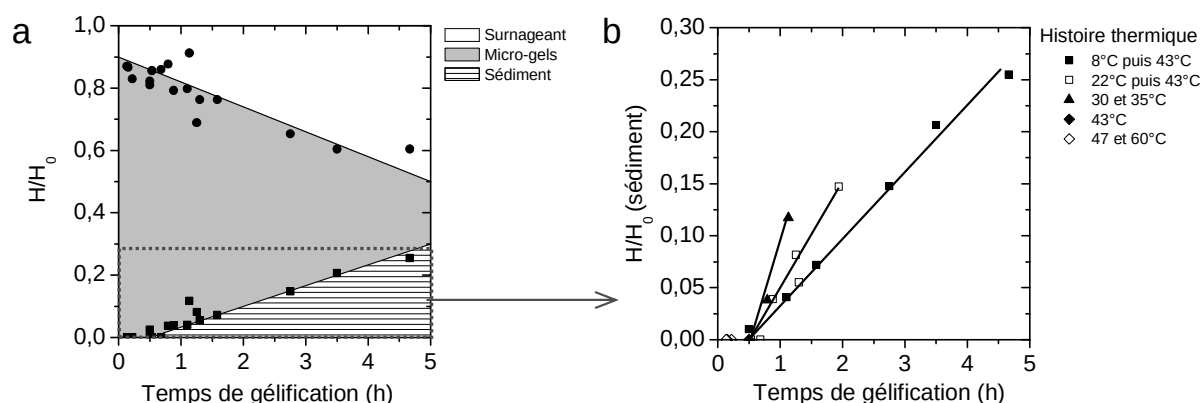


Figure 107 : (a) Hauteurs relatives de chaque phase ; (b) Hauteurs relatives de sédiment de gels acides enrichis en guar à 0,3% à pH 4,6 avant leur brassage ayant subi différentes histoires thermiques lors de leur acidification. Le temps de gélification correspond au temps nécessaire pour atteindre un pH de 5,2.

Les hauteurs de sédiment, de micro-gels et de surnageant semblent varier relativement linéairement en fonction du temps de gélification. Ainsi, l'augmentation du temps nécessaire à la formation du gel permet aux gouttelettes de sédimenter et de former une couche inférieure riche en protéines. La quantité de protéines disponible pour la formation et la coalescence des gouttelettes tend à diminuer aux temps de gélification longs, expliquant ainsi la diminution de la phase riche en micro-gels et l'augmentation du surnageant enrichi en guar. Toutefois, une différence de l'évolution de la couche de sédiment en fonction du temps écoulé avant la formation du gel peut être observée selon les cycles thermiques (Figure 107b). Lorsque les systèmes ont été maintenus à une faible température de 8°C ou 22°C avant l'augmentation de la température jusqu'à 43°C, la hauteur de sédiment formé diminue, et cette tendance est d'autant plus prononcée que la température de stockage est basse. Ce comportement peut être attribué à un effet combiné du décalage de la gélification vers des temps plus longs et à la faible vitesse de sédimentation en lien avec une viscosité de la phase continue plus élevée lors d'un temps passé à basse température avant la gélification.

En complément de l'étude du comportement macroscopique des phases, les microstructures ont été caractérisées (Figure 108). En se basant sur la mesure de la longueur des micro-gels et sur les observations microscopiques, une différence d'évolution des microstructures en fonction du temps de gélification est mise en évidence selon les histoires thermiques subies par les systèmes. Comme discuté dans le paragraphe I.1 de ce chapitre, un allongement des micro-gels a été observé lorsque la température d'acidification diminue de 60 à 30°C, en raison de l'augmentation du temps de gélification permettant une plus grande évolution des structures avant leur gélification. Par ailleurs, l'application d'un cycle thermique incluant un passage à basse température à 8°C ou 22°C aboutit à

une taille de micro-gels très élevée, pouvant atteindre près de 250 μm . Cependant, un temps de gélification supérieur à 1,25 h conduit à une diminution progressive de la longueur moyenne des structures et à l'apparition de zones sombres dans les images de microstructure des gels brassés correspondant à des morceaux de la couche de sédiment fragmentée par le brassage.

Sur la base des longueurs de micro-gels calculées en fonction du temps nécessaire à la formation du gel, trois zones peuvent être délimitées. La première zone, comprenant des temps de gélification entre 0 et 0,5 h, intègre les gels acidifiés aux hautes températures pour lesquels les gouttelettes ont été figées par la gélification sous une forme sphérique et de petite taille. Au contraire, des structures de taille supérieure à 100 μm apparaissent pour des temps de gélification compris entre 0,5 h et 1,25 h. Dans cette seconde zone, l'effet de l'histoire thermique est primordial et l'allongement des structures est réalisé au travers de forces de gravité mais également de l'agitation thermique, notamment lors de la montée en température à 43°C pour les mélanges ayant passé au préalable un temps inférieur à 1,5 h environ à 8°C ou 22°C. Au-delà de 1,25 h de temps de gélification, la taille des micro-gels tend à diminuer, ce qui laisse supposer qu'une quantité non négligeable de protéines a sédimenté avant que les gouttelettes ne puissent être piégées par la gélification acide. L'ensemble de ces résultats confirme qu'un équilibre subtil entre les débuts de coalescence et de sédimentation des gouttelettes et la formation de la couche de sédiment est à trouver afin de contrôler la morphologie des structures obtenues.

Enfin, la connaissance des cinétiques de températures et de gélification appliquées aux différents systèmes permet d'explicitier en partie les propriétés des gels acides avant et après leur brassage. En faisant varier les histoires thermiques appliquées aux mélanges avant et pendant leur gélification, les effets de l'agitation thermique et de l'intervalle de temps compris entre le début de sédimentation des gouttelettes et la formation du gel sur les microstructures ont pu être mis en évidence. Outre le décalage du moment de formation du gel, la modification de la vitesse de sédimentation des gouttelettes provoquée par un changement de température est également à prendre en considération, la combinaison de ces deux paramètres sera abordée dans le chapitre 7.

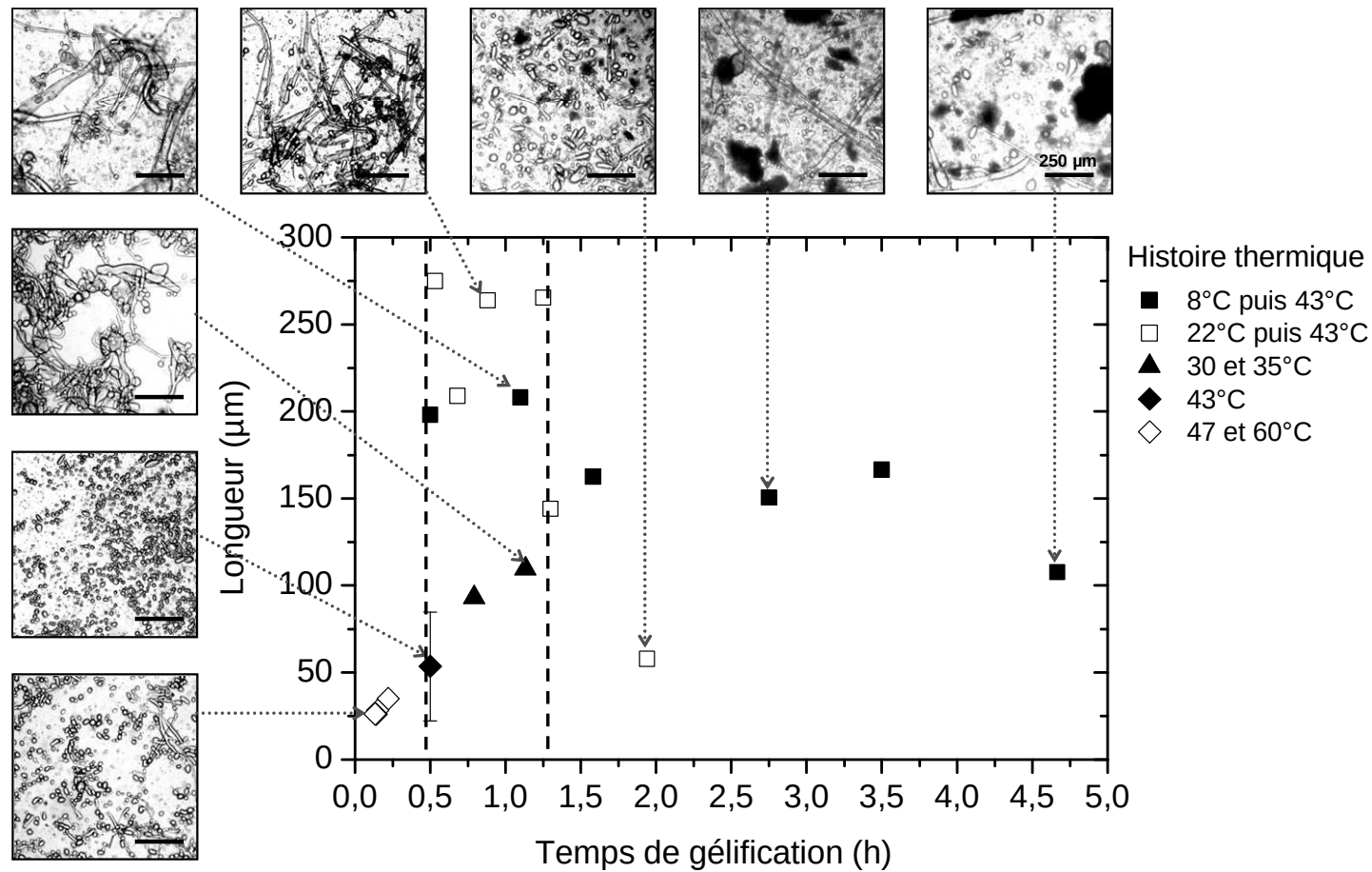


Figure 108 : Longueurs des micro-gels au sein des gels brassés acides enrichis en guar à 0,3% à pH 4,6 ayant subi différentes histoires thermiques lors de leur acidification. Les images ont été obtenues en microscopie optique. Le temps de gélification correspond au temps nécessaire pour atteindre le pH de 5,2. Les barres représentent 250 μm . Les lignes en pointillés à 0,5 h et 1,25 h délimitent trois zones de longueur de micro-gels.

II. EFFET D'UN TRAITEMENT MECANIQUE

La modification de l'histoire thermique a mis en lumière que des niveaux de cisaillement aussi faibles que ceux générés par des phénomènes de gravité ou d'agitation thermique permettaient une déformation des gouttelettes. Par conséquent, la question de l'effet d'un cisaillement aux grandes déformations sur les propriétés des gels mixtes acides se pose. Cette problématique a été traitée à partir de mélanges lait / guar acidifiés à l'aide de l'utilisation de deux types de ferments. Après une étude concernant l'influence de la concentration en guar sur la macrostructure des gels fermes acidifiés à l'aide de ferments, l'effet du cisaillement sur les macro- et microstructures et les propriétés rhéologiques des gels mixtes a été étudié en utilisant une concentration en guar fixe de 0,25%.

En comparaison avec une acidification à l'aide de GDL, les cinétiques de pH obtenues lors de l'acidification du lait par des ferments à 43°C présentent un temps de latence pendant lequel la faible production d'acide lactique par les bactéries n'engendre pas de changement majeur de pH (Figure 109 et Figure 68). A travers les variations de souches bactériennes, l'activité acidifiante des ferments peut être modifiée. A titre d'illustration, le temps de latence particulièrement élevé du ferment 1 conduit à un décalage de la gélification vers 4 h alors que moins de 3 h sont nécessaires à la formation du gel laitier acidifié par le ferment 2. Il est à noter que les ferments 1 et 2 utilisés dans le cadre de cette étude produisent peu ou pas d'exopolysaccharides, les différences entre ferments liées à cet effet ne seront donc pas discutées ici.

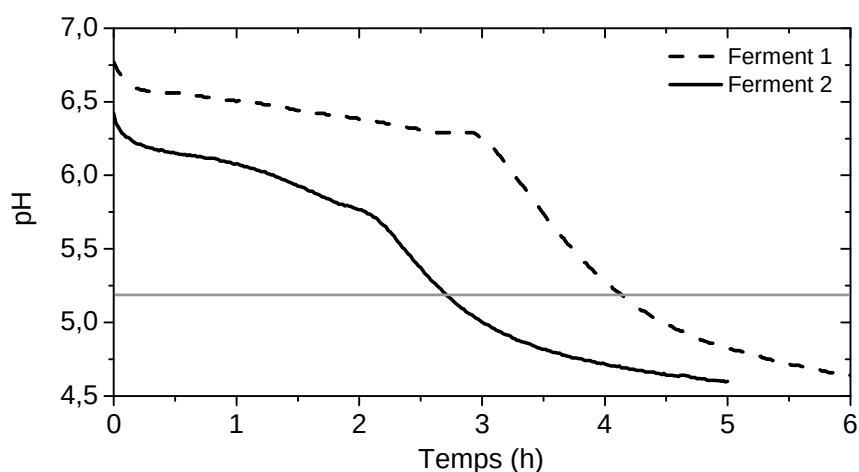


Figure 109 : Cinétiques de pH des mélanges lait / guar à 0,25% acidifiés à l'aide du ferment 1 ou 2 à 43°C. Le pH de gélification de 5,2 est rappelé par la ligne grise.

La méthode d'acidification utilisée influence non seulement la cinétique de diminution de pH, mais aussi les propriétés macroscopiques des gels mixtes avant leur brassage (Figure 110). A la différence des gels acidifiés à l'aide de GDL, la hauteur de surnageant des gels obtenus par l'action du ferment 1 suit une évolution très proche du système non acidifié lorsque la concentration en guar augmente. Ce comportement peut s'expliquer par le temps nécessaire à la formation du gel d'environ 4 h, qui est donc du même ordre de grandeur que celui laissé au mélange lait / guar pour que les gouttelettes riches en protéines coalescent et forment la couche de sédiment. Par conséquent, la gélification tardive du système acidifié par les ferments, en raison de la présence d'un temps de latence élevé, favorise la formation d'une couche de sédiment avant le piégeage des structures.

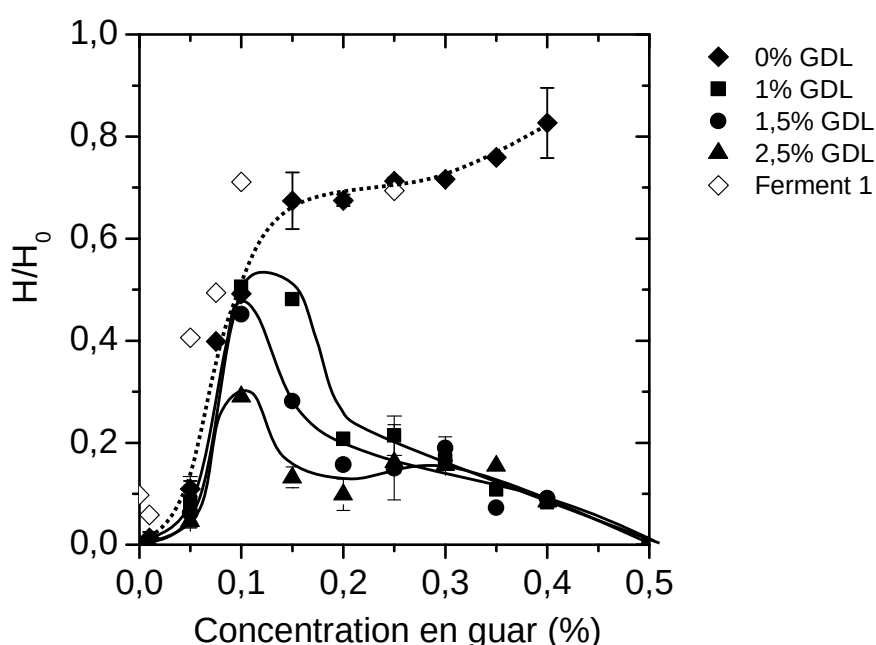


Figure 110 : Hauteurs relatives de surnageant des gels fermes à pH 4,6 contenant de 0% à 0,5% de guar acidifiés avec 1%, 1,5%, 2,5% de GDL ou avec le ferment 1 à 43°C. Les hauteurs relatives de surnageant des mélanges lait / guar de 0% à 0,4% sans ajout de GDL obtenues après 4 h à 43°C sont rappelées en pointillés.

De manière à écourter le temps disponible à la sédimentation des gouttelettes riches en protéines, un cisaillement à 500 rpm sous agitation magnétique a été appliqué en continu jusqu'à un pH déterminé au cours de l'acidification du système lait / guar à 0,25% additionné du ferment 1 ou 2. Même si l'application d'un cisaillement continu peut considérablement affecter voire empêcher l'action de certains ferments, les cinétiques d'acidification des ferments 1 et 2 utilisés dans le cadre de cette étude ne semblent pas avoir été modifiées de façon majeure (résultats non montrés). L'aspect macroscopique des gels mixtes acides avant leur brassage est présenté sur la Figure 111a.

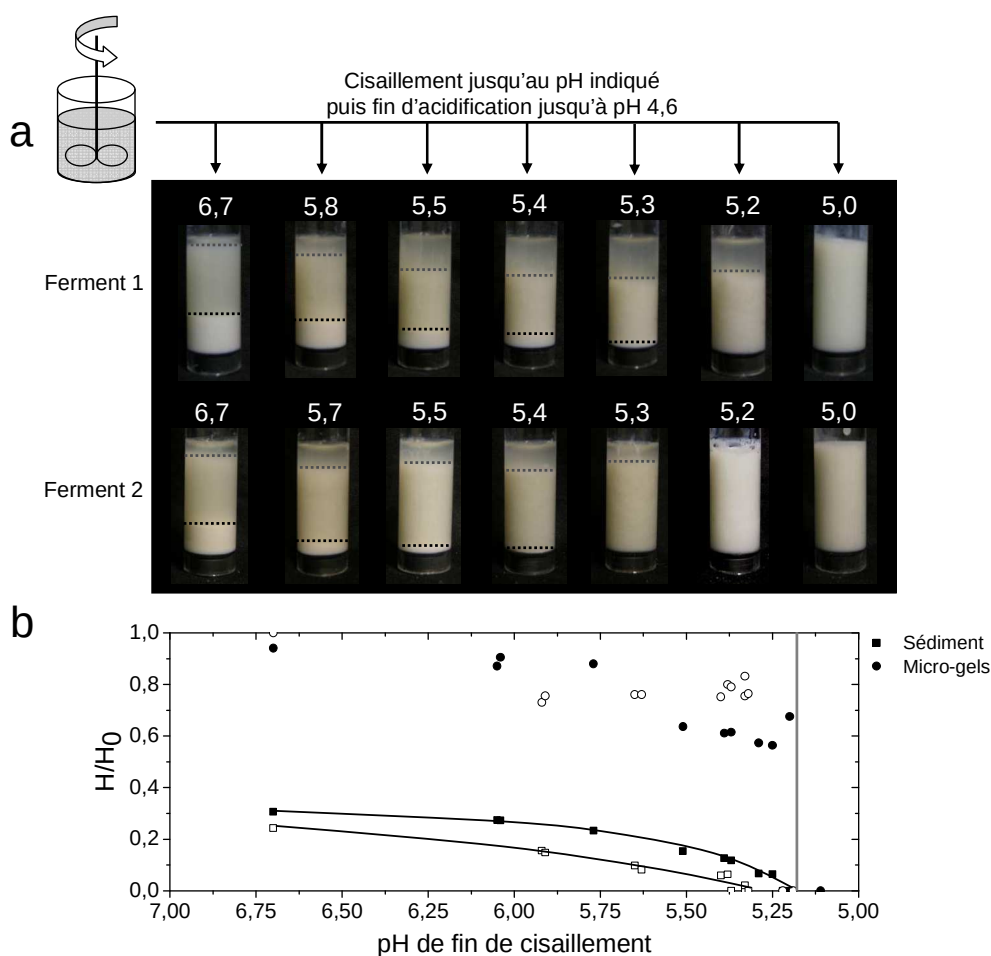


Figure 111 : (a) Aspects macroscopiques des différentes phases des gels acides enrichis en guar à 0,25% à pH 4,6 acidifiés à 43°C à l'aide du ferment 1 ou 2 et ayant été cisailés jusqu'au pH indiqué sur la figure (les pointillés gris délimitent la zone riche en guar de la zone riche en micro-gels, les pointillés noirs, la zone riche en micro-gels de la couche de sédiment) ; (b) Hauteurs relatives de chaque phase (symboles pleins : ferment 1 ; symboles vides : ferment 2). Le pH de gélification de 5,2 est rappelé par la ligne grise.

Quel que soit le ferment utilisé, plus le cisaillement a été conduit jusqu'à un pH bas, plus le sédiment, partie inférieure blanche riche en protéines, diminue. Toutefois, cette observation n'est valable que pour des pH de fin de cisaillement supérieurs à 5,2, correspondant à la formation du gel. Un système homogène en apparence et monophasique apparaît lorsque le cisaillement a été appliqué continûment tout au long de l'acidification y compris à des pH inférieurs au pH de gélification. Pour faciliter l'interprétation, les hauteurs relatives de la phase de sédiment, de la phase riche en micro-gels et par déduction celle de surnageant, ont été reportées sur la Figure 111b. Bien que suivant une évolution similaire en fonction du pH de fin de cisaillement, la hauteur de la couche de sédiment des systèmes acidifiés par le ferment 1 est supérieure à celle formée dans les gels obtenus par l'action du ferment 2 et ce, pour l'ensemble des pH de fin de cisaillement. Ce résultat apparaît en accord avec les

cinétiques d'acidification décrites précédemment et s'explique par un temps de gélification plus élevé pour le ferment 1, bloquant la séparation de phases plus tardivement que dans le cas du ferment 2. Le comportement de la phase riche en micro-gels en fonction du pH de fin de cisaillement semble plus complexe à interpréter, probablement en raison de la variabilité du réarrangement de la phase riche en micro-gels dont la compaction dépend en partie de leur taille et de leur forme.

A l'échelle macroscopique, le cisaillement du système lors de l'acidification du lait a effectivement eu pour effet de diminuer voire de bloquer de manière significative la formation de la couche de sédiment. Afin de compléter ces observations, une étude des propriétés microstructurales et rhéologiques de ces gels après brassage a été menée (Figure 112a et b).

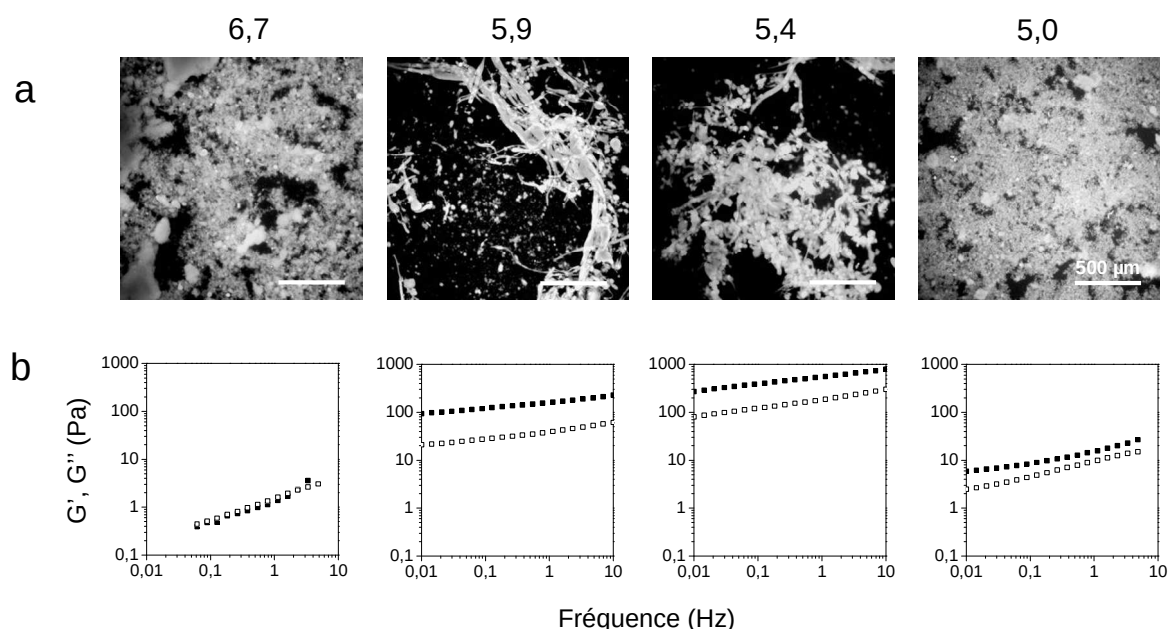


Figure 112 : (a) Gels acides brassés enrichis en guar à 0,25% à pH 4,6 acidifiés à 43°C à l'aide du ferment 2 et ayant été cisailés jusqu'au pH indiqué sur la figure, observés en microscopie en épifluorescence. Les barres représentent 500 μm ; (b) Spectres viscoélastiques à 4°C des gels brassés enrichis en guar à 0,25% à pH 4,6 acidifiés à 43°C à l'aide du ferment 2 et ayant été cisailés jusqu'au pH indiqué sur la figure

Les images obtenues en microscopie en épifluorescence des gels acides brassés ayant été cisailés jusqu'à un pH de 6,7 à 5 sont présentées sur la Figure 112a. Les zones claires révèlent la présence de protéines et par contraste, les zones sombres permettent de localiser le guar et/ou le lactosérum. En absence d'un cisaillement lors de l'acidification, des agrégats de taille variable dispersés dans une solution riche en guar apparaissent. En revanche, l'application d'un cisaillement jusqu'à un pH de 5,9 donne lieu à la formation de très longs filaments de l'ordre du centimètre plus ou moins enchevêtrés et à des micro-gels de plus petite taille. Lorsque le cisaillement a été conduit

jusqu'au pH de 5,4, soit juste avant le point de gélification, les gels brassés se présentent sous la forme de micro-gels de taille moyenne et agrégés entre eux pour certains. La morphologie du gel cisailé en continu, y compris après que le pH critique de gélification ait été atteint, diffère radicalement des microstructures décrites précédemment, avec l'apparition d'un ensemble de très petits agrégats protéiques.

Les propriétés rhéologiques des gels brassés peuvent être mises en lien avec les microstructures (Figure 112b). Ainsi, le spectre viscoélastique du système n'ayant pas été cisailé lors de l'acidification est typique d'un système peu structuré, ce qui peut être attribué à l'absence de connexion entre les agrégats protéiques. La présence de longs filaments dans le gel ayant été cisailé jusqu'au pH de 5,9 contribue de manière importante aux propriétés viscoélastiques du gel. En effet, la valeur élevée des modules viscoélastiques et leur très faible dépendance à la fréquence indiquent la présence de propriétés solides. Celles-ci sont d'ailleurs plus prononcées lorsque le cisaillement a été mené jusqu'au pH de 5,4, en raison de la forte connexion entre les micro-gels. Même si le spectre viscoélastique du système ayant été cisailé jusqu'au pH de 5 se rapproche de celui d'un système structuré, les valeurs de G' et G'' sont relativement faibles. Dans ce cas, les petits agrégats protéiques agissent comme une suspension de particules concentrées mais non connectées entre elles.

L'ensemble des propriétés macrostructurales, microstructurales et rhéologiques peut être discuté à la lumière des cinétiques d'acidification et de séparation de phases. En absence de cisaillement lors de l'acidification, la majorité des gouttelettes a eu la possibilité de sédimenter par effet de gravité pour former la couche de sédiment avant que la gélification n'ait lieu, le brassage ayant eu pour effet de fragmenter les agrégats protéiques gélifiés en diverses tailles.

Lorsque le mélange lait / guar est soumis à un cisaillement, un équilibre entre la coalescence des gouttelettes riches en protéines et leur rupture par instabilité de Rayleigh est mis en place, ce qui conduit à un système homogène macroscopiquement (van Puyvelde et al., 2003 ; Butler & Heppenstall-Bultler, 2003 ; Foster et al., 1996). Toutefois, l'arrêt du cisaillement provoque une séparation de phases presque instantanée, tout au moins à l'échelle microscopique (Figure 54). Ensuite, la vitesse de coalescence des gouttelettes dépend de la force et de la fréquence de collision, de l'état liquide ou solide de la gouttelette, du temps de contact ou encore des propriétés interfaciales (Foster et al., 1997). Sur la base de ces connaissances, l'action du cisaillement à 500 rpm lors de l'acidification du lait aboutit à un phénomène de rupture des gouttelettes prédominant sur leur coalescence. Ainsi, le temps d'évolution des gouttelettes correspondrait uniquement à l'intervalle de temps disponible entre la fin du cisaillement et le début de la formation du gel. Par conséquent, les

longs filaments ou micro-gels présents dans les gels brassés ayant été cisailés jusqu'au pH respectivement de 5,9 et 5,4 seraient à l'origine d'un phénomène de coalescence puis de sédimentation des gouttelettes après arrêt du cisaillement et avant leur gélification. La différence de taille des structures entre ces deux gels brassés pourrait être expliquée par un temps d'évolution des gouttelettes élevé dans le cas du système cisailé jusqu'au pH de 5,9, ce qui justifierait également la présence d'une couche de sédiment importante (Figure 111b).

Si le cisaillement se produit lors de l'acidification, l'effet du cisaillement continu sur les micelles de caséines, et sur leur modification induite par le changement de pH, est à prendre en considération. A la différence du gel brassé ayant été cisailé jusqu'au pH de 5,9, celui ayant été cisailé jusqu'au pH de 5,4 a vraisemblablement subi des mécanismes de dissociation de certaines caséines et surtout de solubilisation du phosphate de calcium colloïdal pendant l'application du cisaillement (Dalglish & Law, 1988). L'aspect relativement agrégé des micro-gels de ce gel brassé pourrait être interprété comme la conséquence d'une augmentation de l'adhérence des micro-gels gélifiés entre eux suite à l'application du cisaillement lors des modifications physico-chimiques des micelles de caséines et/ou aux forces de collision non nulles lors de la formation du gel.

L'effet d'un cisaillement pendant la gélification peut conduire à une inversion de phases suite à une augmentation de la rigidité des gouttelettes liée à leur gélification (Foster et al., 1997). Cependant, dans le cas des gels laitiers acides, seule une cinétique lente associée à une absence d'agitation lors de la transition sol-gel permet d'obtenir un réseau gélifié. Contrairement à la possibilité de formation d'un micro-gel lors de la gélification de gouttelettes riches en protéines, l'action du cisaillement lors de la gélification empêche le regroupement des protéines sous la forme de gouttelettes. De ce fait, les protéines de lait gélifient probablement de manière isolée mais peuvent se réassocier sous forme d'agrégats, notamment lorsque les répulsions électrostatiques sont minimales. La taille des agrégats présents dans le système ayant été cisailé jusqu'au pH de 5 dépendrait essentiellement de la vitesse de cisaillement ainsi que du temps d'agitation (Pacek et al., 2003 ; van Marle, 1998). Il est à noter que les conditions de cisaillement choisies ont permis d'obtenir des agrégats suffisamment petits et nombreux, tels une suspension concentrée en particules, pour éviter une décantation ultérieure dans un délai de plusieurs jours (Figure 111a). Par ailleurs, les propriétés d'écoulement de ce gel brassé s'apparentent tout à fait à un produit laitier de type yaourt à boire, avec toutefois une concentration en guar dans la phase continue de près de 0,25%.

Finalement, le choix de l'application d'un cisaillement a été motivé par la possibilité que présente cette démarche de bloquer l'évolution de l'émulsion eau dans eau. En effet, il semble que la rupture des gouttelettes en une taille inférieure domine sur leur coalescence tant que l'agitation est mise en œuvre. Par un arrêt du cisaillement du système additionné de ferments à un pH déterminé, des longs filaments, similaires à ceux précédemment décrits dans des mélanges acidifiés par la GDL, ont pu être créés. La compréhension des modifications physico-chimiques subies par les micelles de caséines lorsque l'acidification est combinée à un cisaillement resterait toutefois à approfondir.

III. CONCLUSION

La modification de l'histoire thermique et mécanique avant, pendant et après la gélification de mélanges lait / guar a permis de mettre en évidence l'importance du temps dont dispose le système pour évoluer avant sa gélification. Ainsi, l'intervalle de temps entre le début de la séparation de phases et la gélification a été modulé par un stockage à basse température qui a eu pour effet, non seulement de ralentir la séparation de phases, mais aussi de décaler le point de gélification. La deuxième approche a reposé sur l'application d'un cisaillement en continu jusqu'à un pH précis, bloquant de cette manière la séparation de phases.

Un lien étroit entre les conditions de procédé et la microstructure du gel brassé acide obtenu a pu être établi. L'allongement des structures se réalisant au travers de forces de gravité et de l'agitation thermique, la taille des micro-gels enrichis en protéines dépend largement de l'histoire thermique et mécanique appliquée avant la formation du gel. Par conséquent, la maîtrise des conditions thermomécaniques garantit la possibilité de créer des microstructures à façon, composées de micro-gels variant d'une forme sphérique à filamenteuse.

Chapitre 6 : Influence de la microstructure sur la perception sensorielle de yaourts brassés enrichis en micro-gels

En modifiant le type de polysaccharides et le procédé utilisé, il a été possible de créer une variété de microstructures de gels acides brassés sur la base d'une compétition entre une séparation de phases et la gélification acide des protéines. Dans le cadre de cette étude, le terme de « micro-gel » a été utilisé pour désigner les gouttelettes gélifiées ou les structures fibreuses, obtenues respectivement à partir de systèmes enrichis en guar et en xanthane, et séparées de leur phase continue riche en polysaccharides. Une démarche d'incorporation de ces micro-gels au sein d'une matrice de type yaourt brassé a été menée pour appréhender l'impact de ce type de particules sur la texture sensorielle et instrumentale des produits.

De nombreux systèmes alimentaires intègrent la présence de particules telles que des granules d'amidon, des fibres insolubles (Bayarri et al., 2011 ; Dello Staffolo et al., 2004) ou des agrégats protéiques (Cayot et al., 2008 ; Langton et al., 1997). Néanmoins, les particules en apportant potentiellement une sensation de granuleux en bouche, peuvent nuire à l'acceptabilité de certains produits alimentaires. Dans le cas du yaourt, la présence de particules ou grains peut être considérée comme un défaut pour des consommateurs qui recherchent majoritairement des produits lisses et uniformes.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer si les différences de morphologie des micro-gels sont perceptibles par des sujets sur le plan sensoriel, puis de déterminer les caractéristiques sensorielles apportées par ces micro-gels incorporés dans un yaourt sans matière grasse. Outre une modification de la morphologie des particules par un changement des paramètres de composition et de procédé, la concentration en particules constitue un second facteur de variation.

I. STRATEGIE EXPERIMENTALE

Afin de faire varier la forme et la taille des micro-gels, le type de polysaccharides et la vitesse d'acidification ont été modifiés sur la base des comportements décrits dans les chapitres précédents. Les micro-gels ont été obtenus par un effet de compétition entre la séparation de phases de mélanges lait / guar à 0,3% ou xanthane à 0,05% et la gélification acide des protéines. Par ailleurs, l'utilisation

d'une concentration en GDL de 1, 1,5 ou 2,5% a donné lieu à une variation de la morphologie des micro-gels fabriqués à base de systèmes enrichis en guar.

Deux paramètres ont été modifiés pour obtenir un espace de produits varié : le type de micro-gels et la concentration en micro-gels. A l'aide de la modification de ces paramètres, un ensemble de 14 produits a été préparé, dont un échantillon correspondant une répétition (fabriqué à l'aide de l'enrichissement du yaourt brassé avec 2,5% de micro-gels obtenus à partir du système lait / guar acidifié avec 1% de GDL), et le yaourt témoin ne contenant pas de micro-gels. Sur les images en microscopie à contraste de phase (Figure 113), les micro-gels fabriqués à partir du système enrichi en guar ressortent en zones claires alors que ceux élaborés à partir du système riche en xanthane apparaissent dans les domaines sombres.

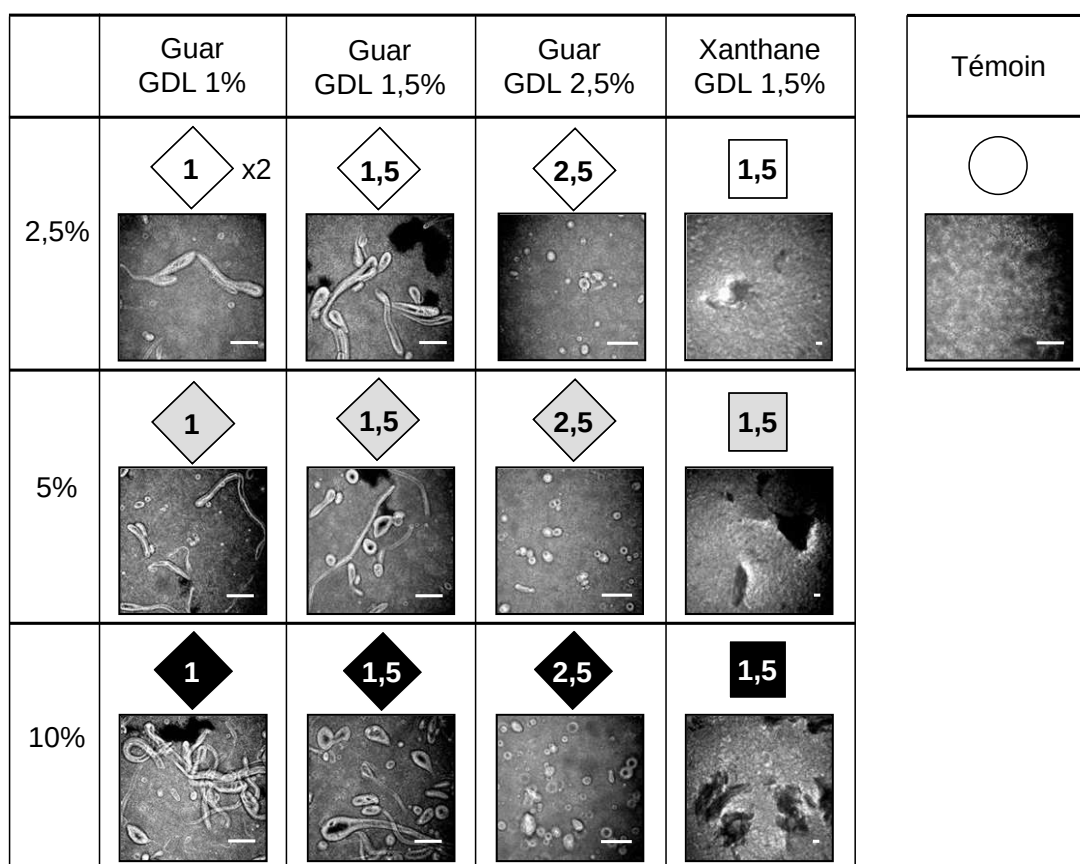


Figure 113 : Plan expérimental des 14 produits élaborés à partir des deux paramètres (type de micro-gels fabriqués à partir du système enrichi en guar ou en xanthane et concentration en micro-gels de 2,5%, 5% ou 10%) et symboles correspondants. Microstructures des 14 produits observés en microscopie optique à contraste de phase. Les barres représentent 100 µm.

II. PROPRIETES SENSORIELLES

La classification ascendante hiérarchique réalisée sur les produits en se basant sur l'ensemble des descripteurs utilisés par les juges a donné lieu à des regroupements schématisés sous la forme du dendrogramme présenté sur la Figure 114. Celui-ci a permis de visualiser les distances entre produits et de relier les produits les plus proches. La coupure en deux classes dissocie deux groupes. Le premier groupe contient les produits avec des micro-gels en faible concentration (2,5%) fabriqués à partir du système riche en guar, le témoin ainsi que deux produits contenant 5% de micro-gels obtenus par les systèmes à base de guar avec les deux extrêmes de concentration en GDL. Tous les produits fabriqués par le système à base de xanthane et ceux contenant 5 à 10% de micro-gels obtenus par les systèmes à base de guar sont inclus dans le deuxième groupe. Une dichotomie peut être effectuée sur ce deuxième groupe, permettant d'isoler les deux produits contenant 5 et 10% de micro-gels fabriqués à base du système riche en xanthane. Toutefois, l'analyse du dendrogramme ne permet pas d'identifier clairement de regroupement selon la composition ou la concentration en GDL, même si les produits de concentration en micro-gels élevée se situent majoritairement dans le deuxième groupe.

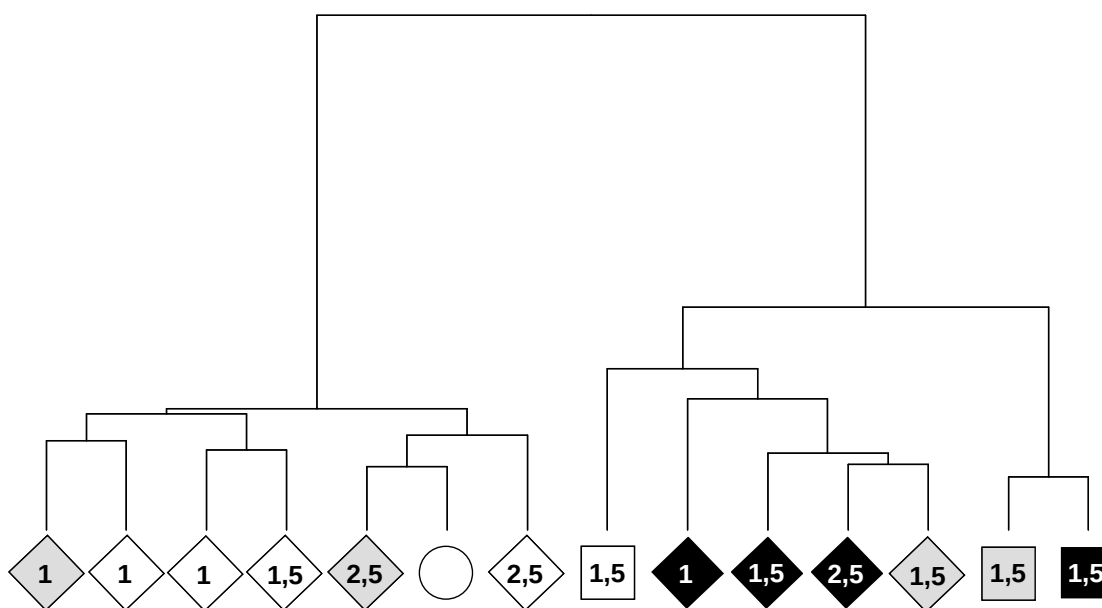


Figure 114 : Dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique des produits lors du profil flash (témoin (○) ; micro-gels fabriqués à partir du système enrichi en guar (◇) ou xanthane (□) acidifié avec 1, 1,5 ou 2,5% de GDL ; concentration en micro-gels : 2,5% (□) ; 5% (■) ; 10% (■))

En complément de la classification ascendante hiérarchique sur les produits, des regroupements basés sur l'ensemble des descripteurs sensoriels du profil flash ont été réalisés (Figure 115).

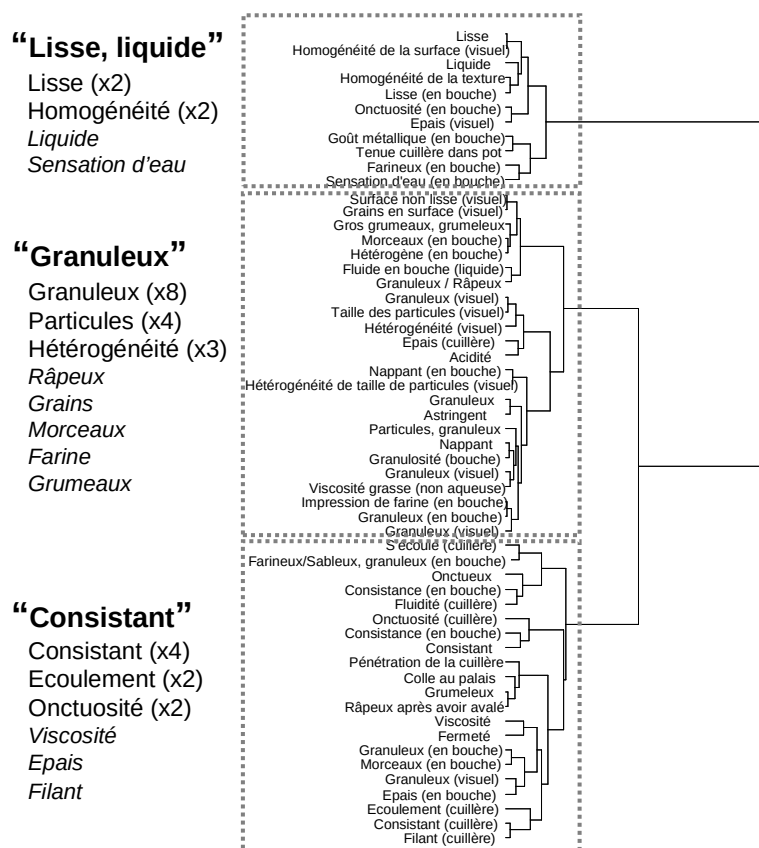


Figure 115 : Dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique des descripteurs sensoriels générés par le panel lors du profil flash. Les notions sémantiques proposées à partir des groupes de termes ainsi que les termes les plus fréquemment cités sont reportés à gauche du dendrogramme.

Les juges ont utilisé chacun entre 3 et 10 descripteurs, soit un total de 56 termes exploités pour le panel. Ces termes concernent en majorité la texture visuelle, en bouche et en cuillère. Le dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique permet de distinguer trois groupes principaux de termes. Le premier groupe intègre un nombre important de termes relatifs au caractère lisse, homogène et liquide. Le second regroupe des termes relatifs au caractère granuleux, hétérogène et à la présence de particules ou morceaux. En revanche, le troisième groupe comprend des termes liés à la consistance, à l'écoulement et à l'onctuosité, mais également d'autres termes faisant référence à d'autres propriétés comme « morceaux », « granuleux » ou « filant ». Ainsi trois notions sémantiques relatives à la texture peuvent être respectivement proposées pour ces trois groupes : « lisse-liquide », « granuleux » et « consistant ». Il est à noter que la notion de « lisse-liquide » est plus séparée des deux autres que ne le sont celles de « granuleux » et « consistant ». De plus, les deux notions de « lisse » et « liquide » ne semblent pas être différenciées par les juges.

Une analyse procrustéenne généralisée a été appliquée aux données individuelles générées par chaque juge afin d'obtenir une carte sensorielle consensuelle. Le premier plan du consensus de l'APG est représenté sur la Figure 116. Ces deux premiers axes expliquent 78% de la variance totale. L'examen des autres plans (non représentés) ne permet pas de mettre en évidence une répartition des produits en groupes distincts.

La représentation des descripteurs individuels sur la Figure 116a montre une opposition sur la première composante de l'APG, portant 65% de la variance, entre les descripteurs relatifs à un caractère lisse et homogène et ceux liés à une perception de granuleux visuelle et en bouche. Si une notion d'hétérogénéité semble ressortir majoritairement de ce premier axe, une distinction entre les termes positionnés dans le premier quartile se référant à une perception de « granuleux en bouche », « sableux » ou encore « râpeux après avoir avalé », et ceux situés dans le deuxième quartile liés à une perception de « granuleux visuel », peut être mise en évidence. Bien que n'expliquant que 13% de la variance, le deuxième axe regroupe majoritairement des descripteurs relatifs à la consistance, ce groupe de termes étant toutefois également corrélé à la première composante de l'APG.

Les produits ont été positionnés par rapport au cercle des corrélations (Figure 116b). Il est à noter que les deux produits fabriqués de manière identique à partir de 2,5% de micro-gels à base du système enrichi en guar acidifié avec 1% de GDL sont relativement proches dans ce plan, ce qui est satisfaisant du point de vue de la cohérence des résultats du groupe. Les produits contenant peu ou pas de particules sont opposés majoritairement selon l'axe 2 de l'APG aux yaourts incluant une quantité importante de micro-gels. Une séparation des produits en fonction de la concentration en micro-gels est donc mise en évidence. La position relative des produits peut être analysée grâce aux éléments d'explication sémantique apportés par le cercle des corrélations de la Figure 116a. Ainsi, les produits contenant une concentration en particules élevée sont caractérisés par des termes sensoriels relatifs à la notion de consistance, ce qui est particulièrement observable pour les produits incluant des micro-gels fabriqués à base du système riche en guar.

Par ailleurs, les yaourts à base de micro-gels préparés par le système enrichi en xanthane, notamment aux hautes concentrations en micro-gels, se distinguent nettement de ceux fabriqués à partir du système riche en guar sur la première composante de l'APG. Ces produits sont reliés aux termes, en majorité évalués visuellement, d'« hétérogénéité », de « granuleux » ou encore de « particules ».

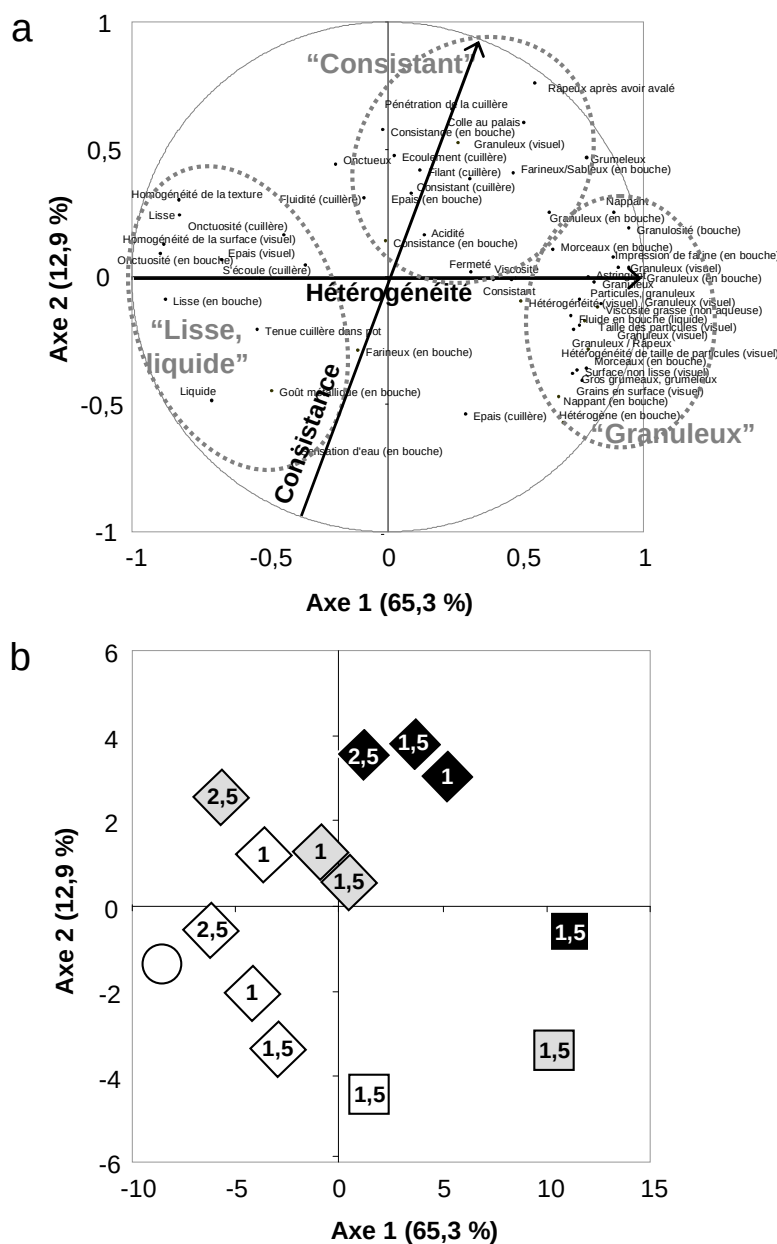


Figure 116 : Plan 1-2 de l'APG (78% de la variance totale) sur les données sensorielles issues du profil flash : (a) Corrélations des descripteurs avec les axes principaux 1 et 2 du consensus procrustéen ; (b) Carte des produits (témoin (○) ; micro-gels fabriqués à partir du système enrichi en guar (◇) ou xanthane (□) acidifié avec 1, 1,5 ou 2,5% de GDL ; concentration en micro-gels : 2,5% (□) ; 5% (▨) ; 10% (■))

III. CARACTERISATION INSTRUMENTALE

L'étude instrumentale globale a été conduite par les réalisations d'une classification ascendante hiérarchique et d'une analyse en composantes principales sur les produits en prenant en compte l'ensemble des paramètres structuraux et rhéologiques.

La classification ascendante hiérarchique menée sur les résultats instrumentaux permet de distinguer trois groupes de produits qui sont différents de ceux obtenus à partir des données sensorielles (Figure 117). A la différence d'un groupe n'incluant que le produit contenant 10% de micro-gels à base du système enrichi en guar acidifié avec 1% de GDL, ou d'un second ne comportant que les deux produits contenant 5 et 10% de particules à base du système riche en xanthane, le dernier groupe rassemble un grand nombre de produits. Toutefois, une coupure en quatre classes permettrait d'isoler de ce grand groupe, les produits fabriqués à partir de micro-gels acidifiés à l'aide de 2,5% de GDL ou sans particules. Les mesures instrumentales permettraient donc de classer les produits, mais seraient moins discriminantes et différentes dans leur caractérisation de la texture que celle issue de l'étude sensorielle.

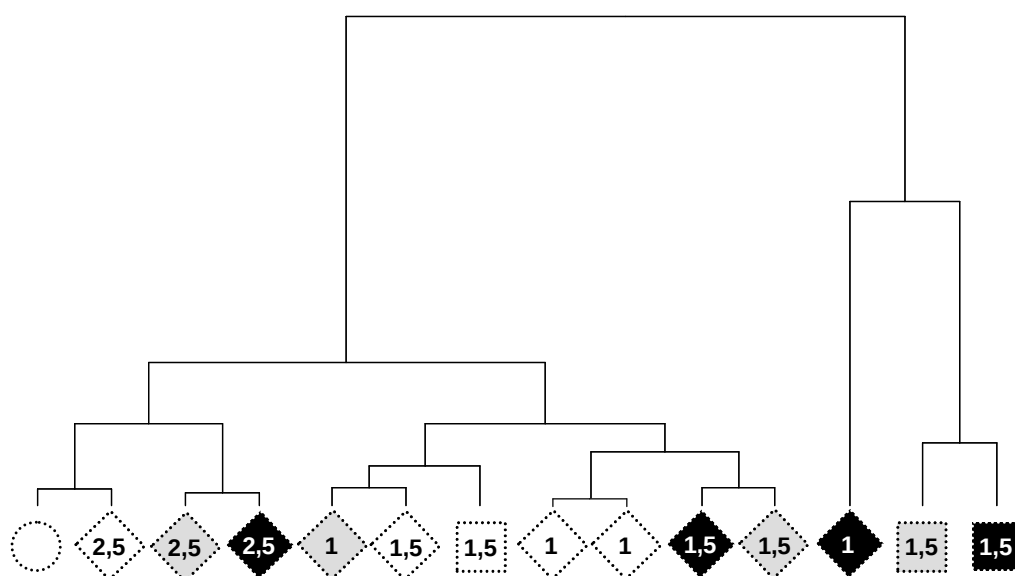


Figure 117 : Dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique de la caractérisation instrumentale des produits (témoin (○) ; micro-gels fabriqués à partir du système enrichi en guar (◇) ou xanthane (□) acidifié avec 1, 1,5 ou 2,5% de GDL ; concentration en micro-gels : 2,5% (□) ; 5% (■) ; 10% (■))

Les deux premières dimensions de l'analyse en composantes principales expliquent 73% de la variance apportée par les caractérisations instrumentales (Figure 118). La projection des résultats instrumentaux sur le plan 1-2 de l'ACP permet de distinguer un premier axe portant les paramètres issus de la modélisation des propriétés d'écoulement par la loi de Herschel-Bulkley opposant l'indice de consistance K à l'indice de comportement n (Figure 118a). Les paramètres structuraux liés à la taille des micro-gels, le diamètre moyen $d_{(4,3)}$ et la longueur L , semblent également être relativement bien corrélés à ce premier axe. Par ailleurs, la viscosité à 100 s^{-1} ainsi que les indices de consistance k et de comportement n issus de la loi de puissance sont bien représentés sur la deuxième dimension de

l'ACP. Les paramètres « aire », correspondant au caractère thixotropique et « force », mesuré par un test de rétro-extrusion sont corrélés à la fois à l'axe 1 et 2 de l'ACP de façon relativement équivalente.

Comme précédemment observé sur le dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (Figure 117), les produits semblent globalement moins discriminés par les mesures instrumentales que sensorielles (Figure 118b). Seuls trois voire quatre produits se détachent de l'ensemble des autres produits. D'une part, les produits incluant 5% et 10% de particules fabriquées à base du système enrichi en xanthane sont caractérisés par un indice de consistance K et une longueur L élevés, ce qui est en accord avec la présence de grandes particules visibles sur les images en microscopie (Figure 113). D'autre part, les produits incluant 5% et surtout 10% de micro-gels préparés à partir du système riche en guar acidifié avec 1% de GDL sont bien représentés sur la première dimension de l'ACP, liée à une viscosité à 100 s^{-1} et un indice de consistance k élevés. La présence de longs filaments gélifiés et enchevêtrés pourrait être à l'origine d'une viscosité importante, y compris aux vitesses de cisaillement élevées et d'un caractère rhéofluidifiant marqué qui est inversement corrélé à n .

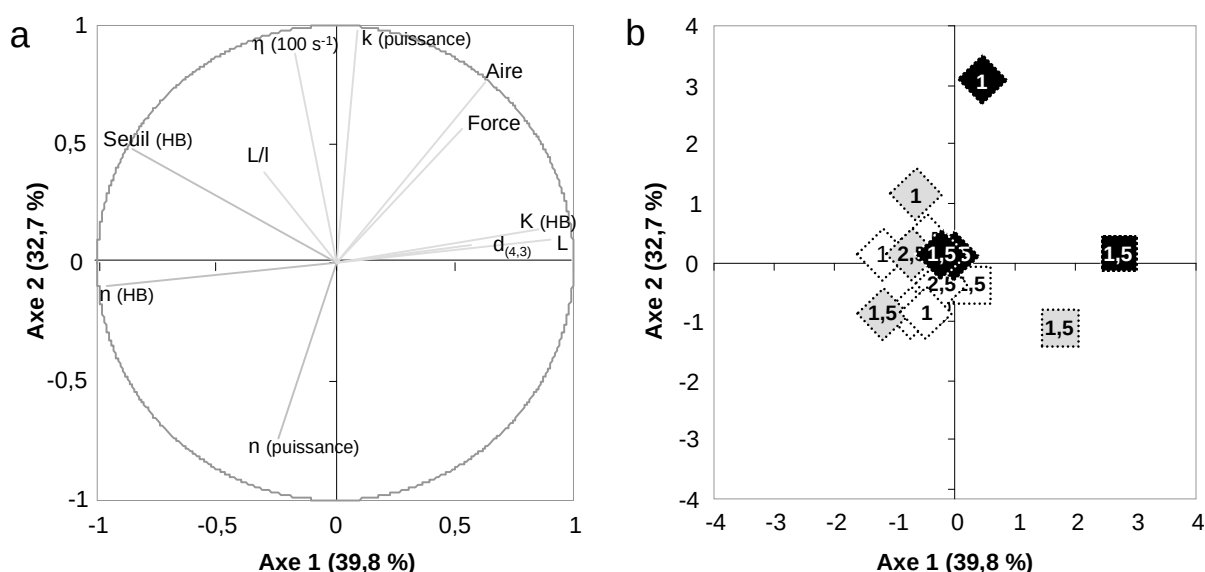


Figure 118 : Plan 1-2 de l'ACP (73% de la variance totale) sur les données de la caractérisation instrumentale : (a) Corrélations des paramètres instrumentaux avec les axes principaux 1 et 2 ; (b) Carte des produits (témoin (○) ; micro-gels fabriqués à partir du système enrichi en guar (◇) ou xanthane (□) acidifié avec 1, 1,5 ou 2,5% de GDL ; concentration en micro-gels : 2,5% (□) ; 5% (■) ; 10% (■))

IV. RELATION ENTRE DONNEES SENSORIELLES ET INSTRUMENTALES

Les réalisations d'une analyse procrustéenne généralisée et d'une classification ascendante hiérarchique ont permis d'analyser conjointement l'ensemble des données sensorielles et instrumentales. Le dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique permet d'isoler un groupe comprenant les produits caractérisés de manière instrumentale et sensorielle incluant différentes concentrations de micro-gels fabriqués à base du système enrichi en xanthane (Figure 119). Une coupure en trois classes dissocie deux groupes supplémentaires. Un groupe contient majoritairement le yaourt témoin et ceux intégrant une faible concentration en micro-gels, alors que l'autre groupe est moins distinct. Ainsi, la classification des produits à partir des données sensorielles et instrumentales permet de distinguer les produits en fonction de la nature du polysaccharide utilisé pour l'élaboration des micro-gels et de la concentration en particules incorporées.

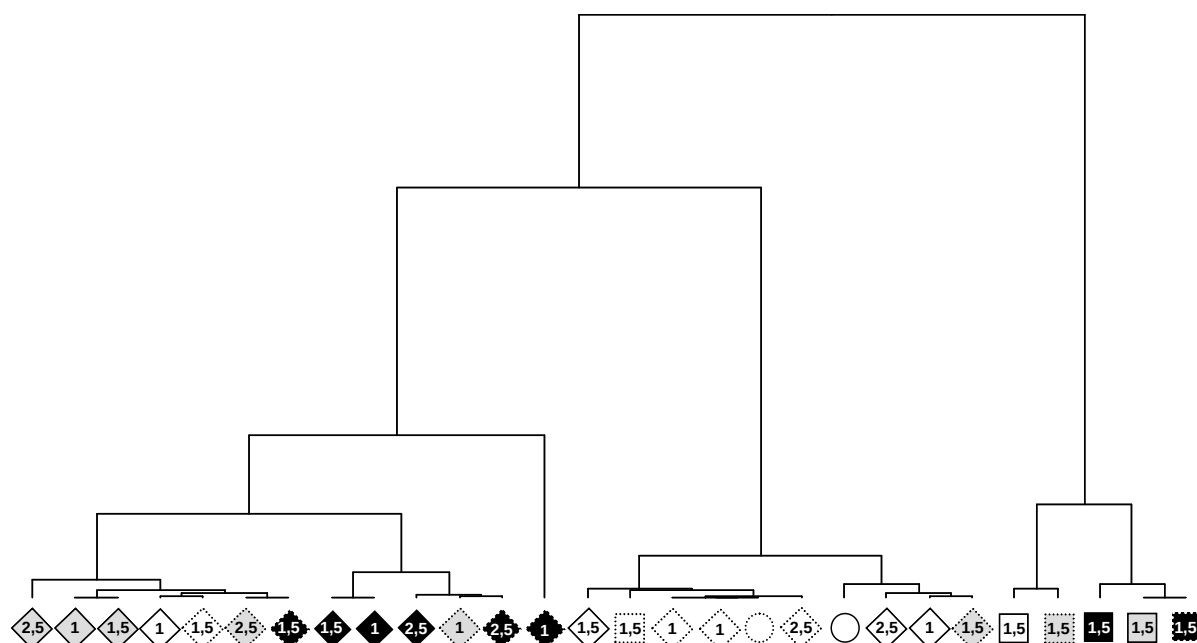


Figure 119 : Dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique des produits de deux premières dimensions des configurations instrumentales et sensorielles de l'APG (témoin (○) ; micro-gels fabriqués à partir du système enrichi en guar (◇) ou xanthane (□) acidifié avec 1, 1,5 ou 2,5% de GDL ; concentration en micro-gels : 2,5% (□) ; 5% (■) ; 10% (■))

Le premier plan de l'APG, représenté sur la Figure 120 explique 89% de la variance totale. Sur le cercle des corrélations, les axes 1 et 2 définis par le consensus sensoriel sont bien représentés sur les première et deuxième dimensions de l'APG respectivement (Figure 120a). En comparant ces axes

aux paramètres issus de la caractérisation instrumentale, l'axe 1 du consensus sensoriel est lié à une longueur L et un diamètre moyen $d_{(4,3)}$ importants, et donc une taille de particules élevée, alors que l'axe 2 est associé à une viscosité à 100 s^{-1} et un indice de consistance k élevés. Ainsi, l'espace de produits étudié se différencierait selon deux dimensions principales, déterminées par les paramètres instrumentaux et les descripteurs sensoriels et qui sont reliées aux notions de « consistance » et « granulosité ». Ce résultat est tout à fait cohérent avec d'autres études sensorielles et rhéologiques de produits de type semi-liquide incluant des particules ou morceaux de gels dispersés dans une phase continue (Espinosa-Munoz et al., 2012 ; Tarea, 2005 ; Matignon, 2013).

Il semble donc exister un lien entre la consistance perçue en bouche et la viscosité à 100 s^{-1} mesurée instrumentalement. Dans le cas de produits rhéofluidifiants tels que les yaourts, la question des conditions de cisaillement est à considérer. Ainsi, une mesure de viscosité à une vitesse de cisaillement comprise entre 10 et 100 s^{-1} a été admise comme permettant d'obtenir une bonne corrélation avec la « consistance » perçue à la cuillère ou en bouche (Cutler, 1983 ; Shama & Sherman, 1973), ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans le cadre de cette étude.

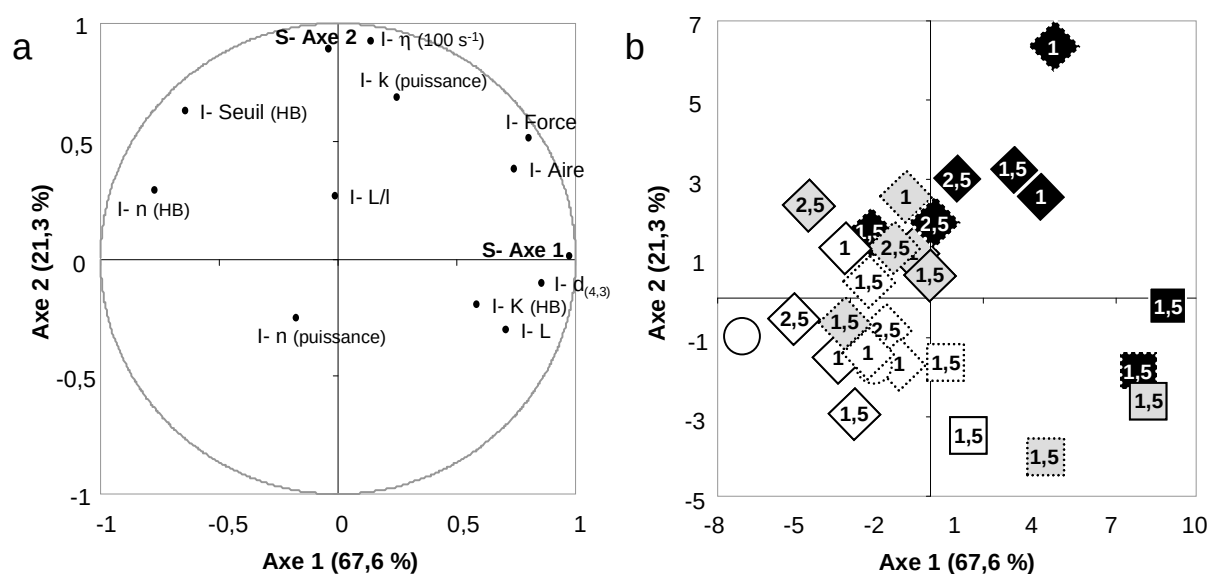


Figure 120 : Plan 1-2 de l'APG (89% de la variance totale) sur les données du plan 1-2 de l'APG de la configuration sensorielle consensuelle et les données de la caractérisation instrumentale : (a) Corrélations des descripteurs sensoriels et instrumentaux avec les axes principaux 1 et 2 du consensus procrustéen ; (b) Carte des produits (témoin (○) ; micro-gels fabriqués à partir du système enrichi en guar (◇) ou xanthane (□) acidifié avec 1, 1,5 ou 2,5% de GDL ; concentration en micro-gels : 2,5% (□) ; 5% (■) ; 10% (■) ; configuration instrumentale en pointillés et sensorielle en ligne pleine)

Le positionnement des produits du consensus sensoriel est relativement proche de celui de la configuration instrumentale pour la majorité des produits, en particulier pour les doublons (Figure 120b). L'axe 1 de l'APG oppose les yaourts contenant des micro-gels à base du système enrichi en guar et contenant peu ou pas de particules à ceux à base du système enrichi en xanthane ou en guar contenant une concentration en micro-gels élevée. La répartition des produits suivant l'axe 2 est moins claire, même si les produits incluant 10% de micro-gels à base des systèmes enrichis en guar acidifiés avec différentes concentrations en GDL sont assez bien représentés sur cette dimension. Par ailleurs, la répartition des produits de la configuration sensorielle est plus vaste dans l'espace de produits que celle de la configuration instrumentale pour laquelle seuls trois produits se distinguent majoritairement, ce qui est cohérent avec les analyses sensorielles et instrumentales présentées séparément précédemment. Ainsi, pour la caractérisation de la texture de cet espace de produits, les mesures instrumentales permettent certes de positionner les produits, mais elles ne sont pas suffisantes pour les discriminer aussi efficacement que le font les juges.

L'analyse du positionnement des produits sur la carte de l'APG conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle les paramètres de structure (longueur des micro-gels et concentration en micro-gels) auraient un rôle clé dans la perception sensorielle mal caractérisée par les mesures instrumentales effectuées dans cette étude.

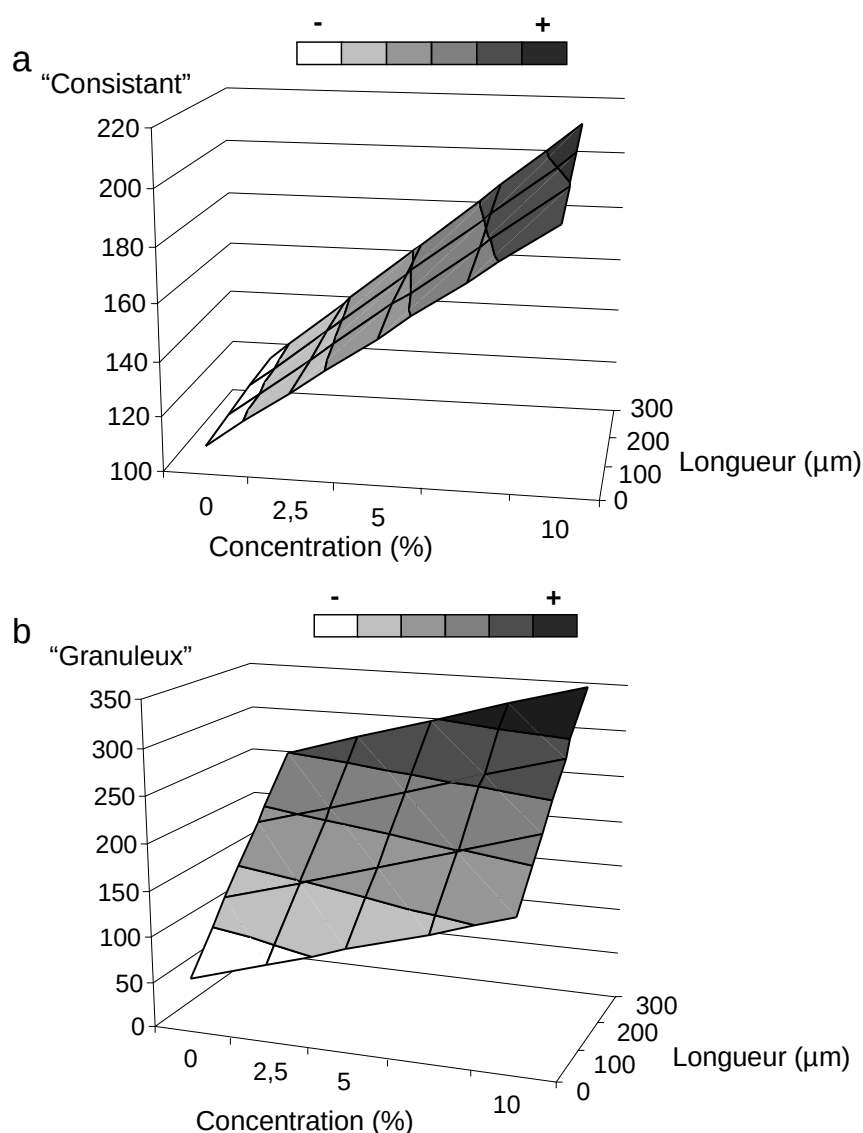
V. RELATION ENTRE LES PARAMETRES DE STRUCTURE ET LES DONNEES SENSORIELLES

Une régression linéaire multiple a été utilisée afin de fournir des modèles permettant d'établir des relations entre les paramètres structuraux (taille des micro-gels évaluée par la longueur L et concentration en micro-gels) et les notions sémantiques de « consistant » et « granuleux ». Il est à noter que ces notions sensorielles sont calculées par la somme de la classification des descripteurs par produit inclus dans le groupe obtenu par la classification ascendante hiérarchique appliquée à l'ensemble des descripteurs sensoriels visuels, en bouche et en cuillère issus du profil flash (Figure 115). Par conséquent, les valeurs correspondant à ces notions sémantiques reflètent une notion globale qui a été interprétée à partir de descripteurs proches et elles sont à prendre avec prudence. Les modèles sont significatifs et présentent un bon ajustement ($R^2 > 0,8$) (Tableau 14).

Tableau 14 : Valeurs des coefficients du modèle de la régression linéaire multiple (Eq. 18) pour les notions sensorielles de « consistant » et de « granuleux »

	α	Concentration	L	Concentration*L	R ²
« Consistant »	110	8,4	0,02	0,004	0,81
« Granuleux »	52	11,3	0,68	-0,009	0,80

Des surfaces de réponses ont été tracées à partir des modèles obtenus par la régression linéaire multiple, permettant ainsi de prédire la perception sensorielle à partir des paramètres structuraux (taille et concentration en micro-gels) (Figure 121).

**Figure 121** : Surfaces de réponses des notions sémantiques sensorielles de (a) « consistant » et (b) « granuleux » en fonction de la concentration en micro-gels et de la longueur des micro-gels, variant selon six niveaux (du plus clair au plus sombre en niveaux de gris)

En émettant l'hypothèse que tous les types de particules présentent un coefficient d'absorption d'eau similaire et sont inertes vis-à-vis de la phase continue, la phase dispersante constituée du yaourt brassé peut être considérée comme identique pour l'ensemble des produits. L'étude de l'effet de l'ajout de particules de taille, forme, concentration ou encore dureté variables sur la perception sensorielle est alors possible.

L'analyse de la surface de réponses de la notion sémantique « consistant » obtenue à partir de la régression linéaire multiple permet de mettre en évidence un effet positif notable de la concentration en micro-gels sur la perception sensorielle liée à la consistance (Figure 121a). Une explication liée à l'intégration des particules dans la phase continue pourrait rendre compte de ce comportement. Alors qu'en faible concentration, les particules peuvent être qualifiées de négligeables vis-à-vis de la perception sensorielle, elles deviendraient dérangeantes à une concentration élevée en interférant par friction entre elles et avec les fragments de gel caséique du yaourt brassé (Houzé et al., 2005), augmentant ainsi la viscosité globale. En revanche, une modification de la taille des particules a un rôle mineur sur la notion sémantique de « consistant ». En effet, l'incorporation en poids égal entre les différents types de micro-gels impliquerait l'ajout d'un nombre important de micro-gels pour des particules de petite taille et au contraire, peu de micro-gels pour les particules de grandes dimensions. Ainsi, le volume de micro-gels inclus dans le yaourt brassé, pour une même concentration en particules, serait sensiblement identique quelle que soit la longueur des particules, ce qui diminuerait son impact sur les propriétés rhéologiques.

La notion sémantique associée au « granuleux » dépend à la fois de la longueur des micro-gels et de leur concentration (Figure 121b). Ces deux paramètres structuraux influencent de manière presque égale la perception du granuleux. Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature lors de l'étude du caractère sableux (« grittiness ») généré par l'ajout de cellulose microcristalline à diverses matrices alimentaires (Imai et al., 1995). Bien que la longueur des particules ait un rôle majeur dans la perception du « granuleux », il serait difficile d'établir un seuil de perception dans le cadre de cette étude en raison de la grande polydispersité des micro-gels fabriqués. En effet, il a été montré que la présence de grandes particules, même en faible proportion par rapport aux petites particules, par exemple 8% de particules de 200 μm , pouvait contribuer à la perception du granuleux (Cayot et al., 2008).

Par ailleurs, le type de micro-gels, non seulement de taille, mais aussi de forme et dureté variables, pourrait avoir un effet sur la perception du « granuleux » (Tyle, 1993 ; Imai et al., 1999 ; Engelen et al., 2005). Ainsi, l'incorporation de micro-gels élaborés à partir du système enrichi en

xanthane reflèterait une hétérogénéité liée à leur taille, détectée en particulier visuellement. Les micro-gels fabriqués à partir du système enrichi en guar, notamment ceux acidifiés avec 2,5% de GDL de forme parfaitement sphérique, pourraient davantage contribuer à un effet « râpeux », à une « impression de farine » ou de « sableux » comme les ont décrits certains juges. Partant de ce constat, une réflexion concernant l'effet de la dureté des particules peut être introduite. Puisque les fragments de gel caséique du yaourt brassé sont de taille sensiblement identique voire légèrement supérieure à celle des particules issues du système enrichi en guar acidifié avec 2,5% de GDL (Figure 113), la grande dureté de ces micro-gels, provoquant un grand contraste de fermeté avec la phase continue, serait à l'origine de leur détection sensorielle, particulièrement en bouche.

VI. CONCLUSION

Dans une démarche exploratoire du positionnement de l'espace de produits créé par des micro-gels de morphologies et concentrations variables, un profil flash a été mis en œuvre conjointement à une caractérisation instrumentale. Les corrélations instrumentales et sensorielles mises en évidence viennent confirmer la présence de deux dimensions principales : la consistance et la granulosité. Il est possible de relier la morphologie des micro-gels à ces dimensions. D'une part, la taille élevée des micro-gels préparés par le système enrichi en xanthane conduit à une hétérogénéité importante. D'autre part, la présence de nombreux enchevêtrements des micro-gels élaborés à partir du système enrichi en guar et acidifié avec 1% de GDL contribue à une augmentation de la consistance instrumentale et sensorielle.

De manière générale, les paramètres structuraux, constitués de la longueur des micro-gels et de leur concentration, ont un rôle clé dans la perception sensorielle. Alors que la notion sémantique sensorielle de « granuleux » est influencée à la fois par la taille et la concentration en particules, seule la concentration a un effet de premier ordre sur la notion de « consistant ».

D'un point de vue nutritionnel, l'incorporation de ces micro-gels, environ quatre fois plus concentrés en protéines qu'un gel laitier standard, constitue une approche particulièrement intéressante. En effet, l'ajout de 2,5%, 5% et 10% de ces micro-gels permet de passer d'une concentration en protéines de 5,5% p/p du yaourt brassé utilisé comme base, à respectivement 6%, 6,5% et 7,5% p/p de protéines.

Les micro-gels protéiques pourraient également être utilisés dans le but de se substituer à la matière grasse au sein de produits allégés. Par un effet de roulement à billes, les particules pourraient,

dans une certaine mesure, donner une sensation glissante du produit sur la langue. La taille trop élevée des micro-gels utilisés dans le cadre de cette étude n'a pas permis de s'approcher de la dimension des globules gras. Toutefois, une stratégie consisterait à diminuer la taille des particules fabriquées à partir du système enrichi en guar en modifiant les paramètres de procédé, par exemple en augmentant la vitesse d'acidification par un changement de la température d'acidification ou de la concentration en GDL.

Une piste de réflexion concernant l'inclusion de particules au sein d'un produit laitier de type yaourt brassé et la perception du caractère granuleux résultante peut être menée. En effet, à l'exemple de l'incorporation de morceaux de fruits dans un yaourt, même si les sujets perçoivent des particules de grande taille, ils ne considéreront vraisemblablement pas qu'elles contribuent à une augmentation de la granulosité du produit. En revanche, il existerait une taille, une dureté et une concentration critiques de particules à partir desquelles les particules ne seraient plus considérées comme faisant partie intégrante du milieu. Ces paramètres critiques pourraient dépendre notamment des habitudes alimentaires des sujets, mais également de leur seuil de détection individuel.

Chapitre 7 : Discussion générale et conclusion

I. DISCUSSION GENERALE

L'ensemble des résultats décrits dans les chapitres précédents peut être discuté sur la base d'une compétition entre les processus de gélification et de séparation de phases. En considérant les démarches mises en œuvre pour moduler le moment de gélification acide des protéines et/ou la vitesse de sédimentation des domaines enrichis en protéines, il a été possible d'identifier un ensemble de facteurs clés déterminant la microstructure des gels acides. Toutefois, la question se pose de la généralisation, par rapport à ces facteurs, des phénomènes aboutissant à différents types de microstructures. Par ailleurs, l'influence de la morphologie particulière des micro-gels sur les caractéristiques sensorielles permettra d'apporter des pistes de réflexion sur la problématique de la perception du caractère granuleux des produits semi-liquides incluant des particules.

Au sein de systèmes mixtes comportant au moins un polymère gélifiant, l'ensemble des phénomènes se produisant avant la formation du gel a un rôle crucial dans la mise en place de la microstructure finale. La gélification peut être gouvernée par différents facteurs tels que la température avec la formation d'un réseau tridimensionnel d'un certain nombre de polymères à chaîne étendue, ou l'acidification du milieu permettant aux protéines de lait de s'agréger. Même si la formation du gel intervient comme un élément perturbateur de la séparation de phases pour ces deux modes de gélification (Lorén et al., 1999 ; Norton & Frith, 2001 ; Aichinger et al., 2007), une distinction de l'évolution du comportement rhéologique avant et après le point de gel en fonction du type de gélification peut être établie.

La Figure 122 présente le schéma théorique de l'évolution de la viscosité apparente, η_{app} , avant la formation du gel et du module élastique relaxé, G_{∞} , mesuré après le point de gel et aux temps d'observation infiniment longs en fonction de l'avancement de la réaction. Lorsque le polymère gélifiant est de type polymère à chaîne étendue tel que la gélatine ou les carraghénanes, la transition sol-gel s'opère progressivement et la viscosité diverge au point critique de gel, p_c , en raison des nombreuses interactions intramoléculaires et intermoléculaires. Au-delà du point de gel, le module élastique relaxé n'est mesurable expérimentalement qu'après un certain temps et l'évolution de ce module se produit de manière progressive. En revanche, le comportement rhéologique de micelles de caséines gélifiant sous l'action d'une diminution de pH diffère. En effet, la viscosité est maintenue presque constante avant que la transition sol-gel n'ait lieu. Au point de gel, la gélification se produit

de manière presque instantanée, faisant tendre la viscosité vers l'infini. Le module élastique relaxé peut être mesuré rapidement et il tend vers un niveau constant au bout d'un temps relativement court. Ajouter un polymère de chaîne étendue aux micelles de caséines permet à la fois d'augmenter la viscosité, qui est maintenue constante jusqu'au point de gel, et de provoquer une séparation de phases. Par ailleurs, une modification de la température conduit également à un changement de la viscosité de la phase continue, mais en ayant un impact négligeable sur la force de déplétion.

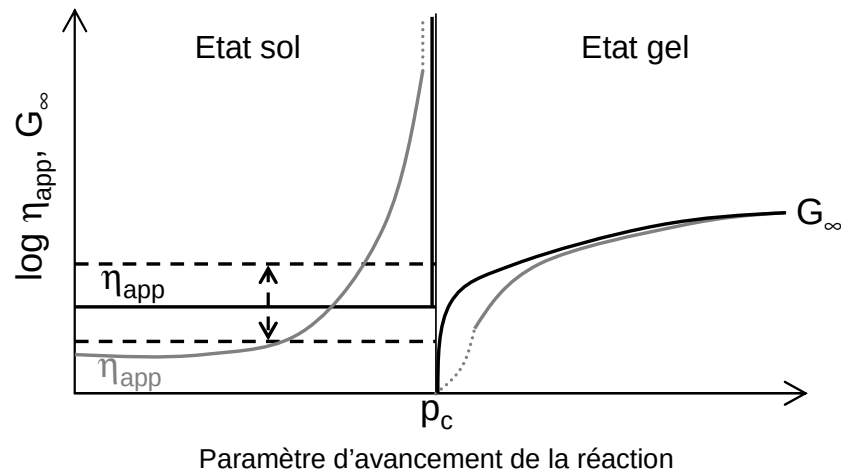


Figure 122 : Schéma théorique représentant l'évolution de la viscosité apparente η_{app} avant le point de gel (p_c) et du module élastique relaxé G_∞ après le point de gel en fonction de l'avancement de la réaction (adapté de Michon, 1995) (en gris : cas théorique des polymères à chaîne étendue, en noir : cas théorique de la gélification des protéines de lait lors de l'acidification). Les pointillés en noir indiquent la variation possible de viscosité du lait enrichi en polysaccharides avant sa gélification.

A la différence des systèmes incluant des polymères de chaîne étendue gélifiant, la mobilité des molécules au sein des mélanges mixtes à base de lait gélifiant par acidification est peu modifiée par le processus de gélification avant que le point de gel ne soit atteint. Dans cette situation, l'évolution du comportement de phases se produisant dans l'intervalle de temps entre le début de la séparation de phases et la formation du gel n'est pas altérée par une gélification progressive du milieu telle que celle des polymères à chaîne étendue. Il est alors possible de modifier de façon contrôlée ce comportement par un changement de la composition en polysaccharides ou du procédé avant la gélification.

Au sein des différents mélanges lait / guar étudiés dans ce travail, des histoires thermomécaniques différentes ont été appliquées avant la gélification du système à pH 5,2 (Figure 123a). Alors qu'un système enrichi en guar à 0,25% a été acidifié à l'aide du ferment 1 ou 2 et cisailé jusqu'à un certain pH afin de limiter la sédimentation, un autre mélange à base de 0,3% de

guar et acidifié avec 1,5% de GDL a été maintenu 2 h ou 4 h à 8°C avant une augmentation jusqu'à 43°C permettant au gel de se former. Un parallèle entre les cinétiques d'acidification d'un lait acidifié par les ferments 1 et 2 et celles obtenues en modifiant l'histoire thermique des systèmes peut être établi (Figure 123a). En effet, le maintien à 8°C pendant 2 h et 4 h des laits acidifiés avec 1,5% de GDL a permis de limiter la diminution du pH jusqu'à l'augmentation à 43°C, simulant ainsi les cinétiques d'acidification respectives des ferments 2 et 1. Malgré une histoire thermomécanique très différente, les deux systèmes présentent des temps de gélification comparables. Ainsi, l'approche consistant à maintenir les systèmes à basse température, utilisée dans l'objectif de décaler le point de gélification vers des temps plus longs, est tout à fait cohérente avec l'utilisation d'un système réel utilisé industriellement intégrant les ferments.

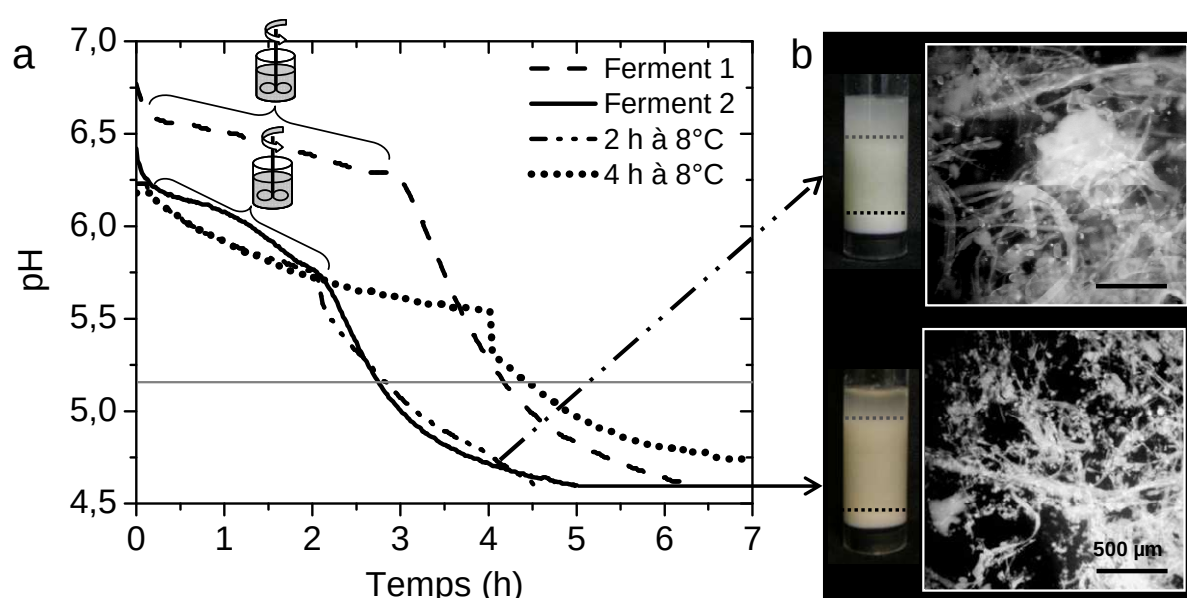


Figure 123 : (a) Cinétiques d'acidification de mélanges lait / guar à 0,25% acidifiés à 43°C à l'aide du ferment 1 ou 2 et cisailés lors de l'acidification, ou de mélanges lait / guar à 0,3% acidifiés avec 1,5% de GDL et maintenus 2 h ou 4 h à 8°C avant une augmentation de la température à 43°C. Le pH de gélification de 5,2 est rappelé par la ligne grise ; (b) Aspects macroscopiques des gels fermes à pH 4,6 et microstructure observée en épifluorescence des gels brassés à pH 4,6 enrichis en guar à 0,3%, acidifiés avec 1,5% de GDL et maintenus 2 h à 8°C (en haut) ou enrichis en guar à 0,25%, acidifiés à 43°C à l'aide du ferment 2 et ayant été cisailé jusqu'à pH 5,7 (en bas). Sur les photos des gels fermes, les pointillés gris délimitent la zone riche en guar de la zone riche en microgels et les pointillés noirs, la zone riche en micro-gels de la couche de sédiment. Les barres représentent 500 μm.

Il apparaît pertinent de comparer les propriétés de systèmes présentant un même temps de gélification et donc pour lesquels seul le comportement des mélanges avant la formation du gel diffère. A titre d'exemple, les macrostructures et microstructures d'un système enrichi en guar à

0,25% acidifié à l'aide du ferment 2 et cisailé jusqu'au pH de 5,7, et celles d'un mélange à 0,25% de guar acidifié avec 1,5% de GDL et maintenu 2 h à 8°C sont montrées sur la Figure 123b. Avant brassage, les gels fermes issus de ces deux mélanges ayant subi une histoire thermomécanique différente avant gélification, présentent tous deux des fractions volumiques similaires composées d'une phase inférieure de protéines sédimentées, d'une phase riche en micro-gels et d'une phase supérieure appauvrie en protéines. Toutefois, à l'échelle microscopique, quelques différences de morphologie des gels acides brassés sont mises en évidence. Sur les images de la Figure 123b, les zones claires révèlent la présence de protéines alors que les zones sombres permettent de localiser le guar et/ou le lactosérum. Même si les micro-gels apparaissent sous la forme de filaments allongés dans les deux systèmes, le mélange ayant passé 2 h à 8°C présente des micro-gels de longueurs et largeurs moyennes supérieures à ceux du système acidifié à 43°C par le ferment 2 et cisailé jusqu'à pH 5,7. Ces différences peuvent être expliquées non seulement par la composition des mélanges, mais également par une histoire thermomécanique différente.

L'augmentation de la concentration en guar contribue certes à augmenter le phénomène de déplétion-floculation, mais elle aboutit également à une augmentation importante de la viscosité de la phase continue riche en guar, diminuant ainsi la vitesse de sédimentation des gouttelettes (Figure 61). Par conséquent, les gouttelettes riches en protéines du système lait / guar à 0,3% auraient davantage le temps de croître par coalescence avant de former la couche de sédiment que le mélange contenant 0,25% de guar. Par ailleurs, l'évolution des structures du système cisailé jusqu'à pH 5,7 se produit à 43°C uniquement pendant l'intervalle de temps de moins d'une heure compris entre la fin de la mise en œuvre du cisaillement et le début de la formation du gel. Au contraire, le passage à 8°C pendant 2 h favoriserait un début de coalescence et de sédimentation des gouttelettes avant une accélération importante de cette évolution lors de l'augmentation de la température à 43°C avant la gélification. L'ensemble de ces conditions thermiques et mécaniques, mais aussi les différences de viscosité de la phase continue seraient à l'origine des différences microstructurales observées. Outre le temps de gélification, des facteurs supplémentaires gouvernent la microstructure de ces systèmes et sont donc à prendre en compte pour la compréhension des phénomènes.

Puisque le temps de gélification apparaît être un facteur important, mais non suffisant, pour la structuration des gels mixtes acides, le phénomène de séparation de phases constitue un deuxième paramètre à maîtriser. Ainsi, une démarche d'ajustement des cinétiques relatives de séparation de phases et de gélification a été mise en place au sein de systèmes enrichis en guar à 0,3% (Figure 124a et b).

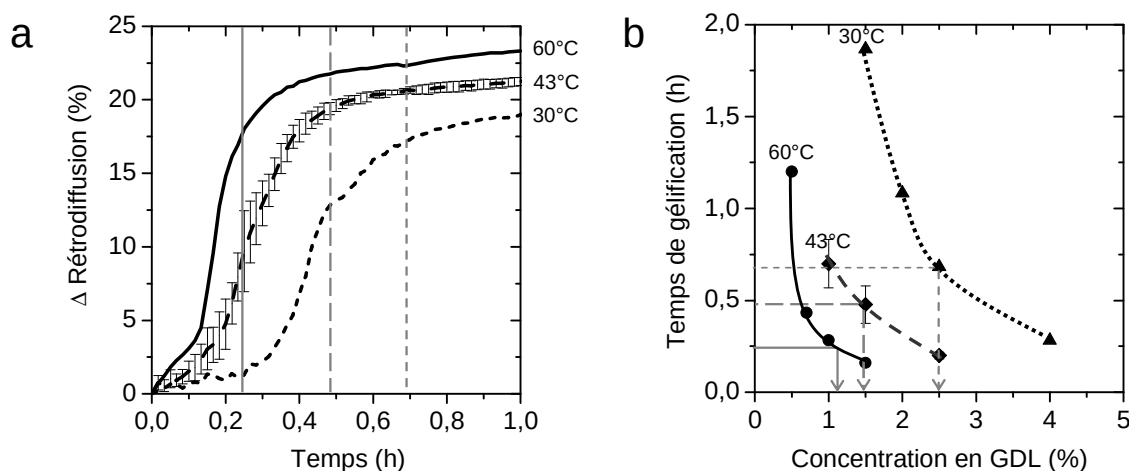


Figure 124 : (a) Valeur maximale de Δ rétrodiffusion dans la partie inférieure de l'échantillon de mélanges lait / guar à 0,3% non acidifiés à 30°C, 43°C et 60°C en fonction du temps ; (b) Temps de gélification correspondant au temps nécessaire pour atteindre un pH de 5,2 en fonction de la concentration en GDL ajoutée à un mélange lait / guar à 0,3% à 30°C, 43°C ou 60°C. Les lignes en pointillés gris correspondent au temps de début de formation de la couche de sédiment sur les figures a et b.

La technique d'interaction lumière-matière utilisée tout au long de ce travail (Figure 58) a permis d'identifier le temps de début de formation de la couche de protéines sédimentées dans des mélanges lait / guar à 0,3% à une température de 30°C, 43°C et 60°C (Figure 124a), soit respectivement 0,7 h, 0,5 h et 0,25 h. Ensuite, de manière à ce que le moment de gélification intervienne juste avant le début de la formation du sédiment, la concentration en GDL a été ajustée à une concentration de 2,5%, 1,5% et 1,13% pour des températures d'acidification respectivement de 30°C, 43°C et 60°C (Figure 124b). Modifier la température a permis d'une part d'ajuster les temps de gélification par une connaissance de la vitesse d'hydrolyse de la GDL, et d'autre part de moduler la vitesse de séparation de phases par un changement de viscosité (Figure 122). A titre d'exemple, un changement de température de 60°C à 30°C diminue d'environ un facteur deux la viscosité du mélange (résultats non montrés).

A partir de l'étude des cinétiques d'acidification obtenues expérimentalement suite à un ajout d'une concentration en GDL déterminée selon la Figure 124b combinée à l'évolution de Δ rétrodiffusion en fonction du temps, il est possible de vérifier si les temps de gélification et de début de sédimentation coïncident (Figure 125a). Alors qu'une concordance parfaite entre ces deux temps est mise en évidence dans les systèmes acidifiés à 30°C et 43°C, une légère sous-estimation du temps de gélification a lieu dans le mélange acidifié à 60°C par rapport au temps d'apparition de la couche de sédiment. L'hydrolyse de la GDL particulièrement rapide en début d'acidification à 60°C, et donc

plus difficilement contrôlable, est responsable de ce léger décalage. Dans cette situation, la sédimentation des gouttelettes riches en protéines a été bloquée par le phénomène de gélification juste avant d'avoir atteint la partie inférieure de l'échantillon.

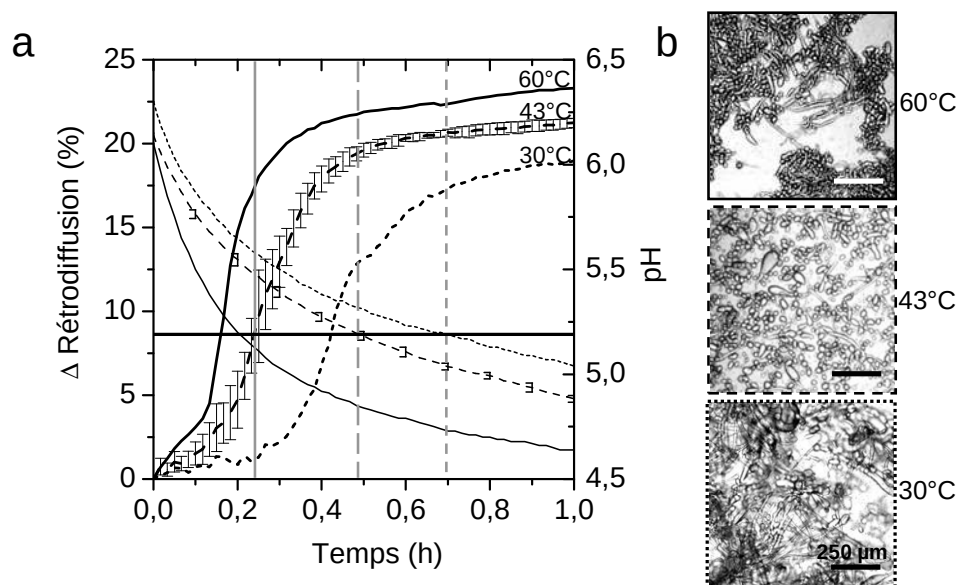


Figure 125 : (a) Valeur maximale de Δ rétrodiffusion dans la partie inférieure de l'échantillon de mélanges lait / guar à 0,3% non acidifiés à 30°C, 43°C et 60°C en fonction du temps (lignes épaisses) et cinétiques d'acidification de ces mélanges additionnés de 2,5%, 1,5% et 1,13% de GDL à respectivement 30°C, 43°C et 60°C (lignes fines). Les lignes en pointillés gris correspondent au temps de début de formation de la couche de sédiment à 30°C, 43°C et 60°C. Le pH de gélification de 5,2 est rappelé par la ligne noire épaisse ; (b) Gels brassés enrichis en guar à 0,3% à pH 4,6 ayant été acidifiés à l'aide de 1,13%, 1,5% et 2,5% de GDL à respectivement 60°C, 43°C ou 30°C (de haut en bas) observés en microscopie optique. Les barres représentent 250 μ m.

Les morphologies des gels brassés obtenus après une acidification à 30°C, 43°C ou 60°C montrées sur la Figure 125b peuvent être comparées sur la base des cinétiques de sédimentation et de gélification. Le système acidifié à 60°C ayant gélifié juste avant que la couche de sédiment ne se forme, apparaît sous la forme de micro-gels d'une taille d'environ 30 μ m, légèrement agrégés entre eux et en mélange avec de fins filaments. En revanche, des micro-gels plus volumineux sont présents dans les gels brassés fabriqués à 30°C et 43°C. Bien que les temps de gélification et de début de formation du sédiment soient parfaitement ajustés dans le cas de ces deux gels, les micro-gels du système préparé à 30°C apparaissent moins sphériques et sont environ deux fois plus grands que ceux formés par une acidification à 43°C. Ces différences de morphologie pourraient s'expliquer par un effet d'agitation thermique. Celle-ci permettrait dans le cas d'une acidification à 60°C, d'allonger certaines gouttelettes de manière très fine, et au contraire, à 30°C, elle favoriserait la coalescence des gouttelettes par une diminution du mouvement des molécules, et un début de sédimentation après

avoir atteint une taille et une densité critiques. Ainsi, l'ajustement des temps de gélification par rapport aux temps de séparation de phases ne permet d'expliquer que partiellement les différences de microstructures des gels acides brassés. L'agitation thermique constitue en effet un second facteur essentiel à prendre en considération.

Dans le but d'étudier l'effet combiné de l'agitation thermique et de l'intervalle de temps entre les débuts de la sédimentation et de gélification, la Figure 126 illustre un ensemble de morphologies de gels brassés enrichis à 0,3% de guar acidifiés de 30°C à 60°C à l'aide de concentrations en GDL variables. Il est à noter que la fabrication de gels brassés à haute température et avec un intervalle de temps faible n'est pas réalisable dans ces conditions en raison de la sédimentation rapide des gouttelettes riches en protéines. Toutefois, comme illustré dans le chapitre 5, II, un levier de formulation consisterait à appliquer un cisaillement avant la formation du gel dans l'objectif de limiter considérablement l'évolution du système.

A basse température d'acidification et quel que soit l'intervalle de temps entre les débuts de la sédimentation et de gélification, une microstructure sous la forme de micro-gels très allongés apparaît. Cependant, il semble que plus cet intervalle de temps augmente, plus la largeur des filaments augmente. Les gouttelettes dispersées auraient davantage le temps d'évoluer par coalescence et sédimentation au sein d'une phase continue de haute viscosité avant la formation du gel. A la différence des gels formés à 30°C et 35°C, les gels acidifiés à une température supérieure à 47°C se présentent sous la forme de micro-gels de petite taille et de plus en plus agrégés entre eux à mesure que la température d'acidification augmente. Pour l'ensemble de ces gels, la gélification intervient avant que la séparation de phases ne se produise, ce qui masquerait un éventuel effet de l'intervalle de temps entre les débuts de la sédimentation et de la gélification. Une très large variation de morphologies de micro-gels du système acidifié à 43°C est mise en évidence en fonction du temps disponible pour l'évolution des gouttelettes avant leur gélification. Ainsi, une acidification à 43°C semble être une température intermédiaire pour laquelle la viscosité de la phase continue favorise la coalescence et la sédimentation des gouttelettes tout en limitant un effet d'agitation thermique excessif qui produirait un mélange de petits micro-gels et de fins filaments. Par conséquent, ces conditions thermiques apparaissent être optimales pour créer une variété de morphologies au sein de mélanges lait / guar à 0,3% en modifiant l'intervalle de temps entre les débuts de la sédimentation et de la formation du gel.

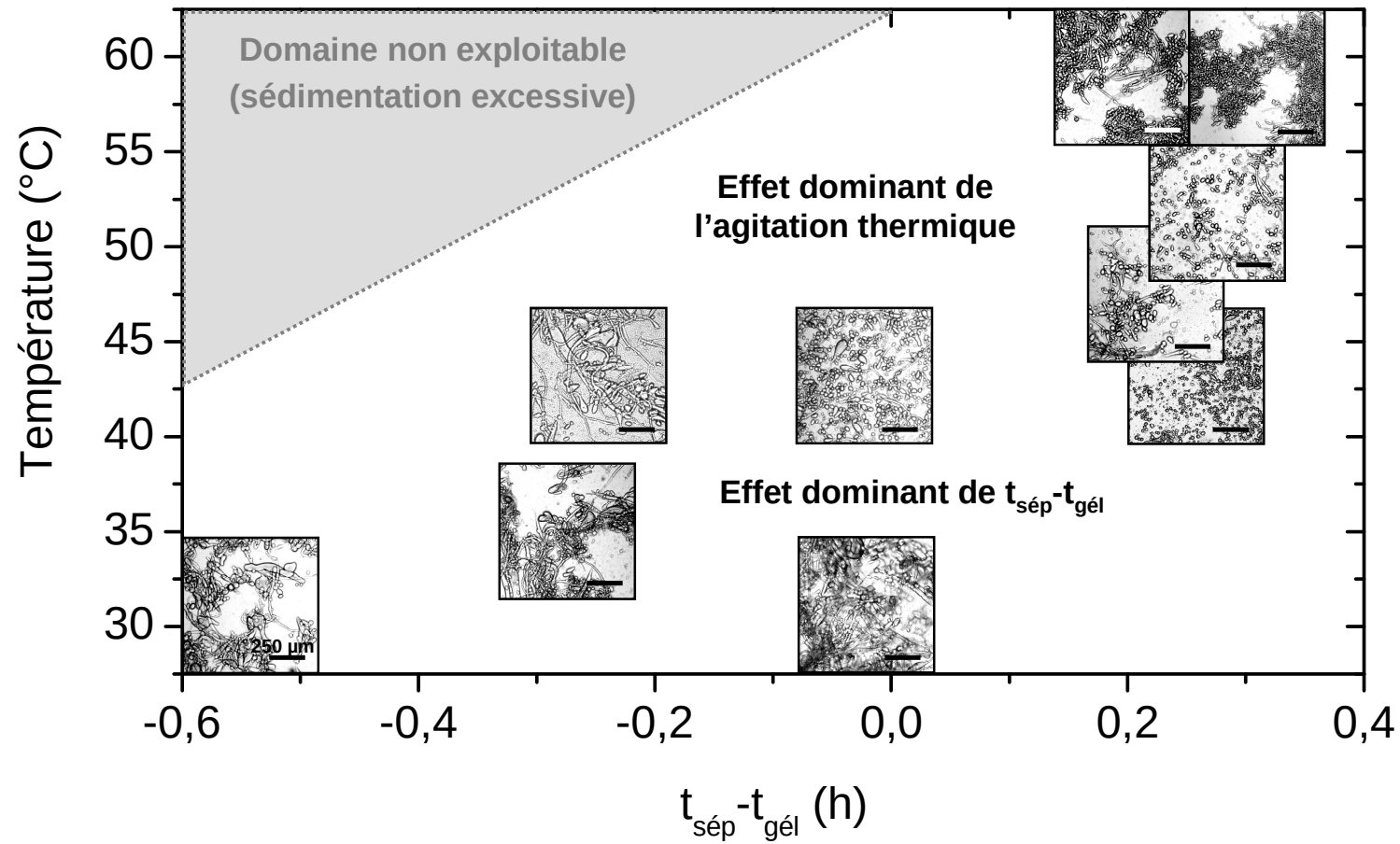


Figure 126 : Gels brassés enrichis en guar à 0,3% à pH 4,6 ayant été acidifiés à l'aide de différentes concentrations en GDL à des températures allant de 30°C à 60°C observés en microscopie optique présentant des intervalles de temps entre le début de la sédimentation ($t_{\text{sép}}$) et de gélification ($t_{\text{gél}}$) variables. $t_{\text{gél}}$ correspond au temps nécessaire pour atteindre un pH de 5,2. Les barres représentent 250 μm .

En complément de l'étude de la microstructure des gels acides brassés, une analyse rhéologique aux petites déformations de gels présentant un intervalle de temps variable entre les débuts de sédimentation et de gélification a été menée (Figure 127).

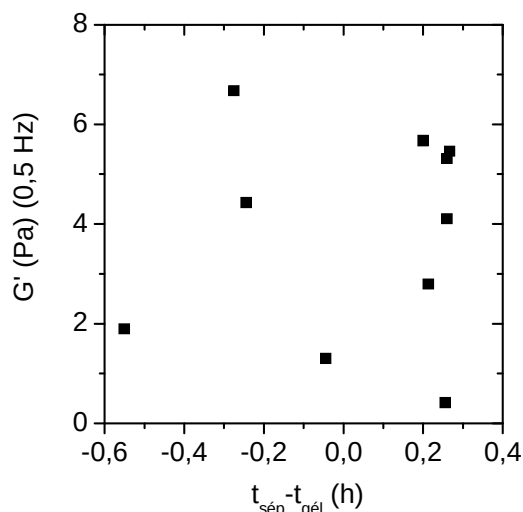


Figure 127 : Modules élastiques G' à 0,5 Hz de gels brassés enrichis en guar à 0,3% à pH 4,6 ayant été acidifiés à l'aide de différentes concentrations en GDL à des températures allant de 30°C à 60°C en fonction de l'intervalle de temps entre le début de la sédimentation (t_{sep}) et de gélification (t_{gel}). t_{gel} correspond au temps nécessaire pour atteindre un pH de 5,2.

Malgré les différences importantes de morphologies mises en lumière à l'échelle microscopique (Figure 126), aucune tendance claire de l'évolution de G' en fonction du temps disponible pour l'évolution des gouttelettes avant leur gélification ne se dégage. En effet, la contribution des microgels dispersés dans une phase riche en guar aux propriétés rhéologiques est variable selon la longueur, la largeur ou encore la dureté de ces particules qui peuvent être présentes de manière isolée, agrégée ou enchevêtrée. L'ensemble de ces différences structurales implique une complexité d'interprétation vis-à-vis des propriétés rhéologiques et établir un lien entre ces structures et les propriétés rhéologiques devient alors difficile.

II. CONCLUSION GENERALE

Sur la base des observations microscopiques, les différences de morphologie des gels mixtes brassés peuvent s'inscrire dans le cadre d'un schéma général d'interprétation faisant appel à un effet de compétition entre les processus de gélification et de séparation de phases. Par ailleurs, la création de ces microstructures originales servira de levier d'action pour orienter les propriétés rhéologiques et sensorielles (Figure 128).

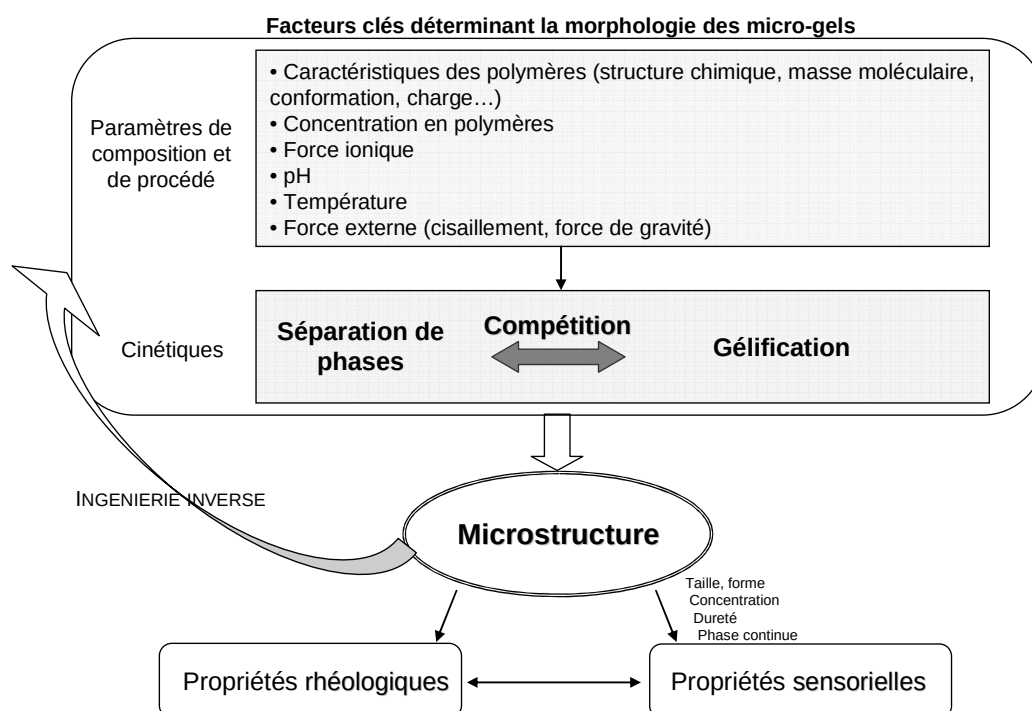


Figure 128 : Schéma récapitulatif des paramètres déterminant la microstructure de gels laitiers acides enrichis en polysaccharides

A travers les variations de paramètres de composition et de procédé, les facteurs clés déterminant la morphologie des micro-gels ont été identifiés. Ces facteurs modifient de manière majeure les trois phénomènes participant à la structuration des gels brassés enrichis en polysaccharides : la force de déplétion, l'agitation thermique et l'intervalle de temps entre les débuts de sédimentation et de gélification. Par la représentation d'un espace tridimensionnel (Figure 129a), il est possible d'isoler trois plans correspondant à une force de déplétion faible, moyenne ou élevée (Figure 129b). La force de déplétion peut varier en fonction de la concentration et de la viscosité intrinsèque du polymère, mais également de la force ionique ou du pH.

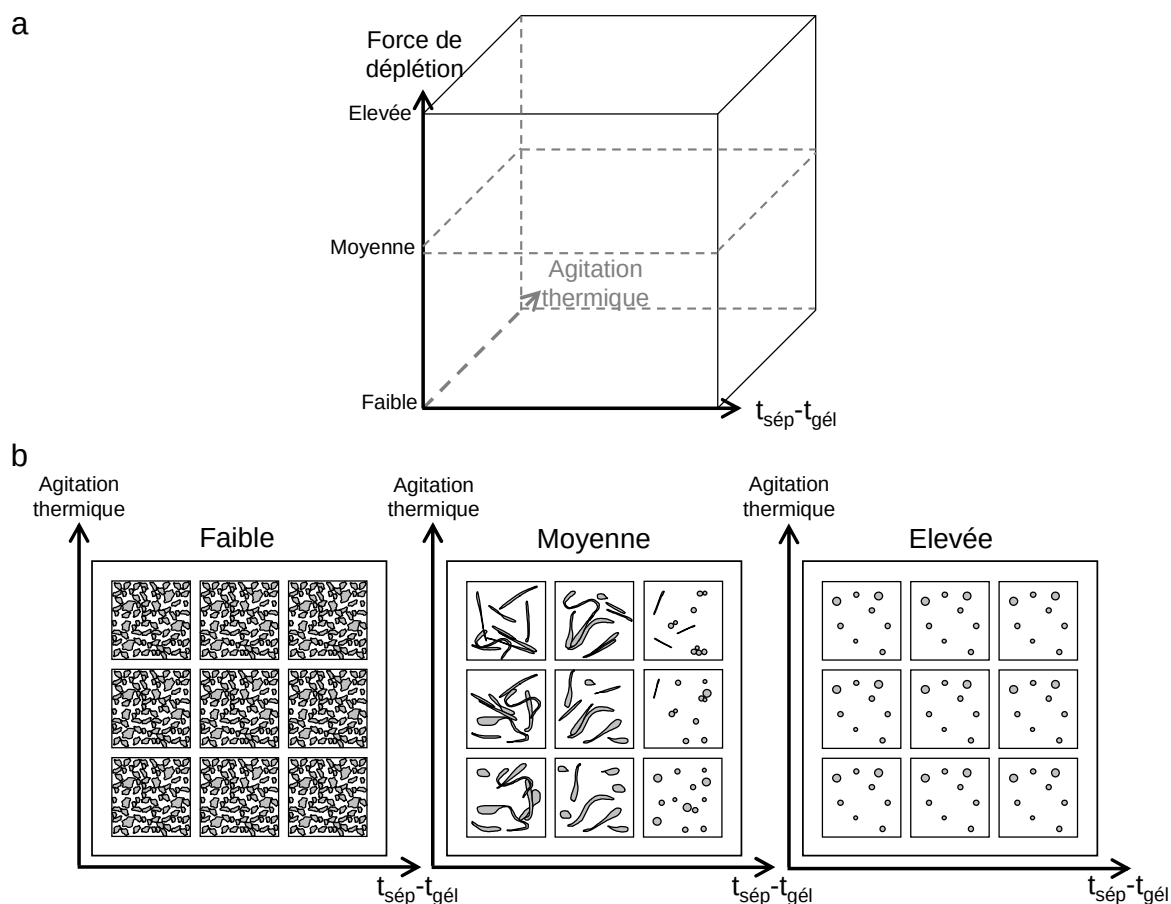


Figure 129 : (a) Représentation schématisée en trois dimensions des facteurs déterminant la microstructure de systèmes acidifiés lait / polysaccharides ; (b) Représentation schématisée de la morphologie des gels acides brassés en fonction de l'agitation thermique et de l'intervalle de temps entre le début de la sédimentation ($t_{\text{sép}}$) et de la gélification ($t_{\text{gél}}$) pour les trois plans correspondant à une force de déplétion faible, moyenne et élevée. Sur les schémas, les parties grises correspondent à des zones riches en protéines, celles blanches à une phase de lactosérum comprenant ou non des polysaccharides.

A faible force de déplétion, les gels acides brassés se présentent sous la forme d'une suspension concentrée d'agrégats protéiques de taille variable dispersés dans du lactosérum en mélange ou non avec une solution de polysaccharides. Une illustration de ce type de microstructure concerne les systèmes intégrant une quantité inférieure ou égale à 0,05% de guar ou 0,01% de xanthane. Pour ces gels brassés, une modification de l'agitation thermique ou un décalage des temps de sédimentation ou de gélification ne contribue pas de manière majeure à un changement de morphologie puisque la micro-séparation de phases est suffisamment lente à s'établir et de faible ampleur.

En condition de force de déplétion élevée, l'utilisation d'une concentration importante en polysaccharides dans un système laitier conduit à une inversion de phases et à la formation de micro-gels riches en protéines dispersés dans une phase continue riche en polysaccharides. En raison de la haute viscosité de la phase continue, les domaines enrichis en protéines sont peu sensibles à une variation de l'agitation thermique et peu enclins à croître par coalescence ou à sédimenter quel que soit le temps disponible avant leur gélification. Les gels acides brassés à base d'une concentration en guar supérieure ou égale à 0,4% ou en xanthane supérieure à 0,2% constituent des exemples de ce type de microstructures.

Seul le plan intermédiaire de l'espace tridimensionnel, caractéristique des systèmes à force de déplétion moyenne, présente des variations importantes de microstructure en fonction de l'agitation thermique et de l'intervalle de temps entre les débuts de sédimentation et de gélification. Par des phénomènes de coalescence et de sédimentation liés à un effet de gravité et/ou d'agitation thermique, une large gamme de morphologies de micro-gels peut être créée, allant de longs filaments enchevêtrés, à des micro-gels déformés et sphériques. Ainsi, augmenter ou diminuer les temps de sédimentation et de gélification détermine la possibilité d'évolution des domaines enrichis en protéines avant que la gélification acide des protéines ne fige le système (Chapitre 3). Ceci peut être mis en œuvre par une modification de la méthode d'acidification, par l'action de forces externes telles que l'application d'un cisaillement ou d'une force centrifuge, ou encore par un changement de la température. Dans ce dernier cas, l'agitation thermique intervient de manière prépondérante en augmentant le mouvement des particules, ce qui conduit à la formation de micro-gels de petite taille et de filaments très fins et allongés dans les systèmes enrichis en guar à 0,3% (Chapitre 5). En revanche, la compréhension des structures fibreuses, mises en évidence dans les mélanges lait / xanthane en milieu acidifié dans ces conditions intermédiaires de force de déplétion, relève d'une complexité supplémentaire en raison de la participation de nombreuses forces intermoléculaires (Chapitre 4).

A partir de la connaissance des facteurs déterminant la morphologie des gels mixtes brassés, la maîtrise de la structure des micro-gels permet de concevoir la construction de nouvelles textures instrumentales et sensorielles. Alors que la taille importante des micro-gels élaborés à partir d'un système enrichi en xanthane conduit à la perception d'un caractère granuleux prononcé, les longs filaments fabriqués à base du mélange lait / guar contribuent davantage, par leurs nombreux enchevêtrements, à des consistances instrumentales et sensorielles élevées (Chapitre 6). Par conséquent, l'ensemble des paramètres structuraux, tels que la taille, la forme ou encore la dureté des

particules est à prendre en considération dans la perception sensorielle de produits composés de particules. Dans l'objectif de diminuer la perception de granuleux des micro-gels, un levier de formulation consisterait à modifier le contraste de fermeté entre la phase continue et les particules. A la différence d'un changement de la viscosité de la phase continue mise en œuvre par exemple par l'ajout d'un épaississant ou d'un gélifiant, la variation de la dureté des micro-gels implique une réflexion plus complexe qui ouvre de nouvelles perspectives quant à la formulation de ces particules.

La transposition de la démarche adoptée pour la création des micro-gels à d'autres systèmes laitiers mixtes pose la question de la validité de la théorie pour des polymères autres que le guar et le xanthane. L'ensemble des résultats obtenus en utilisant deux polymères de chaîne étendue et de volume hydrodynamique connu pourrait servir de base pour prédire, à travers une stratégie d'ingénierie inverse, le comportement d'autres macromolécules dans des systèmes laitiers acidifiés afin de créer des micro-gels de morphologie souhaitée. Cette approche intégrant des mélanges binaires de polymères variés pourrait donc conduire à élargir la gamme de morphologies et de texture des micro-gels, et de manière d'autant plus importante dans le cas de systèmes ternaires. Ainsi, certains polysaccharides chargés interagissant par pontage avec les micelles de caséines tels que les carraghénanes ou les pectines, pourraient être utilisés en combinaison avec le guar dans le but de diminuer une aggrégation dense des caséines et par conséquent, la dureté des micro-gels.

Puisque la morphologie des micro-gels est gouvernée en partie par les propriétés interfaciales particulières de l'émulsion eau dans eau, le rôle de l'interface et notamment des protéines sériques au sein de ces systèmes nécessiterait une étude plus détaillée. Par ailleurs, l'ajout de tensio-actifs spécifiques ou de microparticules solides telles que des nanocristaux de cellulose dans le cas des émulsions de Pickering, agissant en tant que nouveaux modificateurs des propriétés de l'interface, ouvre la voie à de nouvelles recherches.

Un autre axe de développement consisterait à exploiter l'effet du cisaillement pour la création de micro-gels de morphologies contrôlées. En constante progression depuis quelques années, les techniques de microfluidiques pourraient servir de base à l'étude du comportement des émulsions eau dans eau en conditions gélifiantes, afin non seulement de maîtriser l'intensité du cisaillement appliqué, mais aussi de produire des structures davantage monodisperses.

La mise en place de l'évaluation sensorielle de tels produits a permis de mettre en lumière les éléments de structure à prendre en compte pour modifier la perception sensorielle, et notamment le niveau d'allongement des particules. A travers la diversité des conditions explorées dans ce travail,

les connaissances ont pu être mises en pratique pour générer une variété de morphologies de micro-gels. Sur cette base, les impacts de la morphologie des particules, mais également de leur fermeté et de leur état de surface sur la perception du caractère granuleux ou râpeux mériteraient d'être approfondis.

Les perspectives de transfert au plan des applications sont prometteuses, en particulier d'un point de vue de l'innovation produit. Présentant un intérêt nutritionnel grâce à leur teneur en protéines élevée, les micro-gels pourraient être utilisés en tant qu'analogues de fibres protéiques ou substituts de matière grasse. Des ajustements dans la morphologie et la texture des micro-gels permettraient d'augmenter l'acceptabilité de ces produits innovants par les consommateurs. Ainsi, l'étendue du champ des applications serait principalement déterminée par deux facteurs : une connaissance approfondie de ces systèmes complexes et notre créativité.

Références bibliographiques

- Acero Lopez, A., Corredig, M. & Alexander, M., 2009. Diffusing wave and ultrasonic spectroscopy of rennet-induced gelation of milk in the presence of high-methoxyl pectin. *Food Biophysics*, 4, pp.249–259.
- Aichinger, P.A. et al., 2007. Xanthan gum in skim milk: designing structure into acid milk gels. In *Food Colloids: Self-Assembly and Material Science*, Eds E. Dickinson and M. Leser, RSC, Cambridge. pp. 283–296.
- Alexander, M. & Dalgleish, D.G., 2007. The interaction of casein micelles with kappa-carrageenan studied by diffusing wave spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 21, pp.128–136.
- Anema, S.G. & Klostermeyer, H., 1997. Heat-induced, pH-dependent dissociation of casein micelles on heating reconstituted skim milk at temperatures below 100°C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp.1108–1115.
- Anema, S.G. & Li, Y., 2003. Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal of Dairy Research*, 70, pp.73–83.
- Anema, S.G., Lowe, E.K. & Lee, S.K., 2004. Effect of pH at heating on the acid-induced aggregation of casein micelles in reconstituted skim milk. *LWT - Food Science and Technology*, 37(7), pp.779–787.
- Antonov, Y.A., Lefebvre, J. & Doublier, J.L., 1998. On the one-phase state of aqueous protein-uncharged polymer systems casein-guar gum system. *Journal of Applied Polymer Science*, 71, pp.471–482.
- Antonov, Y.A., van Puyvelde, P. & Moldenaers, P., 2003. Effect of shear flow on the phase behavior of an aqueous gelatin-dextran emulsion. *Biomacromolecules*, 5, pp.276–283.
- Antonov, Y.A., van Puyvelde, P. & Moldenaers, P., 2012. Flow-induced phase behaviour and structure development in aqueous emulsion of associative biopolymers. *Food Hydrocolloids*, 27, pp.264–268.
- Antonov, Y.A., Soshinskii, A.A. & Glotova, Y.K., 1994. Thermodynamic compatibility of skim milk proteins with microbial polysaccharides in aqueous media. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 6, pp.760–765.
- Arltoft, D. et al., 2006. Localising pectin in dairy products using direct immunostaining. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 13*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 41–51.
- Asakura, S. & Oosawa, F., 1958. Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *Journal of Polymer Science*, 33, pp.183–192.
- Banon, S. & Hardy, J., 1991. Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection. *Journal of Dairy Research*, 58, pp.75–84.

- Bayarri, S. et al., 2011. Texture perceived on inulin-enriched low-fat semisolid dairy desserts. Rheological and structural basis. *Journal of Texture Studies*, 42, pp.174–184.
- Béal, C. et al., 1999. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *Journal of Dairy Science*, 82(4), pp.673–681.
- Benichou, A. et al., 2007. Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocolloids*, 21, pp.379–391.
- Bertrand, M.E., 2008. Étude des propriétés gélifiantes et viscosifiantes de systèmes mixtes isolat de protéines de lactosérum-polysaccharides en conditions associatives. *Thèse de Doctorat, Université Laval, Canada*.
- Bertrand, M.E. & Turgeon, S.L., 2007. Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 21, pp.159–166.
- Bhat, S., Tuinier, R. & Schurtenberger, P., 2006. Spinodal decomposition in a food colloid – biopolymer mixture: evidence for a linear regime. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18, pp.339–346.
- Boitte, J.B. et al., 2013. A novel rheo-optical device for studying complex fluids in a double shear plate geometry. *Review of Scientific Instruments*, 84, p.13709.
- Bourriot, S., 1999. Comportement de phase, rhéologie et ultrastructure des mélanges caséines micellaires / polysides. *Thèse de Doctorat, ENSIA, Massy, France*, p.160.
- Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.L., 1999a. Micellar-casein–kappa-carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. *Carbohydrate Polymers*, 40, pp.145–157.
- Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.L., 1999b. Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein-guar gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 13, pp.43–49.
- Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.L., 1999c. Phase separation, rheology and structure of micellar casein-galactomannan mixtures. *International Dairy Journal*, 9, pp.353–357.
- Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.L., 1997. Séparation de phase, rhéologie et structure des mélanges caséine micellaire-galactomannanes. *Cahiers de Rhéologie*, 15, pp.284–293.
- Braga, A.L.M. & Cunha, R.L., 2004. The effects of xanthan conformation and sucrose concentration on the rheological properties of acidified sodium caseinate–xanthan gels. *Food Hydrocolloids*, 18, pp.977–986.
- Bryant, C.M. & McClements, D.J., 2000. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.383–390.
- Butler, M.F., 2002. Mechanism and kinetics of phase separation in a gelatin maltodextrin mixture studied by small-angle light scattering. *Biomacromolecules*, 3, pp.676–683.
- Butler, M.F. & Heppenstall-Bultler, M., 2003. Phase separation in gelatin/dextran and gelatin/maltodextrin mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17, pp.815–830.

- Capron, I., Nicolai, T. & Smith, C., 1999. Effect of addition of kappa-carrageenan on the mechanical and structural properties of beta-lactoglobulin gels. *Carbohydrate Polymers*, 40, pp.233–238.
- Cayot, P. et al., 2008. Creaminess in relation to consistency and particle size in stirred fat-free yogurt. *International Dairy Journal*, 18, pp.303–311.
- Cayot, P. et al., 2003. Improvement of rheological properties of firm acid gels by skim milk heating is conserved after stirring. *International Dairy Journal*, 70, pp.423–431.
- Cayot, P. & Lorient, D., 1998. Structures et technofonctions des protéines du lait. *Ed. Arilait Recherches, Paris : Tec & Doc, Lavoisier*.
- Chawla, R. & Patil, G.R., 2010. Soluble dietary fiber. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9, pp.178–196.
- Corredig, M. & Dalgleish, D.G., 1996. Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International*, 29(1), pp.49–55.
- Corredig, M., Sharafbafi, N. & Kristo, E., 2011. Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocolloids*, 25, pp.1833–1841.
- Cullen, P.J., 2009. Immiscible liquid-liquid mixing. In *Food mixing: principles and applications*. p. 292.
- Cutler, A., 1983. Oral perception of viscosity in fluid foods and model systems. *Journal of Texture Studies*, 14, pp.377–395.
- Cuvelier, G., 1988. Propriétés fonctionnelles de la gomme xanthane : propriétés rhéologiques en solution aqueuse et interactions avec la gomme de caroube. *Thèse de Doctorat, Universités Paris 7, Paris 11 et ENSIA, France*.
- Cuvelier, G. & Launay, B., 1986. Concentration regimes in xanthan gum solutions deduced from flow and viscoelastic properties. *Carbohydrate Polymers*, 6, pp.321–333.
- Dalgleish, D.G., 2011. On the structural models of bovine casein micelles - review and possible improvements. *Soft Matter*, 7, pp.2265–2272.
- Dalgleish, D.G. & Law, A.J.R., 1988. pH-induced dissociation of bovine casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 55, pp.529–538.
- Dalgleish, D.G. & Morris, E.R., 1988. Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of particles. *Food Hydrocolloids*, 2, pp.311–320.
- Dalgleish, D.G., Spagnuolo, P.A. & Goff, H.D., 2004. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14, pp.1025–1031.
- Dejmek, P. & Cuvelier, G., 1998. Rheological properties of stirred fermented milk products - Texture of fermented milk products & dairy desserts. *International Dairy Federation*, 2, pp.132–138.

- Dickinson, E., 1998. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein - polysaccharide interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 9, pp.347–354.
- Ding, P. et al., 2002. Interfacial tension in phase-separated gelatin/dextran aqueous mixtures. *Journal of Colloid and Interface Science*, 253, pp.367–376.
- Donato, L. & Guyomarc'h, F., 2009. Formation and properties of the whey protein / κ -casein complexes in heated skim milk – A review. *Dairy Science & Technology*, 89, pp.3–29.
- Doublier, J.L. et al., 2000. Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloids and Interface Science*, 5, pp.202–214.
- Drohan, D. et al., 1997. Milk protein-carrageenan interactions. *Food Hydrocolloids*, 11(1), pp.101–107.
- Du, B. et al., 2007. The stabilization mechanism of acidified milk drinks induced by carboxymethylcellulose. *Lait*, 87, pp.287–300.
- Duboc, P. & Mollet, B., 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, pp.759–768.
- Edmond, E. & Ogston, A.G., 1968. An approach to the study of phase separation in ternary aqueous systems. *Biochemical Journal*, 109(4), pp.569–576.
- Engelen, L. et al., 2005. Relating particles and texture perception. *Physiology & Behavior*, 86, pp.111–117.
- Espinosa-Munoz, L. et al., 2012. The significance of structural properties for the development of innovative apple puree textures. *LWT - Food Science and Technology*, 49, pp.221–228.
- Everett, D. & McLeod, R.E., 2005. Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 15(11), pp.1175–1183.
- Famelart, M.H. et al., 2004. Comprehensive study of acid gelation of heated milk with model protein systems. *International Dairy Journal*, 14, pp.313–321.
- Flory, P.J., 1942. Thermodynamics of high polymer solutions. *Journal of Chemical Physics*, 10, pp.51–61.
- Foster, T.J. et al., 1997. Emulsion behaviour of non-gelled biopolymer mixtures. In *Food Colloids - Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Eds E. Dickinson and T. Van Vliet, RSC, Cambridge. pp. 346–355.
- Foster, T.J., Brown, C.R.T. & Norton, I.T., 1996. Phase inversion of water-in-water emulsions. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 8*, Eds G.O. Phillips, P.A. Williams and D.J. Wedlock, RSC, Cambridge. pp. 297–308.
- Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H., 2003. Protein. In *Advanced Dairy Chemistry*.
- Franco Picone, C.S. & Cunha, R.L., 2010. Interactions between milk proteins and gellan gum in acidified gels. *Food Hydrocolloids*, 24, pp.502–511.

- Frith, W.J., 2010. Mixed biopolymer aqueous solutions – phase behaviour and rheology. *Advances in Colloid and Interface Science*, 161, pp.48–60.
- Fuquay, J.W., Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H., 2011. Encyclopedia of dairy science. *Elsevier, London*.
- Garnier, C. et al., 2003. Iota-carrageenan / casein micelles interactions: evidence at different scales. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, pp.177–184.
- Garnier, C., Bourriot, S. & Doublier, J.L., 1998. The use of confocal laser scanning microscopy in studying mixed biopolymer systems. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 9*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 247–256.
- Gastaldi, E., 1994. Etude de l'évolution des micelles de caséines au cours de l'acidification : Mise en évidence d'un état de transition entre pH 5,5 et 5,0. *Thèse de Doctorat, Montpellier, France*.
- Gaucheron, F., Le Graët, Y. & Schuck, P., 2004. Equilibres minéraux et conditions physicochimiques. In *Minéraux et produits laitiers*, Ed F. Gaucheron, Tec & Doc - Lavoisier, Paris.
- De Gennes, P.G., 1979. Scaling concepts in polymer physics. *Cornell University Press, New York*. p.324.
- Gentès, M.C., St-Gelais, D. & Turgeon, S.L., 2011. Gel formation and rheological properties of fermented milk with in situ exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Dairy Science & Technology*, 91, pp.645–661.
- Girard, M. et al., 2004. Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectins solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35, pp.15–22.
- Girard, M. & Schaffer-Lequart, C., 2008. Attractive interactions between selected anionic exopolysaccharides and milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 22, pp.1425–1434.
- Girard, M. & Schaffer-Lequart, C., 2007. Gelation and resistance to shearing of fermented milk: Role of exopolysaccharides. *International Dairy Journal*, 17, pp.666–673.
- Grinberg, V.Y. & Tolstoguzov, V.B., 1997. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11(2), pp.145–158.
- Gurov, A.N. et al., 1988. Equilibrium and non-equilibrium complexes between bovine serum albumin and dextran sulfate - III. Methylene blue binding by equilibrium complexes. *Food Hydrocolloids*, 2(4), pp.297–310.
- Haque, A., Richardson, R.K. & Morris, E.R., 2001. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yoghurt. *Food Hydrocolloids*, 15, pp.593–602.
- Harte, F.M. et al., 2007. Solubilized micellar calcium induced low methoxyl-pectin aggregation during milk acidification. *Journal of Dairy Science*, 90, pp.2705–2709.
- Hassan, A.N. et al., 2003. Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86, pp.1632–1638.

- Heertje, I., Visser, J. & Smits, P., 1985. Structure formation in acid milk gels. *Food microstructure*, 4, pp.267–277.
- Hemar, Y. et al., 2002. Small and large deformation rheology and microstructure of kappa-carrageenan gels containing commercial milk protein products. *International Dairy Journal*, 12, pp.371–381.
- Hemar, Y. et al., 2001. Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 15, pp.565–574.
- Herbert, S. et al., 1999. Fluorescence spectroscopy investigation of acid- or rennet-induced coagulation of milk. *Journal of Dairy Science*, 82(10), pp.2056–2062.
- Hermansson, A.M., Altskär, A. & Jordansson, E., 1998. Phase-separated mixed gelatin-milk protein systems. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 9*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 107–116.
- Higiro, J. et al., 2007. Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution: Effect of salt. *Food Research International*, 40, pp.435–447.
- Holt, C., 1992. Structure and stability of the bovine casein micelle. In *Advances in protein chemistry*, Eds C.B. Afinsen, J.D.E.D. Sall, F.K. Richards and D.S. Eisenberg. pp. 63–151.
- Holt, C. et al., 2003. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213, pp.275–284.
- Holt, C. & Horne, D.S., 1996. The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, pp.85–111.
- Horne, D.S., 2001. Factors influencing acid-induced gelation of skim milk. In *Food Hydrocolloids: Fundamental of Formulation*, Eds E. Dickinson and R. Miller, RSC, Cambridge. pp. 345–351.
- Horne, D.S., 1999. Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 9, pp.261–268.
- Houzé, G. et al., 2005. Viscoelastic properties of acid milk gel as affected by fat nature at low level. *International Dairy Journal*, 15, pp.1006–1016.
- Hui, Y.H. & Sherkat, F., 2006. Handbook of Food Science, Technology and Engineering - Volume 4.
- Hyvärinen, A. & Oja, E., 2000. Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural Network*, 13, pp.411–430.
- Imai, E. et al., 1999. Effect of physical properties of food particles on the degree of graininess perceived in the mouth. *Journal of Texture Studies*, 30, pp.59–88.
- Imai, E., Hatae, K. & Shimada, A., 1995. Oral perception of grittiness: effect of particle size and concentration of the dispersed particles and the dispersion medium. *Journal of Texture Studies*, 26, pp.561–576.

- Jacob, M. et al., 2011. Physical properties of acid milk gels: acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. *Food Hydrocolloids*, 25(5), pp.928–934.
- Jamieson, A.M., Southwick, J.G. & Blackwell, J., 1982. Dynamical behavior of xanthan polysaccharide in solution. *Journal of Polymer Science*, 20, pp.1513–1524.
- Jansson, P., Kenne, L. & Lindberg, B., 1975. Structure of the extracellular polysaccharide from *xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, 45(1), pp.275–282.
- Ji, S., Corredig, M. & Goff, H.D., 2008. Aggregation of casein micelles and kappa-carrageenan in reconstituted skim milk. *Food Hydrocolloids*, 22, pp.56–64.
- Johnson, A.H., 1978. The composition of milk. In *Fundamentals of Dairy Chemistry*, Eds B.H. Webb, A.H. Johnson and J.A. Alford, AVI Publishing, Westport, CT. pp. 1–57.
- Jones, D.B., 1941. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentage of protein. *U.S.Dept. Agric. Cir.* 183, p.22.
- De Jong, S., Klok, H.J. & van de Velde, F., 2009. The mechanism behind microstructure formation in mixed whey protein–polysaccharide cold-set gels. *Food Hydrocolloids*, 23, pp.755–764.
- De Jong, S. & van de Velde, F., 2007. Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 21, pp.1172–1187.
- Jouan-Rimbaud Bouveresse, D. et al., 2012. Two novel methods for the determination of the number of components in Independent Components Analysis models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 112, pp.24–32.
- Kalab, M. & Emmons, D.B., 1975. Milk-gel structure. IV. Microstructure of yoghurts in relation to the presence of thickening agents. *Journal of Dairy Research*, 42, pp.453–458.
- Kasapis, S. et al., 1993. Phase equilibria and gelation in gelatin/maltodextrin systems - Part III: phase separation in mixed gels. *Carbohydrate Polymers*, 21, pp.261–268.
- Katzbauer, B., 1998. Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, 59, pp.81–84.
- Kobori, T., Matsumoto, A. & Sugiyama, S., 2009. pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), pp.719–723.
- Kouame, F.A. et al., 2010. Rheological and biochemical properties of acidified milk pectin co-gels. *Journal of Food Technology*, 8(2), pp.46–51.
- Koupantsis, T. & Kiosseoglou, V., 2009. Whey protein–carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 23, pp.1156–1163.

- Kristo, E., Biliaderis, C.G. & Tzanetakis, N., 2003. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *International Dairy Journal*, 13, pp.517–528.
- De Kruif, C.G., 1998. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *Journal of Dairy Science*, 81(11), pp.3019–3028.
- De Kruif, C.G. & Tuinier, R., 2001. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15, pp.555–563.
- De Kruif, C.G., Weinbreck, F. & de Vries, R., 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, pp.340–349.
- Laligant, A. et al., 2003. Fermentation by lactic acid bacteria at two temperatures of pre-heated reconstituted milk. I - Behaviour of proteins and minerals. *Lait*, 83, pp.181–192.
- Laneuville, S.I., 2004. Interaction associative entre la bêta-lactoglobuline et le xanthane natif ou le xanthane traité aux hautes pressions hydrodynamiques. *Thèse de Doctorat, Université Laval, Canada*, p.276.
- Laneuville, S.I., Paquin, P. & Turgeon, S.L., 2000. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein-xanthan gum complexes. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.305–314.
- Langendorff, V. et al., 1999. Casein micelle / iota carrageenan interactions in milk: influence of temperature. *Food Hydrocolloids*, 13, pp.211–218.
- Langendorff, V. et al., 2000. Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.273–280.
- Langendorff, V., 1998. Etude des interactions entre micelles de caséine et carraghénane dans le lait. *Thèse de Doctorat, ENSIA, Massy, France*.
- Langendorff, V. et al., 1997. Gelation and flocculation of casein micelle/carrageenan mixtures. *Food Hydrocolloids*, 11(1), pp.35–40.
- Langton, M. et al., 1997. Effect of microstructure on sensory perception of particulate gels. In *Food Colloids - Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Eds E. Dickinson, B. Bergenstahl, RSC, Cambridge. pp. 18–28.
- Launay, B., Cuvelier, G. & Martinez-Reyes, S., 1997. Viscosity of locust bean, guar and xanthan gum solutions in the Newtonian domain: a critical examination of the $\log(\eta_{sp})_0 - \log C[\eta]_0$ master curves. *Carbohydrate Polymers*, 34, pp.385–395.
- Lazaridou, A., Vaikousi, H. & Biliaderis, C.G., 2008. Impact of mixed-linkage (1-3, 1-4) beta-glucans on physical properties of acid-set skim milk gels. *International Dairy Journal*, 18, pp.312–322.
- Lee, W.J. & Lucey, J.A., 2004. Structure and physical properties of yogurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. *Journal of Dairy Science*, 87, pp.3153–3164.

- Lorén, N., 2001. Structure evolution during phase separation and gelation of biopolymer mixtures. *PhD Thesis, Chalmers University of Technology, Sweden*.
- Lorén, N. & Hermansson, A.M., 2000. Phase separation and gel formation in kinetically trapped gelatin/maltodextrin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(4), pp.249–262.
- Lorén, N. & Hermansson, A.M., 2003. Structure evolution during phase separation and gelation of biopolymer mixtures. In *Food Colloids - Biopolymers and Materials*, Eds E. Dickinson and T. van Vliet, RSC, Cambridge. pp. 298–308.
- Lorén, N., Langton, M. & Hermansson, A.M., 1999. Confocal laser scanning microscopy and image analysis of kinetically trapped phase-separated gelatin/maltodextrin gels. *Food Hydrocolloids*, 13, pp.185–198.
- Lucey, J.A., Tamehana, M., et al., 1998. A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-delta-lactone. *Food Research International*, 31(2), pp.147–155.
- Lucey, J.A. et al., 1996. Effect of acidification and neutralization of milk on some physico-chemical properties of casein micelles. *International Dairy Journal*, 6, pp.257–272.
- Lucey, J.A. et al., 2001. Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid. *International Dairy Journal*, 11, pp.559–565.
- Lucey, J.A., Teo, C.T., et al., 1998. Microstructure, permeability and appearance of acid gels made from heated skim milk. *Food Hydrocolloids*, 12, pp.159–165.
- Lucey, J.A. et al., 1997. Properties of acid casein gels made by acidification with glucono-delta-lactone. 1. Rheological properties. *International Dairy Journal*, 7, pp.381–388.
- Lucey, J.A., Munro, P.A. & Singh, H., 1999. Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, 9, pp.275–279.
- Lundin, L. et al., 2000. Phase separation in mixed biopolymer systems. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 10*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 169–180.
- Lundin, L., Williams, M.A.K. & Foster, T.J., 2003. Phase separation in foods. In *Texture in Food Volume 1: Semi-Solid Food*, Ed B.M. McKenna, Woodhead Publishing Limited. pp. 63–85.
- Van Marle, M.E. et al., 1999. Steady-shear viscosity of stirred yoghurts with varying ropiness. *Journal of Rheology*, 43, pp.47–65.
- Van Marle, M.E., 1998. Structure and rheological properties of yoghurt gels and stirred yoghurts. *PhD Thesis, University of Twente, Enschede, The Netherlands*.
- Maroziene, A. & de Kruif, C.G., 2000. Interaction of pectin and casein micelles. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.391–394.

- Martin, A.H. et al., 2006. Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM). *Food Hydrocolloids*, 20, pp.817–824.
- Matia-Merino, L., Lau, K. & Dickinson, E., 2004. Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. *Food Hydrocolloids*, 18, pp.271–281.
- Matia-Merino, L. & Singh, H., 2007. Acid-induced gelation of milk protein concentrates with added pectin: Effect of casein micelle dissociation. *Food Hydrocolloids*, 21, pp.765–775.
- Matignon, A., 2013. Développement d'outils pour la conception raisonnée de dessert laitier neutre - Amélioration de la compréhension des interactions physico-chimiques entre les ingrédients, de la mise en place de la structure et de son impact sur la perception sensorielle des produits. *Thèse de Doctorat, AgroParisTech, Massy, France*.
- McMahon, D.J. et al., 2009. Microstructural changes in casein supramolecules during acidification of skim milk. *Journal of Dairy Science*, 92(12), pp.5854–5867.
- McMahon, D.J. & Oommen, B.S., 2008. Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, 91(5), pp.1709–1721.
- Mende, S. et al., 2013. Concentration dependent effects of dextran on the physical properties of acid milk gels. *Carbohydrate Polymers*, 98, pp.1389–1396.
- Michon, C., 1995. Etude des gels de gélatine, de iota-carraghénane et de leurs mélanges. *Thèse de Doctorat, Université Paris VII, Université de Paris XI et ENSIA, Massy, France*.
- Michon, C. et al., 2002. Gelatin/carrageenan interactions in coil and ordered conformations followed by a methylene blue spectrophotometric method. *Food Hydrocolloids*, 16, pp.613–618.
- Michon, C. et al., 2000. Gelatin/iota-carrageenan interactions in non-gelling conditions. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.203–208.
- Michon, C. et al., 1997. Interactions in mixtures of gelatin and iota-carrageenan. In *Food Colloids - Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Eds E. Dickinson & B. Bergenstahl, RSC, Cambridge. pp. 316–325.
- Michon, C. et al., 2003. Structure and Properties of Carrageenan+Micellar Casein Mixtures. In *Food Colloids - Proteins, Lipids and Polysaccharides*, Eds E. Dickinson and T. Van Vliet, RSC, Cambridge. pp. 345–353.
- Michon, C., Bosc, V. & Cuvelier, G., 2010. Gels de biopolymères naturels pour formulation agroalimentaire. *Techniques de l'Ingénieur*.
- Morand, M., Guyomarc'h, F. & Famelart, M.H., 2011. How to tailor heat-induced whey protein/ κ -casein complexes as a means to investigate the acid gelation of milk—a review. *Dairy Science & Technology*, 91(2), pp.3–29.

- Morris, V.J., 1986. Multicomponent gels. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 3*, Eds G.O. Phillips, D.J. Wedlock and P.A. Williams, RSC, Cambridge. pp. 87–99.
- Morris, V.J., 2006. Probing food structure. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 13*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 3–11.
- Morris, V.J., Franklin, D. & I'Anson, K., 1983. Rheology and microstructure of dispersions and solutions of the microbial polysaccharides from *Xanthomonas campestris* (xanthan gum). *Carbohydrate Research*, 121, pp.13–30.
- Mottar, J. et al., 1989. Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yoghurt texture. *Journal of Dairy Science*, 72, pp.1744–1751.
- Muller, G. et al., 1986. Salt dependence of the conformation of a single-stranded xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8, pp.167–172.
- Nandini, R. & Vishalakshi, B., 2011. Spectrophotometric study of interaction between sodium carrageenate and cationic dyes. *E-Journal of Chemistry*, 8, pp.253–265.
- Narchi, I., Vial, C. & Djelveh, G., 2009. Effect of protein-polysaccharide mixtures on the continuous manufacturing of foamed food products. *Food Hydrocolloids*, 23, pp.188–201.
- Niki, R., Motoshima, H. & Tsukasaki, F., 2000. Viscoelastic properties of acid-induced milk gel at different gelation temperatures. In *Hydrocolloids, Part 1*, Ed. K. Nishinari, Elsevier Science. pp. 447–451.
- Nono, M. et al., 2011. Cluster formation and phase separation in mixtures of sodium kappa-carrageenan and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 25, pp.743–749.
- Norton, I.T. & Frith, W.J., 2001. Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), pp.543–553.
- Norton, I.T. & Frith, W.J., 2003. Phase separation in mixed biopolymer systems. In *Food Colloids - Biopolymers and Materials*, Eds E. Dickinson and T. van Vliet, RSC, Cambridge. pp. 282–297.
- Ono, T. & Obata, T., 1989. A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits. *Journal of Dairy Research*, 56, pp.453–461.
- Ould Eleya, M.M. & Turgeon, S.L., 2000. Rheology of kappa-carrageenan and beta-lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.29–40.
- Pacek, A.W., Ding, P. & Norton, I.T., 2003. Effect of temperature and hydrodynamic conditions on structure and drop size in a phase-separated gelatin+dextran system. In *Food Colloids - Biopolymers and Materials*, Eds E. Dickinson and T. van Vliet, RSC, Cambridge. pp. 309–318.
- Payens, T.A.J., 1966. Association of caseins and their possible relation to structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, 11, pp.1317–1325.

- Peng, Y., Horne, D.S. & Lucey, J.A., 2009. Impact of preacidification of milk and fermentation time on the properties of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 92, pp.2977–2990.
- Perez, A.A. et al., 2009. Interactions between milk whey protein and polysaccharide in solution. *Food Chemistry*, 116, pp.104–113.
- Perrechil, F.A., Braga, A.L.M. & Cunha, R.L., 2009. Interactions between sodium caseinate and LBG in acidified systems: Rheology and phase behavior. *Food Hydrocolloids*, 23, pp.2085–2093.
- Polyakov, V.I., Grinberg, V.Y. & Tolstoguzov, V.B., 1997. Thermodynamic incompatibility of proteins. *Food Hydrocolloids*, 11(2), pp.171–180.
- Van Puyvelde, P., Antonov, Y.A. & Moldenaers, P., 2003. Morphology evolution of aqueous biopolymer emulsions during a weak shear flow. *Food Hydrocolloids*, 17, pp.327–332.
- Ramaswamy, H.S. & Basak, S., 1991. Rheology of stirred yoghurts. *Journal of Texture Studies*, 22, pp.231–241.
- Redigueri, C.F. et al., 2007. Thermodynamic incompatibility and complex formation in pectin/caseinate mixtures. *Biomacromolecules*, 8(11), pp.3345–3354.
- Renan, M. et al., 2008. Changes in the rheological properties of stirred acid milk gels as induced by the acidification procedure. *Dairy Science & Technology*, 88, pp.341–353.
- Renan, M. et al., 2009. Rheological properties of stirred yoghurt as affected by gel pH on stirring, storage temperature and pH changes after stirring. *International Dairy Journal*, 19, pp.142–148.
- Renard, D., Boué, F. & Lefebvre, J., 1998. Solution and gelation properties of protein-polysaccharide mixtures: signature by small-angle neutron scattering and rheology. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 9*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 189–201.
- Renard, D., van de Velde, F. & Visschers, R.W., 2006. The gap between food gel structure, texture and perception. *Food Hydrocolloids*, pp.423–431.
- Ribadeau Dumas, B. & Garnier, J., 1970. Structure of the casein micelle. The accessibility of the subunits to various reagents. *Journal of Dairy Research*, 37, pp.269–278.
- Ribadeau Dumas, B. & Grappin, R., 1989. Milk protein analysis. *Lait*, 69, pp.357–416.
- Rocheft, W.E. & Middleman, S., 1987. Rheology of xanthan gum: salt, temperature and strain effects in oscillatory and steady shear experiments. *Journal of Rheology*, 31(4), pp.337–369.
- Rohart, A. & Michon, C., 2014. Phase separation and gel formation in kinetically-trapped guar gum/acid milk gels. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 17*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 205–213.
- Ruas-Madiedo, P. et al., 2002. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal*, 12, pp.689–695.

- Rutledge, D.N. & Barros, A.S., 2002. Durbin-Watson statistic as a morphological estimator of information content. *Analytica Chimica Acta*, 454, pp.277–295.
- Rutledge, D.N. & Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., 2013. Independent Components Analysis with the JADE algorithm. *Trends in Analytical Chemistry*, 50, pp.22–32.
- Sanchez, C. et al., 2000a. Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. *International Dairy Journal*, 10, pp.199–212.
- Sanchez, C. et al., 2000b. Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. *International Dairy Journal*, 10(3), pp.199–212.
- Sanchez, C. et al., 2002. Self-assembly of beta-lactoglobulin and acacia gum in aqueous solvent: structure and phase-ordering kinetics. *Langmuir*, (18), pp.10323–10333.
- Sanchez, C., Mekhloufi, G. & Renard, D., 2006. Complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum: a nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299, pp.867–873.
- Schmidt, D.G., 1982. Association of caseins and casein micelle structure. In *Developments in Dairy Chemistry*, Ed. F. Fox, Applied Science Publishers, London. pp. 61–86.
- Schmitt, C. & Turgeon, S.L., 2007. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167, pp.63–70.
- Schoenberg, M.D. & Moore, R.D., 1964. The conformation of hyaluronic acid and chondroitin sulfate C: the metachromatic reaction. *Biochimica Acta*, 83, pp.42–51.
- Schorsch, C., Jones, M.G. & Norton, I.T., 2000. Phase behaviour of pure micellar casein/k-carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.347–358.
- Schorsch, C., Jones, M.G. & Norton, I.T., 1999. Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 13, pp.89–99.
- Shama, F. & Sherman, P., 1973. Identification of stimuli controlling the sensory evaluation of viscosity. II. Oral methods. *Journal of Texture Studies*, 4(1), pp.111–118.
- Shirai, M., Nagaika, Y. & Tanaka, M., 1977. Interaction between dyes and polyelectrolytes. IV. Metachromatic behavior of methylene blue induced by poly(vinylphenol). *Journal of Polymer Science*, 15, pp.1021–1025.
- Sieffermann, J.M., 2000. Le profil flash : un outil rapide et innovant d'évaluation sensorielle descriptive. In *AGORAL 2000 – XIIèmes rencontres « L'innovation : de l'idée au succès »*, Montpellier, France. pp. 335–340.
- Simonet, F., 2000. Comportement de phase, rhéologie et structure de mélanges de polyosides en présence de protéines. *Thèse de Doctorat, Université de Paris 6, Paris, France*.

- Snoeren, T.H.M. et al., 1975. Electrostatic interaction between kappa-carrageenan and kappa-casein. *Milchwissenschaft*, 30, pp.393–395.
- Snoeren, T.H.M., 1976. Kappa-carrageenan. A study of its physico-chemical properties, sol-gel transition and interactions with milk. *PhD Thesis, Wageningen, The Netherlands*.
- Southwick, J.G. et al., 1980. Self association of xanthan in aqueous solvent systems. *Carbohydrate Research*, 84, pp.287–295.
- Spagnuolo, P.A. et al., 2005. Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 19, pp.371–377.
- Spyropoulos, F., Portschi, A. & Norton, I.T., 2010. Effect of sucrose on the phase and flow behaviour of polysaccharide protein aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloids*, 24, pp.217–226.
- Dello Staffolo, M. et al., 2004. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, 14, pp.263–268.
- Stone, J.V., 2004. Independent Component Analysis – A Tutorial Introduction. In *A Bradford book, Cambridge (MA)*.
- Swaigood, H.E., 1982. Chemistry of milk protein. In *Developments in Dairy Chemistry*, Ed F. Fox, Applied Science Publishers, London. pp. 1–59.
- Syrbe, A., Bauer, W.J. & Klostermeyer, H., 1998. Polymer science concepts in dairy systems - An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8, pp.179–193.
- Tafulo, P.A.R., Queiros, R.B. & Gonzalez-Aguilar, G., 2009. On the “concentration-driven” methylene blue dimerization. *Spectrochimica Acta Part A*, 73, pp.295–300.
- Tamine, A.Y., 2009. Structure of dairy products - Microstructure of milk components. In *Dairy Powders and Concentrated Products*, Wiley. pp. 63–71.
- Tamine, A.Y. & Robinson, R.K., 2007. Tamine and Robinson’s Yoghurt Science and Technology. *Third edition, CRC Press LLC*. pp.67–84.
- Tamine, A.Y. & Robinson, R.K., 1999. Yoghurt: science and technology. *Second edition. CRC Press LLC, Boca Raton, FL*.
- Tan, Y.L., Singh, H. & Hemar, Y., 2007. Effects of biopolymer addition on the dynamic rheology and microstructure of renneted skim milk systems. *Journal of Texture Studies*, 38, pp.404–422.
- Tanglertpaibul, T. & Rao, M.A., 1987. Intrinsic viscosity of tomato serum as affected by methods of determination and methods of processing concentrates. *Journal of Food Science*, 52(6), pp.1642–1688.

- Tarea, S., 2005. Etude de la texture de suspensions de particules molles concentrées. Relations entre la structure, la rhéologie et la perception sensorielle. Application aux purées de pommes et poires et mise au point de milieux modèles. *Thèse de Doctorat, ENSIA, Massy, France*, p.335.
- Thaiudom, S. & Goff, H.D., 2003. Effect of kappa-carrageenan on milk protein polysaccharide mixtures. *International Dairy Federation*, 13, pp.763–771.
- Tolstoguzov, V.B., 1991. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4(6), pp.429–468.
- Tolstoguzov, V.B., 1986. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In *Functional properties of food macromolecules*, Eds J.R. Mitchell and D.A. Ledward. Elsevier Applied Science, London. pp. 385–415.
- Tolstoguzov, V.B., 2007. Ingredient interactions in complex foods: aggregation and phase separation. In *Understanding and controlling the microstructure of complex foods*, Eds D.J. McClements. pp. 185–206.
- Tolstoguzov, V.B., 1995. Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. *Food Hydrocolloids*, 9(4), pp.317–332.
- Tolstoguzov, V.B., 2003. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17(1), pp.1–23.
- Tromp, R.H., Edelman, M.W. & van der Linden, E., 2004. Gelatin/dextran solutions - A model for food polymer mixtures. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 12*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 201–210.
- Tuinier, R., Grotenhuis, E. & de Kruif, C.G., 2000. The effect of depolymerised guar gum on the stability of skim milk. *Food Hydrocolloids*, 14, pp.1–7.
- Tuinier, R. & de Kruif, C.G., 1998. Depletion flocculation of casein micelles induced by the EPS of a lactic acid bacterium. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 9*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 222–230.
- Tuinier, R. & de Kruif, C.G., 2002. Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics*, 117(3), pp.1290–1295.
- Tuinier, R., Rolin, C. & de Kruif, C.G., 2002. Electrosorption of pectin onto casein micelles. *Biomacromolecules*, pp.632–638.
- Turgeon, S.L. et al., 2003. Protein–polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloids and Interface Science*, 8, pp.401–414.
- Tyle, P., 1993. Effect of size, shape and hardness of particles in suspension on oral texture and palatability. *Acta Psychologica*, 84(1), pp.111–118.
- Tziboula, A. & Horne, D.S., 1999. Influence of milk proteins on kappa-carrageenan gelation. *International Dairy Journal*, 9, pp.359–364.

- Vasbinder, A.J., Alting, A.C. & de Kruif, K.G., 2003. Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, pp.115–123.
- Vasbinder, A.J. & de Kruif, C.G., 2003. Casein-whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. *International Dairy Journal*, 86, pp.669–677.
- Vasiljevic, T., Kealy, T. & Mishra, V.K., 2007. Effects of beta-glucan addition to a probiotic containing yogurt. *Journal of Food Science*, 72, pp.405–411.
- Van de Velde, F. et al., 2005. The structure of k/i-hybrid carrageenans II. Coil–helix transition as function of chain composition. *Carbohydrate Research*, 340, pp.1113–1129.
- Vétier, N. et al., 1997. Effect of temperature and acidification rate on the fractal dimension of acidified casein aggregates. *Journal of Dairy Science*, 80, pp.3161–3166.
- Walstra, P., 1999. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9, pp.189–192.
- Walstra, P. & Jenness, R., 1984. *Dairy Chemistry and Physics*. New York: John Wiley & Sons.
- Wolf, B., Frith, W.J. & Norton, I.T., 2001. Influence of gelation on particle shape in sheared biopolymer blends. *Journal of Rheology*, 45, pp.1141–1157.
- Wolf, B., Frith, W.J. & Norton, I.T., 2002. Morphology control in disperse biopolymer mixtures with at least one gelling component. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 11*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips, RSC, Cambridge. pp. 112–119.
- Xu, Z.-M. et al., 2008. Effects of heating temperature and fat content on the structure development of set yogurt. *Journal of Food Engineering*, 85(4), pp.590–597.
- Zasypkin, D.V., Braudo, E.E. & Tolstoguzov, V.B., 1997. Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*, 11(2), pp.159–170.
- Zoon, P., 2003. Viscosity, smoothness and stability of yoghurt as affected by structure and EPS functionality - Fermented Milk. *International Dairy Federation*, pp.280–289.
- Zoon, P. & van Marle, M.E., 1998. Relation between the consistency of stirred yoghurt and the structure of the yoghurt gel - Texture of fermented milk products & dairy desserts. *International Dairy Federation*, 2, pp.122–127.

ACTE DE CONFÉRENCES

InsideFood Symposium, 9-12 April 2013, Leuven, Belgium

Designing microstructure into acid skim milk/guar gum gels

Anne Rohart^{a,b,c} and Camille Michon^{a,b,c}

^a *AgroParisTech, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, 1 avenue des Olympiades, F- 91300 Massy, France*

^b *INRA, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, 1 avenue des Olympiades, F- 91300 Massy, France*

^c *CNAM, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, 292 rue Saint-Martin, F- 75003 Paris, France*

ABSTRACT

The possibility of designing various microstructures through the interplay between phase separation due to depletion mechanisms and gelation process due to acid-induced casein micelles aggregation was investigated. Acid skim milk/guar gum gels were prepared at different guar gum and glucono- δ -lactone (GDL) concentrations in order to be able to modulate the extent of phase separation and the gelation rate. Results obtained by using microscopy and rheological measurements indicated that at low guar gum concentrations a denser network was formed whereas higher guar gum concentrations lead to filamentous or protein-rich droplets in a guar gum continuous phase with fluid-like properties. Changing GDL concentration, *i.e.* gelation rate, provoked a shift in microstructure and rheological properties of the mixed gels. It suggested that milk gelation process had the effect of stopping phase separation at some intermediate state, generating controlled microstructures varying in size and shape from elongated to droplet-like.

1 INTRODUCTION

During the production of acid milk gels, the pH of the milk is lowered from 6.8 to 4-4.5 using either bacterial cultures, which ferment lactose into lactic acid, or using glucono- δ -lactone (GDL), which mimics the bacterial fermentation. This process leads to a network of three-dimensional casein strands aggregated through iso-electric precipitation. The casein strands can be broken apart by shearing, providing stirred acid milk gels (Tamime & Robinson, 1999). The kinetics and the dynamics of the formation of casein gels can be controlled by varying the glucono- δ -lactone (GDL) amount to produce different acidification rates (Horne, 2001). Whereas the aggregation and gelation of casein micelles as a result of acidification have frequently been studied (Lucey, 2002), the presence of polysaccharides during the acid-induced gelation leads to another degree of complexity of milk protein systems. Polysaccharides such as guar gum, locust bean gum, xanthan gum or pectin can

be used in acid milk gels to modify the rheological properties (Sanchez et al., 2000; Everett & McLeod, 2005; Doublier et al., 2000). It has been shown that the addition of guar gum to the skim milk at the natural pH of the mixtures results in a segregative phase separation between the micellar casein and guar gum described by a depletion-flocculation mechanism (Bourriot et al., 1999; Tuinier et al., 2000). When acidified with a low guar gum concentration, the acid mixed systems showed a more compact aggregate structure. With higher concentrations, aggregated caseins are trapped within a viscous polysaccharide solution (Everett & McLeod, 2005). Thus gelation of one phase appears as a competing event and will arrest the process of the phase separation at some intermediate state. This phenomenon was well illustrated using mixtures of gelatin and dextran or maltodextrin (Lorén & Hermansson, 2000; Norton & Frith, 2001; Van Puyvelde et al., 2003).

The main objective of this work was to illustrate how the microstructure and rheological behaviour of food material can be designed, considering the competition between phase separation and gel formation. For this purpose, the effect of guar gum on the microstructural and rheological properties of stirred acid skim milk gels was investigated.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Mixed gels manufacture

Skim milk with 46 g.kg⁻¹ of proteins was prepared with low-heat skim milk powder (CH low heat, Ingredia, Arras, France) dissolved in Milli-Q water (made by reverse osmosis followed by filtration through a Milli-Q apparatus) using a magnetic stirrer for 1 h at room temperature. The reconstituted skim milk was then left to fully hydrate overnight in a refrigerator. The milk was heat-treated in a thermostatically controlled water bath at 80°C for 7 min, and cooled to 60°C for dry powdered guar gum addition. The mixture was stirred for a further 30 min at 60°C and finally cooled to 43°C. Skim milk/guar gum mixed solutions were prepared at guar gum concentrations from 0 to 0.5 wt%.

The acidification of the milk was obtained by addition of different levels (1, 1.5 or 2.5 wt%) of GDL (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) at 43°C under stirring for 1 min. Immediately after the GDL addition, the milk was poured into plastic cylinders (30 mm diameter X 65 mm height) and placed in an incubator at 43°C until a pH of 4.60 (±0.05) for 1.5 and 2.5 wt% GDL or pH of 4.7 (±0.05) for 1 wt% GDL was reached. The pH was measured in parallel with a pH meter Consort D130 multiparameter analyzer (Turnhout, Belgium). Acid milk gels were stored at 4°C for 1 day until required analysis. For stirred gels preparation, after cooling down to 20°C for 1 h in tap water, the

gels were broken and stirred by forcing the gels with a peristaltic pump through two successive plastic pipes (length: 40 cm and internal diameter: 7 mm; length: 100 cm and internal diameter: 3 mm) with a mesh of 500 μm holes at the end. Strongest gels, typically those with strand-like structure, could not be forced through the filter and were only stirred in the pipes to obtain a homogeneous gel.

For phase separation observations, milk samples (4 mL) were poured and let acidify in glass tubes (inner diameter 6.1 mm) and then stored at 4°C overnight after reaching a pH of 4.60 (± 0.05) for 1.5 and 2.5 wt% GDL or pH of 4.7 (± 0.05) for 1 wt% GDL or 5 h for the non acidified mixture. The value of height fraction of supernatant enriched in guar gum and/or whey was calculated as the ratio of the height of top layer (H) to the total height of the sample (H_0).

2.1 Instrumental characterization (microstructure and rheological measurements)

Epifluorescence microscopy was used to visualize the microstructure of the stirred mixed gels using an Olympus BX51 microscope (Olympus America, Lake Success, NY). Nile Red was dispersed in the samples (25 μL in 1 g of sample) in order to stain the proteins. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was performed with a Leica TCS AOBS SP2 microscope (Leica, Germany). Proteins were labelled by addition of DyLight 549 (20 μL in 1 g of sample). DyLight 549 was excited using a helium-neon laser with wavelength 543 nm and the fluorescence was detected with a photomultiplier. The samples were placed on a microscope slide with a glass coverslip on the surface. All measurements were carried out 1 day after mixed gels manufacture.

Rheological measurements of stirred acid milk gels were performed using a stress-controlled rheometer (Carri-Med CSL²100, TA Instruments, UK). Stainless steel plate and cone (diameter 60 mm, 4° angle) geometries were used to this measurement. The frequency sweep measurements were performed within the linear domain, in the range of 0.01-10 Hz. The $\tan \delta$ ($=G''/G'$) was calculated at the frequency of 0.5 Hz.

3 RESULTS

3.1 Phase separation behaviour of set acid skim milk/guar gum gels

Fig. 1a shows the pH decrease as a function of time after adding various amounts of GDL to skim milk. The initial pH of the sample was 6.8 and dropped to approximately 4.6 after 2 h or 50 min with addition of 1.5 or 2.5 wt% GDL respectively and to 4.7 after 4 h with addition of 1 wt% GDL. With a decrease in the pH, the casein micelles become unstable and flocculation takes place around

pH 5.2 for heated milk (Lucey, 2002). From the pH decrease kinetics it is possible to notice that the reduction of pH was faster and the time needed for the casein micelles to flocculate was lower for higher GDL concentrations. This implies that the gelation time decreased with increasing amount of GDL. Thus these curves can be used to identify the amount of GDL required for a certain acidification rate.

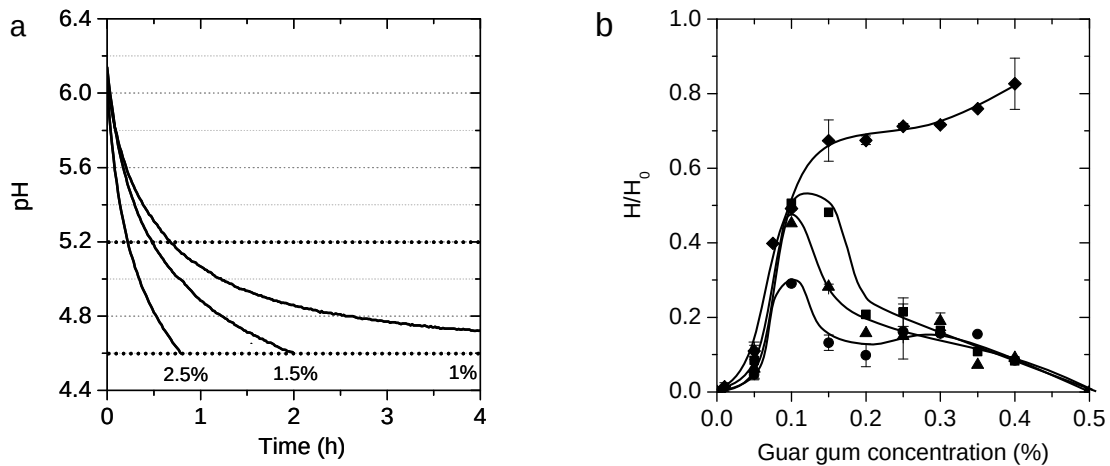


Fig. 1 Effect of GDL concentration on: **a** pH kinetic after various amounts of GDL addition (1, 1.5, 2.5 wt%). Values are means from triplicate experiments; **b** macroscopic phase separation of the gels formed at 43°C until pH 4.6 for acidified gels from skim milk + various concentrations (wt%) of guar gum observed 24 h after GDL addition (1 (■), 1.5 (▲) and 2.5 wt% (●)) or non-acidified mixtures kept 5 h at 43°C (◆)

The height fraction of supernatant in acid skim milk/guar gum gels is shown in Fig. 1b for the three GDL concentrations studied and in non-acidified skim milk/guar gum mixture. The drawn lines serve to guide the eye. Only 0.01 wt% guar gum is required to induce phase separation in guar gum/skim milk at pH 6.8. The supernatant is composed of a whey or guar gum solution or both of them. There is a clear increase in height fraction of supernatant up to 0.15 wt% guar gum followed by a stabilization for higher guar gum concentrations. Working on casein micelles/guar gum mixtures, Bourriot, Garnier & Doublier (1999) showed that phase separation was due to a phenomenon of depletion. The stabilization of height fraction of supernatant for guar gum concentration above 0.2 wt% behaviour can be attributed to the high viscosity of mixed systems that hinders phase separation. Thus the phase separation may be severely retarded. Phase separation was not observed for more than 0.5 wt% guar gum on the experimental time.

When acidified with 1, 1.5 or 2.5 wt% GDL, the height fraction of supernatant of the mixed gels showed a characteristic maximum between 0.1 and 0.2 wt% guar gum and then decreased. These observations are in agreement with those obtained with locust bean gum at 0.1 wt% by Sanchez et al.,

2000. They reported an increase of the porosity of the acid skim milk/locust bean gum gels leading to apparent whey off. No phase separation appeared above 0.4 wt% guar gum. This behaviour is similar for the three GDL concentrations. As the GDL concentration increased, the extent of phase separation was lower for guar gum concentrations higher than 0.1 wt%. Thus a faster gelation rate, determined by the GDL concentration, reduces phase separation. As a result, a quick or retarded gelation of the proteins allowed or not the phase separation process before the formation of the protein network.

3.2 Microstructure of stirred acid skim milk/guar gum gels

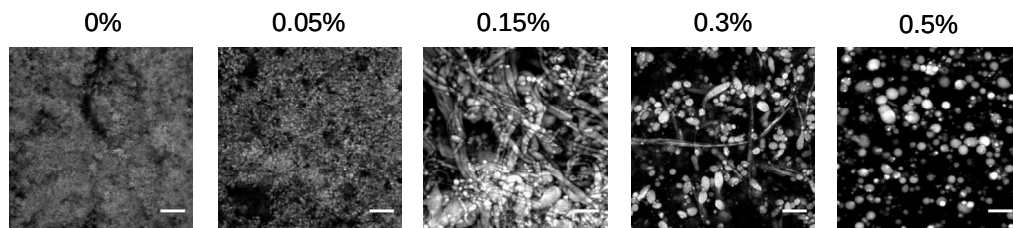


Fig. 2 Microstructure of acid milk/guar gum gels at pH 4.6 containing various guar gum concentrations (0-0.5 wt%) indicated in the figure as determined by CLSM at a fixed amount of GDL (1.5 wt%). Scale bars indicate 100 μm .

The microstructure of stirred acid milk gels with fixed amount of GDL (1.5 wt%) and increasing concentrations of guar gum are shown in Fig. 2. The white areas indicate the protein stained by DyLight 549, while the dark areas correspond to zones devoid of protein, thus containing whey or exuded guar gum. Acid milk gels with no added guar gum were homogeneous, but when 0.05 wt% guar gum was added, the casein micelles tended to form a denser network with larger dark voids in between. With further addition of guar gum (0.15, 0.3 wt%) the area of protein network decreased. Filamentous morphology appeared for 0.15 wt% of guar gum while a mix of filamentous structures and deformed droplets (from 10 to more than 100 μm) dispersed in a continuous guar gum-rich phase was found for 0.3 wt% guar gum concentration. The protein-rich droplets became smaller and more spherical as guar gum concentration continues to increase up to 0.5 wt%. It should be noted that filamentous structures and droplets existed before stirring the acid gels and were not oriented after stirring. As far as we know, such microstructures have never been reported previously for acid skim milk/guar gum gels.

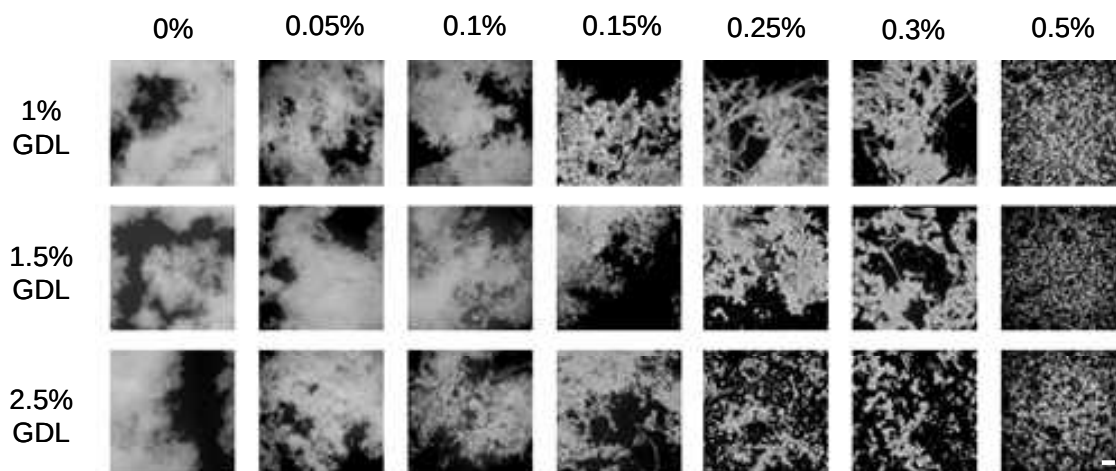


Fig. 3 Microstructure of acid milk/guar gum gels at pH 4.6 containing various guar gum concentrations (0-0.5%) indicated in the figure in wt% as determined by epifluorescence microscopy at three different GDL concentrations (1, 1.5, 2.5 wt%). Scale bar indicates 100 μm .

Fig. 3 illustrates the change in microstructure with increasing levels of guar gum at three different GDL concentrations. Epifluorescence micrographs at 1.5 wt% GDL revealed the same features as CLSM, *i.e.* a transformation of the structure from an homogeneous to very porous network, then into organized filamentous structures and finally into protein-rich droplets depending on the guar gum concentration. The microstructure of the gels acidified with 1 or 2.5 wt% GDL is comparable to those observed for 1.5 wt% GDL concentration, although it was shifted from homogeneous protein network to protein-rich droplets at lower guar gum concentration when GDL concentration increased from 1 to 2.5 wt%. For instance filamentous morphology appeared from 0.1 wt% guar gum for 2.5 wt% GDL whereas it is observed from 0.15 wt% for lower GDL concentrations.

3.3 Rheological properties of stirred acid skim milk/guar gum gels

Fig. 4a shows the viscoelastic behaviour of stirred milk protein/guar gum gels acidified with 1.5 wt% GDL by means of the mechanical spectra (G' and G'' as a function of frequency) measured at 4°C. The gels without guar gum or with low guar gum concentration (below 0.3 wt% guar gum) exhibited a solid-like behaviour with the G' values higher than G'' values, and both G' and G'' showing little dependence on frequency. Adding a high guar gum concentration yielded a dramatic change in the viscoelastic properties of the system. This is clearly illustrated for 0.3 and 0.5 wt% guar gum. The solid-like behaviour of the systems tends to disappear with a loss of connectivity in the network. Instead, a strong frequency dependence of dynamic moduli (G' and G'') was observed for those samples with the viscous component exceeding the elastic one for frequency values lower than

2.5 Hz and 1.5 Hz respectively, indicating a fluid-like behaviour. Therefore, when guar gum was added to the skim milk system, the mechanical spectra changed significantly, indicating the transition from a structured system to an entangled polymer solution. The variation of $\tan \delta$ as a function of guar gum concentration in Fig. 4b for 1.5 wt% GDL illustrates this clear change in rheological properties of mixed gels. As the GDL concentration increased, the transition from a structured system to an entangled solution occurred for lower guar gum concentrations (Fig. 4b). In the case of 2.5 wt% GDL $\tan \delta$ began to increase from 0.2 wt% guar gum whereas it was stable until 0.25 wt% guar gum for 1 wt% GDL addition. However it is worth noting that the value of $\tan \delta$ was similar for the three GDL concentrations studied for low guar gum concentrations (below 0.2 wt%) and high concentrations (above 0.4 wt%).

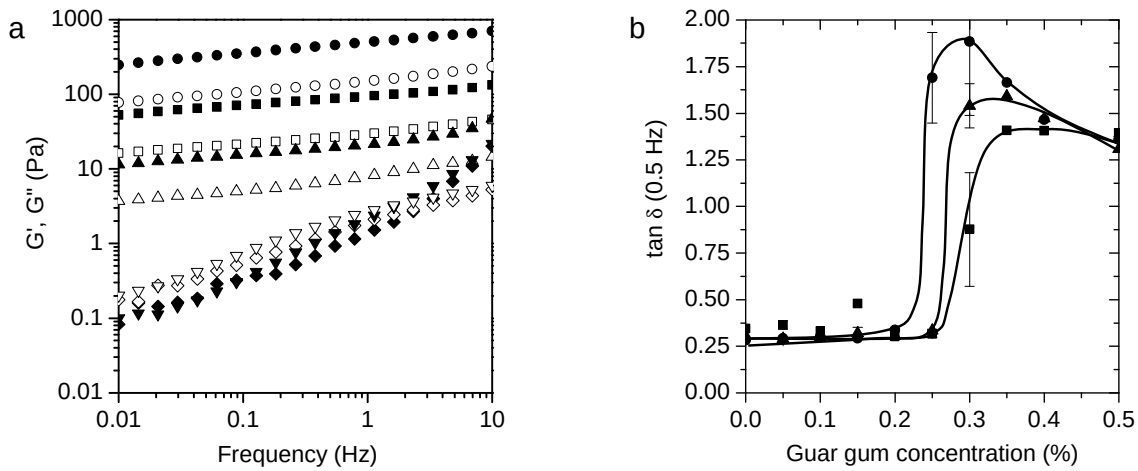


Fig. 4. **a** Mechanical spectra of stirred acid milk gels with different guar gum concentrations (0 (■), 0.05 (●), 0.15 (▲), 0.3 (◆) or 0.5 wt% (▼) acidified with 1.5 wt% GDL (G' , filled symbols; G'' , empty symbols). **b** Variation of $\tan \delta$ values at 0.5 Hz of stirred acid milk gels with different guar gum concentrations acidified with 1 (■), 1.5 (▲) and 2.5 wt% (●) GDL.

4 DISCUSSION

The mixed acid skim milk/guar gum gels showed different behaviours exhibiting distinctive microstructures and mechanical properties. The microstructures resulted from the competition between the gel formation of the protein and the phase separation process between protein and guar gum. Phase separation in skim milk/guar gum is likely to be due to flocculation of casein micelles by depletion mechanisms (Bourriot et al., 1999; Tuinier et al., 2000). However, acidification of milk leads to a gelation phenomenon. In a complex biopolymer mixture that undergoes phase separation and gelation at the same time, the later arrests the phase separation (Norton & Frith, 2001; Tolstogunov, 2003). Playing on the gelation rate but also on the phase separation extent allows

obtaining various final macro- and microstructures. Adding increasing amounts of guar gum to acid skim milk gels induced the creation of different microstructures. At low guar gum concentrations the stirred gel microstructures are characterized by a micro-phase separation into the protein network explaining the high porosity and the high level of syneresis. During milk acidification, the balance between aggregation of concentrated casein micelles and volume exclusion effects results in compaction of the casein network and thus to stronger stirred gels (Sanchez et al., 2000; Everett & McLeod, 2005). Exceeding a certain polymer concentration leads to phase separation into a protein-enriched and a polysaccharide-enriched phase coexisting in the form of a water/water emulsion (Norton & Frith, 2001; Tolstoguzov, 1991; Schorsch et al., 2000). When gelation occurs, the system is trapped at some intermediate state of phase separation and the morphology obtained is influenced by the droplet dynamics. Both gravitational force and thermal agitation contributes to the extension of the droplet, which allows obtaining filamentous microstructures or elongated droplets when the system is “frozen” by the protein gelation. This change in microstructure of the stirred gels in turn explains their rheological properties with the apparition of liquid-like behaviour. At higher guar gum concentrations (*i.e.* 0.35 wt%), guar gum may form a viscous continuous phase containing trapped compact micellar droplets (Everett & McLeod, 2005). In this case, macroscopic phase separation does not occur because of the high viscosity of the matrix. Varying the amount of GDL can be used to modulate the microstructure of the gels. The competition between gelation and phase separation is affected by the rate of gelation, which in turn is determined by the GDL concentration. A faster gelation leads to a shift in the microstructure of the gels at lower guar gum concentrations. This change in microstructure is accompanied by a clear modification of the rheological properties of the mixed gels. Thus the gelation process has the effect of stopping the development of a two-phases structure at some intermediate state which slows down the phase separation (Frith, 2010).

The morphologies of the stirred acid skim milk/guar gum gels at high guar gum concentrations (above 0.15 wt%) can be explained by an incomplete phase separation, since the formation of the protein network occurred before total phase separation process of systems (Perrechil et al., 2009). Thus the gel microstructure can be designed by triggered arrest of the phase-separating structure through acid-induced particle aggregation (Aichinger et al., 2006). A good knowledge of the phase separation kinetics and particle dynamics as a function of the acidification kinetics imposed can therefore be used to produce new structures varying in size and shape from elongated to droplet-like structures.

5 CONCLUSIONS

The present study showed how the combined phenomenon of phase separation and gelation in acid skim milk/guar gum gels can be used to design a wide range of microstructures. Microscopy in combination with rheological experiments was used to understand the mechanisms involved in acidified milk containing varying concentrations of guar gum and GDL. Interpreting the microstructure and rheological properties allows interesting conclusions to be drawn regarding the competition between phase separation and gel formation. Thus gelation can be used to trap kinetically microstructures and allows the production of controlled structures and morphologies, generating novel textures for the food products. However, a phenomenological understanding of how different microstructures can be designed using various guar gum concentrations and gelation rates is not sufficient to be able to identify which of these mechanisms are dominant in controlling the dynamics of these mixed gels. Thus, ongoing work is focused on influencing phase separation kinetics using appropriate acceleration fields and therefore particle dynamics.

ACKNOWLEDGEMENTS

The results were obtained in the context of Satiarome project which is supported by Vitagora pole, DGCIS and local authorities with the financial support of OSEO and FEDER. The authors would like to thank Gabrielle Moulin for her assistance with the confocal microscopy experiments.

REFERENCES

- Aichinger, P.A., Dillmann, M.L., Rami-Shojaei, S., Michel, M., Horne, D.S., 2006. Xanthan gum in skim milk: designing structure into acid milk gels. *Food Colloids: Self-Assembly and Material Science*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 283–296.
- Bourriot, S., Garnier, C., Doublier, J.-L., 1999. Phase separation, rheology and structure of micellar casein-galactomannan mixtures. *Int. Dairy J.* 9, 353–357.
- Doublier, J.L., Garnier, C., Renard, D., Sanchez, C., 2000. Protein-polysaccharide interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5, 202-214.
- Everett, D.W., McLeod, R.E., 2005. Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. *Int. Dairy J.* 15, 1175–1183.
- Frith, W.J., 2010. Mixed biopolymer aqueous solutions – phase behaviour and rheology. *Adv. Colloid Interface Sci.* 161, 48–60.
- Horne, D.S., 2001. Factors influencing acid-induced gelation of skim milk. *Food Colloids*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 345–351.

- Lorén, N., Hermansson, A.M., 2000. Phase separation and gel formation in kinetically trapped gelatin/maltodextrin gels. *Int. J. Biol. Macromol.* 27, 249–262.
- Lucey, J.A., 2002. Formation and physical properties of milk protein gels. *J. Dairy Sci.* 5, 281–294.
- Norton, I.T., Frith, W.J., 2001. Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocoll.* 15, 543–553.
- Perrechil, F.A., Braga, A.L.M., Cunha, R.L., 2009. Interactions between sodium caseinate and LBG in acidified systems: Rheology and phase behavior. *Food Hydrocoll.* 23, 2085–2093.
- Sanchez, C., Zuniga-Lopez, R., Schmitt, C., Despond, S., Hardy J., 2000. Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. *Int. Dairy J.* 10, 199–212.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K., 1999. *Yoghurt: science and technology*. 2nd edition. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- Tolstoguzov, V.B., 1991. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocoll.* 4, 429–468.
- Tolstoguzov, V.B., 2003. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocoll.* 17, 1–23.
- Tuinier, R., ten Grotenhuis, E., de Kruif, C.G., 2000. The effect of depolymerised guar gum on the stability of skim milk. *Food Hydrocoll.* 14, 1–7.
- Van Puyvelde, P., Antonov, Y.A., Moldenaers, P., 2003. Morphology evolution of aqueous biopolymer emulsions during a weak shear flow. *Food Hydrocoll.* 17, 327–332.

ACTE DE CONFÉRENCES

***Gums and Stabilizers for the Food Industry, 17*, Eds P.A. Williams and G.O. Phillips. Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 205-213**

PHASE SEPARATION AND GEL FORMATION IN KINETICALLY-TRAPPED GUAR GUM/ACID MILK GELS

A. Rohart^{1,2,3} and C. Michon^{1,2,3}

¹ AgroParisTech, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 91300 Massy

² INRA, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 91300 Massy

³ CNAM, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F- 75003 Paris

ABSTRACT

Phase separation and gel formation kinetics of acid skim milk / guar gum mixtures were investigated. Due to biopolymer incompatibility, adding specific amount of guar gum to skim milk created emulsion-like microstructures, which could then be trapped through acid-induced gelation. A better knowledge of the phase separation and gel formation kinetics allowed choosing accurate gelation rates. Hence, a surprising spinning of the protein-enriched droplets was observed for low gelation rates where droplet sedimentation competes with the gelation process. Another way of playing on particle dynamics was to speed up the phase separation process by using appropriate acceleration field. Following Stokes' law, additional gravitational forces contributed to the production of very long protein-enriched filaments whereas smaller deformed droplets were obtained under quiescent conditions. Thus a broad range of systems with defined microstructures and mechanical properties was created by using acid-induced protein gelation to freeze the phase separation process at the chosen state.

1 INTRODUCTION

Polysaccharides such as guar gum, locust bean gum, xanthan gum or pectin are often used in acid milk gels to modify the rheological properties.^{1,2,3} However it has been shown that the addition of guar gum to skim milk at the natural pH of the mixture results in a segregative phase separation between the casein micelles and guar gum which is described as a depletion-flocculation phenomenon.^{4,5} Exceeding a given polysaccharide concentration, the phase-separated biopolymer

solutions have emulsion-like properties and can be treated as ‘water-in-water emulsions’, each phase being enriched in one of the two polymers.^{6,7} When the produced emulsion is under non-equilibrium conditions, emulsion droplets can evolve through coalescence and sedimentation. Following Stokes’ law, factors determining emulsion instability are the density differences between the two phases, the mean droplet size, the viscosity of the continuous phase and the gravitation acceleration.⁸

In order to ‘freeze’ the droplet evolution at an intermediate state of phase separation, gelation can be used: the gelation process freezes the development of the two-phase structure far from the thermodynamic equilibrium conditions.⁹ Using a mixture of gelatin and guar, Wolf et al. (2000 and 2002)^{10,11} have shown that under specific conditions of applied shear and controlled gelatin gelation temperature, it was possible to use gelation to trap the dispersed phase in an anisotropic morphology. Gelation can also be achieved through acid-induced protein gelation.¹² During the production of acid milk gels, the pH of the milk is lowered from 6.8 to 4-4.5 using glucono- δ -lactone (GDL). This leads to a network of three-dimensional casein strands aggregated through iso-electric precipitation. The kinetics of the formation of casein gels can be controlled by varying the glucono- δ -lactone (GDL) amount to produce different gelation rates.¹³

A good knowledge of the phase separation kinetics and particle dynamics as a function of gel formation kinetics is therefore crucial to kinetically trap various morphologies. The main objective of this work was to explore more precisely various conditions of phase separation and gelation kinetics and gain knowledge on the most important factors influencing particle dynamics.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Mixed Gels Manufacture

Skim milk with 46 g.kg⁻¹ of proteins was prepared with low-heat skim milk powder (CH low heat, Ingredia, Arras, France) dissolved in Milli-Q water (made by reverse osmosis followed by filtration through a Milli-Q apparatus) using a magnetic stirrer for 1 h at room temperature and kept overnight in a refrigerator in order to let proteins fully hydrate. The milk was then heat-treated at 80°C during 7 min using a thermostatically-controlled water bath. It was cooled down to 60°C and guar gum (Viscogum, Cargill, USA) was dispersed under stirring. The mixture was stirred 30 min at 60°C and finally cooled to 43°C. Guar gum concentrations from 0 to 0.5 wt% were studied.

Milk was acidified by addition of different levels (1, 1.5 or 2.5 wt%) of GDL (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) at 43°C under stirring during 1 min. Immediately after the GDL addition,

the milk was poured into plastic cylinders (30 mm diameter, 65 mm height) and placed in an incubator at 43°C until a pH of 4.60 (± 0.05) for 1.5 and 2.5 wt% GDL and pH of 4.7 (± 0.05) for 1 wt% GDL, respectively. The pH was measured in the meantime with a pH-meter Consort D130 multiparameter analyzer (Turnhout, Belgium). After cooling down to 20°C during 1 h at room temperature, the gels were sheared using of a peristaltic pump; the product passed through two successive plastic pipes (length: 40 cm and internal diameter: 7 mm; length: 100 cm and internal diameter: 3 mm) with a mesh of 500 μm holes at the end while pushed by a Masterflex[®] peristaltic pump (Cole Parmer, Vernon Hills-USA) (380 mL.min⁻¹). Stirred acid milk gels were stored at 4°C during 1 day before analysis.

In order to speed up the macroscopic phase separation, some mixtures were transferred prior to gelation in centrifuge tubes (25 mL) and centrifuged in a 3.18 K centrifuge (Sigma, Munich, Germany) with a centrifuge force of 2.5 g at a temperature of 43°C until pH 4.6 was reached.

2.2 Instrumental Characterization

For phase separation observations, a non-acidified guar gum / skim milk mixture was poured in glass tubes (diameter 27.5 mm). Backscattering values at 880 nm were acquired every 40 μm along a 40 mm height of tube using a Turbiscan LAB (Formulaction, France) at different time intervals.

Systems were observed using a Leica TCS AOBs SP2 (Leica, Germany) confocal laser scanning microscope (CLSM). Proteins were labelled by addition of DyLight 549 (20 μL in 1 g of sample) that was excited at 543 nm using a helium-neon laser. Fluorescence was detected with a photomultiplier. The samples were placed on a microscope slide under a glass coverslip.

Rheological measurements of stirred acid milk gels were carried out in a stress-controlled rheometer (Carri-Med CSL²100, TA Instruments, UK), using a stainless steel plate and cone geometry (60 mm diameter, 4° angle). The frequency sweep measurements were performed from 0.01 to 10 Hz within the linear domain. $\tan \delta$ corresponds to the ratio of viscous to elastic properties. All measurements were carried out 1 day after stirred acid milk gels manufacture.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Acid Skim Milk / Guar Gum Gels: Microstructure and Rheological Properties

Figure 1 shows the microstructure and the rheological properties of stirred acid milk gels with 1.5 wt% of GDL and increasing concentrations of guar gum (0-0.5 wt%). The white areas indicate the

protein stained by DyLight 549, while the dark areas correspond to zones devoid of protein, thus containing whey and exuded guar gum.

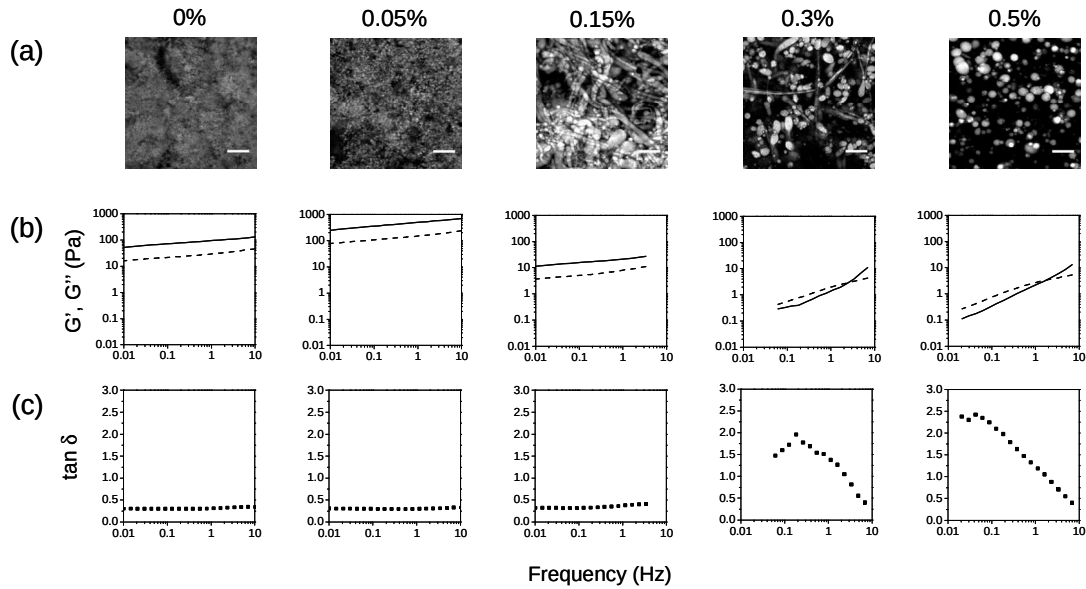


Figure 1 (a) Microstructure; (b) Mechanical spectra (G' (line) and G'' (dotted line)); (c) Variation of $\tan \delta$ values with frequency of stirred acid milk / guar gum gels at pH 4.6 containing various guar gum concentrations (0-0.5 wt%) indicated in the figure acidified at a fixed amount of GDL (1.5 wt%). Microstructure was determined by CLSM. Scale bars indicate 100 μm

Acid milk gels with no added guar gum were homogeneous. When 0.05 wt% guar gum was added, the casein micelles tended to form a denser network with larger dark voids in between (Figure 1a). Those gels exhibited a solid-like behaviour with the G' values higher than G'' ones, and both G' and G'' showing little dependence on frequency (Figure 1b). Although filamentous morphology appeared for 0.15 wt% of guar gum, the G' , G'' and $\tan \delta$ spectra shown in figure 1b and 1c respectively were still that of a typical structured system but with lower G' et G'' values and slightly higher $\tan \delta$ values than those obtained for a non-enriched guar gum gel. Increase of guar gum concentration lead to dramatic changes in stirred gels microstructure and rheological properties. A mix of filamentous structures and deformed droplets (from 10 to more than 100 μm length) dispersed in a continuous guar gum-rich phase was found for 0.3 wt% guar gum. By adding a large amount of guar gum to the system (0.5 wt%), protein-rich spherical droplets were observed. This change in microstructure is accompanied by a clear modification of the rheological properties of the mixed gels. The solid-like behaviour of the systems tended to disappear with a loss of connectivity in the network. Instead, a strong frequency dependence of the dynamic moduli (G' and G'') was

observed for those samples indicating a fluid-like behaviour. Therefore, when increasing guar gum concentrations were added to the skim milk system, the mechanical spectra changed significantly with a transition from a structured system to an entangled polymer solution.

Adding increasing amounts of guar gum to acid skim milk gels induced the creation of different microstructures. At low guar gum concentrations the stirred gel microstructures are characterized by a micro-phase separation in the protein network explaining the high porosity of the network. During milk acidification, the balance between aggregation of concentrated casein micelles and volume exclusion effects results in compaction of the casein network and thus to stronger stirred gels.² Exceeding a given polymer concentration leads to a phase separation into a protein-enriched phase and a polysaccharide-enriched phase coexisting in the form of a water-in-water emulsion.^{7,14,15} At higher guar gum concentrations (*i.e.* 0.3 wt%), guar gum forms a viscous continuous phase (as shown in figure 1b and 1c) containing trapped compact micellar droplets.³

However, for intermediate guar gum concentrations (between 0.15 and 0.3 wt%), the viscosity of the continuous phase is not sufficient to inhibit droplet mobility. According to Stokes' law, a lower continuous phase viscosity will accelerate the phase separation process. Therefore the protein-enriched droplets will tend to sediment in mixed gels containing between 0.15 and 0.3 wt% guar gum, which can explain the elongated and deformed droplets that were obtained. We will discuss this point more thoroughly below.

3.2 Influence of Phase Separation and Gelation Kinetics on Microstructure of Acid Skim Milk / Guar Gum Gels

Addition of guar gum to skim milk results in a phase separation beyond a given biopolymer concentration.^{4,5} This process is highly dependent on experimental time because of a non-thermodynamic equilibrium. Therefore, the phase separation kinetics of a 0.3 wt% guar gum / skim milk mixture was studied using light backscattering technique. Figure 2a shows the variation of the delta backscattering for this mixture over different times compared to the control (time = 0 h).

A modification of backscattered intensity profiles appeared from 0.1 h compared to the initial time with a decrease in backscattering level at the top while it increased at the bottom of the tube (Figure 2a). However, after 0.5 h, the delta backscattering level remained constant at the bottom whereas the height of sedimented layer increased and reached 10 mm after 1 h (Figure 2a and b). It was shown that in the case of a 75/25 volume ratio locust bean gum / skim milk protein mixture, the phase separation was observable less than 1 min after mixing.⁷

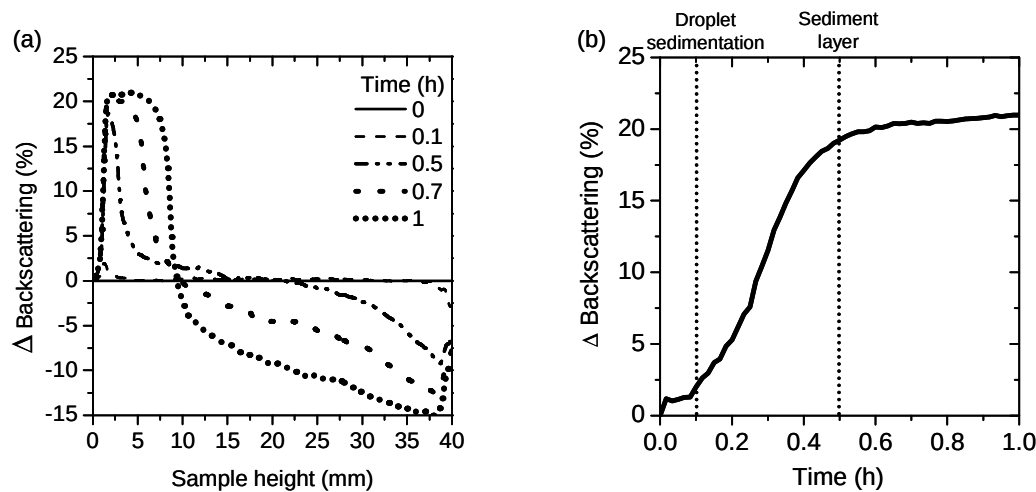


Figure 2 (a) Delta backscattering values of non-acidified 0.3% guar gum / skim milk mixture along its height in a glass tube over the time at 43°C; (b) Maximum value of delta backscattering at the bottom of the tube as a function of time. Dotted lines correspond to the time of the beginning of droplet sedimentation (0.1 h) and apparition of continuous sediment layer (0.5 h)

When a mixed biopolymer solution phase separates, the two phases will form a droplet structure, similar to that of an emulsion.⁹ A change in backscattering is mainly related to a change in particle size or concentration. Thus the increase in backscattering level at the bottom after 0.1 h may be consecutive to an increase in droplet concentration due to sedimentation. According to Stokes' law, the larger droplets migrate to the bottom of the tube first, which contributes to the increase in delta backscattering up to 0.5 h. Then, the packed bed of droplets is coalescing to form the broken sedimented layer at the bottom of the tube.

Figure 3 shows the pH decrease as a function of time after adding various amounts of GDL to skim milk. The initial pH of the sample was 6.8 and dropped to approximately 4.6 after 2 h or 50 min with addition of 1.5 or 2.5 wt% GDL respectively and to 4.7 after 4 h with addition of 1 wt% GDL. With a decrease in pH, the casein micelles become unstable and flocculation takes place around pH 5.2 for heated milk.¹⁶ From these pH decrease kinetics it is possible to notice that the reduction of pH was faster and the time needed for the casein micelles to flocculate was lower for higher GDL concentrations. This implies that the gelation time decreased with increasing amount of GDL. Indeed the pH of 5.2 was reached after 0.7, 0.5 and 0.2 h with addition of GDL amount of 1, 1.5 and 2.5 wt% respectively.

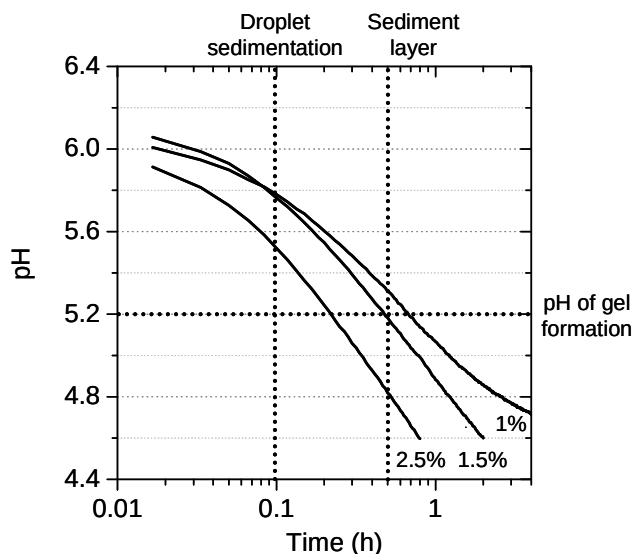


Figure 3 *pH kinetics of 0.3 wt% guar gum / milk mixture after various amounts of GDL addition (1, 1.5, 2.5 wt%). Dotted lines correspond to the time of the beginning of droplet sedimentation (0.1 h) and apparition of continuous sediment layer (0.5 h) and the pH of gel formation (pH 5.2) as indicated in the figure. Values are means from triplicate experiments*

It seems important to understand the interplay between phase separation and gelation kinetics (Figures 2 and 3). For instance, in the case of 0.3% guar gum / skim milk mixture acidified with 2.5 wt% GDL, only a few droplets began to sediment before pH of gel was reached. It should also be noted that with addition of 1.5 wt% GDL the gelation occurred at the same time as the apparition of the sediment layer. On the contrary there is a time delay for the system containing 1 wt% GDL to begin phase separation, suggesting that the phase separation kinetics was quicker than the network formation kinetics.

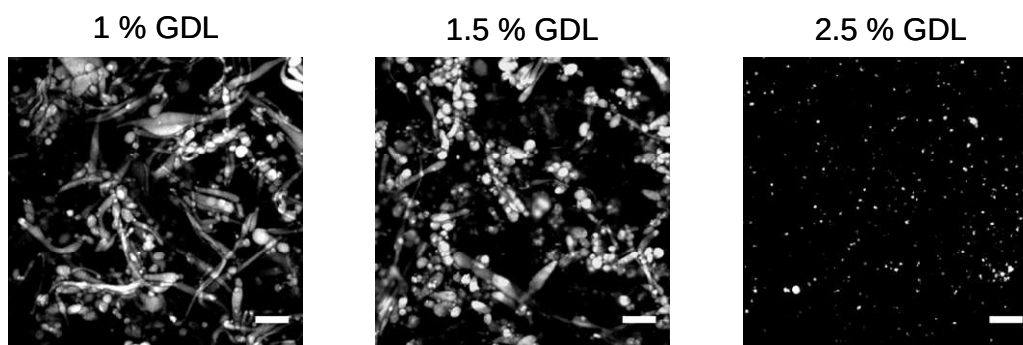


Figure 4 *Microstructure of stirred acid milk / guar gum gels at pH 4.6 containing 0.3 wt% guar gum acidified with three different GDL concentrations as indicated in the figure (1, 1.5, 2.5 wt%). Scale bars indicate 100 μm*

Relative kinetics of gelation and phase separation seem to govern the morphology of the mixed systems. The CLSM micrographs in figure 4 show the microstructure of acid milk / guar gum stirred gels containing 0.3 wt% guar gum and acidified with three different amounts of GDL (1, 1.5 or 2.5 wt%). Gels prepared with 1.5 wt% GDL exhibited the same microstructural features as those visualized in figure 1a, composed of a mix of filamentous structures and deformed droplets dispersed in a continuous guar gum-enriched phase. On the contrary, small spherically-shaped protein-enriched droplets were found in the system containing 2.5 wt% GDL, while filamentous structures appeared in the mixed gel acidified with 1 wt% GDL, *i.e* with the lowest gelation rate. It should be noted that filamentous structures and droplets existed before stirring the acid gels and were not oriented after stirring. As far as we know, such microstructures have never been reported previously for acid skim milk / guar gum gels.

Upon mixing, the guar gum / skim milk mixture formed an unstable water-in-water emulsion.^{7,15} Induced by Brownian motion giving rise to droplet collision, those spherical domains can either continue to grow through coalescence or/and sediment following Stokes' law.⁷ However, in the case of mixed gels acidified with 2.5 wt% GDL, the gelation rate was faster than the formation of the sediment layer (Figure 3). Therefore, the small droplets shown in figure 4 were "frozen" before complete coalescence mechanism and sedimentation occurred. Then the gelation process has the effect of freezing the evolution of the droplets at an intermediate state, far from the thermodynamic equilibrium conditions, thus hindering additional phase separation process.

For lower gelation rates (addition of 1 or 1.5 wt% GDL to the system), the gelation process competes with droplet sedimentation and the apparition of a sedimented layer. For instance, the droplets composing the gel prepared with 1.5 wt% GDL probably had already grown and coalesced when gelation occurred. However, the sedimentation process is greatly influenced by the relative densities of the phases, as well as droplet size. Moreover, owing to very low interfacial tension typical of water-in-water emulsions, droplets are easily deformable.¹⁵ Thus it can be suggested that some droplets are large enough to sediment, and the initially spherical dispersed droplets can greatly deform with gravitation and/or thermal agitation, leading to a mix of filamentous structures and deformed droplets. This phenomenon appeared in a greater extent for the system containing 1 wt% GDL, where gelation occurred just after the beginning of the apparition of sedimented layer (Figure 3). This delay in time to phase separate allowed the microstructure to evolve before triggered freezing through protein gelation. As a consequence, the extension of the droplets formed long protein-enriched filaments, which were kinetically trapped by gelation.

3.3 Influence of Acceleration Field on Microstructure of Acid Skim Milk / Guar Gum Gels

As previously demonstrated from the microscopic results, it appeared that the dynamics of protein-enriched droplets in a form of water-in-water emulsion followed Stokes' law. Hence, the parameters that contribute to droplet sedimentation are not only the density difference between the two phases, the mean droplet size or the viscosity of the continuous phase, but also gravitation. In order to explore more precisely possible reasons for droplets extension, guar gum / acid milk gels were prepared in a temperature-controlled centrifuge using additional acceleration field (2.5 g).

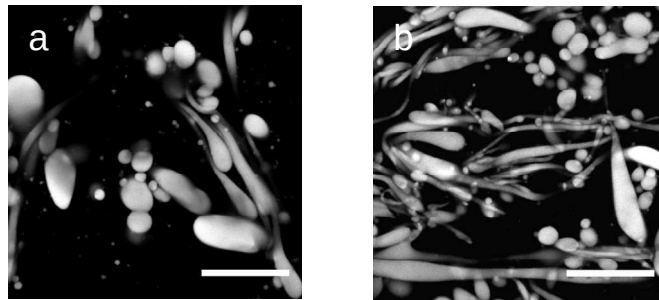


Figure 5 *Microstructure of stirred acid milk / guar gum gels at pH 4.6 containing 0.3 wt% guar gum acidified at a fixed amount of GDL (1.5 wt%) while an acceleration field of (a) 1 g or (b) 2.5 g was applied. Scale bars indicate 100 μm*

Evidence of droplet spinning due to higher acceleration field is shown in figure 5b in comparison to figure 5a. Very long protein-enriched filaments (between 100 and 400 μm) dispersed in a guar gum continuous phase were produced upon centrifugation at 2.5 g (Figure 5b) whereas smaller filamentous and deformed droplets (between 20 and 100 μm) were found in absence of additional acceleration field (Figure 5a). Therefore, increasing the acceleration field produced enough energy to distort the droplets, which had the effect of making the droplets spin by increasing particle deformation, without promoting break-up or coalescence. Such structures have been produced in the past using extensional or orifice flows¹⁷, or using appropriate shear flows.^{14,15} With increasing shear stress, particle deformation increases which offers a broad flexibility to generate different extents of anisotropy from deformed droplets to the formation of a string phase.¹¹

As soon as the applied deformation is stopped, the droplet can easily relax to the equilibrium condition in a spherical form.⁹ However, if droplet gelation occurs in a non-equilibrium state, the unstable morphology is trapped by gelation. This phenomenon was well illustrated using mixtures of gelatin and maltodextrin or dextran^{14,18,19} for which the system gelation was induced by decreasing the temperature of the gelatin continuous phase. In the case of acid skim milk / guar gum gels, the triggered freezing of the phase-separating structure was governed by acid-induced protein

aggregation. Thus gelation can be used to kinetically trap various morphologies created by controlling the particle dynamics, using modification of the gelation rate (gel formation kinetics) or the acceleration field (droplet deformation extent).

4 CONCLUSION

The present study has shown how the combined parameters of particle dynamics and gelation kinetics in acid skim milk / guar gum mixtures can be used to design a wide range of microstructures. Adding specific amounts of guar gum into skim milk gave rise to a droplet-like morphology which can be trapped by acid-induced gelation.

A more in-depth experimental investigation of the combined gelation time-phase separation process was carried out by changing the gelation rate and using appropriate acceleration field. The potential to generate different types of morphologies, by controlling the gelation rate and the acceleration field to obtain different droplet deformation extents, gives a way to manipulate textures. Therefore, future works should focus on quantifying the droplet dynamics more precisely, which could be achieved through rheo-optical processes for instance.

Acknowledgements

The results were obtained in the context of Satiarome project which is supported by Vitagora pole, DGCIS and local authorities with the financial support of OSEO and FEDER. The authors would like to thank Gabrielle Moulin for her assistance with the confocal microscopy experiments.

References

- 1 J.L. Doublier, C. Garnier and C. Sanchez, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2000, **5**, 202-214.
- 2 C. Sanchez, R. Zuniga-Lopez, C. Schmitt, S. Despond and S. Hardy, *Int. Dairy J.*, 2000, **10**, 199-212.
- 3 D.W. Everett and R.E. McLeod, *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 1175-1183.
- 4 S. Bourriot, C. Garnier and J.L. Doublier, *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 353-357.
- 5 R. Tuinier, E. ten Grotenhuis and C.G. de Kruif, *Food Hydrocoll.*, 2000, **14**, 1-7.
- 6 T.J. Foster, C.R.T. Brown, D.P. Ferdinando and I.T. Norton, In: *Food Colloids*, E. Dickinson and B. Bergenstahl (Eds.), 1997, 346-356.
- 7 C. Schorsch, M.G. Jones and I.T. Norton, *Food Hydrocoll.*, 1999, **13**, 89-99.
- 8 G.G Stokes, *Trans. Cambridge Phil. Soc.*, 1851, **9**.
- 9 W.J. Frith, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2010, **161**, 48-60.
- 10 B. Wolf, R. Scirocco, W.J. Frith and I.T. Norton, *Food Hydrocoll.*, 2000, **14**, 217-225.
- 11 B. Wolf, W.J. Frith and I.T. Norton, In: *Gums and Stabilizers for the Food Industry 11*. P.A. Williams and G.O. Philipps (Eds.), IRL Press, Cambridge, 2002, 112-119.

- 12 P.A. Aichinger, M.L. Dillman, S. Rami-Shojaei, M. Michel and D.S. Horne, In: *Food Colloids*, E. Dickinson and M.E. Leser (Eds.), 2006, 283-296.
- 13 D.S. Horne, In: *Food Colloids*, E. Dickinson and R. Miller (Eds.), 2001, 345-351.
- 14 I.T. Norton and W.J. Frith, *Food Hydrocoll.*, 2001, **15**, 543-553.
- 15 V.B. Tolstoguzov, *Food Hydrocoll.*, 2003, **17**, 1-23.
- 16 J.A. Lucey, *J. Dairy Sci.*, 2002, **5**, 281-294.
- 17 Y.A. Antonov, V.Y. Grinberg, N.A. Zhuravskaya and V.B. Tolstoguzov, *J. Texture Stud.*, 1980, **11**, 199-215.
- 18 N. Lorén, M. Langton and A.M. Hermansson, *Food Hydrocoll.*, 1999, **13**, 185-198.
- 19 P. Van Puyvelde, Y.A. Antonov and P. Moldenaers, *Food Hydrocoll.*, 2003, **17**, 327-332.

Mélanges lait / polysaccharides : création de microstructures par effet de compétition entre gélification acide et séparation de phases

Résumé :

La microstructure et les propriétés rhéologiques de systèmes laitiers enrichis en polysaccharides (guar et xanthane) ont été décrites avant et après acidification (gels fermes et brassés). Au sein des mélanges lait / polysaccharides, une structure sous la forme d'une émulsion eau dans eau instable est rendue possible par un mécanisme de déplétion-floculation conduisant à une séparation de phases. La gélification acide des gouttelettes riches en protéines a pour conséquence de bloquer l'évolution de la coalescence et de la sédimentation des gouttelettes qui se figent alors qu'elles ont une forme allongée. Une approche basée sur l'étude des cinétiques de séparation de phases et de gélification a permis de mettre en évidence un phénomène de compétition entre ces deux processus.

Une large gamme de morphologies de micro-gels aux caractéristiques bien définies a pu être créée, variant de longs filaments d'une taille proche de 400 μm à des micro-gels sphériques d'environ 20 μm . L'allongement des structures dans les systèmes lait / guar se réalise au travers de forces de gravité et de l'agitation thermique. Par conséquent, la taille des micro-gels enrichis en protéines dépend largement des traitements thermique et mécanique appliqués avant et pendant la formation du gel. Il apparaît clairement que d'autres forces interviennent également dans la mise en place de la structure sous la forme de structures fibreuses dans les gels brassés enrichis en xanthane, l'hypothèse de la présence d'interactions électrostatiques associatives étant discutée. La création de ces microstructures originales a servi de levier d'action pour orienter les propriétés rhéologiques et la perception sensorielle des gels brassés.

Mots clés : microstructure, système mixte, séparation de phases, gélification acide, polysaccharide, lait, rhéologie, sensoriel.

Milk / polysaccharides mixtures: designing microstructure through the competition between acid gelation and phase separation

Abstract:

Microstructure and rheological properties of milk / polysaccharides (guar gum and xanthan gum) mixtures were studied before and after acidification (set and stirred gels). Milk / polysaccharides mixtures formed an instable water-in-water emulsion due to depletion flocculation which led to phase separation. Acid-induced protein-enriched droplet gelation stopped droplet coalescence and sedimentation which trapped the droplets in an elongated form. In-depth investigation of the combined phase separation and gelation kinetics was used to highlight competition between those two processes.

A wide range of micro-gel morphologies with defined properties was designed, from very long protein-enriched filaments of around 400 μm to spherical micro-gels of 20 μm . Droplet spinning in milk / guar gum systems originated from the effect of gravitational forces and thermal agitation. Therefore protein-enriched micro-gel size greatly depends on the thermomechanical treatment applied before and during gel formation. In the case of xanthan gum-enriched acid milk gels, specific fibrous-like structures may be generated by other forces including electrostatic associative interactions. Design of original microstructures was used to modify rheological properties and sensory perception of stirred gels.

Keywords: microstructure, mixed system, phase separation, acid gelation, polysaccharide, milk, rheology, sensory.

