

Impact de traitements d'homogénéisation à haute pression sur les propriétés physico-chimiques des protéines du lactosérum

Auteur : Weekers, Thomas

Promoteur(s) : Blecker, Christophe; Jacquet, Nicolas

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/13241>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative" (BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Impact de traitements d'homogénéisation à haute pression sur les propriétés physico-chimiques des protéines du lactosérum

Thomas WEEKERS

Travail de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Bioingénieur en chimie et Bio-Industries

Année académique 2020 – 2021

Promoteurs : Prof. Christophe Blecker, Dr. Nicolas Jacquet

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

Impact de traitements d'homogénéisation à haute pression sur les propriétés physico-chimiques des protéines du lactosérum

Thomas WEEKERS

Travail de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Bioingénieur en chimie et Bio-Industries

Année académique 2020 – 2021

Promoteurs : Prof. Christophe Blecker, Dr. Nicolas Jacquet

i. REMERCIEMENTS

Dans la réalisation de ce travail, qui représente l'aboutissement de mes études ici à Gembloux, j'ai eu la chance de bénéficier de l'aide, du soutien et du conseil de nombreuses personnes.

Je remercie particulièrement mes deux promoteurs : le Professeur Christophe Blecker et le Docteur Nicolas Jacquet qui m'ont permis de réaliser mon travail de fin d'étude dans leur laboratoire. Professeur Blecker, je vous remercie également pour les conseils précis, avisés mais surtout bienveillants que vous avez pu me fournir pendant les derniers mois mais aussi pour nos discussions aux sujets diverses et variés mais toujours passionnant. Docteur Jacquet, je voulais vous remercier pour votre disponibilité au laboratoire, votre écoute attentive, vos conseils toujours pertinents mais je voulais également souligner votre qualité à fabriquer des systèmes de refroidissement/chauffage innovants!

Bien évidemment, je remercie le Professeur Aurore Richel du laboratoire de biomasse et technologie verte qui m'a permis d'utiliser son équipement tout au long de mon travail.

Professeur Romdhane Karoui (Université d'Artois), merci de m'avoir accueilli dans votre centre de recherche *Adrianor*. Pour un étudiant, avoir la chance de découvrir un nouveau laboratoire de recherches ainsi que de bénéficier de votre savoir et de vos explications ont constitué une expérience enrichissante personnellement et professionnellement.

enfin, comme pourrais-je oublier les personnes qui m'ont aidé au quotidien lors de ma vie au laboratoire ? Gilles et Lionel, merci pour votre soutien ainsi que vos conseils précieux. Marjorie, je voudrais souligner ta gentillesse, ta bienveillance et ton dévouement envers les étudiants. Et, merci aussi pour les pesées Dumas. Lynn, merci pour ton aide précieuse lors de mes premières semaines au laboratoire ainsi que le reste du semestre. Sandrino et Mathilde, vous avez toujours su vous rendre disponibles pour répondre à mes questions et m'aider, je vous en remercie. Et pour terminer, merci Dominique pour tout ce que tu m'as appris ainsi que pour les coups de main que tu as pu me donner lorsque j'en avais besoin.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et Chloé qui ont toujours été présentes à mes côtés tout au long de mes études et ce même dans les moments les plus difficiles. Vous avez toujours su trouver les mots justes pour me rassurer, m'encourager, me consoler, me pousser à me dépasser et à avoir confiance en moi et en mon travail.

Je tenais à dédier mon travail à ma mère, Isabelle, qui a toujours suivi mon travail depuis mon plus jeune âge et m'a donné les clés pour franchir tous les obstacles qui se sont présentés devant moi.

ii. SYNOPSIS – FRANÇAIS

Les effets de la microfluidisation sur la structure et les propriétés physico-chimiques des protéines de lactosérum ont été étudiées dans ce travail. Une solution de protéines de lactosérum à 10% w/w a été préparée et traitée par microfluidisation à l'échelle pilote à différentes pressions (1000 bars & 1375 bars) et différents nombres de passages dans la chambre de traitement (1 passage & 5 passages). Ensuite, les échantillons ont été analysés en termes de propriétés de tension de surface, y compris une modélisation des phénomènes impliqués dans la diminution de tension à l'interface air-eau par les modèles de Joos & Rillaerts et Ward & Tordai.

En complément, les propriétés : thermiques, de taille des particules, de solubilité de l'azote, des liaisons sulfhydryles libres et ponts disulfures et de l'hydrophobicité de surface ont aussi été étudiées.

Il a été constaté que la microfluidisation possède un impact sur les propriétés des protéines de lactosérum. La tension de surface à l'équilibre a été diminuée et les cinétiques de diffusion ralenties par le traitement. La réaction d'échange entre ponts disulfures et groupements sulfhydryles libres a été favorisée, et l'hydrophobicité de surface a été significativement augmentée. Les propriétés physico-chimiques ont donc été modifiées. Plus précisément, après microfluidisation, la taille des particules dans la solution a été divisée par deux tandis que la solubilité a été améliorée de 10% à 12%. Aucun signe de modification de la température de dénaturation thermique n'a été mis en évidence. En revanche, la vitesse d'hydratation de la poudre de protéines de lactosérum a été quadruplée, passant de 4h à moins d'1h. La pression à laquelle la microfluidisation est réalisée a un effet variable sur les différentes propriétés mais semble globalement augmenter l'impact de celle-ci. Les mêmes conclusions peuvent être formulées pour le nombre de passages.

Mots clés : Microfluidisation, Protéines de lactosérum, Propriétés physico-chimiques, Modélisation, Interface, Agrégats

iii. ABSTRACT – ENGLISH

The effects of microfluidization on the structure and physicochemical properties of whey proteins were studied in this work. A 10% w/w whey protein solution was prepared and processed by pilot scale microfluidization at different pressures (1000 bar & 1375 bar) and different number of passes through the processing chamber (1 pass & 5 passes). Then, the samples were analyzed in terms of surface tension properties, including a modeling of the phenomena involved in the tension decrease at the air-water interface by the Joos & Rillaerts and Ward & Tordai models. In addition, thermal properties, particle size, nitrogen solubility, free sulfhydryl bonds and disulfide bridges, and surface hydrophobicity were also studied.

Microfluidization was found to have an impact on the properties of whey proteins. The equilibrium surface tension was decreased, and the diffusion kinetics were slowed down by the treatment. The exchange reaction between disulfide bond and free sulfhydryl groups was enhanced and the surface hydrophobicity was significantly increased. The physico-chemical properties were thus modified. Specifically, after microfluidization, the particle size in the solution was halved while the solubility was improved by 10% to 12%. There was no evidence of a change in the temperature of thermal denaturation, however, the hydration rate of the whey protein powder was quadrupled from 4h to less than 1h. The pressure at which the microfluidization is performed has a variable effect on the different properties but seems to increase the overall impact. The same conclusions can be drawn for the number of passages.

Keywords: Microfluidization, Whey proteins, Physicochemical properties, Modeling, Interface, Aggregates

iv. TABLES DES MATIERES

<i>i.</i> REMERCIEMENTS.....	VI
<i>ii.</i> SYNOPSIS – FRANÇAIS.....	VII
<i>iii.</i> ABSTRACT – ENGLISH	VIII
<i>iv.</i> TABLES DES MATIERES	IX
<i>v.</i> LISTE DES FIGURES.....	XI
<i>vi.</i> LISTE DE TABLES.....	XIII
<i>vii.</i> LISTE DES EQUATIONS	XIV
1. <i>Introduction générale</i>	1
1.1. Contexte.....	1
1.2. Objectifs.....	1
1.3. Stratégie expérimentale.....	2
2. <i>État de l'art.....</i>	4
2.1. Le lactosérum.....	4
2.1.1. Le lactosérum, enjeux économiques et environnementaux	4
2.1.2. Composition et type de lactosérum.....	4
2.1.3. Transformation du lactosérum liquide et obtention des concentrés protéiques.....	5
2.1.4. Propriétés technofonctionnelles des concentrés de protéines de lactosérum.....	6
2.2. Principales protéines des concentrés de protéines de lactosérum.....	7
2.2.1. La β -lactoglobuline - β -Lg.....	7
2.2.2. L' α -lactalbumine - α -La.....	9
2.2.3. Le sérum albumine bovin – BSA.....	10
2.2.4. Les immunoglobulines - Ig	11
2.3. Dénaturation et agrégation des protéines de lactosérum.....	12
2.3.1. L'agrégation de la β -lactoglobuline.....	12
2.3.2. L'agrégation de l' α -lactalbumine	13
2.3.3. L'agrégation de la BSA	13
2.4. Techniques de modifications des protéines de lactosérum	14
2.4.1. Modification par voie chimique.....	14
2.4.2. Modification par voie enzymatique	14
2.4.3. Modification par voie physique	15
2.4.3.1. Traitements thermiques	15
2.4.3.2. Traitements non thermiques	16
2.5. Cinétique de diffusion et d'adsorption des protéines tensioactives aux interfaces air/liquide	20
3. <i>Matériel et méthode.....</i>	22
3.1. Matériel.....	22
3.2. Production de la poudre de protéines de lactosérum traitées par microfluidisation ...	22
3.2.1. Préparation des solutions de protéines de lactosérum à microfluidiser	22
3.2.2. La microfluidisation.....	23
3.2.2.1. Appareillage et traitements appliqués aux protéines.....	23
3.2.2.2. Évaluation du taux de cisaillement	23
3.2.3. La lyophilisation	25
3.2.4. Dénomination des échantillons.....	25

3.3. Analyse de l'impact de la microfluidisation sur les propriétés de tension de surface à l'interface air-eau.....	26
3.3.1. Cinétique d'adsorption courte – Age de surface de 10 à 10 000 ms	26
3.3.2. Cinétiques d'adsorption longue – Age de surface de 1000 ms à 1800 s	26
3.3.3. Tension de surface à l'équilibre.....	26
3.4. Analyse de l'impact de la microfluidisation sur les autres propriétés physico-chimiques des protéines	27
3.4.1. Analyse calorimétrique différentielle - DSC	27
3.4.2. Distribution et taille moyenne	27
3.4.3. Mesure de la solubilité de l'azote	27
3.4.4. Dosage des liaisons sulfhydryles libres (SHF) et ponts disulfures (SS).....	28
3.4.5. Détermination de l'hydrophobicité de surface des protéines en solution.....	29
3.4.6. Matière sèche et teneur en protéines des poudres.....	30
3.4.7. Activité de l'eau.....	30
3.5. Analyse statistique	30
4. Résultats et discussion	31
4.1. Déterminations préliminaires et vérification de l'absence de biais	31
4.1.1. Détermination du temps d'hydratation optimal des poudres de protéines de lactosérum	31
4.1.2. Impact de la lyophilisation.....	32
4.2. Traitement par microfluidisation.....	34
4.2.1. Impact de la concentration en protéines des solutions avant microfluidisation sur leurs propriétés physico-chimiques.....	34
4.2.2. Calcul du taux de cisaillement relatif à la microfluidisation	35
4.3. Caractérisation de l'impact de la microfluidisation sur les protéines de lactosérum ..	36
4.3.1. Étude des propriétés de tension de surface à l'interface air-eau.....	36
4.3.1.1. Cinétique d'adsorption courte – Age de surface de 10 à 10 000 ms	36
4.3.1.2. Cinétiques d'adsorption longue – Age de surface de 1000 ms à 1800 s	37
4.3.1.3. Tension de surface à l'équilibre	38
4.3.1.4. Discussion des résultats et conclusions	39
4.3.2. Étude des autres propriétés physico-chimiques	41
4.3.2.1. Analyse calorimétrique différentielle – DSC	41
4.3.2.2. Taille des particules dans la solution de protéines de lactosérum	43
4.3.2.3. Solubilité des protéines de lactosérum.....	44
4.3.2.4. Liaison sulfhydryle libres (-S-H) et pont disulfure (-S-S-).	45
4.3.2.5. Hydrophobicité de surface des protéines	46
4.3.3. Modélisation des dynamiques et interactions à l'interface air-eau.....	48
4.3.3.1. Coefficient de diffusion – Modèle de Joos & Rillaerts	48
4.3.3.2. Coefficient d'adsorption – Modèle de Ward & Tordai.....	52
5. Conclusions et perspectives	56
6. Contribution de l'étudiant	58
7. Bibliographie.....	59
8. Annexes	64

v. LISTE DES FIGURES

Figure 1: Flow sheet de la stratégie expérimentale employée dans ce travail.	3
Figure 2: Aperçu des transformations applicables au lactosérum liquide. (Onwulata et Huth, 2009)	5
Figure 3: Illustration de la séquence d'a.a. de la β -lactoglobuline bovine (variant B) ainsi que les différences avec d'autres espèces animales. (Sawyer et al., 2013)	7
Figure 4: Structure 3D l' α -lactalbumine. Les chaînes latérales sont montrées pour les huit cystéines ainsi que pour les résidus dans les sites de liaison Ca et Zn. (K. Brew et al., 2013) .	9
Figure 5: Structure tertiaire de la BSA (Kovalska et al., 2019)	10
Figure 6: Structure des trois principaux isotypes d'immunoglobulines (IgG, IgA, et IgM) présents dans le lait bovin. (Hurley et Theil, 2013).....	11
Figure 7: Modèle de Miller et al. : mécanisme en trois étapes de l'adsorption des protéines aux interfaces air/liquide ©Schéma réalisé avec le logiciel « BioRender ».....	20
Figure 8. Schéma d'une chambre d'interaction en configuration « Z » ©Microfluidics Processor user guide	23
Figure 9: Schéma de la chambre d'interaction t en "z" du microfluidiseur et calcul du taux de cisaillement ©Microfluidics Processor user guide	24
Figure 10: Exemple du système de dénomination employé dans ce travail pour l'échantillon WP-1-L.	26
Figure 11: Flux de chaleur (W/g) en fonction de la température (°c) obtenu par DSC sur une solution de WP-10-L hydratée pendant 0 - 1 - 4 - 24 heures.....	31
Figure 12: Tension de surface (mN/m) de WP-1-L (losange noir) et WP-1-N (rond blanc) en fonction de l'âge de la surface (ms).....	32
Figure 13: Tension de surface (mN/m) des protéines de lactosérum lyophilisées (WP-1-L, courbe noir) ou non (WP-1-N, courbe grise) en fonction du temps (s)	33
Figure 14: Tension de surface (mN/m) de 1375-10/1-L (losange noir) et 1375-1-L (rond blanc) en fonction de l'âge de la surface (ms).....	34
Figure 15: Tension de surface (mN/m) de WP-1-L (carré blanc), 1000M-1-L (rond blanc), 1375-1-L (rond gris) et 1375M-1-L (carré noir) en fonction de l'âge de la surface (ms).....	36
Figure 16: Tension de surface (mN/m) des échantillons WP-1-L (courbe noir), 1000M-1-L (courbe grise foncée) & 1375M-1 (courbe grise claire) en fonction du temps (s)	37

Figure 17: Tension de surface (mN/m) des échantillons WP-1-L (courbe noir), 1000M-1-L (courbe grise foncée) & 1375-1 (courbe grise claire) en fonction de l'inverse de la racine carrée du temps (s ⁻¹).....	38
Figure 18: Flux de chaleur (W/g) en fonction de la température (°c) obtenu par DSC pour une solution de WP-10-L hydratée pendant 1 heure et des solutions de WP-10-L, 1000M-10-L & 1375M-1-L hydratées 4 heures	41
Figure 19: Flux de chaleur (W/g) en fonction de la température (°c) obtenu par DSC sur une solution de 1375M-10-L après 1 heure et 4 heures d'hydratation.	42
Figure 20: Comparaison de la quantité de liaisons sulfhydryles (gris clair avec points blancs) et disulfures (gris foncé) (μmol/g) pour des échantillons microfluidisés (1000M-1-L, 1375-1-L & 1375M-1-L) ou non (WP-1-L).....	45
Figure 21: Comparaison de l'hydrophobicité de surface (u.a.) de solutions de protéines de lactosérum microfluidisées dans différentes conditions (1000M-1-L, 1375-1-L & 1375M-1-L) et non microfluidisées (WP-1-L)	47
Figure 22: Modèle de Joos & Rillaerts – Comparaison de l'évolution du coefficient de diffusion (m ² /s) en fonction du terme 1/c ² *t (L ² * g ⁻² * s ⁻¹) pour un échantillon non microfluidisé (rond noir) et un échantillon microfluidisé (carré noir) 1375M-1-L.	49
Figure 23: Tension de surface (mN/m) des protéines de lactosérum non microfluidisées (WP-1-L, carré blanc) et microfluidisées (1375M-1-L, carré noir) en fonction de l'âge de la surface (ms).	51
Figure 24: Détermination de la tension de surface à l'équilibre par régression linéaire - Évolution de la tension de surface (mN/m) en fonction de l'inverse de la racine carrée du temps (s ⁻¹) pour les échantillons WP-(0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5)-L	53
Figure 25: Détermination de la tension de surface à l'équilibre par régression linéaire - Évolution de la tension de surface (mN/m) en fonction de l'inverse de la racine carrée du temps (s ⁻¹)pour les échantillons 1375M-(0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5)-L.....	53
Figure 26: Détermination de la pente de la droite dans la région où l'évolution de la concentration affecte la tension de surface - Évolution de la tension de surface (mN/m) en fonction du logarithme de la concentration (% w/w) pour le 1375M-1-L (carré noir) et le WP-1-L (rond noir)	54
Figure 27: Modèle de Ward et Tordai - Évolution du coefficient d'adsorption (m ² /s) en fonction du terme 1/c ² *t (L ² * g ⁻² * s ⁻¹) pour les échantillons WP-1-L (rond blanc) & 1375M-1-L (losange noir).....	55

vi. LISTE DE TABLES

Tableau 1: Propriétés chimiques et physicochimiques des protéines de lactosérum. (De Wit et al., 1986)	8
Tableau 2: Composition standard de la poudre de protéines de lactosérum "PROTARMOR 82 SBLi" et normes associées	22
Tableau 3: Combinaisons de paramètres de microfluidisation utilisés.....	23
Tableau 4: Récapitulatif des dénominations utilisées pour les échantillons selon le modèle établi.....	25
Tableau 5: Activité d'eau (Aw) des poudres de protéines de lactosérum natives (WP-P), natives lyophilisées (WP-P-L) et microfluidisées lyophilisées (1000-P-L, 1375-P-L & 1375M-P-L)	33
Tableau 6: Données et résultats relatifs au calcul du taux de cisaillement en fonction de la pression	35
Tableau 7: Tension de surface à l'équilibre (mN/m) des échantillons WP-1-L, 1000M-1-L & 1375-1-L	38
Tableau 8: Évaluation de la taille des particules (nm) dans les solutions de protéines de lactosérum - Échantillons WP-1-L, 1000M-L & 1375-1-L	43
Tableau 9: Solubilité des protéines de lactosérum avant et après traitement par microfluidisation (%)	44
Tableau 10: Modèle de Joos & Rillaerts - Coefficient de diffusion (m^2/s) moyen pour les échantillons de protéines de lactosérum microfluidisés (1000M-1-L, 1375-1-L & 1375M-1-L) ou non (WP-1-L).....	50

vii. LISTE DES EQUATIONS

Équation 1: Détermination du taux de cisaillement (s^{-1}) dans la chambre d'interaction	24
Équation 2: Calcul de la vitesse maximum (m/s) atteinte dans la chambre d'interaction	24
Équation 3: Calcul de la vitesse moyenne (m/s) dans la chambre d'interaction.....	24
Équation 4: Détermination de la solubilité (%) de la poudre de protéines de lactosérum	28
Équation 5: Calcul du nombre de liaisons sulphydryles libres et sulphydryles totales ($\mu\text{mol/g}$ protéine) à partir de l'absorbance (412 nm) et de la concentration en protéines dans la solution.	
.....	28
Équation 6: Calcul du nombre de liaisons disulfures ($\mu\text{mol/g}$ protéine) à partir de l'absorbance (412 nm) et de la concentration en protéines dans la solution.....	29
Équation 7: Equation de Lineweaver-Burk	29
Équation 8: Equation permettant le calcul de l'hydrophobicité de surface (u.a.)	30
Équation 9: Détermination de la matière sèche (%) de la poudre de protéines de lactosérum.	
.....	30
Équation 10 : Équation de Joos & Rillaerts décrivant la diffusion aux interfaces. Avec: σ_t = tension superficielle à l'âge de la surface t ; σ_0 = tension superficielle du solvant pur ; R = constante universelle des gaz ; T = température absolue ; C = concentration molaire du tensioactif ; D_s = coefficient de diffusion.....	48
Équation 11: Équation de Ward et Tordai décrivant l'adsorption aux interfaces. Avec : σ_t = tension superficielle à l'âge de la surface t ; σ_{eq} = tension superficielle à l'équilibre dynamique ; t = âge de la surface ; R = constante universelle des gaz ; T = température absolue ; r = concentration excédentaire en surface ; C = concentration molaire de la solution ; D_l = coefficient d'adsorption	52
Équation 12: Calcul de l'excès de concentration de surface. Avec : R = constante universelle des gaz ; T = température absolue ; σ = tension superficielle ; c = concentration molaire de l'agent de surface.....	52

1. Introduction générale

1.1. Contexte

Au fil des décennies, les enjeux environnementaux et économiques ont poussé l'industrie à valoriser ses sous-produits. L'industrie laitière a ainsi fortement développé la valorisation du lactosérum notamment par le biais des protéines qu'il contient. De nos jours, la demande croissante en ingrédients possédant des propriétés technofonctionnelles précises ainsi qu'une haute valeur ajoutée a non seulement permis de continuer à améliorer la valorisation de ces sous-produits mais a également permis l'émergence d'une nouvelle filière entièrement consacrée à l'extraction et la valorisation des ingrédients protéines qu'ils soient d'origine végétale ou animale.

Les protéines de lactosérum, en raison de leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles exceptionnelles, ont reçu une attention soutenue de la part de la communauté scientifique depuis de nombreuses années.¹ Cependant, la demande toujours croissante du marché pour de nouveaux produits a poussé les chercheurs à tenter de modifier les propriétés de ces protéines afin de mettre en évidence de nouvelles fonctionnalités et ainsi élargir leur champ d'application. Les protéines peuvent ainsi être fonctionnalisées par le biais de traitements chimiques, enzymatiques ou physiques.^{2,3}

Les modifications effectuées par voie chimique, en plus du coût associé aux réactifs et aux traitements de leurs déchets, ne bénéficie pas d'une image positive chez le consommateur. Le même raisonnement est applicable pour les modifications par voies enzymatiques. Les modifications par voies physiques permettent de se prémunir de ces problèmes tout en améliorant l'image du produit auprès du consommateur. Les modifications physiques par traitement thermiques ont déjà largement été étudiées par le passé.⁴ Cependant de nouvelles techniques de modification physique telles que l'homogénéisation à haute pression font l'objet d'études ces dernières années⁵⁻⁸, ré-ouvrant ainsi ce domaine et offrant de nouvelles possibilités de thématique de recherche.

1.2. Objectifs

L'homogénéisation à haute pression ayant récemment permis de modifier les propriétés physico-chimiques des protéines de lactosérum. Ce travail se focalisera sur un cas particulier de celle-ci, à savoir : la microfluidisation. Dans un contexte de fonctionnalisation des ingrédients protéiques, l'impact de ce traitement sur les propriétés de tensions de surface à l'interface air-eau sera étudié. Ces propriétés étant directement liées à des propriétés concrètes d'un point de vue formulation telles que la capacité moussante ou émulsifiante.

L'étude essayera également d'apporter des réponses aux observations effectuées sur les propriétés de tensions de surface par l'intermédiaire d'autres propriétés physico-chimiques telles que : la taille des particules, les variations de dénaturations thermiques et d'enthalpies, la

solubilité de l'azote, la quantité de liaisons sulfhydryles libres et de ponts disulfures ou encore de l'hydrophobicité de surface.

En parallèle, le calcul du taux de cisaillement sera effectué afin de voir s'il pourrait remplacer le terme de pression pour décrire le traitement subi par l'échantillon et ainsi faciliter la reproductibilité des conditions de traitement lors d'un changement d'appareil.

Enfin, ce travail tentera d'adapter les modèles de diffusion de Joos & Rillaerts et d'adsorption de Ward & Tordai, habituellement utilisés pour des protéines pures, au mélange complexe de protéines tel que le lactosérum afin d'approfondir l'observation des mécanismes mis en jeux à l'interface air-eau.

1.3. Stratégie expérimentale

Pour atteindre les objectifs présentés au point précédent, la stratégie expérimentale suivante a été mise en place (**Figure 1**).

Pour commencer, il convient d'éliminer les biais qui pourraient conduire à des conclusions erronées quant à l'effet du traitement. Pour ce faire, le temps d'hydratation optimale des poudres de protéines de lactosérum sera défini grâce à l'analyse de la cinétique d'hydratation. Ensuite, il conviendra d'assurer que le traitement de lyophilisation appliqué à la solution de protéines de lactosérum microfluidisée afin de la conserver, ne modifie pas les propriétés de celle-ci.

Une fois ces points cités plus hauts vérifiés, les considérations relatives à l'application du traitement de microfluidisation peuvent être abordées. Parmi celles-ci se trouve la concentration à laquelle les solutions de protéines initiales sont microfluidisées. Afin de diminuer les volumes à traiter, il est envisagé de microfluidiser les solutions à des concentrations plus élevées (10% w/w au lieu de 1% w/w) que celles utilisées pour les analyses et ainsi multiplier par dix la capacité de production. Il convient de déterminer si ce changement possèdent un impact sur les propriétés des protéines de lactosérum. En fonction de la concentration choisie pour effectuer le traitement, les données nécessaires seront mesurées afin de pouvoir estimer le taux de cisaillement subi par les protéines de lactosérum.

Ensuite, la caractérisation de l'impact de la microfluidisation sur les protéines de lactosérum se fera par l'étude des propriétés de tension de surface à l'interface air-eau. En effet, ces propriétés sont intimement liées aux capacités émulsifiantes et moussantes elles-mêmes au centre de la conception de bon nombres de produits commerciaux. A partir de ces variations, des hypothèses seront émises. Celles-ci seront ensuite critiquées sur base de toutes une série des résultats pour d'autres propriétés physico-chimiques. Enfin, pour analyser plus en finesse les propriétés de tension de surface à l'interface air-eau, deux modèles mathématiques seront adaptés et utilisés afin de mettre en évidence les phases limitantes lors de l'abaissement de la tension de surface.

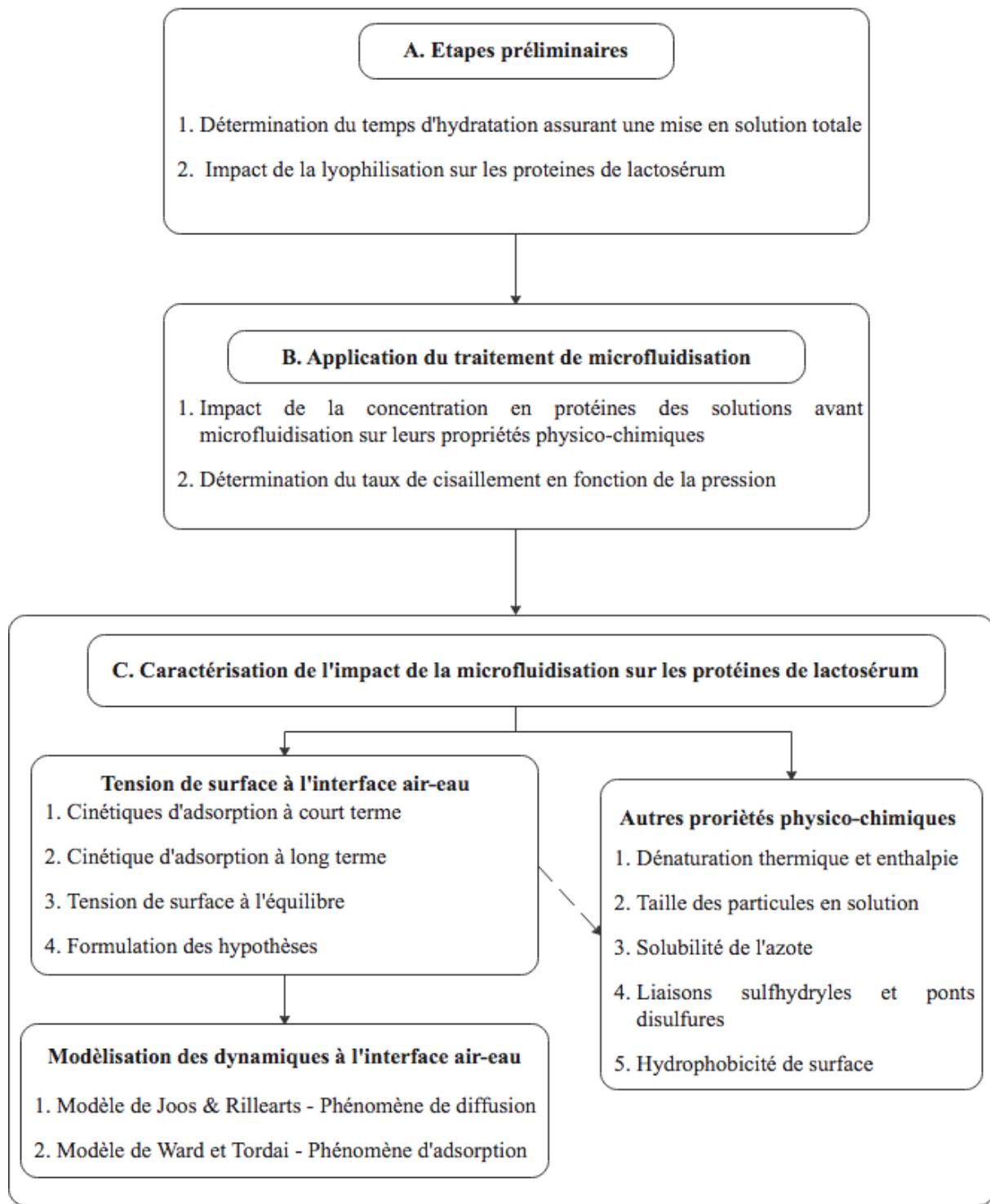


Figure 1: Flow sheet de la stratégie expérimentale employée dans ce travail.

2. État de l'art

2.1. Le lactosérum

2.1.1. Le lactosérum, enjeux économiques et environnementaux

En 2015, Yadav et al.⁹ ont estimé que la production mondiale annuelle de lactosérum équivalait à environ 180-190 millions de tonnes. Une grande usine de fabrication de fromage peut donc ainsi produire plus d'un million de litres de lactosérum par jour¹⁰, ce qui en fait l'un des principaux et plus volumineux sous-produits de l'industrie laitière.¹

Le lactosérum contient la moitié des solides totaux du lait. Ainsi, la non valorisation de ce lactosérum entraîne non seulement une perte en matières premières et nutriments, mais aussi une augmentation de l'impact environnemental et de la pollution de l'environnement en raison de la présence d'un taux élevé de matière organique et d'une forte demande biologique en oxygène pour le dégrader.¹

2.1.2. Composition et type de lactosérum

Lors de la fabrication du fromage, le lait coagule puis se rétracte en rejetant un liquide : le lactosérum. Il existe deux grandes façons de faire coaguler le lait lors de la production de fromage. Il en découle donc deux grands types de lactosérum^{11,12} :

- Le lactosérum doux, dont le pH est d'au moins 5,6, provient de la production de fromage coagulé par la présure.
- Le lactosérum acide, dont le pH ne dépasse pas 5,1, provient de la fabrication de fromages coagulés par acidification.

Les lactosérum, issus de la production de fromage, sont des solutions aqueuses complexes contenant près de 7 % de solides solubilisés. Ces solides sont composés d'environ 10 à 12 % de protéines, le reste étant principalement du lactose (74 %), des minéraux (8 %), de la graisse de lait (3 %) et de l'acide lactique.¹³

Les principales protéines du lactosérum sont la β -lactoglobuline (β -LG), l' α -lactalbumine (α -LA), la sérum-albumine bovine (BSA), les protéoses-peptones et les immunoglobulines à chaînes lourdes et légères (Ig). D'autres protéines importantes présentes dans le lactosérum, mais en quantités mineures, sont la lactoferrine (LF) et la lactoperoxidase. Le lactosérum doux peut également contenir les composants protéiques et peptidiques que sont les glycomacropeptides (GMP) et les composés de faible poids moléculaire formés par la dégradation enzymatique des caséines au cours du processus de fabrication du fromage.⁴

2.1.3. Transformation du lactosérum liquide et obtention des concentrés protéiques

La principale source d'intérêt économique du lactosérum provient des minéraux, du lactose mais surtout des protéines qu'il contient. La **Figure 2** donne une première approche des produits qu'on peut tirer du lactosérum liquide.

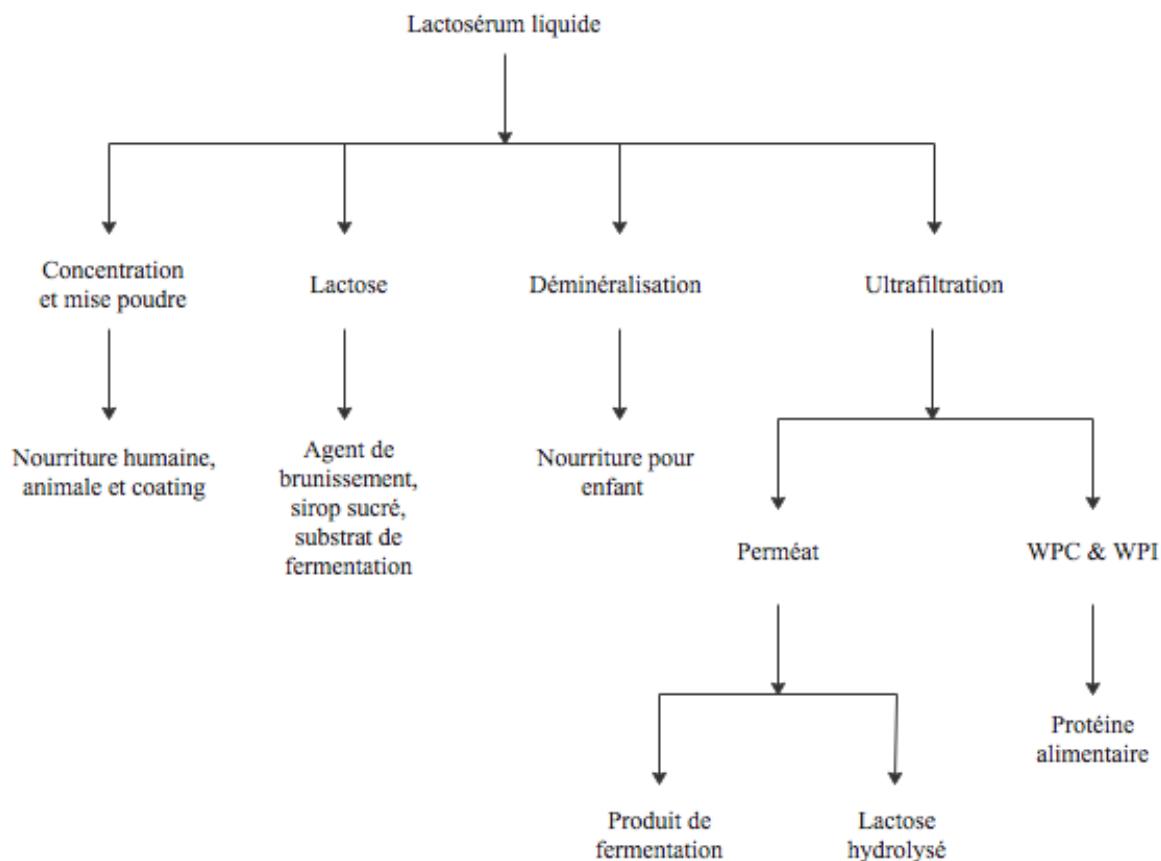


Figure 2: Aperçu des transformations applicables au lactosérum liquide. (Onwulata et Huth, 2009)

Pour concentrer ces protéines sans les dénaturer, plusieurs techniques de filtration sont employées dans l'industrie, parfois en combinaison.¹⁴

L'ultrafiltration (UF), est généralement la technique la plus employée pour la production de concentré protéique. Cette technique permet effectivement de séparer efficacement les sels minéraux et le lactose des protéines.¹⁵ L'UF est généralement suivie par une étape de diafiltration afin de retirer le peu de lactose et de sel minéraux retenus dans le gâteau de filtration.¹⁶ Quelle que soit la technique de filtration, elle est toujours suivie d'une étape de séchage par atomisation afin d'atteindre une humidité inférieure à 5%.¹

Les deux types de concentrés les plus fréquemment produit par ultrafiltration sont :

- Le concentré de protéines de lactosérum (WPC, teneur en protéines 60-90%)
- L'isolat de protéines de lactosérum (WPI, teneur en protéines $\geq 90\%$)

Dans le but de répondre à des besoins techno-fonctionnels et nutritionnels précis, ces concentrés de protéines de lactosérum sont couramment transformés par des techniques d'ensymolyse, de fractionnement et de traitement thermique.⁵

2.1.4. Propriétés technofonctionnelles des concentrés de protéines de lactosérum

Les protéines de lactosérum présentent d'excellentes propriétés technofonctionnelles qui en font des ingrédients de choix notamment pour l'industrie agroalimentaire. Les plus importantes de ces propriétés étant : la solubilité, la capacité moussante, la capacité émulsifiante ou bien encore, la capacité à former un gel.

Solubilité : Les poudres de protéines de lactosérum commerciales, grâce à leur excellente solubilité, sont fortement utilisées pour réaliser des boissons protéinées. Il est important que les poudres commerciales possèdent une bonne solubilité. La solubilité des protéines dépend de diverses propriétés physico-chimiques endogènes dont notamment le poids moléculaire, la structure secondaire et tertiaire, l'hydrophobicité et la charge électrostatique,... La solubilité est également fortement affectée par les conditions de la solution telles que le pH, la température et la composition ionique. La valeur de solubilité est généralement plus faible à proximité du point isoélectrique.¹⁷

Capacité moussante : Les mousses sont le résultat du comportement des protéines aux interfaces air-eau. Les protéines contribuent à la formation du film de mousse en réduisant la tension interfaciale. Elles se concentrent à la surface des cellules de mousse, où elles subissent un dépliage partiel et une interaction ultérieure par liaison intermoléculaire, ce qui donne un film cohésif et stabilise les cellules de mousse.¹ Les protéines de lactosérum ont de très bonne capacités moussantes.

Capacité émulsifiante : L'émulsion est le système hétérogène d'une ou plusieurs phases dispersées dans une phase continue. Dans une émulsion stabilisée par une protéine, le rôle de cette dernière est de fournir une membrane interfaciale autour du globule lipidique pour empêcher le crémage, la coalescence, la flocculation et le dégraissage.¹ Les protéines de lactosérum peuvent par exemple être utilisées pour remplacer les œufs dans les produits de boulangerie. Le remplacement des œufs par des protéines de lactosérum dans la fabrication de gâteaux présente des avantages tant économiques que nutritionnels.¹⁸

Formation de gel et viscosité: Les protéines de lactosérum ont d'excellentes caractéristiques de gélification, en particulier au-dessus de pH-7,0. Les propriétés de gélification du WPC sont liées à la composition des protéines, des minéraux, des lipides ainsi qu'au pH. La gélification est un processus en deux étapes impliquant le dépliage initial d'une molécule de protéine suivi d'une agrégation ultérieure.¹³ Grâce à leur propriétés gélifiantes, les WPC et WPI peuvent également être utilisés comme substitut au blanc d'œuf dans la fabrication de gâteaux ou bien dans le produit carné.¹⁸

2.2. Principales protéines des concentrés de protéines de lactosérum

Les concentrés de protéines de lactosérum sont composés de différentes fractions de protéines. Il existe quatre fractions majeures et quelques fractions mineures. Les principaux composants des protéines de lactosérum comprennent la β -lactoglobuline (56-60 %), l' α -lactalbumine (18-24 %), la sérum-albumine (6-12 %), les immunoglobulines (6-12 %), la lactoferrine, les facteurs de croissance et la peroxydase.

2.2.1. La β -lactoglobuline - β -Lg

La β -lactoglobuline représente la majeure partie de protéines du lactosérum de 18,3 kDa constituée de 162 acides aminés¹⁹. Elle existe généralement sous la forme d'un dimère composé de deux sous-unités identiques. Chacun de ces monomères possède une liaison sulfhydryle (-SH) ainsi que deux liaisons disulfure (-S-S-).

Bien qu'il y ait une certaine variabilité entre les différents variants génétiques de la β -lactoglobuline, tous possèdent deux ponts trypsine, deux ponts disulfure et un groupe thiol libre.²⁰ La première liaison disulfure se situe entre la Cys 66 - Cys 160. Tandis que la deuxième se situe vraisemblablement entre la Cys 106 - Cys 119.²⁰ La Figure 3 illustre l'emplacement de ces différents ponts disulfures et donne également un aperçu de la variabilité de la β -lactoglobuline (variant B) d'une espèce animale à une autre. Les deux ponts disulfures entre les résidus 66-160 et 106-119 sont représentés par des hachures noires. Le jaune indique les régions de l'hélice 3₁₀, le bleu montre les β -brins et le brun représente l'hélice α .²¹

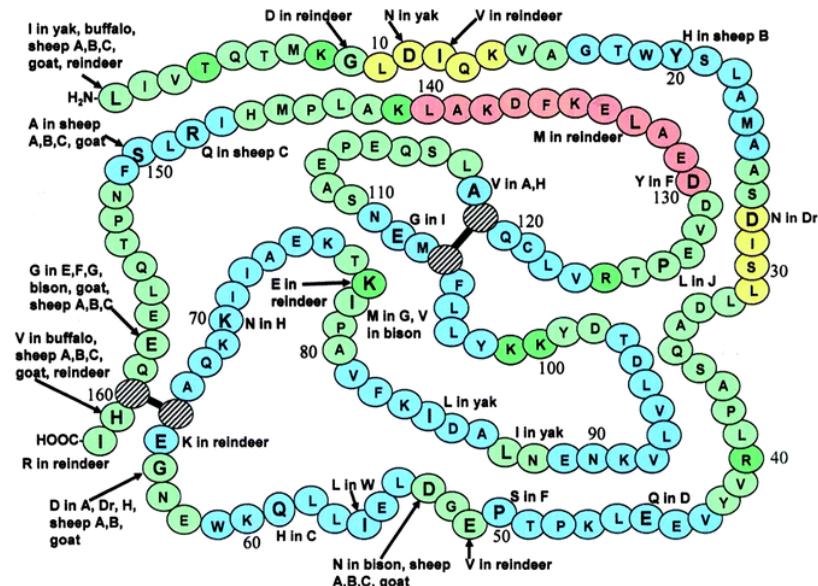


Figure 3: Illustration de la séquence d'a.a. de la β -lactoglobuline bovine (variant B) ainsi que les différences avec d'autres espèces animales. (Sawyer et al., 2013)

La structure secondaire de la β -lactoglobuline est dépendante du pH. En effet, dans une gamme de pH comprise entre 5 et 7,5, elle tend à former des dimères tandis que dans des conditions de pH comprises entre 3,5 et 5 les dimères polymérisent en octamères. Pour des valeurs de pH encore plus basses, en dessous de 3,5, elle est essentiellement présente sous forme de monomères.²⁰

La structure tertiaire de la β -lactoglobuline consiste en des feuillets antiparallèles formés par neuf brins enroulés pour former un calice aplati. Le noyau de la molécule est un barreau antiparallèle à huit brins et les brins des deux feuillets qui forment les côtés opposés du calice sont orthogonaux. À l'extérieur du calice, six brins sont adjoints d'une hélice à trois tours dont l'un d'entre eux participe à la formation du dimère.^{22, 23}

Des modifications rapides de l'environnement des acides aminés aromatiques ont été mises en évidence et leur intensité augmente avec la température. Ces modifications de structure ne sont irréversibles qu'à des températures supérieures à 65 -70°C.²³ La température de dénaturation de la β -lactoglobuline se situe aux alentours de 74 °C en fonction de la proportion des différents variants génétiques.²⁴ La β -lactalbumine possède une charge nette négative à des valeurs de pH neutres.²⁵ Le point isoélectrique de la protéine pour ses variantes A et B, qui ne diffèrent qu'aux positions 64 (Asp/Gly) et 118(Val/Ala), sont au point isoélectrique à une valeur de pH=5,1.²⁶

Le **Tableau 1** reprend les principales caractéristiques chimiques et physicochimiques de la β -lactoglobuline, mais aussi ceux de l' α -La (**Chap. 2.2.2**), de la BSA (**Chap. 2.2.3.**) et des Ig (**Chap. 2.2.4**).

Tableau 1: Propriétés chimiques et physicochimiques des protéines de lactosérum. (De Wit et al., 1986)

	β -La	α -La	BSA	Ig
Point isoélectrique	5.2	4.2-4.5	4.7-4.9	5.5-8.3
Concentration dans le lactosérum (g/l)	2-4	0.6-1.7	0.4	0.4-1.0
Concentration dans le lactosérum (% w/w)	56-60	18-24	6-12	6-12
Poids moléculaire (daltons)	18 000	14 000	69 000	>146,000
Hydrophobicité moyenne (kcal/résidu)	1075	1020	995	-
Résidus totaux d'acides aminés/mol	162	123	582	-
Résidus apolaires/mol	54	44	163	-
Résidus cystéine/mol	5	8	35	-
Résidus disulfure/mol	2	4	17	-
Résidus sulfhydryle/mol	1	0	1	-
Résidus lysine/mol	15	12	59	-
Résidus d'acide glutamique/mol	16	8	59	-
Résidus d'acide aspartique/mol	10	9	39	-

2.2.2. L'α-lactalbumine - α-La

L'α-lactalbumine est une petite protéine globulaire dont la masse moléculaire est de 14,2 kDa²⁷ jouant un rôle clé dans la biosynthèse du lactose ainsi que dans la formation et la sécrétion de la phase aqueuse du lait. Elle est un membre de la superfamille des lysozymes de type C. Elle possède d'ailleurs une structure 3D similaire à celles des lysozymes. En effet, l'α-lactalbumine possède un ion calcium stabilisateur avec lequel elle est étroitement lié²⁸. α-La est la protéine régulatrice du système enzymatique de la lactose synthase qui catalyse et régule la synthèse du lactose dans la glande mammaire en lactation.²⁹ Elle ne possèdent aucun groupement sulfhydryle libre .

La structure de l'α-La ne diffère pas significativement entre les formes libre et complexée et comprend entre autres trois hélices α régulières et un petit feuillet β plissé antiparallèle à trois brins séparés par des tournants-β irréguliers.²⁸ Elle possède également huit cystéines qui lui permettent de former quatre liaisons transversales disulfure reliant (**Figure 4**): deux dans le lobe hélicoïdal entre la Cys6 à la Cys120 et la Cys28 à la Cys111, un dans le lobe contenant le feuillet β entre la Cys60 à la Cys77 et enfin un la Cys73 du lobe β et la Cys90 du lobe hélicoïdal. L' α -la sous sa forme native (forme N ou holo) est une métallo- protéine contenant du calcium. Le site de liaison du Ca⁺⁺ au sein de la protéine est constitué de sept atomes d'oxygène coordonnant le Ca⁺⁺ qui sont fournis par les groupes carboxylates des Asp 82, 87 et 88, par les atomes d'oxygène carbonyle de la Lys 79 et de l'Asp 84, et par deux atomes d'oxygène carbonyle de l'Asp 84.²⁰

Si l'α-la est chauffée seule, des agrégats via des liaisons disulfure ne peuvent être formés qu'à des combinaisons extrêmes de temps et de température. En présence de β-lactoglobuline, la stabilité thermique de l'α-la diminue car la β-lg, avec son groupe thiol libre, agit comme un catalyseur (promoteur) pour ouvrir le pont disulfure dans l'α-la et ainsi diminuer sa stabilité thermique.²⁷ Dans ces conditions, sa température de dénaturation est alors de 65,2°C à pH 6,7.³⁰ L'α-lactalbumine possède une charge nette négative à des valeurs de pH neutres et son point isoélectrique se situe à une valeur de pH = 4,2.³¹

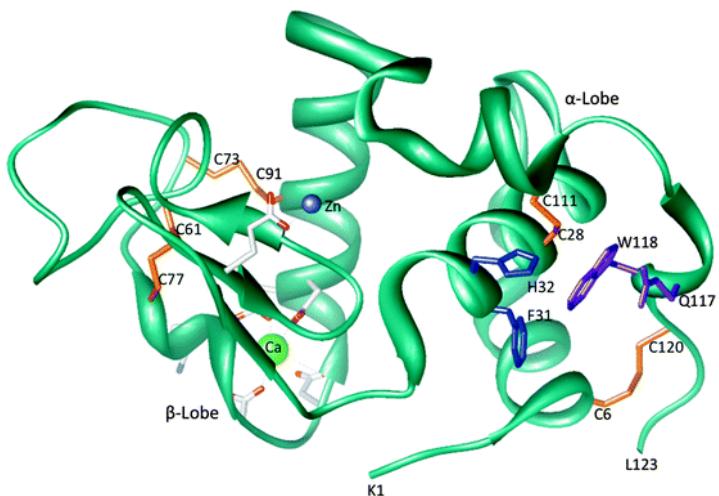


Figure 4: Structure 3D l'α-lactalbumine. Les chaînes latérales sont montrées pour les huit cystéines ainsi que pour les résidus dans les sites de liaison Ca et Zn. (K. Brew et al., 2013)

2.2.3. Le sérum albumine bovin – BSA

La BSA, présente dans le lait de vache à environ 0,1 à 0,4 g/L possède un rôle dans la facilitation du transport des acides gras insolubles dans le système circulatoire sanguin. Elle a une masse molaire de 69 000 daltons et se compose de 582 résidus d'acides aminés. C'est la plus longue chaîne polypeptidique unique de toutes les protéines du lactosérum. Cette protéine possède 17 liaisons disulfure intramoléculaires et un groupe sulfhydryle libre au niveau du résidu 34.⁴

Sa structure secondaire est composée de 50 à 55 % d'hélices α , de 15 à 18 % de feuillets β et de 27 à 35 % de structures enroulées aléatoires. Sa structure tertiaire est organisée en neuf boucles qui se répètent en triplet avec un schéma de types: grandes-petites-grandes boucles. Elles sont regroupées en trois domaines homologues de trois boucles chacun (**Figure 5**).^{20, 32}

La BSA possède des sites de liaison spécifiques pour les ligands métalliques cationiques et pour les acides gras à longue chaîne. Les propriétés de liaison des ligands confèrent à ces protéines une grande stabilité thermique. Par exemple, la présence d'acides gras liés est connue pour stabiliser la protéine contre la dénaturation thermique. En effet, la température de dénaturation de la BSA dégraissée à pH 4 est d'environ 64°C. La BSA contenant 1,0 à 1,3 mole d'acides gras/mol d'albumine a une température de dénaturation de 74°C. La molécule de BSA est plus compacte dans la région C-terminale que dans la région N-terminale. En outre, les différents domaines ne sont pas semblables en termes d'hydrophobilité, de charge nette et de propriétés de liaison des ligands.³³

Elle a tendance à précipiter autour de 40-45°C en raison de l'augmentation de l'exposition de parties hydrophobes qui tendent à former des liaisons hydrophobes entre les chaînes.³⁴ Son point isoélectrique se situe à des valeurs de pH comprises entre 4,7 et 4,9.³⁰

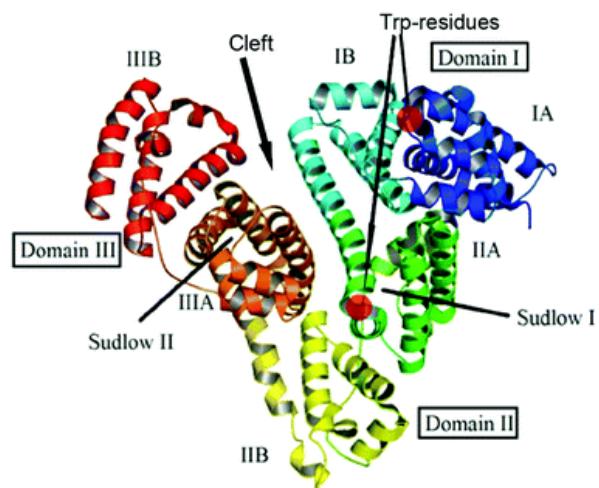


Figure 5: Structure tertiaire de la BSA (Kovalska et al., 2019)

2.2.4. Les immunoglobulines - Ig

Les immunoglobulines sont, en terme de quantité, les quatrième protéines présentes dans le lactosérum. Celles-ci, sécrétées dans le colostrum et le lait par le mammifère en lactation, sont des facteurs majeurs de la protection immunitaire du nouveau-né. Les immunoglobulines présentes dans les sécrétions mammaires représentent la réponse immunitaire cumulative de l'animal en lactation à l'exposition antigénique qui se produit par l'interaction avec l'environnement. Dans le colostrum bovin, les Ig représentent 70 à 80 % du contenu protéique total, alors que dans le lait mature, elles ne représentent que 1 à 2 % des protéines totales.¹ Il existe une grande variabilité dans les Ig aussi bien d'un point de vue intra-espèce qu'inter-espèce.³⁵ Les principaux isotypes présents dans les sécrétions mammaires bovines sont les IgG, les IgA, et les IgM (**Figure 6**).

Les immunoglobulines sont des complexes hétéromériques en forme de Y composés de deux chaînes légères (~25 kD) et de deux chaînes lourdes (~55 kD) dans le cas des IgG. Les chaînes légères interagissent avec l'extrémité amine des chaînes lourdes pour former le domaine Fab de la molécule qui contient les sites de liaison à l'antigène à leur extrémité. La partie carboxyle des chaînes lourdes se combine pour former le domaine Fc qui permet les interactions avec le complément et les récepteurs Fc. Les classes d'immunoglobulines se distinguent par le type de chaîne lourde et leur capacité à interagir avec la chaîne J ou chaîne de jonction (~15 kDa) qui relie les chaînes lourdes pour former des immunoglobulines polymériques dans le cas des IgA et IgM.³⁵

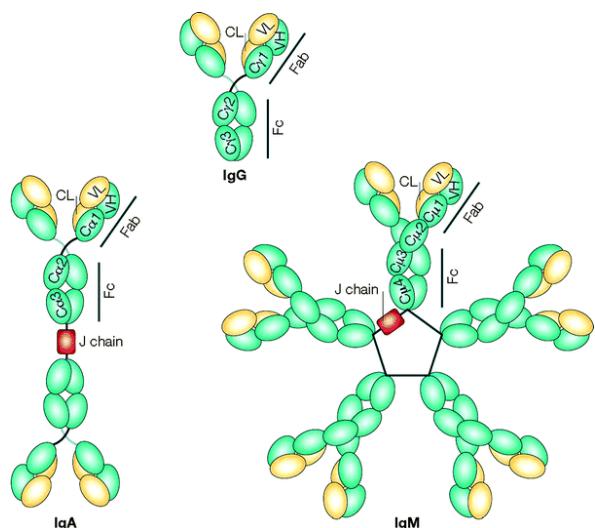


Figure 6: Structure des trois principaux isotypes d'immunoglobulines (IgG, IgA, et IgM) présents dans le lait bovin. (Hurley et Theil, 2013)

L'immunoglobuline G existe sous la forme monomère dans le lait tandis que la plupart des IgA présentes dans les sécrétions des muqueuses sont des IgA di- ou tétramériques. Les IgM du sérum et du lait sont des molécules complexes composées de cinq monomères d'IgM liés par des liaisons disulfure.³⁶ L'immunoglobuline G est la plus thermostable et l'IgM est la plus thermolabile des Ig présentes dans le lait bovin. Les échantillons de lait qui subissent une pasteurisation classique peuvent conserver 25 à 75 % de la concentration d'IgG tandis que le lait soumis à une pasteurisation à ultra-haute température ne conserve que peu d'IgG détectables.³⁶ Le point isoélectrique des Ig est directement dépendant de l'isotype. Celui-ci se situe toujours dans une gamme de valeur de pH comprise entre 5,5 et 8,3.³⁴

2.3. Dénaturation et agrégation des protéines de lactosérum

Les protéines de lactosérum sont aisément dénaturées pendant le traitement thermique. En effet, elles subissent des changements de conformation dus à l'ouverture de groupements qui étaient initialement repliés. Cette tendance à la dénaturation représente d'ailleurs un problème majeur en industrie en raison notamment du relargage de composés soufrés aromatiques provoquant des saveurs de cuissons au lait chauffé.³⁷ Une autre source de problème provient de la formation d'agrégats protéiques qui tend à encrasser les échangeurs de chaleur lors des traitements thermiques du lait servant à garantir que celui-ci soit sain d'un point de vue microbiologique. La dénaturation des protéines de lactosérum est l'un des principaux effets du chauffage du lait, qui entraîne une modification des propriétés chimiques et nutritionnelles du lait. L'ordre apparent de dénaturation des protéines individuelles du lactosérum est le suivant : Ig > BSA > β -Lg > α -La.⁴

En fonction des conditions dans le lait, le processus de dénaturation peut être soit réversible soit irréversible. Dans le premier cas, un dépliement partiel des protéines de lactosérum ainsi qu'une perte de la structure hélicoïdale sont observés. Dans le second, des processus d'agrégation impliquant des interchangeabilités entre groupements sulfhydryle (-SH) et pont disulfure (-S-S-)³⁸, des interactions hydrophobes et électrostatiques se produisent.³⁹

L'agrégation des protéines de lactosérum met en jeu des interactions entre des groupes -SH libre et des liaisons -S-S- de protéines contenant de la cystine telles que la β -Lg, l' α -La et la BSA via des réactions d'échange -SH/S-S. Ces interactions protéine-protéine conduisent à la formation irréversible d'agrégats de taille variable selon les conditions de chauffage et la compositions en protéines.⁴⁰

2.3.1. L'agrégation de la β -lactoglobuline

Il est souvent accepté que l'agrégation des protéines de lactosérum est dirigée par la β -Lg notamment en raison de sa prépondérance dans le lactosérum. Bien qu'il existe plusieurs modèles concurrents pour décrire en finesse les différentes interactions physico-chimique de ces protéines, il peut être admis qu'en général l'agrégation de la β -Lg se produit comme suit : dans l'agrégation induite par la chaleur, les interactions non covalentes jouent un rôle majeur dans la dissociation des dimères natifs en monomères dénommée « globule fondu ».⁴⁰

Ces globules fondus possèdent un groupement -SH libre ainsi que des surfaces hydrophobes adhésives et sont donc enclin à former des dimères, trimères ou tétramères non natifs par le biais d'échange de -SH/-S-S- et en moindre mesures des interactions non covalentes.²⁴ Par conséquent, la formation d'agrégats de poids moléculaire plus élevé, appelés polymères, est initiée par des réactions d'échange -SH/S-S. Pour que cette polymérisation se produise, les dimères, trimères et oligomères doivent atteindre leur concentration maximal respective.²⁴

2.3.2. L'agrégation de l' α -lactalbumine

L' α -La et la BSA, bien que non majoritaires ont aussi un rôle dans les phénomènes d'agrégation. Il est établi depuis longtemps que l' α -La, en l'absence de β -Lg, n'est pas capable de former des agrégats ni de se dénaturer de façon irréversible à moins d'être chauffé à plus de 95°C pendant au moins 15 minutes en l'absence de calcium.⁴¹ Cette stabilité élevée s'explique notamment par le fait que cette protéine ne possède pas de groupement -SH libre.⁴² L'agrégation de l' α -La est donc un procédé complexe se déroulant en cinq étapes distinctes. Ce n'est que lors de la deuxième étape, quand chauffé à plus de 90 °C, qu'une dénaturation irréversible se produit. Malgré cela, plusieurs études ont démontré que l' α -La n'est pas capable de former de vrais gels. En effet, seuls des gels faibles peuvent être formés, et ce, dans un grand éventail de conditions physico-chimiques.^{40,42,43}

2.3.3. L'agrégation de la BSA

La BSA est l'une des principales protéines gélifiantes du lactosérum. Le processus de gélification implique le dépliage de cette molécule de protéine et son agrégation. Une modification particulière de la structure du feuillett β peut être un facteur essentiel lors de la gélification de la BSA. Par exemple, à l'état natif de la BSA, la teneur en feuillets β est relativement faible par rapport à celle des autres protéines du lactosérum. Cependant, lorsque la chaleur est appliquée, la teneur en feuillets β augmente et la quantité d'hélices α diminue avant la gélification.⁴³ Une étude par analyse calorimétrique différentielle (DSC) a montré que la BSA commence à se dénaturer à 62 °C et a une vitesse d'agrégation plus rapide que la β -Lg.⁴⁴ Avec la dénaturation, les protéines de BSA présentent une plus grande hydrophobie de surface, ce qui provoque une plus forte attraction hydrophobe intermoléculaire et donc, l'agrégation.⁴⁵

2.4. Techniques de modifications des protéines de lactosérum

Les protéines de lactosérum sont déjà largement utilisées comme ingrédient dans de nombreux produits alimentaires traditionnels et nouveaux. Afin d'encore étendre leur champ d'utilisation, différentes techniques de modification peuvent être utilisées pour diversifier ou améliorer leurs propriétés physiques et fonctionnelles. Parmi tous les types de modifications existants, trois grands familles peuvent être mis en évidence, à savoir les modifications par voies : chimique, enzymatique et physique. Celles-ci sont présentées de façon non exhaustive ci-dessous.

2.4.1. Modification par voie chimique

La majorité des modifications par voie chimique implique le recours à la réaction de Maillard. Celle-ci s'avère supérieure aux autres types de réactions, dans le contexte de protéines alimentaires, car elle ne nécessite pas d'ajout de produit chimique supplémentaire mais aussi en raison de son caractère spontané.

Olivier et al. (2006) ont démontré que la liaison covalente des protéines à des polysaccharides et à des sucres réducteurs plus petits via la réaction de Maillard modifie la fonctionnalité des protéines sans nécessiter l'ajout de réactifs chimiques permettant ainsi d'améliorer les propriétés fonctionnelles des protéines et même de leur conférer de nouvelles fonctionnalités.⁴⁶

La solubilité ainsi que les propriétés thermiques et émulsifiantes des protéines du lactosérum peuvent être modifiées par glycation avec divers sucres, principalement réducteurs. L'incubation à 60°C d'un mélange de poudres de protéines de lactosérum et de carboxyméthyl-cellulose a permis d'améliorer les propriétés émulsifiantes de la poudre finale.⁴⁷ Plus récemment, Setiowati et al. (2017) ont mis en évidence que la résistance au crémage et à la chaleur des émulsions peut être améliorée en utilisant des protéines de lactosérum conjuguées à de la pectine à faible teneur en « méthoxy » par traitement thermique à sec.⁴⁸ De même, la formation de conjugués WPI-pectine de betteraves à sucre via la réaction de Maillard augmente considérablement les propriétés émulsifiantes des WPI mais aussi leur stabilité thermique.⁴⁹ De plus, de Oliveira et al. (2015) ont montré que les propriétés de solubilité, thermiques et émulsifiantes des protéines individuelles du lactosérum peuvent également être améliorées par la réaction de Maillard, comme l'α-lactalbumine-gomme d'acacia et la β-lactoglobuline-DX.⁵⁰

2.4.2. Modification par voie enzymatique

Les enzymes peuvent s'avérer être des outils utiles pour la manipulation de matières premières telles que les protéines. L'utilisation d'enzymes pour la modification des protéines du lactosérum peut se faire par *cross-linking* covalent ou par hydrolyse. Ces modifications entraînent non seulement une amélioration de la fonctionnalité, mais aussi un renforcement de la bio activité.⁵¹

Pour les modifications par *cross-linking*, la transglutaminase (TGase) est régulièrement utilisée. La TGase (γ -glutamyltransférase) catalyse la réaction de transfert d'acyle par la formation de

liaisons isopeptidiques covalentes entre les ϵ -(γ -glutamyl)-lysines intra ou inter moléculaire dans les protéines. Ces réactions entraînent la formation de polymères de poids moléculaire élevé qui modifient les propriétés physico-chimiques.⁵² Damodaran et Agyare (2013) ont ainsi mis en évidence que la température à laquelle un gel se forme et la température de dénaturation des protéines de lactosérum peuvent être augmenter après le traitement à la TGase. Cependant, ce traitement rend les protéines très sensibles au pH, à cause de la perte partielle de charges positives sur les résidus de lysine et à la perturbation de l'équilibre hydrophile-hydrophobe à la surface de la protéine.⁵³

Les protéines de lactosérum peuvent également être modifiées par hydrolyse enzymatique. Les produits de cette modification sont appelés hydrolysats de protéines de lactosérum et sont caractérisés par leur degré d'hydrolyse (%). Les six enzymes les plus couramment utilisées sont : la trypsine, la pepsine, la chymotrypsine, la papaïne, la broméline et la pronase.⁵² Les hydrolysats de protéines de lactosérum présentent plusieurs excellents avantages par rapport aux protéines de lactosérum, notamment l'amélioration de la stabilité thermique, la réduction de l'allergénicité, la teneur en peptides bioactifs, la production de peptides ciblés pour les régimes spéciaux. Les propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes des protéines du lactosérum peuvent également être modifiées après hydrolyse enzymatique.^{43,52}

2.4.3. Modification par voie physique

Une large gamme de techniques de modifications physiques existe et peut être scindée en deux grandes familles : les traitements thermiques et les traitements non thermiques. Ces techniques proposent une approche sans ajout de produit chimique ou d'enzyme permettent d'une part de réduire les coûts liés à ce type de produit, et d'autre part d'inscrire ceux-ci dans une démarche plus favorable aux yeux du consommateur.

2.4.3.1. Traitements thermiques

Les traitements thermiques sont l'un des moyens les plus anciens mais également l'un des plus utilisés pour modifier les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines de lactosérum. Ces traitements changent principalement les protéines en raison du dépliage de la molécule pendant le chauffage et de l'exposition à la chaleur de résidus d'acides aminés hydrophobes initialement enfouis dans la molécule.⁵²

En fonction de la concentration en protéines, l'exposition à des températures élevées conduit à la formation d'agrégats solubles ou de gels. Wijayanti et al. (2014) ont montré que des agrégats solubles étaient obtenus en chauffant des solutions de protéines de lactosérum (5-15 % w/w, pH 6-8) à 55-120 °C pendant 1-120 min.⁴³

En manipulant les conditions du traitement thermique, il est possible d'obtenir des agrégats de protéines de lactosérum présentant les propriétés physicochimiques souhaitées, notamment la charge de surface, l'hydrophobie de surface, et une large gamme de morphologies, y compris des particules sphériques de différentes tailles.⁵²

2.4.3.2. Traitements non thermiques

Les traitements non thermiques peuvent être utilisés pour modifier sélectivement les structures et les fonctions des protéines, produisant ainsi des protéines avec des fonctions spécifiques et répondant aux besoins de différents secteurs alimentaires. Ces traitements offrent un avantage non négligeable par rapport aux traitements thermiques au niveau énergétique car ils ne nécessitent pas de chauffage qui représente généralement la partie la plus énergivore des procédés physiques. Ci-dessous sont abordées certaines de ces techniques de modifications non thermiques.

Ultrasons

Les ultrasons sont des ondes sonores qui peuvent être classés en deux catégories sur base de la gamme de fréquences: haute intensité (16-100 kHz, 10-1000 W/cm²) et basse intensité (de 100 kHz à 1 MHz, avec une intensité inférieure à 1 W/cm²). Ces dernières années, ils ont été largement utilisés pour améliorer les propriétés physiques et fonctionnelles de plusieurs protéines alimentaires, notamment l'hydrophobie de surface, la solubilité, le comportement rhéologique, la propriété émulsifiante et la capacité moussante.⁵²

La capacité moussante et la stabilité de la mousse d'une solution de WPC à 10% w/w peuvent être respectivement doublées et passer de 68,3 à 98,4 min après avoir subi un traitement par ultrasons à haute intensité (20 kHz pendant 15 minutes, température contrôlée à 20 °C). De même, des traitements à 20 kHz et 40 kHz pendant 15 minutes (température contrôlée à 20°C), ont permis de faire passer la solubilité d'une solution de WPI à 10% w/w de 66,8% à respectivement 85% et 84%. En revanche, des traitements à basse fréquence (500 kHz pendant 15 minutes, température contrôlée à 20 °C) n'ont permis de modifier aucune des propriétés mentionnées ci-dessus.⁵⁴

Chandrapala et al. (2011) ont montré que les traitements ultrasons (20 kHz, pendant 1, 5, 10, 20, 30 et 60 min) ne modifient pas la température de dénaturation thermique d'une solution de WPC (5% w/w) et ont conclu que les ultrasons, dans ces conditions, ne semblent pas changer la structure protéique des solutions de WPC à un degré significatif.⁵⁵

Les ultrasons peuvent également être utilisés en combinaison des traitements thermiques. Cette combinaison s'est avérée avoir un impact considérable sur les propriétés physicochimiques et émulsifiantes des protéines du lactosérum. Le traitement par ultrasons (20 kHz, 31W/cm² pendant 20 min) appliqué après l'agrégation thermique a perturbé les interactions associatives non covalentes par un fort cisaillement. Cet effet a provoqué une diminution de la taille des particules, de la turbidité, de la viscosité apparente, et une augmentation de l'hydrophobie de surface, des groupements sulfhydryles libres, ainsi qu'une amélioration des propriétés émulsifiantes des agrégats solubles de protéines de lactosérum.⁵⁶

Haute pression hydrostatique

La haute pression hydrostatique ou ultra-haute pression, est une technique de modification non thermique. Dans ce traitement, les denrées alimentaires sont exposées à une pression importante (100-1000 MPa) pendant une courte période de temps avec pour effets l'inactivation des micro-organismes et des enzymes, la rétention des nutriments et la modification des propriétés physico-chimiques des protéines. La modification des protéines par la haute pression est attribuée à la perturbation des interactions hydrophobes et électrostatiques.⁵²

Les recherches de Devi et al. (2013) ont permis d'établir que à pH neutre et à température ambiante, la sensibilité à la pression des différents types de protéines présentes dans le lactosérum est la suivante : β -lactoglobuline B > β -lactoglobuline A > albumine de sérum bovin > α -lactalbumine.⁵⁷

Plusieurs facteurs affectent les gels de protéines de lactosérum induits par la pression, notamment le niveau de pression, la température et la durée du traitement, la composition et la concentration des protéines de lactosérum, les conditions environnementales (pH et force ionique).

Homogénéisation dynamique à haute pression

L'homogénéisation à haute pression est un procédé de modification physique relativement nouveau. Il est appliqué aux aliments liquides par des dispositifs qui consistent en une pompe volumétrique (généralement une pompe à piston) et une ou plusieurs restrictions de débit (étages) créées par des valves ou des buses.⁵⁸ La procédé se base sur : un fort cisaillement, un impact à grande vitesse, une vibration intense et une libération soudaine de la pression pour modifier la structure et les propriétés fonctionnelles des macromolécules biologiques, tels que les protéines et l'amidon.⁵

A l'heure actuelle, bien que peu d'études soient disponibles concernant l'effet de l'homogénéisation à haute pression sur les protéines alimentaires⁵⁸, une série de motivations des propriétés physico-chimiques des protéines de lactosérum ont cependant été mises en évidence. Blayo et al. (2016) ont ainsi utilisé l'homogénéisation à haute pression pour induire l'agrégation des protéines de lactosérum et ainsi changer l'efficacité de la protéolyse.⁷ L'augmentation des pressions d'homogénéisation de 25 à 100 MPa permet de diminuer significativement la taille des protéines de lactosérum présentes dans une solution de WPC à 10% w/w.⁵⁹ Plusieurs études ont montré que l'hydrophobicité de surface est graduellement augmentée avec l'augmentation de la pression. Bouaouina et al. (2006) précisent que celle-ci est doublée lorsque les protéines sont traitées à 300 MPa et que cet effet serait dû à l'exposition accrue des sites hydrophobes résultant de la rupture de grands agrégats de protéines. Ces auteurs ont également mis en évidence que la tension de surface à l'équilibre d'une solution de WPI à 3% w/w ne semble pas influencée par le traitement, peu importe la pression.⁶⁰

La solubilité des protéines de lactosérum peut être grandement améliorée par l'homogénéisation à haute pression avec, pour une solution de WPC à 1% w/w traitée à 150 MPa, une augmentation de près de 10%. Cette augmentation de la solubilité est accompagnée d'une diminution par un facteur quatre de la taille des agrégats protéiques présents dans la solution.⁵

Le traitement à haute pression diminue les propriétés émulsifiantes des protéines de lactosérum, cependant, il semble augmenter la stabilité de celles-ci. En effet, l'homogénéisation à haute pression réduit la taille des particules de l'émulsion et rend la solution plus homogène, ce qui augmente la stabilité de l'émulsion.^{5,60} La capacité moussante est d'abord fortement augmentée (quasiment doublée) avec l'augmentation de la pression à laquelle est réalisé le traitement et atteint un maximum vers 150 MPa, ensuite, elle diminue de plus en plus fortement pour devenir moins importante que la capacité initiale à partir de 250 MPa.^{5,7,52} Étant donné que le traitement augmente la solubilité des protéines du lactosérum, cette méthode améliore par conséquent la formation de mousses des protéines du lactosérum. Cependant, l'homogénéisation à très haute pression détruit l'équilibre des groupes hydrophobes et hydrophiles et des groupes polaires chargés dans les solutions de protéines de lactosérum, ce qui détruit l'équilibre de la membrane protéique à l'interface gaz-eau et favorise la formation et le maintien de la mousse protéique.⁶¹

En conclusion, le traitement par homogénéisation à haute pression semble montrer un intérêt non négligeable de par son efficacité dans l'amélioration et la modulation des propriétés technofonctionnelles des protéines de lactosérum et plus largement des produits alimentaires. De plus, de récentes études suggèrent qu'il pourrait y avoir un grand potentiel pour la production d'une nouvelle gamme de produits hypoallergéniques et à haute valeur ajoutée à base de protéines de lactosérum.⁵²

La microfluidisation est un cas particulier d'homogénéisation à haute pression. Dans celle-ci, la valve est remplacée par une chambre de traitement à géométrie fixe en « Z » ou en « Y ». Le principe repose sur un flux entrant à très haute vitesse dans une chambre d'interaction conçue avec des micro-canaux. Le principe se base sur les forces subies par un fluide lorsqu'il est poussé au travers d'un micro-canal à très grande vitesse. Bien que l'importance de chacun des différents phénomènes n'ait pas encore été clairement établie, les mécanismes mis en jeu sont les suivants : le frottement à grande vitesse, la cavitation, le cisaillement, les turbulences, les impacts importants et enfin, l'échauffement.⁶²⁻⁶⁴

Contrairement aux traitements thermiques connus pour favoriser la dénaturation des protéines, la microfluidisation, tout comme l'homogénéisation à haute pression des protéines du lactosérum semblent plutôt affecter les structures tertiaires ou quaternaires de celles-ci. Les changements de la conformation moléculaire pourraient conduire à modifier les propriétés physico-chimiques des protéines de lactosérum mais pourraient également permettre de restaurer certaines propriétés fonctionnelles endommagées par le traitement à haute température.⁶²

En effet, Iordache et Jelen (2003), ont mis en évidence que les protéines de lactosérum dénaturées thermiquement peuvent être partiellement voir même totalement résolubilisées par

des traitements de microfluidisation à haute pression (150 MPa) et ce à pH acide (3,8) et neutre (7). De plus, les protéines de lactosérum resolubilisées sont sensibles à la coagulation secondaire induite par la chaleur, ce qui suggère que certains sites réactifs des structures thermiquement modifiées ont pu être nouvellement reformés. Le nombre de passages dans la chambre de traitement n'a pas d'impact sur les protéines.^{70,71} En modulant la pression à laquelle le traitement est effectué, il serait ainsi possible de moduler la taille des fibrilles formées lors des traitements thermiques afin d'obtenir des propriétés de viscosités spécifiques.⁶³

2.5. Cinétique de diffusion et d'adsorption des protéines tensioactives aux interfaces air/liquide

Le mouvement des molécules tensioactives entre une solution et un interface gazeux a d'abord été décrit comme un processus en deux étapes^{65,66} :

1. Le transport de molécules tensioactives d'une solution vers un interface.
2. Le réarrangement de la conformation des molécules tensioactives dans la couche adsorbée.

Par la suite, ce modèle a été complexifié en divisant l'adsorption d'une protéine tensioactive à l'interface air/eau en trois phases (**Figure 7**).^{67,68} La première phase est dépendante des phénomènes de diffusion et peut être décrite par le modèle de Joos & Rillaerts⁶⁹ alors que les phases deux et trois, difficilement discernables en pratique, sont décrites par le modèle de Ward et Tordai⁷⁰.

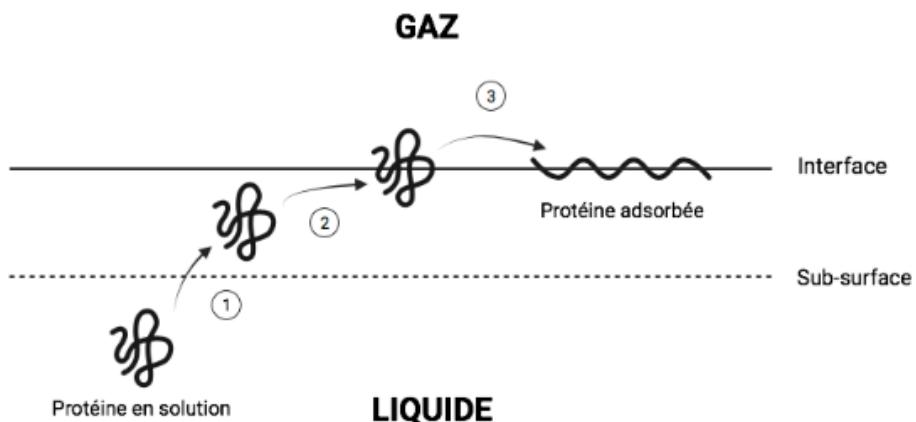


Figure 7: Modèle de Miller et al. : mécanisme en trois étapes de l'adsorption des protéines aux interfaces air/liquide ©Schéma réalisé avec le logiciel « BioRender »

1. Lors de la première phase, la molécule tensioactive doit passer de la phase liquide à la région située juste immédiatement sous l'interface. Cette zone est dénommée la « sub-surface ». Ce premier mouvement est contrôlé par des mécanismes de diffusion ou de convection.
2. Lors de la deuxième phase, la protéine doit se déplacer de la « sub-surface » vers l'interface à proprement parler. Pour ce faire, elle devra franchir des barrières énergétiques locales plus ou moins importantes.
3. La troisième phase voit la protéine subir une série de réarrangements conformationnels à l'interface afin d'atteindre un optimum énergétique.

La cinétique d'adsorption des molécules aux interfaces liquides est décrite par le modèle théorique de Ward et Tordai.⁷⁰ Il est d'application pour les interfaces avec des zones invariantes

dans le temps et est basé sur l'hypothèse que la dépendance temporelle de la tension à l'interface est causée par un transport de molécules vers celui-ci.

Le modèle contrôlé par la diffusion est basé sur l'hypothèse que le transport des molécules actives à l'interface depuis le liquide vers l'interface contrôle la vitesse du processus. Le modèle dit de "régulation cinétique" est basé sur l'hypothèse que la diffusion est rapide par rapport au transfert de molécules entre la sub-surface et l'interface.⁷¹

Dans le cas, des mesures de tension de surface dynamique, la quantité adsorbée peut être calculée pour un modèle dans lequel la variation de la concentration de surface en fonction du temps est supposée être proportionnelle au gradient de concentration à l'emplacement de l'interface. Ce modèle est en accord avec la première loi de diffusion de Fick.

Les hypothèses qui sous-tendent les modèles exposés plus haut sont les suivantes:

- Le mouvement d'une protéine vers la sous-surface est contrôlé par la diffusion.
- Il n'y a pas de barrière énergétique associée au mouvement d'une protéine de la sous-surface à la surface.

Il n'y a pas de changement de conformation de la protéine immédiatement après l'adsorption.⁷¹

3. Matériel et méthode

3.1. Matériel

La poudre de concentré de protéines de lactosérum (WPC) a été achetée chez ARMOR PROTEINES SAS (PROTARMOR 82 SBLi, France). Sa composition moyenne annoncée par le fournisseur est présentée ci-dessous (**Tableau 2**).

Tableau 2: Composition standard de la poudre de protéines de lactosérum "PROTARMOR 82 SBLi" et normes associées

Caractéristiques	Valeur type	Norme
Humidité	5,5%	NF V04-348 (oct 1978)
pH (at 5% w/w)	6,7%	
Particule calcinée	A	ADMI
Protéine (Nx6.38) / Poudre	79,0%	ISO 8968-1:2014 / IDF 20-1:2014
Protéine (Nx6.38) / Matière sèche	83,0%	ISO 8968-1:2014 / IDF 20-1:2014
Matière grasse	7,8%	ISO 5543:2004 / IDF 127:2004
Cendre	3,0%	NF V04-208 (oct 1989)
Lactose	3,0%	Par différence
Lécithine	1,0 % max	

Le Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane (Tris), la glycine, le sel disodique d'acide éthylènediamine-tétra-acétique, l'urée, l'acide trichloracétique (TCA), le β -mercaptoproanol, le réactif d'Ellman (d'acide 5,5-dithio-bis 2-nitrobenzoïque (DTNB)) et l'acide 8-anilino-1-naphtalènesulfonique (ANS) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Tous les réactifs étaient de grade analytique.

3.2. Production de la poudre de protéines de lactosérum traitées par microfluidisation

3.2.1. Préparation des solutions de protéines de lactosérum à microfluidiser

Les solutions de protéines de lactosérum à la concentration finale de 10 mg/g d'eau (1% w/w) et 100 mg/g (10% w/w) ont été préparées avec de l'eau ultra pure et de la poudre de lactosérum commerciale (WP 82). Ensuite, les solutions de protéines ont été agitées à l'aide d'un barreau magnétique et d'une plaque d'agitation (300 rpm) pendant quatre heures à température ambiante.

3.2.2. La microfluidisation

3.2.2.1. Appareillage et traitements appliqués aux protéines

Les traitements par microfluidisation des solutions de protéines de lactosérum ont été effectués à l'aide d'un *Microfluidizer Processor M-110EH* (Microfluidics - Newton, Massachusetts, USA).

Dans ce travail, une chambre de type Z avec une canalisation d'un rayon minimal de 100 µm a été employée (**Figure 8**).

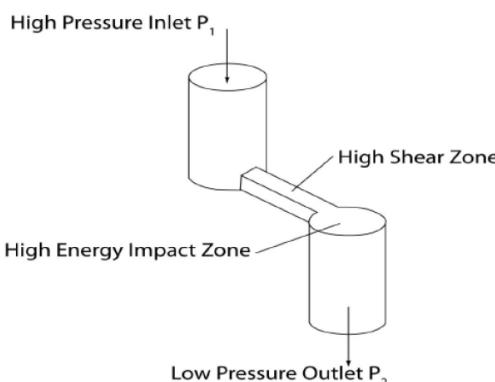


Figure 8. Schéma d'une chambre d'interaction en configuration « Z » ©Microfluidics Processor user guide

Des traitements différents (pression et nombre de passages) ont été appliqués à différentes solutions de protéines de lactosérum à des concentrations différentes (1% w/w et 10% w/w). Les températures d'entrée ainsi que la température du système de refroidissement ont été maintenue constantes (**Tableau 3**).

Tableau 3: Combinaisons de paramètres de microfluidisation utilisés

Pression (bars)	Nombre de passages	Concentration en protéines (% w/w)	Température entrée (°C)	Température sortie (°C)
1375	1	1	20 ± 0,5 °C	12 à 14
1375	1	10	20 ± 0,5 °C	12 à 14
1000	5	10	20 ± 0,5 °C	12 à 14
1375	5	1	20 ± 0,5 °C	12 à 14
1375	5	10	20 ± 0,5 °C	12 à 14

3.2.2.2. Évaluation du taux de cisaillement

Le taux ou vitesse de cisaillement mesure le cisaillement appliqué au sein d'un fluide. Il dépend de la contrainte de cisaillement et de la nature du fluide (notamment de sa viscosité).

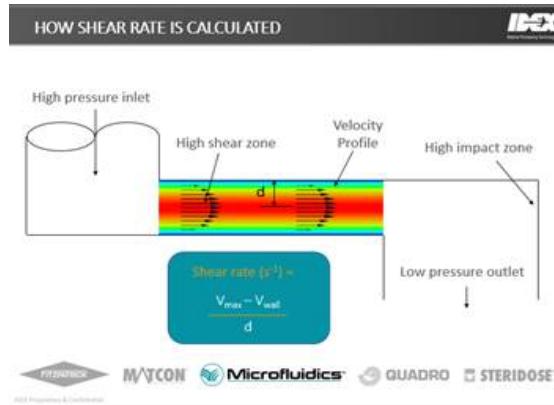


Figure 9: Schéma de la chambre d'interaction *t* en "z" du microfluidiseur et calcul du taux de cisaillement ©Microfluidics Processor user guide

Des mesures de débit pour les différentes pressions ont été effectuées. Conformément aux recommandations de Microfluidics®, un écoulement laminaire a été supposé dans la chambre d'interaction (Figure 9). La vitesse du fluide à proximité directe de la paroi peut donc être considérée égale à zéro.

Dans ces conditions, le taux de cisaillement se définit par l'**Équation 1**:

$$\text{Taux de cisaillement (s}^{-1}\text{)} = \frac{V_{\max}}{d}$$

Équation 1: Détermination du taux de cisaillement (s⁻¹) dans la chambre d'interaction

Le terme V_{\max} correspond à la vitesse au centre de la canalisation (m*s⁻¹) et le terme d (100 µm), au rayon de la canalisation dans la chambre d'interaction. La valeur de V_{\max} obtenue à partir de l'équation (Équation 2) :

$$V_{\max} = V_{\text{moyenne}} * 2 \text{ (m/s)}$$

Équation 2: Calcul de la vitesse maximum (m/s) atteinte dans la chambre d'interaction

La vitesse moyenne, V_{moyenne} (m*s⁻¹), est calculée comme suit ($V_{\text{moyenne}} = D * A_{\text{section}} \quad \left(\frac{m}{s}\right)$)

Équation 3) :

$$V_{\text{moyenne}} = D * A_{\text{section}} \quad \left(\frac{m}{s}\right)$$

Équation 3: Calcul de la vitesse moyenne (m/s) dans la chambre d'interaction

Où d = le débit de liquide dans le microfluidiseur en (m³*s⁻¹) et A_{section} = l'air de la section de la canalisation dans la chambre d'interaction (m²).

3.2.3. La lyophilisation

Préalablement à la lyophilisation, les échantillons ont été placés dans un congélateur à -50 °C *Revco* (Thermo Fisher Scientific, USA), pendant une nuit.

La lyophilisation a été réalisée sur des échantillons déjà congelés de solutions de protéines de lactosérum natives ou microfluidisées. Les échantillons ont été séchés dans un lyophilisateur *Christ Gamma 2-16 LSC* (Martin Christ, Allemagne) équipé d'une pompe à vide *Vacuum duo line* (Pfeiffer vacuum, Allemagne). La température du plateau a été fixée à 20 °C sous une pression de vide de 66 Pa. Le séchage a été interrompu après 72h. Les échantillons ont ensuite été broyés à l'aide d'un pilon et d'un mortier puis stockés au frigo à 4°C dans un contenant hermétique.

3.2.4. Dénomination des échantillons

Afin de faciliter la compréhension, un système de dénomination des échantillons a été mis en place. Le code attribué aux échantillons est composé de trois segments : le premier fait référence au traitement subi par la solution (microfluidisé ou non), le deuxième fait référence à l'état et à la concentration pour les solutions (poudre, solution 1% w/w et solution 10% w/w) et enfin le troisième permet de savoir si l'échantillon a été lyophilisé ou non.

Le **Tableau 4**, ci-dessous, reprend l'ensemble des abréviations relatives aux échantillons.

Tableau 4: Récapitulatif des dénominations utilisées pour les échantillons selon le modèle établi

Première partie	Deuxième partie	Troisième partie
Type de traitement	État physique et concentration	Traitement de séchage
Non microfluidisé = WP	Poudre = p	Lyophilisé = L
Microfluidisé 1375 bars et 1 passage = 1375	Solution 1% w/w = 1	Non lyophilisé = N
Microfluidisé 1000 bars et 5 passages = 1000M	Solution 10% w/w = 10	
Microfluidisé 1375 bars et 5 passages = 1375M	Solution microfluidisée à 10% w/w et reconstituée à 1% w/w = 10/1	

La **Figure 10** donne un exemple du système de dénomination décrit plus haut à savoir : des protéines de lactosérum non microfluidisées, en solution à 1% w/w et ayant subi une lyophilisation.

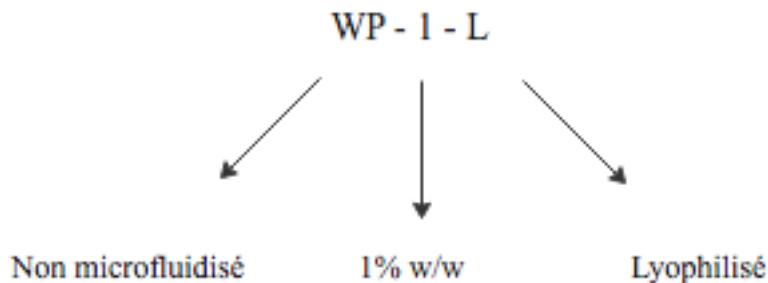


Figure 10: Exemple du système de dénomination employé dans ce travail pour l'échantillon WP-I-L.

3.3. Analyse de l'impact de la microfluidisation sur les propriétés de tension de surface à l'interface air-eau

3.3.1. Cinétique d'adsorption courte – Age de surface de 10 à 10 000 ms

Les mesures des tensions de surface dynamiques à l'interface air/liquide à des échelles de temps très courtes ont été réalisées à l'aide d'un tensiomètre *BP 100* (Krüss, Hamburg, Germany). La mesure est basée sur la méthode de la pression de bulle maximale. Dans cette méthode, des bulles d'air sont générées à vitesse constante à 20 °C à travers un capillaire (diamètre 0,200 mm) dans la phase liquide. Les mesures permettent également de sonder la cinétique de diffusion et d'adsorption des tensioactifs.⁷²

3.3.2. Cinétiques d'adsorption longue – Age de surface de 1000 ms à 1800 s

Les tensions de surface à des intervalles de temps plus long ont quant à elles été étudiées à l'aide d'un *Tracker* (TECLIS, France). La solution de protéines à analyser a été chargée dans la seringue. L'aiguille, attachée à la seringue, a été insérée dans une cuvette laissée vide, puis une gouttelette d'échantillon de 5 µL a été formée. La valeur de tension de surface a été déterminée en numérisant et en analysant le profil de la gouttelette selon l'équation fondamentale de *Laplace*, au moyen d'une caméra CCD (Invaritar P/N 59LG575) et d'un logiciel informatique de traitement d'images propre à l'appareil (DROP, TECLIS, France)

Toutes les mesures ont été effectuées à 20 ± 0,5 °C et en triplicata pour chaque solution (1% ou 10% w/w, hydratation = 4 heures).

3.3.3. Tension de surface à l'équilibre

A partir des données obtenus par les analyses *Tracker*, il est possible de déterminer par transformation mathématique la tension de surface à l'équilibre. Razafindralambo et al. (1995) Cette valeur correspond à l'ordonnée à l'origine de l'équation de la régression linéaire liant les points d'une même analyse. L'axe des ordonnées est exprimé comme étant $1/t^{0,5}$.⁷³ Cette détermination a été réalisée en triplicata pour chaque type d'échantillon.

3.4. Analyse de l'impact de la microfluidisation sur les autres propriétés physico-chimiques des protéines

3.4.1. Analyse calorimétrique différentielle - DSC

Les transitions thermiques présentées pour les différents échantillons ont été étudiées à l'aide d'un analyseur DSC *TA Instruments Q2000* (New Castle, Delaware, USA) équipé d'un système de refroidissement. La cellule a été purgée avec 50 mL min^{-1} d'azote sec et calibrée en utilisant comme standard de l'indium et de l'eicosane. Des échantillons d'environ 10 mg de liquide ont été pesés dans des capsules en aluminium scellées *Tzero* (TA Instruments), pour réaliser l'analyse.

Pour l'analyse, des solutions à 10% w/w en protéines ont été préparées dans de l'eau milli Q et agitées à température ambiante. Différents temps d'hydratation ont été étudiés.

Les mesures ont été effectuées sur une plage de température de 10 à 100 °C avec une rampe de température de 5 °C/min. L'enthalpie ΔH a été calculée en intégrant l'aire du signal endothermique divisée par la quantité exacte de protéines utilisée pour la mesure. La température d'*onset* et les températures de pic de fusion ont été calculées à l'aide du logiciel *NV Thermal analysis* (Universal analysis, New Castle, Delaware, USA).

3.4.2. Distribution et taille moyenne

Le diamètre hydrodynamique a été évalué par diffusion dynamique de la lumière à l'aide de l'analyseur de particules *Delsa Nano C* (Beckman Coulter, San Diego, U.S.A.).

l'appareil est équipé d'une source laser rouge ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$), et détecte la lumière diffusée à 90 °. La distribution de la taille des particules a été générée par le logiciel *Delsanano software* (v.2.21), ainsi que les tailles moyennes des particules et les distributions de population, ainsi que les indices de polydispersité (P.I), ont également été déterminés. Tous les échantillons (1%, hydratation = 4 heures) ont été analysés à température ambiante en triplicata.

3.4.3. Mesure de la solubilité de l'azote

Les solutions de protéines (10% w/w) ont été centrifugées à 20 000g (Beckman Coulter, Avanti J-E, Brea, USA) pendant 15 minutes à température ambiante pour éliminer les protéines insolubles.⁵⁴ Une masse de environ exactement 200 µg de surnageant a ensuite été prélevée et la teneur en protéines est déterminée par la méthode du *Dumas* (Rapid N Cube ; Elementar®, Hanau, Allemagne) en utilisant un facteur de conversion protéine/azote de 6,38.⁷⁴ Ce facteur représente la teneur en azote des protéines de lactosérum. La solubilité est définie comme le rapport entre la quantité de protéines dans le surnageant et la quantité totale de protéines pesée pour préparer la solution (**Équation 4**).

$$\text{Solubilité (\%)} = \frac{\text{Teneur en protéines dans le surnageant}}{\text{Teneur en protéines total dans la solution initiale}} * 100$$

Équation 4: Détermination de la solubilité (%) de la poudre de protéines de lactosérum

3.4.4. Dosage des liaisons sulfhydryles libres (SHF) et ponts disulfures (SS)

La teneur en groupes sulfhydryles (SH_F) libres a été évaluée pour les différents échantillons de protéines de lactosérum traités et non traités (1% w/w, hydratation = 4 heures) selon la méthode initialement proposée par Beveridge et al. (1974)⁷⁵ et adaptée par Ambrosi et al. (2016)⁷⁶.

Le tampon Tris-glycine est réalisé comme suit : 0,1 M de Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane (Tris), 0,1 M de glycine et 4 mM de sel disodique d'acide éthylènediamine-tétra-acétique ; ajusté à pH = 8,0.

Une solution d'urée 8 M dans le tampon Tris-glycine pH 8 a été préparée. Le réactif d'Ellman, lui, a été préparé en dissolvant 4 mg d'acide 5,5-dithio-bis 2-nitrobenzoïque (DTNB) dans 1 mL de tampon Tris-Glycine.

L'échantillon, dissout dans 5 mL de solution d'urée 8 M, a été ajouté au réactif d'Ellman (40 µL) et incubé pendant 30 min à température ambiante (20 °C).

La teneur totale en groupes sulfhydryle (SH_T) a été évaluée pour les différents échantillons de protéines de lactosérum traités et non traités comme suggéré par Wang et al. (2020).⁵

En bref, 0,2 mL de solution protéique (1% w/w, hydratation = 4 heures) a été mélangée avec 1,0 mL de solution de Tris-glycine et d'urée 10 M (0,086 M de Tris, 0,09 M de glycine, 0,004 M d'EDTA et 10 M d'urée) et 0,02 mL de β-mercaptoproéthanol et incubée à 25 °C pendant 1 h.

Ensuite, 10 mL de TCA à 12 % ont été ajoutés au mélange avant d'être incubé pendant encore 1 h et centrifugé à 3000 g pendant 10 min. Le culot a été lavé avec une solution de TCA à 12% à deux reprises, puis mélangé avec 3 mL de solution de Tris-glycine dans de l'urée 8 M et 0,03 mL de solution de DTNB (4 mg/mL) à 20 °C pendant 30 min.

Dans les deux cas, l'absorbance a été mesurée à 412 nm avec un spectrophotomètre UV/VIS *Hitachi U-2900* (Hitachi, Tokyo, Japan), en utilisant le mélange sans protéine comme blanc. Les groupes sulfhydryles libres et totaux ont été évalués selon l'**Équation 5**:

$$SH_F \text{ ou } SH_T = \frac{73,53 * A_{412}}{C} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \text{ protéine} \right)$$

Équation 5: Calcul du nombre de liaisons sulfhydryles libres et sulfhydryles totales (µmol/g protéine) à partir de l'absorbance (412 nm) et de la concentration en protéines dans la solution.

La quantité de liaisons disulfures a été évaluée selon l'**Équation 6**:

$$\text{Liaison disulfure} (-S-S-) = \frac{SH_T - SH_F}{2} \text{ } (\mu\text{mol/g protéine})$$

Équation 6: Calcul du nombre de liaisons disulfures (μmol/g protéine) à partir de l'absorbance (412 nm) et de la concentration en protéines dans la solution.

A₄₁₂: absorbance à 412 nm, C: concentration de l'échantillon en mg de solide/mL et D: facteur de dilution. Les résultats ont été exprimés comme la moyenne de trois mesures.

3.4.5. Détermination de l'hydrophobicité de surface des protéines en solution

Dans le cadre de l'Unité Mixte de Recherche transfrontalière BioEcoAgro, les mesures d'hydrophobicité de surface ont été réalisées à l'Université d'Artois (Complexe Adrianor, Aras) sous la supervision du Pr. R. Karoui et de ses équipes.

L'hydrophobicité de surface a été mesurée comme suggère par Yuksel et al. (2012).⁷⁷

La fluorescence relative des échantillons a été mesurée à l'aide d'un spectrofluoromètre *Fluoromax-4* (Jobin Yvon, Horiba, NJ, USA) équipé d'un contrôleur de température *Haake A25 AC200* (Thermo-Scientific, Courtaboeuf, France) permettant de maintenir la température à 20°C pendant l'analyse. La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 390 nm. Pour l'émission, un spectre de longueur d'onde allant de 400 à 650 nm a été enregistré.

Dans deux millilitres de solution de protéines de lactosérum à 1% w/w, la concentration en acide 8-anilino-1-naphtalènesulfonique (ANS) a été portée successivement à : 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 & 150 μM. Le volume total est supposé constant. Pour chaque concentration, trois spectres ont été enregistrés. Le blanc correspondant à la mesure de la solution sans ANS.

Toutes les valeurs ont été calculées selon l'équation Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{F} = \frac{1}{F_{max}} + \frac{K_d}{[ANS]} * F_{max}$$

Équation 7: Equation de Lineweaver-Burk

Où F = intensité de fluorescence maximale enregistrée, [ANS] = concentration de la sonde fluorescente (μM), F_{max} = intensité de fluorescence maximale et K_d = constante de dissociation apparente d'un complexe protéine/ANS supposé mono moléculaire.

Les valeurs de F_{max} et K_d ont été calculés par des procédures d'ajustement de régression linéaire standard. L'hydrophobicité de surface est calculée comme le rapport entre la pente de droite de régression linéaire (F_{max}) et le coefficient K_d corrigé par la concentration exacte en protéine :

$$\text{Hydrophobicité de surface} = \left(\frac{F_{\max}}{K_d} \right) * C$$

Équation 8: Equation permettant le calcul de l'hydrophobicité de surface (u.a.)

Où F_{\max} = pente de droite de régression linéaire, K_d = constante de dissociation apparente d'un complexe protéine/ANS supposé mono moléculaire et C = concentration en protéines dans la solution (% w/w).

3.4.6. Matière sèche et teneur en protéines des poudres

La matière sèche a été obtenue par gravimétrie en séchant la poudre dans une étuve (*UFE 500*, Memmert, Allemagne) à 105 °C pendant 24 h.⁷⁸ La formule suivante est utilisée (**Équation 9**):

$$\text{Masse sèche} (\%) = \frac{\text{Masse après séchage} * 100}{\text{Masse avant séchage}}$$

Équation 9: Détermination de la matière sèche (%) de la poudre de protéines de lactosérum.

La teneur en protéines est déterminée sur environ exactement 200 mg de poudre par la méthode du *Dumas* (Rapid N Cube ; Elementar®, Hanau, Allemagne) en utilisant un facteur de conversion protéine/azote de 6,38.

3.4.7. Activité de l'eau

L'activité de l'eau a été mesurée (*Aqualab Decagon CX3*, Meter Group, USA) sur des poudres tempérées une heure dans une enceinte à 20°C. Les analyses ont été réalisées en triplicata.

3.5. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne, de l'écart-type et du coefficient de variation. Lorsque cela est nécessaire, une ANOVA à un facteur avec un intervalle de confiance de 95 % a été réalisée à l'aide du logiciel *Minitab 18* (Pennsylvanie, USA). Les données ANOVA avec une p valeur < 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives. Les différents groupes statistiques déterminés sont marqués avec une lettre en exposant.

4. Résultats et discussion

4.1. Déterminations préliminaires et vérification de l'absence de biais

Afin de commencer l'étude sur des bases solides, il était nécessaire de vérifier qu'aucun biais ne vienne fausser les interprétations. Pour ce faire, le temps d'hydratation optimale de la poudre a été déterminé (chap. 4.1.1.) et l'absence d'impact de la lyophilisation sur les propriétés de protéines a été vérifié (chap. 4.1.2.).

4.1.1. Détermination du temps d'hydratation optimal des poudres de protéines de lactosérum

Les solutions sur lesquelles sont réalisées les analyses sont reconstituées à partir de poudre de protéines de lactosérum selon la méthode évoquée au chapitre 3.2.1.. Le temps idéal d'hydratation a été déterminé en étudiant l'évolution de l'enthalpie par DSC d'une solution de protéines de lactosérum non microfluidisé (WP-10-L) à plusieurs temps d'hydratation (**Figure 11**).

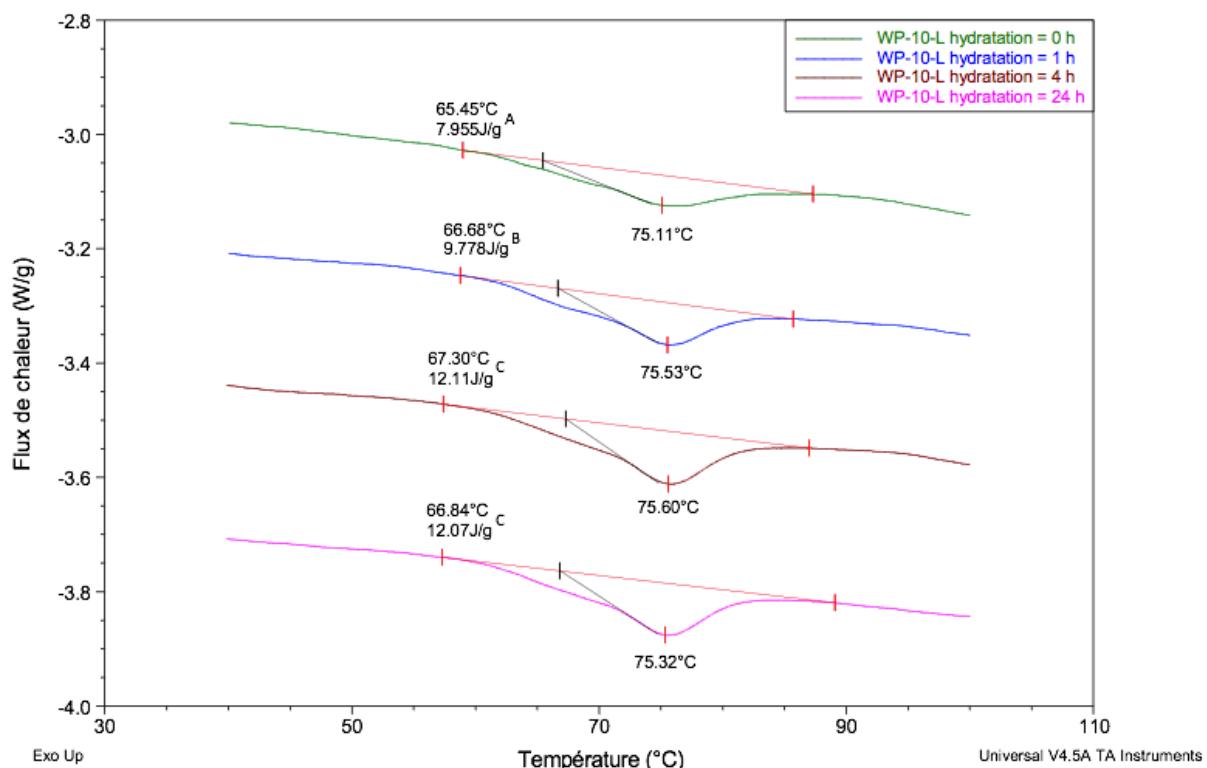


Figure 11: Flux de chaleur (W/g) en fonction de la température (°c) obtenu par DSC sur une solution de WP-10-L hydratée pendant 0 - 1 - 4 - 24 heures

Il est observé que l'enthalpie augmente entre les deux premiers temps d'hydratation mais ne semble plus évoluer entre 4h et 24h d'hydratation. Une autre mesure a également été réalisée après trois heures d'hydratation et a exposé une valeur d'enthalpie de 11,3 J/g, ce qui suggère que l'hydratation n'était pas encore totale.

Pour atteindre une hydratation complète, et ne pas introduire de biais quant à un possible effet de la microfluidisation sur les protéines de lactosérum, il est nécessaire de laisser les poudres hydrater pendant quatre heures.

4.1.2. Impact de la lyophilisation

Pour obtenir les échantillons traités sous forme de poudre, la lyophilisation a été choisie en raison de la faible dénaturation apportée au produit par rapport à d'autres traitements de déshydratation.

Afin d'étudier l'influence de ce traitement sur les propriétés physico-chimiques des protéines, des analyses de tensions de surface dynamique ont été réalisées à l'aide du *Bubble Pressure* (**Figure 12**) et du *Tracker* (**Figure 13**) sur deux solutions à 1% w/w. La première (WP-1-N) est constituée de protéines de lactosérum native tandis que la seconde (WP-1-L) est constituée de ces mêmes protéines mais lyophilisées puis reconstituées à la même concentration.

L'activité d'eau Aw a également été mesurée (**Tableau 5**) afin de vérifier l'efficacité de la lyophilisation.

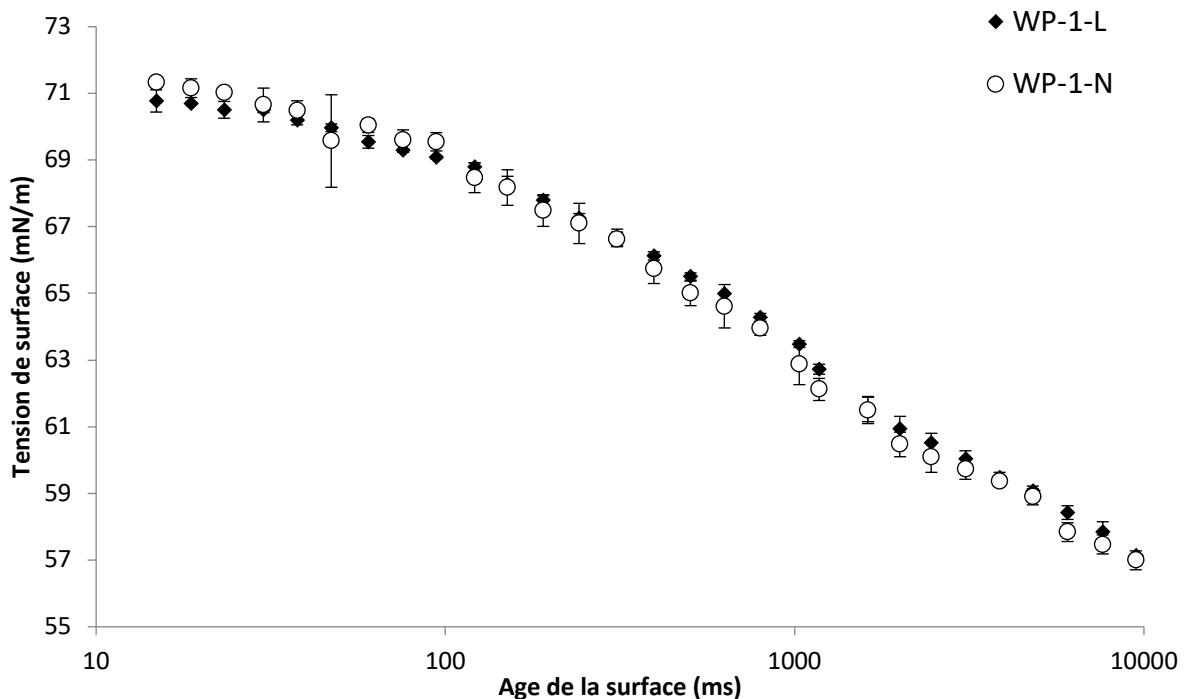


Figure 12: Tension de surface (mN/m) de WP-1-L (losange noir) et WP-1-N (rond blanc) en fonction de l'âge de la surface (ms)

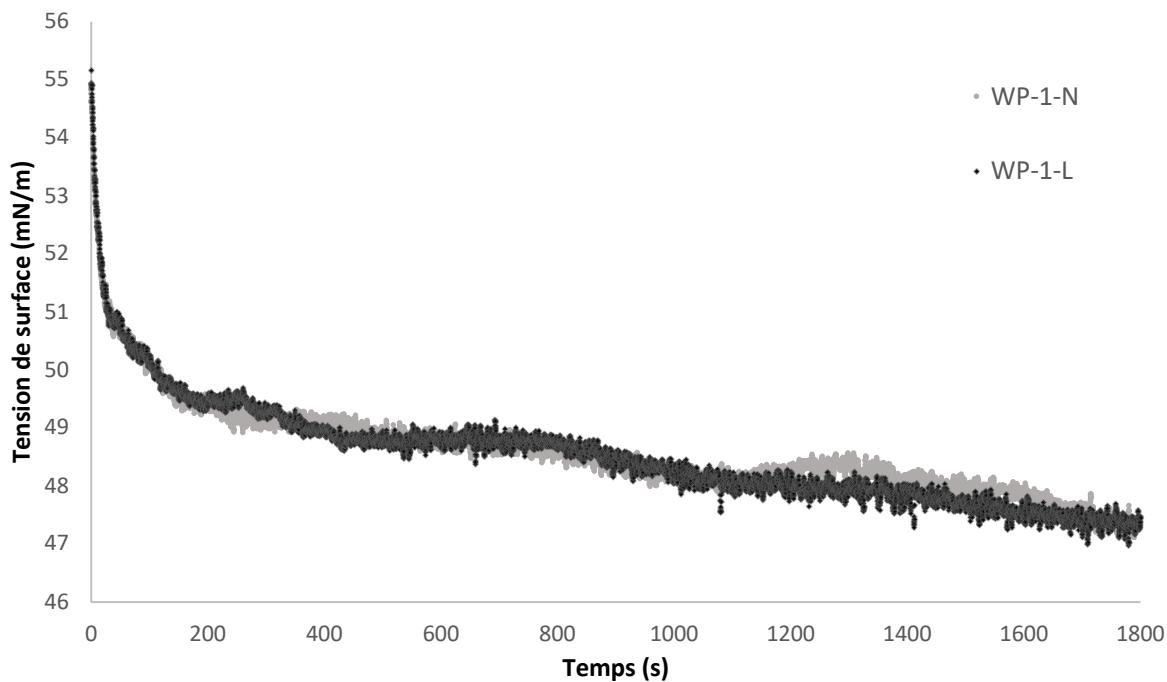


Figure 13: Tension de surface (mN/m) des protéines de lactosérum lyophilisées (WP-1-L, courbe noir) ou non (WP-1-N, courbe grise) en fonction du temps (s)

Les mesures de cinétiques d'adsorption étant des techniques sensibles au changement de propriétés des protéines, l'absence de différence significative dans les données présentées ci-dessus suggèrent que la lyophilisation ne dégrade et/ou ne modifie pas les protéines de lactosérum, ce qui est en accord avec les observations d'autres auteurs.^{5,54,62}

Tableau 5: Activité d'eau (A_w) des poudres de protéines de lactosérum natives (WP-P), natives lyophilisées (WP-P-L) et microfluidisées lyophilisées (1000-P-L, 1375-P-L & 1375M-P-L)

Échantillon	Activité d'eau (A_w)	Moyenne (%)	Écart type (%)
WP-P-N	0,264 0,276 0,261	0,267	0,008
WP-P-L	$A_w < 0,065$ $A_w < 0,065$ $A_w < 0,065$	$A_w < 0,065$	-
1000M-P-L	$A_w < 0,064$ $A_w < 0,064$ $A_w < 0,064$	$A_w < 0,064$	-
1375-P-L	$A_w < 0,065$ $A_w < 0,065$ $A_w < 0,065$	$A_w < 0,065$	-
1375M-P-L	$A_w < 0,066$ $A_w < 0,066$ $A_w < 0,066$	$A_w < 0,066$	-

Les valeurs d'activité d'eau (**Tableau 5**) atteintes montre que le séchage a été très poussé. Les valeurs se situent même en dessous de l'optimum de conservation et une oxydation des protéines et lipides résiduels pourraient être à craindre. Cependant, aucune des analyses réalisées sur le produit lyophilisé ou non n'a montré de différence significative en terme de résultat. Il apparaît donc acceptable de considérer que la lyophilisation n'aurait pas d'impact significatif dans le cadre de ce travail sur les protéines de lactosérum.

La lyophilisation va donc permettre une meilleure conservation des protéines traitées par microfluidisation mais aussi de pouvoir reconstituer des solutions à différentes concentrations.

4.2. Traitement par microfluidisation

4.2.1. Impact de la concentration en protéines des solutions avant microfluidisation sur leurs propriétés physico-chimiques

Dans l'optique de produire une plus grande quantité de protéines de lactosérum microfluidisées par batch, il a été envisagé de microfluidiser des solutions à 10% w/w, de les lyophiliser puis de les reconstituer à 1 % w/w. Afin de vérifier que cette méthode n'a pas d'impact sur les propriétés de la poudre de lactosérum produite, les tensions de surface dynamique ont été étudiées pour : une solution microfluidisée à 10% w/w reconstituée à 1% w/w après lyophilisation et une solution microfluidisée à 1% w/w reconstituée à 1% w/w après lyophilisation (**Figure 14**).

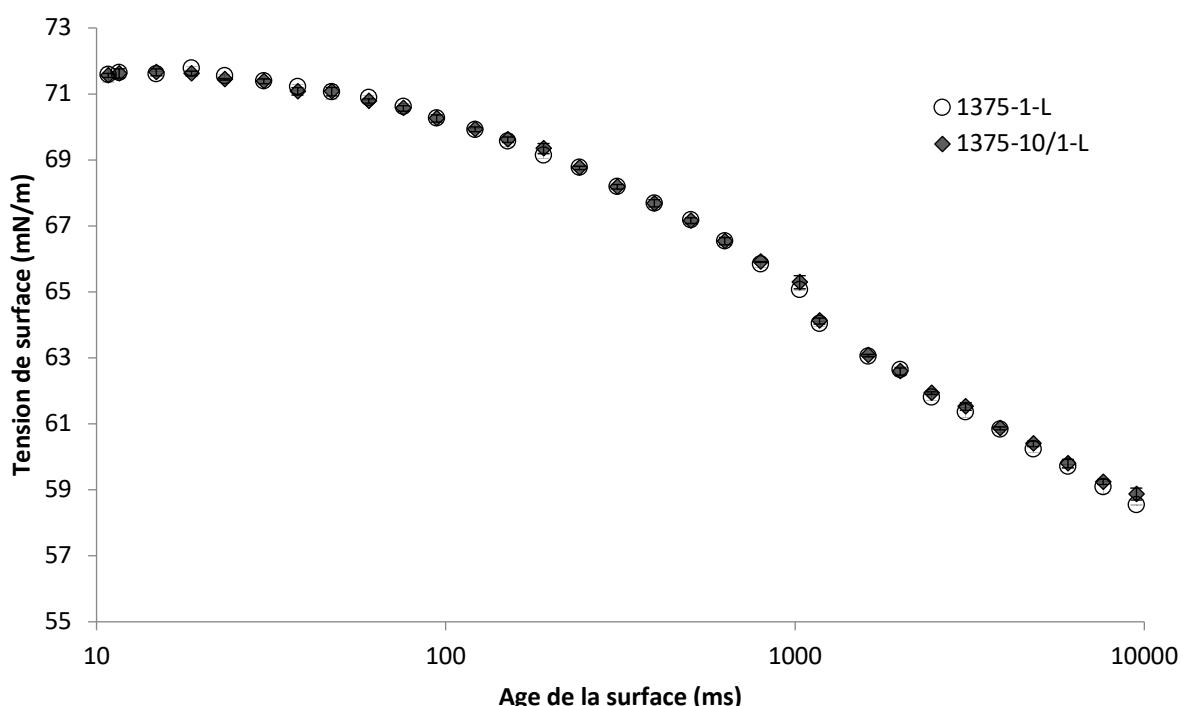


Figure 14: Tension de surface (mN/m) de 1375-10/1-L (losange noir) et 1375-1-L (rond blanc) en fonction de l'âge de la surface (ms)

Cette technique étant très sensible, l'absence de différence suggère que la concentration au moment de la microfluidisation n'influence pas les propriétés de la poudre obtenue post lyophilisation. Des résultats similaires ont également été obtenus avec les cinétiques d'adsorptions à longues.

4.2.2. Calcul du taux de cisaillement relatif à la microfluidisation

Les traitements de cisaillement, qu'il s'agisse d'homogénéisation à haute pression ou de microfluidisation posent la problématique de la reproductibilité des conditions lors du changement d'appareillage. En effet, pour décrire les traitements subis par le produit, la notion de pression est employée. Or, le cisaillement auquel le produit est exposé dépend de nombreux paramètres (type de chambre de traitement, taille de la chambre de traitement, viscosité du produit, ...). Le taux de cisaillement a donc été estimé afin de voir s'il pourrait constituer une alternative à la pression lors de la comparaison des traitements.

Le **Tableau 6** reprend les valeurs des différentes variables calculées pour des solutions à 10% w/w en protéines. Il a également été démontré que pour les conditions étudiées, la concentration (1% w/w ou 10% w/w) n'engendre pas de différence significative du taux de cisaillement (données non montrées). La comparaison du traitement à 1000 bars avec celui à 1375 bars, met en évidence une différence significative ($p < 0,05$) de taux de cisaillement. Le taux de cisaillement du second est en effet plus élevé que le premier. Cependant, cette augmentation n'est pas du tout proportionnelle. En effet, une augmentation de 37,5% de la pression n'augmente le taux de cisaillement que de 3,9%.

Tableau 6: Données et résultats relatifs au calcul du taux de cisaillement en fonction de la pression

Pression (bar)	Concentration en protéines (% w/w)	Débit *10 ⁻⁶ (m ³ *s ⁻¹)	Vitesse maximale (m*s ⁻¹)	Taux de cisaillement *10 ⁻⁶ (s ⁻¹)
1000	10	$7,21 \pm 0,018$	459,2	$4,59 \pm 0,012^A$
1375	10	$7,48 \pm 0,028$	476,7	$4,77 \pm 0,11^B$

Il est cependant important de souligner que l'effet de la microfluidisation n'est pas seulement dû aux forces de cisaillements. Plusieurs autres phénomènes tels que: le frottement à grande vitesse, la cavitation, les turbulences, des impacts importants et l'échauffement ont également un effet sur les protéines lors du procédé.⁶⁴

Quant au traitement multi passage, d'après le fabricant, celui-ci sert à augmenter le temps d'exposition à l'énergie du système dans la chambre de traitement. Ce temps de séjour à l'intérieur de la chambre est de l'ordre de 1-5 millisecondes. Si la taille de particule désirée n'a pas été atteinte après le passage initial, les passages suivants peuvent permettre d'obtenir les résultats souhaités.

4.3. Caractérisation de l'impact de la microfluidisation sur les protéines de lactosérum

L'impact du traitement de microfluidisation a été étudié dans un premier temps sur les propriétés de tension de surface à l'interface air-eau. Les interprétations établies ont ensuite été discutées sur base d'autres propriétés physico-chimiques. Pour terminer, les phénomènes impliqués dans la diminution de tension de surface ont été analysés plus en finesse par les biais de modèles mathématiques.

4.3.1. Étude des propriétés de tension de surface à l'interface air-eau

4.3.1.1. Cinétique d'adsorption courte – Age de surface de 10 à 10 000 ms

Les tensions de surface dynamiques mesurées à des âges de surfaces très petits des différentes solutions à 1% w/w sont présentées sur la **Figure 15**. Les solutions de protéines de lactosérum microfluidisées se distinguent clairement de la solution non microfluidisée. La différence entre les deux groupes est d'environ 2 mN/m, la solution non microfluidisée ayant la tension de surface la plus basse. L'échantillon non microfluidisé présente également une variabilité beaucoup plus grande que ceux microfluidisés bien que celle-ci tende à se réduire avec l'augmentation de l'âge de la surface. Après 10 000 ms, aucune différence significative n'est observée entre les protéines microfluidisées à 1000 bars et 5 passages (1000M-1-L) et celle n'ayant subi qu'un passage à 1375 bars (1375M-1-L). En revanche, les protéines microfluidisées à 1375 bars et 5 passages (1375M-1-L) présente une tension de surface significativement plus élevée que les deux échantillons cités précédemment, et ce, à partir d'un âge de surface de 800 ms.

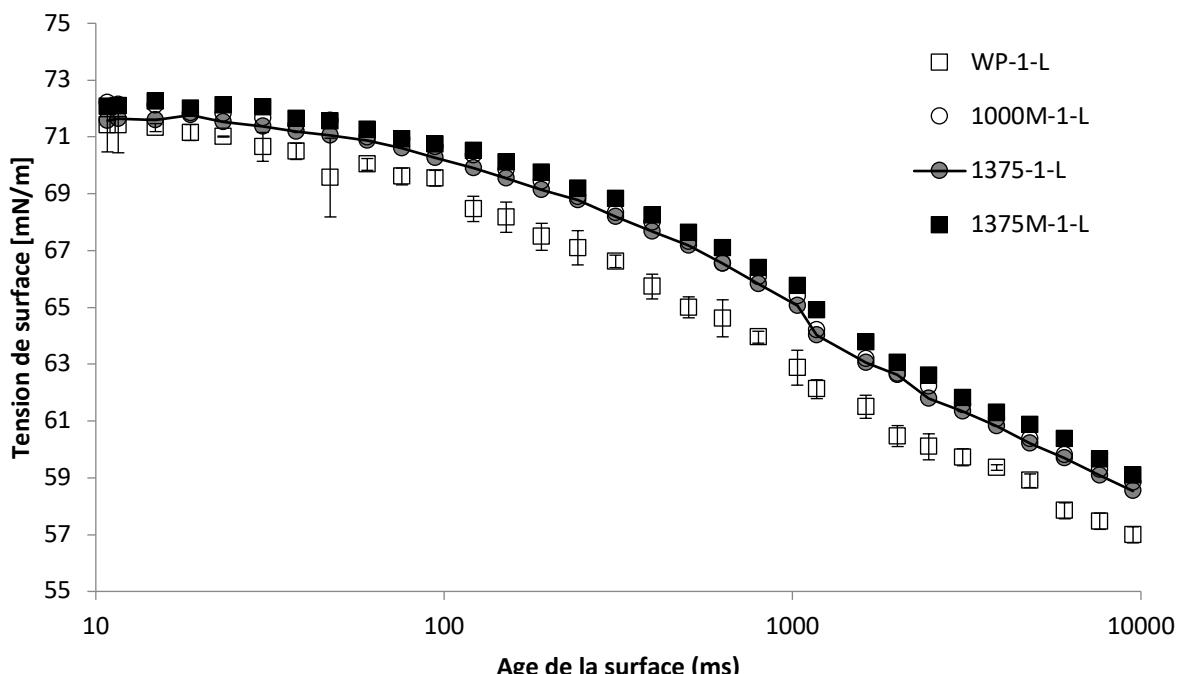


Figure 15: Tension de surface (mN/m) de WP-1-L (carré blanc), 1000M-1-L (rond blanc), 1375-1-L (rond gris) et 1375M-1-L (carré noir) en fonction de l'âge de la surface (ms)

4.3.1.2. Cinétiques d'adsorption longue – Age de surface de 1000 ms à 1800 s

Pour des âges de surface plus grands, jusqu'à 1800 secondes, une cinétique d'adsorption longue a été réalisée sur une solution de WP lyophilisée ainsi que sur des solutions microfluidisées aux différentes conditions (solutions 1% w/w) (**Figure 16**). Chaque courbe est la moyenne de trois répétitions. En raison du nombre de points sur le graphique, plus de 20 000, il n'est pas possible de présenter les écart-types sur les courbes. Cependant, ceux-ci ont été calculés et ne dépassent que très rarement 0,5 mN/m et sont le plus souvent inférieurs à 0,2 mN/m. L'échantillon ayant la courbe de tension de surface la plus basse, peu importe le temps, est celle du lactosérum non microfluidisé. Celui avec la tension la plus haute étant l'échantillon 1375M-1-L, microfluidisé à 1375M bars de pression et 5 passages. Le courbe intermédiaire correspond au 1000M-1-L, un échantillon microfluidisé à 1000 bars et 5 passages. Après 1800 s, un écart significatif ($p<0,05$) de plus ou moins 2 mN/M est observable entre les courbes. Les pentes des trois droites sont également différentes, celle avec l'angle de pente le plus faible étant le 1375M-1-L et celle avec l'angle de pente le plus grand étant le WP-1-L.

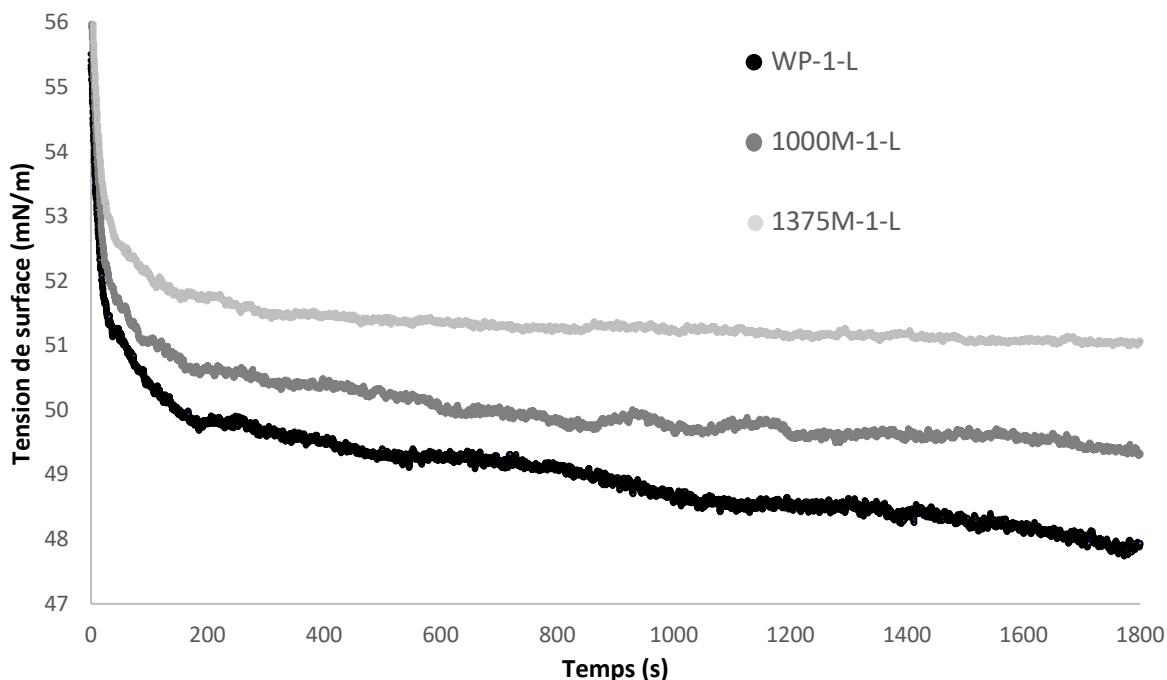


Figure 16: Tension de surface (mN/m) des échantillons WP-1-L (courbe noir), 1000M-1-L (courbe grise foncée) & 1375M-1 (courbe grise claire) en fonction du temps (s)

Bien que les courbes commencent à fortement se stabiliser après 1800 secondes (**Figure 16**), la tension d'équilibre n'est pas encore atteinte.

4.3.1.3. Tension de surface à l'équilibre

A partir des données de cinétiques d'adsorption longue, la valeur d'équilibre est estimée graphiquement (**Figure 17**) comme suggéré par Razafindralambo et al. (1995).⁷³

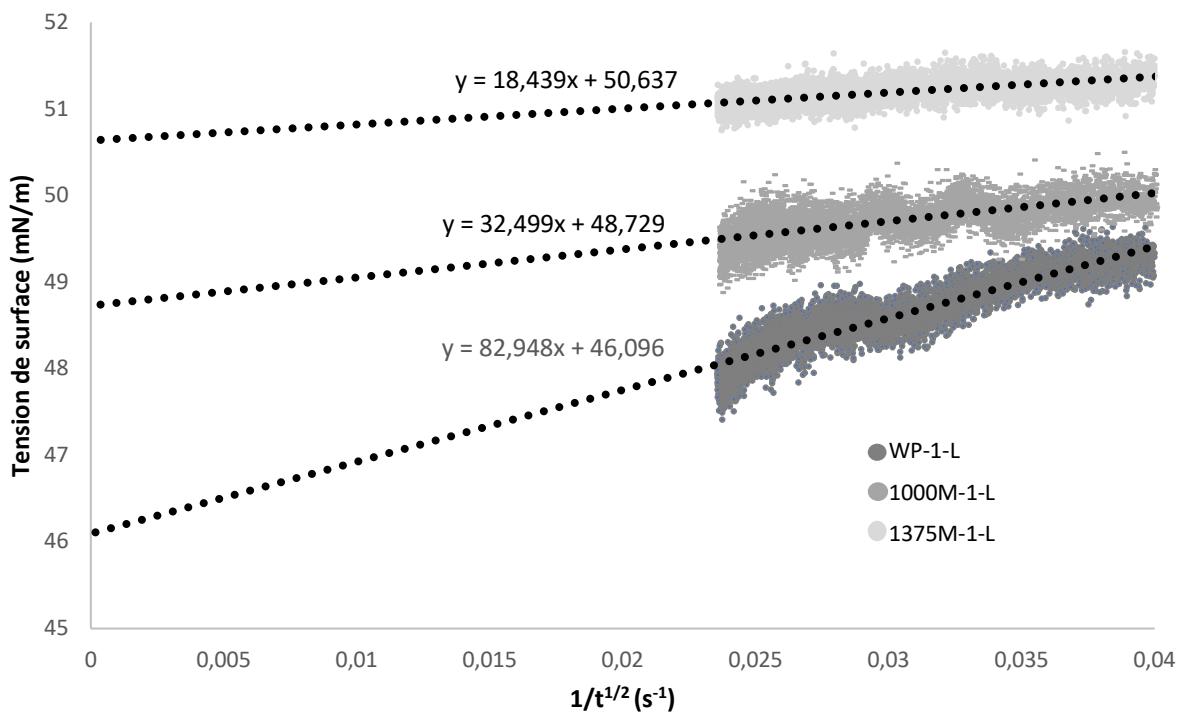


Figure 17: Tension de surface (mN/m) des échantillons WP-1-L (courbe noir), 1000M-1-L (courbe grise foncée) & 1375M-1-L (courbe grise claire) en fonction de l'inverse de la racine carrée du temps (s⁻¹).

Les valeurs moyennes de tension de surface à l'équilibre obtenues sont présentées dans le **Tableau 7**. Les résultats montrent que les trois tensions de surface à l'équilibre obtenues sont significativement différentes les unes des autres, avec un maximum identifié pour l'échantillon 1375M-1-L et une valeur plus faible obtenue pour l'échantillon WP-1-L.

Tableau 7: Tension de surface à l'équilibre (mN/m) des échantillons WP-1-L, 1000M-1-L & 1375M-1-L

	WP-1-L	1000M-1-L	1375M-1-L
Tension à l'équilibre (mN/m)	46,01 ^A	48,73 ^B	50,64 ^C
Écart-type (mN/m)	0,3	0,19	0,02

Les tendances mises en évidence à des âges de surface courts se confirment donc à des temps de surface plus longs, entre 1000 ms et 18 000 s ainsi qu'à l'équilibre.

4.3.1.4. Discussion des résultats et conclusions

Les résultats obtenus dans les points ci-dessus semblent être convergents. Ils sont donc possibles de regrouper ceux-ci afin de tirer des conclusions et d'émettre des hypothèses.

Les différences de cinétique d'adsorption et de tension de surface entre les échantillons microfluidisés ou non semblent démontrer que cette technique a un impact sur les protéines. Deux hypothèses majeures peuvent être avancées pour expliquer cette augmentation de la tension de surface à savoir :

- L'hypothèse d'une dénaturation des protéines :

Durant le traitement par microfluidisation des protéines de lactosérum, celles-ci auraient subi une dénaturation. Cette dénaturation pourrait mener à une diminution de leur capacité à abaisser la tension de surface de façon efficace.

- L'hypothèse de la désagrégation des agrégats protéiques :

Lors de la fabrication du concentré de lactosérum, des agrégats protéiques ont été formés. Ces agrégats possèdraient une bonne balance hydrophile-hydrophobe qui leur permettraient d'abaisser de façon efficace la tension de surface à un interface air-eau. La microfluidisation réduirait la taille de ces agrégats. Cette réduction de taille conférerait aux néo-agrégats un profil hydrophile-hydrophobe moins performant pour abaisser la tension de surface à l'interface air-eau.

La variabilité beaucoup plus importante présentée par l'échantillon non microfluidisé (WP-1-L) lors des cinétiques d'adsorption à court terme pourrait être justifiée avec l'hypothèse de désagrégation. En effet, s'il y a une très large répartition de taille dans les agrégats, à des âges de surfaces très petits, il est possible que : à chaque bulle formée par l'appareil, des agrégats de tailles différentes qui arrivent à la surface. Ces agrégats n'ont pas forcément tous les mêmes propriétés d'abaissement de la tension de surface car ils ne possèdent ni la même composition en protéines, ni la même structure. En revanche, à des âges de surface plus long, les agrégats ont tous le temps d'arriver à la surface et trouver l'organisation optimale, ce qui réduirait la variabilité.

Quelle que soit l'hypothèse, le fait de combiner le multi passages et l'augmentation de pression amplifie l'effet du traitement sur les protéines, et ce, pour des cinétiques d'adsorption courtes ou longues à l'exception des âges de surface inférieures à 100 ms. Cette différence se marque d'ailleurs avec l'augmentation de l'âge de la surface comme le montre les tensions de surface à l'équilibre. La proximité des différentes courbes à des âges de surface très courts (inférieure à 100 ms) pourrait être due au fait que sur des temps de bulle si courts, les protéines viennent à peine d'arriver à l'interface et n'ont encore que peu d'impact sur la tension de surface. Il n'y a encore aucun phénomène de réaménagement ni de compétition, ce qui expliquerait que les différences de tensions de surface ne soient pas encore marquées.

Il est également à noter que la microfluidisation semble ralentir la cinétique d'adsorption des protéines à l'interface. Cette hypothèse sera étudiée plus en détail dans le chapitre 4.3.3 grâce à des modélisations des phénomènes impliqués dans l'abaissement de la tension de surface.

4.3.2. Étude des autres propriétés physico-chimiques

Afin de mettre à l'épreuve les deux hypothèses formulées ci-dessus, une série d'autres propriétés physico-chimiques a été déterminée. Pour commencer, l'étude des résultats fournis par DSC permettront d'amener des éléments de réponses quant à la dénaturation des protéines de lactosérum. Les variations de tailles de particules présentent dans la solution permettront, elles, de statuer sur l'état d'agrégation/désagrégations des protéines. Enfin, la critique des éventuels changements de solubilité des protéines ainsi que la variation de la quantité de liaisons sulfhydryles libres et ponts disulfures permettra de conforter l'une ou l'autre hypothèse.

4.3.2.1. Analyse calorimétrique différentielle – DSC

Les analyses DSC ont été réalisées en duplicita en raison de la très faible variabilité lors de ce type d'analyses. Un exemple de la répétabilité des analyses est présenté en **annexe 1**. Les analyses DSC conduites permettent de réaliser plusieurs observations. Pour commencer, aucune différence significative entre les protéines microfluidisées (WP-10-L) ou non (1000M-10-L & 1375M-10-L) n'est visible ni au niveau des *onset points* (qui représentent la température à laquelle de la dénaturation des protéines commence), ni à celui des pics de fusion (**Figure 18**).

Pour les protéines microfluidisées, la valeur maximale d'enthalpie est atteinte après environ une heure d'hydratation. En revanche, pour celles qui n'ont pas été microfluidisées, il faut attendre au minimum quatre heures avant de voir l'enthalpie se stabiliser.

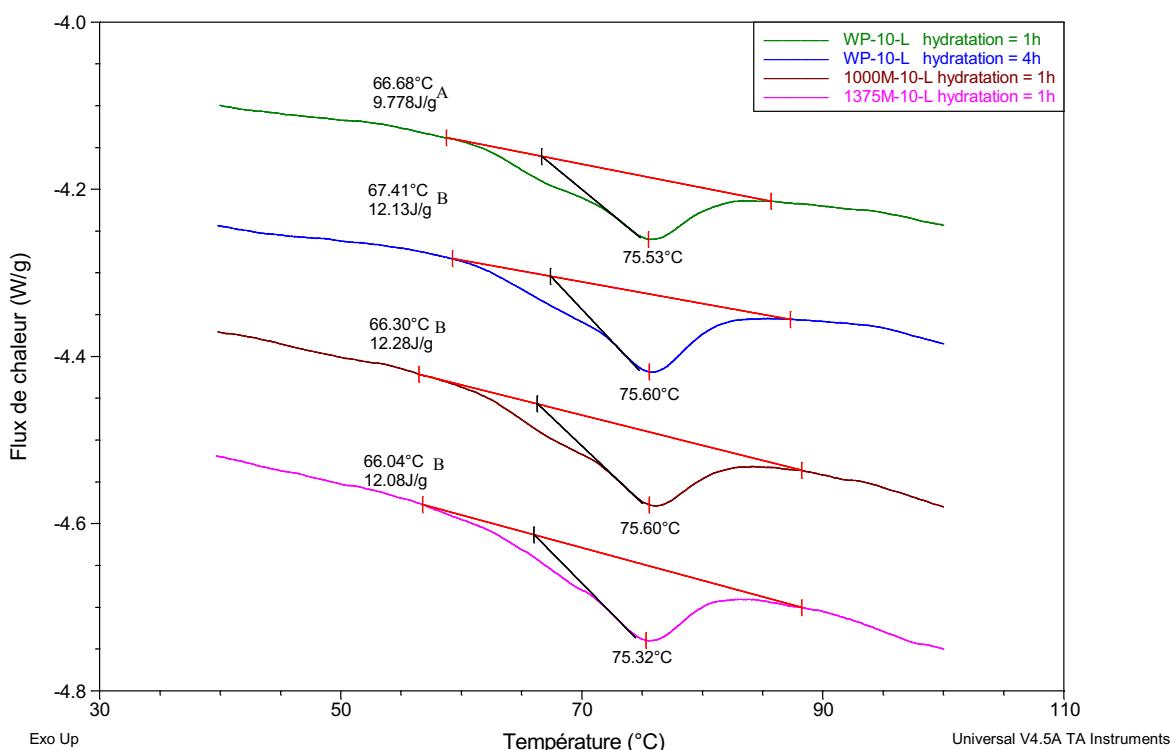


Figure 18: Flux de chaleur (W/g) en fonction de la température (°c) obtenu par DSC pour une solution de WP-10-L hydratée pendant 1 heure et des solutions de WP-10-L, 1000M-10-L & 1375M-1-L hydratées 4 heures

Pour les protéines microfluidisées, si on augmente le temps d'hydratation (passage de 1 à 4 heures), la valeur d'enthalpie maximale atteinte par celle-ci n'évolue plus et reste égale à celle des protéines non microfluidisées (**Figure 19**).

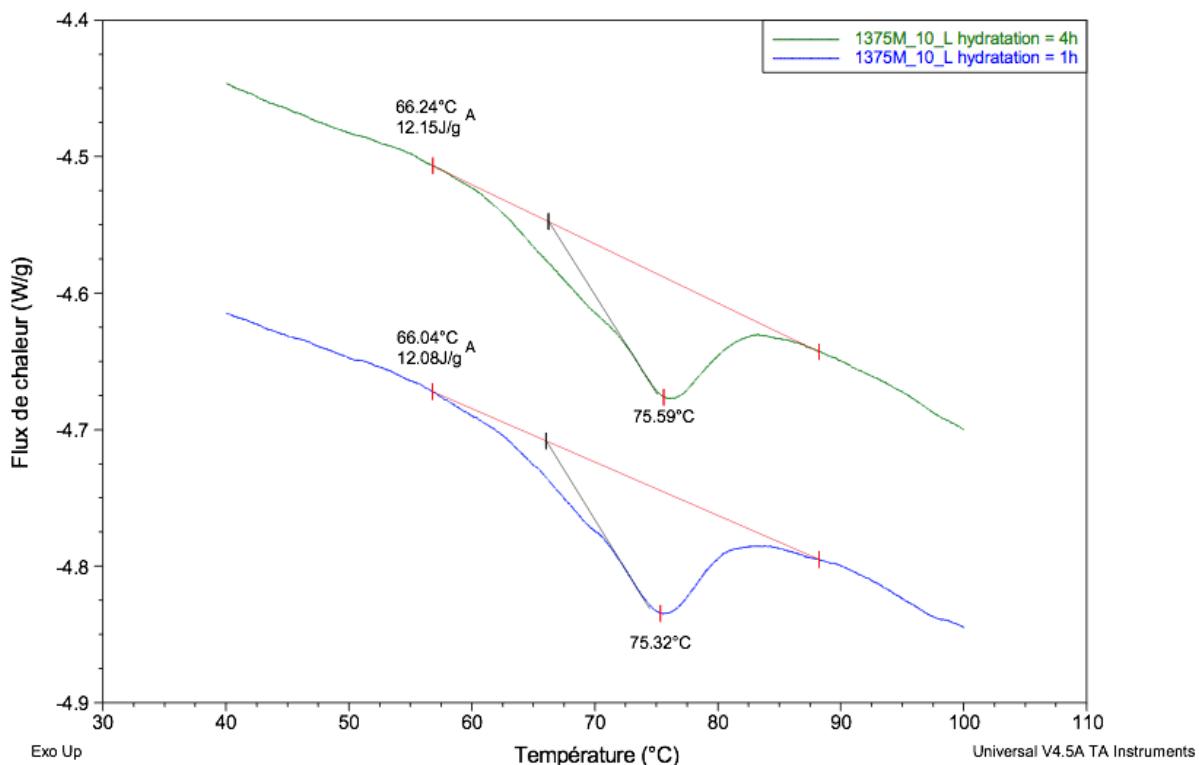


Figure 19: Flux de chaleur (W/g) en fonction de la température (°c) obtenu par DSC sur une solution de 1375M-10-L après 1 heure et 4 heures d'hydratation.

L'absence de variation de température d'*onset point* et de température de pic de fusion semble suggérer que la microfluidisation ne dénature pas les protéines de lactosérum. Les forces de cisaillement générées ne seraient donc pas suffisantes pour briser les protéines elles-mêmes allant ainsi à l'encontre de l'hypothèse de dénaturation. L'hypothèse de désagrégation, à l'inverse, s'accorde relativement bien de ces résultats. En effet, une réduction de la taille des agrégats protéiques n'est pas une dénaturation à proprement parler des protéines de lactosérum. De ce fait, aucune modification de ces deux paramètres ne serait visible. Similairement, aucun changement de température de pics de fusion n'a été mis en évidence par rapport au lactosérum natif lors de traitement par homogénéisation à très haute pression (2500 bars).⁷

Concernant le troisième paramètre étudié, la différence de temps nécessaire pour atteindre la valeur d'équilibre d'enthalpie est probablement due à une différence de vitesse d'hydratation des poudres de lactosérum. La microfluidisation tendrait donc à augmenter cette vitesse d'hydratation. Une augmentation de celle-ci est également probablement corrélée à une augmentation de la solubilité.

Bien qu'aucune différence entre les différents traitements de microfluidisation que ce soit d'un point de vue pression ou nombre de passages ne puisse être mise en évidence avec les données

obtenues, il se pourrait cependant qu'une différence soit bel et bien présente mais qu'elle ne soit pas visible car se situant à des temps d'hydratation inférieurs au temps étudié ici à savoir : une heure.

L'analyse, des données DSC semble donc faire pencher la balance en faveur de l'hypothèse d'une désagrégation. Afin de confirmer celle-ci, il convient d'étudier la taille des agrégats protéiques avant et après microfluidisation afin de déceler une éventuelle réduction de leur taille.

4.3.2.2. Taille des particules dans la solution de protéines de lactosérum

Comme évoqué dans le chapitre précédent, l'analyse de la taille des particules (**Tableau 8**) tente de confirmer une éventuelle réduction de la taille des agrégats protéiques. Les résultats mettent en évidence que les agrégats présents dans les échantillons microfluidisés (1000M-1-L & 1375-1-L) sont significativement plus petits que ceux présents dans les échantillons non microfluidisés (WP-1-L), et ce, pour tous les paramètres de taille étudiés. Les différents traitements de microfluidisation, eux, ne génèrent pas de différence significative.

Pour le diamètre cumulé, la microfluidisation semble réduire la taille des particules de moitié. De même, 50% des protéines non microfluidisées (D50) possèdent une taille inférieure à approximativement 491 nm contre seulement approximativement 235 nm et 230 nm pour les protéines microfluidisées. Il est également intéressant de mettre en évidence que la distribution de taille est beaucoup plus large pour les protéines non microfluidisées avec un D90 approchant les 1341 nm que pour les protéines microfluidisées avec des valeurs de D90 de 464 nm et 471 nm. L'index de polydispersité, qui représente une mesure de l'hétérogénéité d'un échantillon en fonction de sa taille, semble appuyer les observations réalisées avec le D90. En effet, la valeur de cette index diminue avec le traitement de microfluidisation ce qui correspond à une réduction de l'hétérogénéité de la taille des particules dans les solutions de protéines de lactosérum.

Tableau 8: Évaluation de la taille des particules (nm) dans les solutions de protéines de lactosérum - Échantillons WP-1-L, 1000M-L & 1375-1-L

	WP-1-L	1000M-1-L	1375-1-L
Diamètre cumulé (nm)	398,23 ^A	211,57 ^B	205,67 ^B
Écart-type (nm)	34,23	6,19	1,71
Index polydispersité	0,31 ^A	0,22 ^B	0,23 ^B
Écart-type	0,04	0,03	0,01
Diamètre 50% (nm) – D50	491,73 ^A	235,93 ^B	230,30 ^B
Écart-type (nm)	73,27	5,43	1,47
Diamètre 90% (nm) – D90	1341,07 ^B	464,77 ^B	471,30 ^B
Écart-type (nm)	361,51	45,23	16,73

Au vu des résultats, il semble qu'une partie des protéines soient présentes sous forme d'agrégats parfois relativement grands dans la solution de protéines de lactosérum non microfluidisées (WP-1-L). En observant les résultats sur les protéines microfluidisées, la microfluidisation aurait deux effets sur ces agrégats protéiques : réduire drastiquement la taille des agrégats les plus grands mais aussi, comme le montre l'index de polydispersité et le D90, rendre la distribution de taille plus homogène et étroite. Cette homogénéisation de la taille des agrégats protéiques grâce à la microfluidisation pourrait donc être mise en lien avec la diminution de la variabilité lors des mesures de tensions de surface pour les échantillons microfluidisés. Ding et kan (2017) avait déjà mis en évidence que l'homogénéisation à ultra-haute pression permettait de réduire la taille des agrégats protéiques d'une solution de nanoparticules d'amidon sous l'effet du cisaillement, de l'impact à grande vitesse, des vibrations violentes, et de la libération instantanée de la pression dans la chambre de réaction.⁶¹ Les mêmes effets ont ensuite été mis en évidence en utilisant le même traitement mais cette fois sur des protéines de lactosérum.⁵

Cette analyse de taille, tout comme les analyses DSC, vient appuyer l'hypothèse de réduction de taille des agrégats protéines formulée plus haut. Cette réduction de la taille des agrégats, tout comme l'augmentation de la vitesse d'hydratation observée au chapitre précédent, pourraient avoir un impact positif sur la solubilité des protéines microfluidisées.

4.3.2.3. Solubilité des protéines de lactosérum

L'impact du traitement a été étudié sur la solubilité des protéines de lactosérum (**Tableau 9**). Le traitement par microfluidisation des solutions augmente significativement celle-ci de 10 à 12 pourcent selon les conditions de traitement. Le passage de 1000 bars à 1375 bars permet également d'augmenter de façon significative la solubilité d'environ 2%. Par contre, le nombre de passage appliqué ne semble pas avoir d'effet sur la solubilité. En effet, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le lactosérum microfluidisé à 1375 bars ayant subi un ou cinq passages.

Tableau 9: Solubilité des protéines de lactosérum avant et après traitement par microfluidisation (%)

	WP-10-L	1000M-10-L	1375-10-L	1375M-10-L
Solubilité (%)	80,17 ^A	90,79 ^B	92,10 ^C	92,72 ^C
Écart-type (%)	0,39	0,51	0,71	1,42
CV (%)	0,49	0,56	0,77	1,53

Il est établi que la dénaturation thermique des protéines de lactosérum conduit une perte de solubilité.³⁴ Bien qu'une attention particulière soit apportée par le fabricant afin d'assurer de bonnes propriétés à son produit, celui-ci a tout de même subi plusieurs traitements susceptibles d'avoir un effet négatif. En effet, il a subi, au minimum, une pasteurisation ainsi qu'une atomisation lors de sa fabrication. Cette diminution de la solubilité lors de traitement thermique est due à des processus d'agrégation impliquant des interchangeabilités entre groupements sulfhydryles (-SH) et ponts disulfures (-S-S).³⁸ La microfluidisation pourrait inverser ces phénomènes d'interchangeabilités et ainsi ré-augmenter la solubilité de protéines.

Wang et al. (2020) ont obtenu des résultats similaires à ceux obtenus par microfluidisation mais à l'aide d'un traitement d'homogénéisation à très hautes pressions dynamiques. En effet, ils améliorent la solubilité de 9% pour la condition de traitement la plus performante.⁵ Une explication de cette augmentation serait que les néo-agrégats protéiques formés seraient de taille réduite augmentant ainsi la surface de contact entre la protéine et l'eau. De même, lorsque la protéine est microfluidisée à haute pression, les chaînes polymérisées de la protéine de lactosérum sont rompues, ce qui augmente par conséquent la solubilité de la protéine de lactosérum.⁷⁹

Avec les résultats abordés plus haut, notamment la réduction de taille des agrégats protéiques, la nette augmentation de la solubilité grâce au traitement des protéines par microfluidisation était attendue et vient une nouvelle fois appuyer l'hypothèse de désagrégation avancée aux chapitres précédents.

4.3.2.4. Liaison sulfhydryle libres (-S-H) et pont disulfure (-S-S-)

Le dosage des liaisons sulfhydryles libres et totales a permis de déterminer la quantité de ponts disulfures présents dans les protéines de lactosérum (**Figure 20**) (Les valeurs exactes de l'analyse sont présentées à l'**Annexe 2**). Les résultats montrent que la quantité de liaisons sulfhydryles libres augmente de façon significative lorsque les protéines sont microfluidisées. A l'inverse, la quantité de ponts disulfures diminue de façon significative avec le traitement de microfluidisation. La variation des deux paramètres semble corrélée, lorsque les liaisons disulfures diminuent, les liaisons sulfhydryles libres augmentent. Il convient cependant d'aborder le résultat de l'échantillon 1375-1-L avec prudence en raison de son écart-type conséquent.).

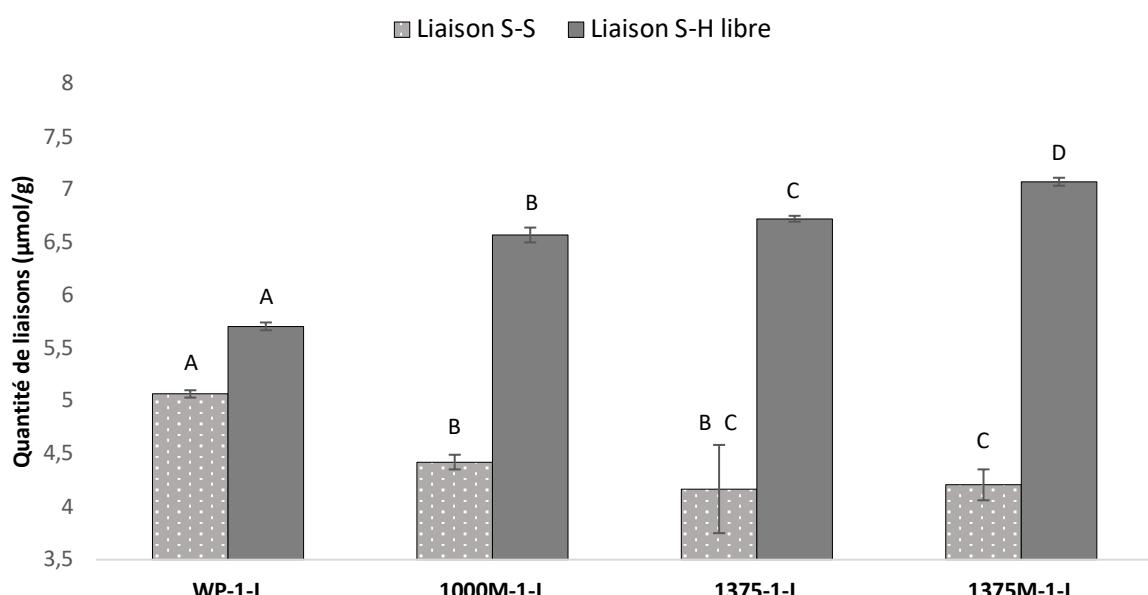


Figure 20: Comparaison de la quantité de liaisons sulfhydryles (gris clair avec points blancs) et disulfures (gris foncé) ($\mu\text{mol/g}$) pour des échantillons microfluidisés (1000M-1-L, 1375-1-L & 1375M-1-L) ou non (WP-1-L).

Comme abordé précédemment, la formation d'agrégats de protéines de lactosérum implique non seulement des groupes -SH libres réactifs mais aussi des liaisons S-S dans la structure des protéines du lactosérum. Leur interaction via des réactions d'échange -SH/S-S conduit finalement à l'agrégation et à la polymérisation lors de la production du concentré protéique.⁴³ Surroca et al. (2002) ont prouvé que la Cys121, possédant le groupe -SH le plus réactif, initie des réactions intramoléculaires d'échange S-S avec la Cys66-Cys160 dans la β -lactoglobuline.⁸⁰ Un groupe -SH réactif néoformé initie alors la formation de polymères par son interaction avec les ponts S-S d'autres protéines.⁸¹

Le traitement par microfluidisation, devrait réduire la taille des agrégats protéiques dont la formation est décrite dans le paragraphe précédent. La variation de cette teneur en -SH et -S-S après le traitement par microfluidisation pourrait donc être principalement imputée au clivage des liaisons intramoléculaires non covalentes.⁸² Les forces de cisaillements subies par les protéines lors de la microfluidisation ont donc probablement entraîné la rupture de certaines liaisons disulfures, ce qui explique la diminution de la quantité de liaisons S-S. L'augmentation de la quantité de liaisons S-H proviendrait quant à elle de la réduction de liaisons S-S fraîchement brisées.⁵

Lors de l'application de traitements hydrostatiques à haute pression sur des protéines de soja, Xi et He (2018) ont mis en évidence que la réduction des agrégats protéiques induit une augmentation de la teneur en groupements S-H alors que, à l'inverse, une augmentation de ces groupements est, elle, signe d'une réticulation de la protéine.⁶

L'augmentation de la quantité de groupement sulfhydryles libres en surface, dûe à la désagrégation par le traitement de microfluidisation, devrait également se traduire par une augmentation de l'hydrophobicité de surface des protéines.

4.3.2.5. Hydrophobicité de surface des protéines

L'hydrophobicité est importante pour maintenir la structure tertiaire des protéines, qui détermine leur stabilité, leur conformation et leurs fonctions. En milieu aqueux, les résidus d'acides aminés non polaires ont tendance à être orientés vers l'intérieur protéine en raison des interactions hydrophobes afin de minimiser leur contact direct avec l'eau. Cependant, des interactions hydrophobes peuvent encore se produire à la surface des molécules de protéines, rendant la surface de la protéine hydrophobe.⁸³

Les résultats présentés sur la **Figure 21** mettent en évidence que l'hydrophobicité de surface augmente de façon significative pour les protéines microfluidisées à 1375 bars par rapport aux protéines non traitées. Le traitement à 1000 bars, lui, ne semble pas augmenter significativement par rapport aux protéines non microfluidisées. Dans le cas du traitement à 1375 bars, l'augmentation du nombre de passages semble accroître l'effet du traitement sur l'hydrophobicité de surface.

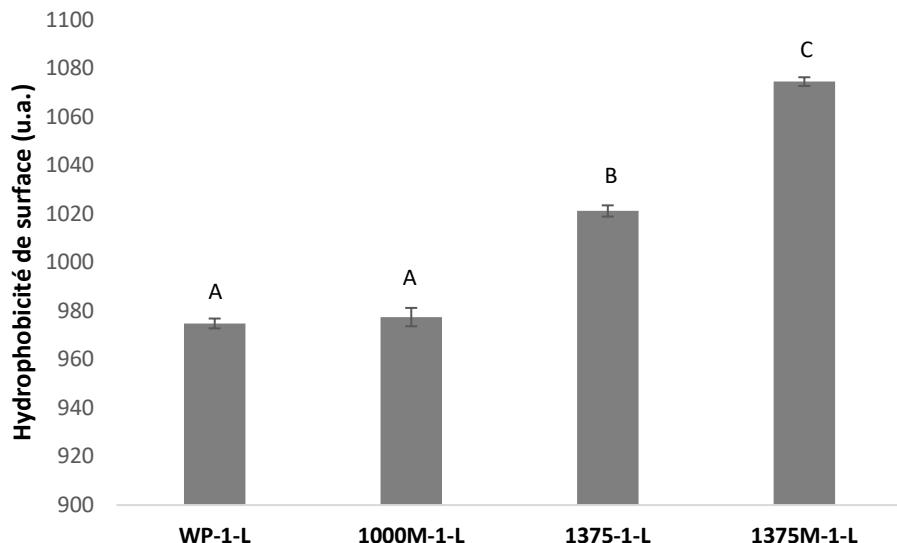


Figure 21: Comparaison de l'hydrophobicité de surface (u.a.) de solutions de protéines de lactosérum microfluidisées dans différentes conditions (1000M-1-L, 1375-1-L & 1375M-1-L) et non microfluidisées (WP-1-L)

Avant la microfluidisation des protéines de lactosérum, la plupart des chaînes latérales non polaires des résidus d'acides aminés s'encastrent dans la région interne des molécules de protéines et forment un noyau hydrophobe stable, tandis que la plupart des chaînes latérales polaires des résidus d'acides aminés se répartissent à la surface des protéines pour assurer la stabilité de l'interaction des molécules d'eau dans le noyau hydrophile.⁸³ La microfluidisation, à des pressions de 1375 bars, a rendu les solutions de protéines de lactosérum homogènes avec des tailles de particules plus petites ce qui entraîne ; une augmentation de la surface et une redistribution des chaînes latérales hydrophobes avec pour effet une exposition accrue des résidus d'acides aminés non polaires à la surface des protéines. Cette augmentation de l'hydrophobicité de surface est en accord avec l'augmentation de la quantité de groupements sulfhydryles libres présentée plus haut. Des résultats similaires, c'est-à-dire : une augmentation simultanée de l'hydrophobicité de surface ainsi que de la quantité de liaisons sulfhydryles ont été observés dans le cadre d'une étude de traitement des protéines de lactosérum par homogénéisation à très haute pression. Cette augmentation est, selon les auteurs, liée à l'exposition accrue des sites hydrophobes résultant de la rupture de grands agrégats de protéines.^{60,83}

Bien que ces résultats viennent, une nouvelle fois, supporter l'hypothèse d'une désagrégation, il convient d'observer une certaine prudence quant à leur interprétation. En effet, en raison de la quantité résiduelle en lipides dans les concentrés de protéines de lactosérum (entre 6 et 7%), les tests d'hydrophobicité pourraient fournir des résultats difficiles à interpréter.⁴

4.3.3. Modélisation des dynamiques et interactions à l'interface air-eau

Afin de permettre un analyse plus fine des cinétiques d'adsorption à des âges de surface courts, une modélisation des phénomènes mise en jeu dans les procédés d'abaissement de tension de surface à l'interface air-eau a été affectée en adaptant des modèles habituellement utilisés pour des protéines pures. Les modifications effectuées sur ceux-ci ont été détaillées et les résultats discutés.

4.3.3.1. Coefficient de diffusion – Modèle de Joos & Rillaerts

Le coefficient de diffusion (constante de diffusion, diffusivité) se traduit par une mesure de la vitesse de transport des matières en fonction du mouvement thermique aléatoire des particules (diffusion).

Joos et Rillaerts ont établi une équation (**Équation 10**) permettant de calculer un coefficient de diffusion relatif à la variation de la tension superficielle en fonction du temps, due à la diffusion résultant du mouvement des molécules de tensioactives à l'interface.⁶⁹

$$\sigma_t = \sigma_0 - 2RTC * \left(\frac{D_s * t}{\pi} \right)^{0,5}$$

Équation 10 : Équation de Joos & Rillaerts décrivant la diffusion aux interfaces. Avec: σ_t = tension superficielle à l'âge de la surface t ; σ_0 = tension superficielle du solvant pur ; R = constante universelle des gaz ; T = température absolue ; C = concentration molaire du tensioactif ; D_s = coefficient de diffusion

Le modèle de Joos et Rillaerts ainsi que celui de Ward et Tordai sont généralement utilisés pour des protéines pures. Dans le cadre de ce travail, des adaptations ont été réalisées afin de le rendre utilisable pour le mélange complexe de protéines.

Le principale problème avec les deux modèles initiaux provient du terme « C » qui représente la concentration en tensioactif. Pour calculer cette concentration, il est nécessaire de connaître le poids moléculaire du tensioactif. Or, le lactosérum se trouve être un mélange extrêmement complexe de protéines possédant toutes leur propre poids moléculaire. Il est donc risqué de tenter de donner une valeur moyenne de poids moléculaire pour le concentré protéique dans son ensemble.

Pour contourner ce problème, il a été décidé de travailler en concentration massique en fixant le nombre de moles à un. Le coefficient de diffusion ne représente donc plus le déplacement d'un certain nombre de moles de protéines mais bien d'une certaine masse de protéines.

Cette modification présente cependant un problème majeur : les valeurs de coefficient de diffusion sont biaisées et inférieures à la réalité. Cependant, ce biais étant égal pour tous les échantillons, il sera possible de réaliser une comparaison des valeurs obtenues entre elles. Par contre une comparaison à la littérature ne sera donc pas réalisable.

Le modèle ne permet pas de déterminer une valeur de coefficient de diffusion que dans la zone où la diminution de tension de surface n'est due qu'aux phénomènes de diffusion.⁶⁹ Cette zone, si elle existe pour l'échantillon, sera visible sur le graphique sous forme d'un plateau horizontal. Si aucun plateau n'est visible sur celui-ci, cela signifie que la diffusion n'est pas un phénomène limitant dans le processus de diminution de la tension de surface par les protéine tensioactives.

Le modèle de Joos & Rillaerts a donc été appliqué sur les mesures de tension de surface dynamique obtenues précédemment pour les échantillons de protéines de lactosérum microfluidisées ou non. Pour chaque modalité (WP-1-L, 1000M-1-L, 1375-1-L & 1375M-1-L), le modèle a été calculé sur la moyenne des triplicata et est présenté respectivement en **Annexe 3, 4, 5 & 6**.

La **Figure 22** montre le résultat obtenu pour l'échantillon de protéines de lactosérum non microfluidisées (WP-1-L) ainsi que pour l'échantillon ayant subi un traitement de microfluidisation plus intense, c'est-à-dire 1375 bars et cinq passages (1375M-1-L). Les zones utilisées pour la détermination du coefficient de diffusion, ont été mises en évidence par des rectangles sur le graphique.

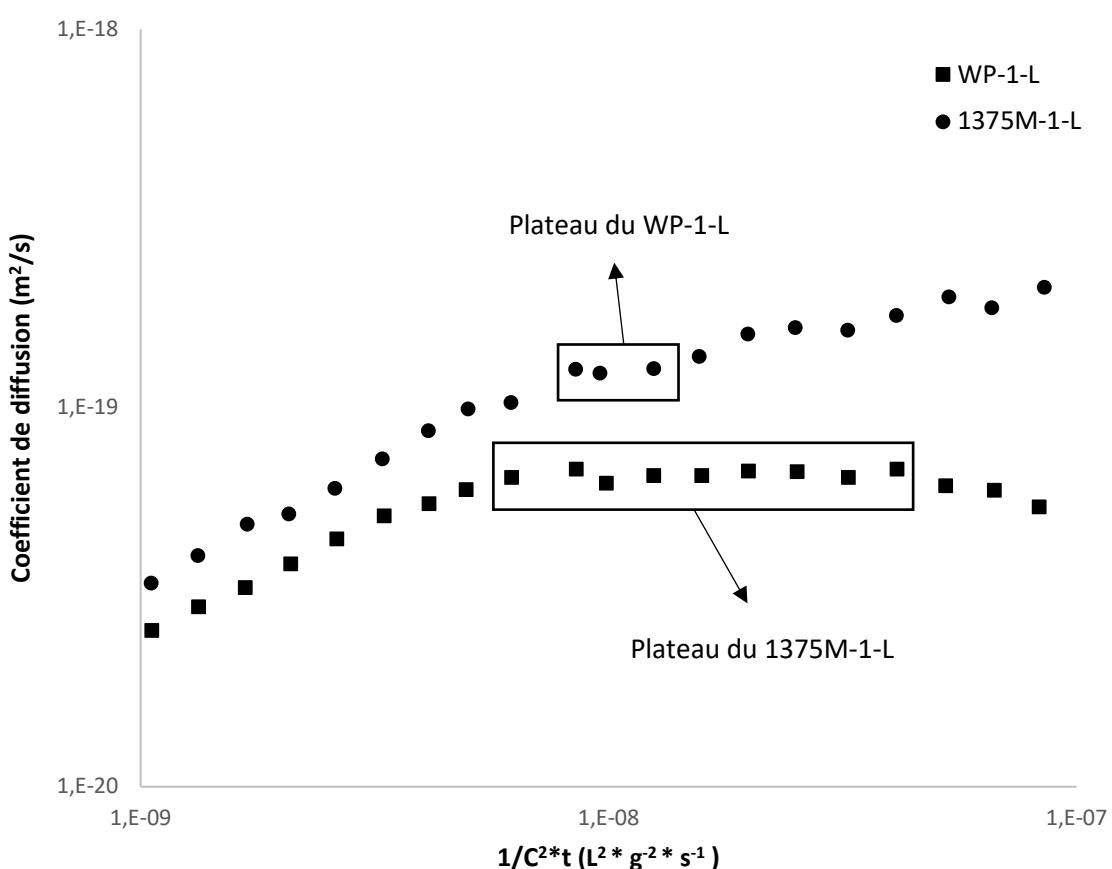


Figure 22: Modèle de Joos & Rillaerts – Comparaison de l'évolution du coefficient de diffusion (m²/s) en fonction du terme $1/c^2*t$ ($L^2 * g^{-2} * s^{-1}$) pour un échantillon non microfluidisé (rond noir) et un échantillon microfluidisé (carré noir) 1375M-1-L.

Les plateaux des deux échantillons diffèrent de façon significative, non seulement au niveau de la valeur du coefficient de diffusion, mais aussi au niveau de la longueur de ceux-ci. Le coefficient de diffusion étant plus grand mais le plateau plus court pour l'échantillon non microfluidisé.

Le coefficient de diffusion voit sa valeur divisée par deux (de 1,67 à 0,67-0,85 selon la modalité de traitement appliquée) lors du traitement par microfluidisation (**Tableau 10**). Le passage de 1000 bars et 5 passages à 1375 bars et un passage ne semble pas affecter significativement le coefficient de diffusion. En revanche, pour le traitement le plus drastique(1375 bars et cinq passages), une diminution significative du coefficient de diffusion est observée par rapport aux deux autres conditions de traitement. Il semblerait donc que les agrégats protéiques obtenus après microfluidisation ne soient pas capables de se déplacer aussi vite que ceux présents avant le traitement. Par contre, cette phase de diffusion est beaucoup plus longue pour les échantillons microfluidisés. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène serait que : plus les agrégats sont grands, moins ils sont nombreux, plus leur diffusion sera donc plus courte. A l'inverse, s'il y a beaucoup de petits agrégats, ils vont diffuser pendant plus longtemps comme on peut l'observer au niveau du plateau. Celui-ci représentant la phase pendant laquelle le phénomène qui limite l'abaissement de tension de surface par les protéines est la diffusion.

Tableau 10: Modèle de Joos & Rillaerts - Coefficient de diffusion (m^2/s) moyen pour les échantillons de protéines de lactosérum microfluidisés (1000M-1-L, 1375-1-L & 1375M-1-L) ou non (WP-1-L).

	WP-1-L	1000M-1-L	1375-1-L	1375M-1-L
D * 10^{-19} (m^2/s)	1,67 ^A	0,78 ^B	0,85 ^B	0,67 ^C
Écart-type* 10^{-19} (m^2/s)	0,18	0,04	0,01	0,02
CV (%)	10,72	5,35	1,14	2,28

A partir des coefficients de diffusion obtenus plus haut, il est possible de déterminer sur le graphique de tension de surface dynamique la zone dans laquelle la diminution de la tension de surface est maximale et limitée par les phénomènes de diffusion. Il est également possible de mettre en évidence la phase de latence qui précède la diminution de tension de surface. Cette phase porte le nom de temps d'induction. La **Figure 23** met en évidence les éléments mentionnés ci-dessus pour les protéines de lactosérum non microfluidisées (WP-1-L) ainsi que pour les protéines de lactosérum microfluidisées à 1375 bars et cinq passages (1375M-1-L).

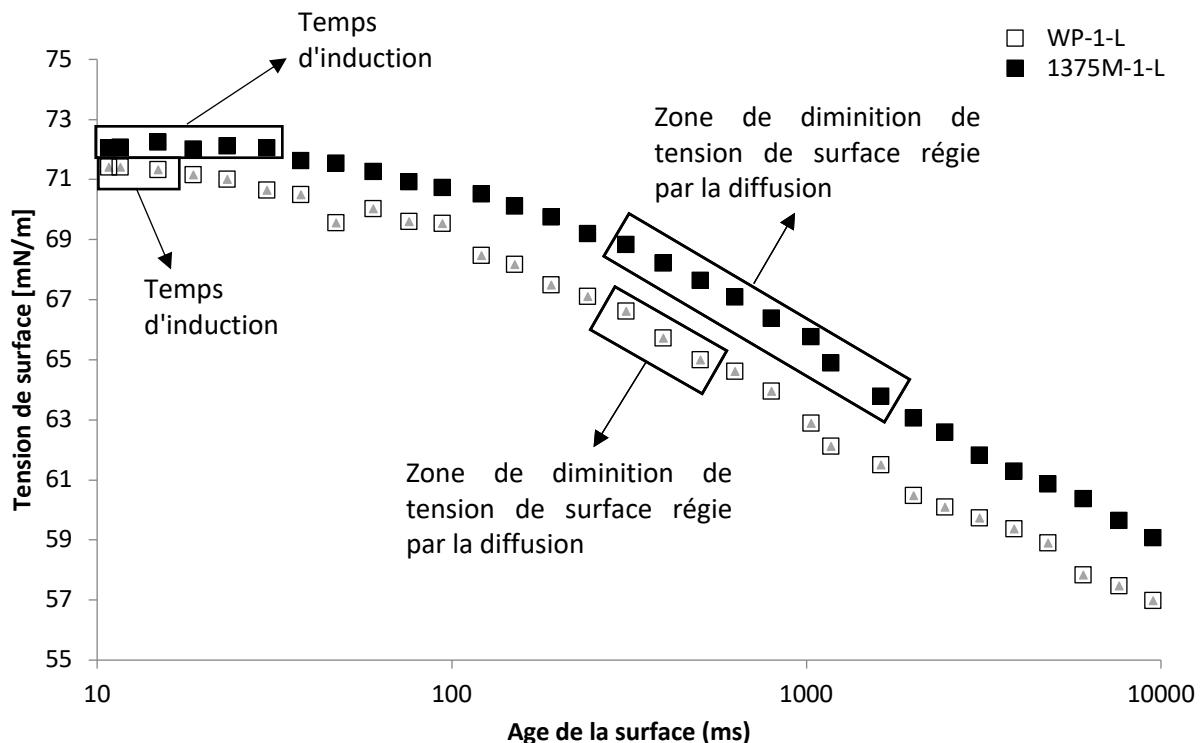


Figure 23: Tension de surface (mN/m) des protéines de lactosérum non microfluidisées (WP-1-L, carré blanc) et microfluidisées (1375M-1-L, carré noir) en fonction de l'âge de la surface (ms).

Une réduction de tension de surface dynamique théorique peut être divisée en quatre zones majeures à savoir : une région d'induction (temps courts), une région de chute rapide, une région de pseudo-équilibre et une région d'équilibre (temps longs). Le temps d'induction assez long chez les protéines, par rapport au tensioactif classique, peut être attribué à leur structure et à leur taille moléculaire.⁸⁴ Plus fondamentalement, cette différence entre protéines et tensioactifs classiques provient du fait que la tension de surface ne commence à diminuer que lorsqu'une certaine couverture monocouche est présente à l'interface. Le temps nécessaire pour atteindre cette couverture minimale est appelé temps d'induction.⁶⁸

Dans le cas des données présentées sur la **Figure 23**, seules les deux premières étapes sont aisément discernables. Le temps d'induction observé pour les protéines microfluidisées est plus long que celui des protéines non traitées. L'augmentation de la tension de surface avec le traitement de microfluidisation et l'allongement du temps d'induction pourraient être mis en relation avec l'hypothèse de désagrégation. En effet, la réduction des agrégats pourrait induire un changement de conformation et d'orientation moléculaire des résidus hydrophobes et hydrophiles à l'interface, diminuant ainsi leur capacité d'abaissement de tension de surface.⁸⁵

Les analyses ont également montré que la période d'induction et la tension superficielle des solutions diminuent avec la concentration. A des concentrations plus élevées, un point de saturation est atteint et l'augmentation de la concentration ne modifie pas les courbes de tension de surface dynamique, ce qui est en accord avec les résultats de Shrestha et al. (2008).⁸⁴

4.3.3.2. Coefficient d'adsorption – Modèle de Ward & Tordai

Le coefficient d'adsorption (constante d'adsorption) est une mesure de la vitesse à laquelle les molécules d'un agent de surface sont adsorbées à la surface.

Les molécules de tensioactifs se retrouvent à la surface et s'alignent de telle sorte que les types de molécules ayant une plus grande affinité avec la phase liquide sont orientés vers l'intérieur et ceux qui ont moins d'affinité sont orientés vers l'extérieur. Ce faisant, la tension superficielle diminue avec l'augmentation de la concentration en surface. Le comportement transitoire du processus d'adsorption, qui devient plus lent avec l'augmentation de la concentration de surface, a été décrit par Ward et Tordai⁷⁰ au moyen de l'**Équation 11**:

$$\sigma_t = \sigma_{eq} + \frac{R T r^2}{2C} * \left(\frac{D_l * t}{\pi} \right)^{-0,5}$$

Équation 11: Équation de Ward et Tordai décrivant l'adsorption aux interfaces. Avec : σ_t = tension superficielle à l'âge de la surface t ; σ_{eq} = tension superficielle à l'équilibre dynamique ; t = âge de la surface ; R = constante universelle des gaz ; T = température absolue ; r = concentration excédentaire en surface ; C = concentration molaire de la solution ; D_l = coefficient d'adsorption

L'excès de concentration en surface r est la concentration surfacique d'un composé tensioactif à une surface ou à un interface. Il peut être calculé en mesurant la CMC à partir de la pente de la région de la tension superficielle dépendant de la concentration avec l'**Équation 12**:

$$r = -\frac{1}{RT} * \frac{d\sigma}{d\ln(C)}$$

Équation 12: Calcul de l'excès de concentration de surface. Avec : R = constante universelle des gaz ; T = température absolue ; σ = tension superficielle ; c = concentration molaire de l'agent de surface.

Le modèle de Ward et Tordai a été adapté comme décrit dans le chapitre précédent. Cette même modification a été réalisée pour calculer l'excès de concentration de surface.

Pour calculer la valeur de cet excès de concentration de surface, il est nécessaire de calculer la concentration « micellaire » critique. En effet, le terme $\frac{d\sigma}{d\ln(C)}$ correspond à la pente de la droite dans la zone où l'augmentation de la concentration en protéines provoque une diminution de la tension de surface.

Pour les protéines de lactosérum non microfluidisées (WP-1-L - **Figure 24**) et pour celles microfluidisées à 1375 bars et cinq passages (1375M-1-L - **Figure 25**), les tensions de surface à l'équilibre ont été déterminées à partir des cinétiques d'adsorption à des âges de surface courts à des concentrations de : 0,05 – 0,10 – 0,25 – 0,50 – 1 – 2,5 & 5 % w/w.

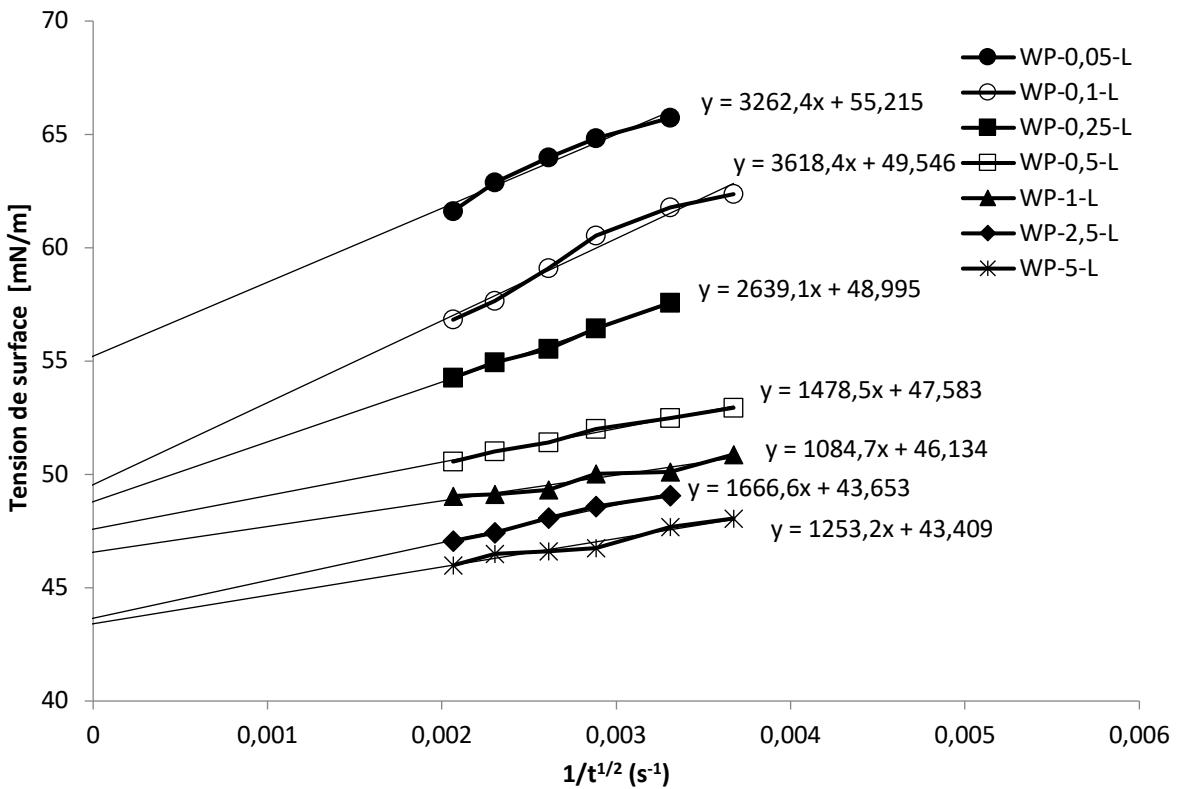


Figure 24: Détermination de la tension de surface à l'équilibre par régression linéaire - Évolution de la tension de surface (mN/m) en fonction de l'inverse de la racine carrée du temps (s⁻¹) pour les échantillons WP-(0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5)-L

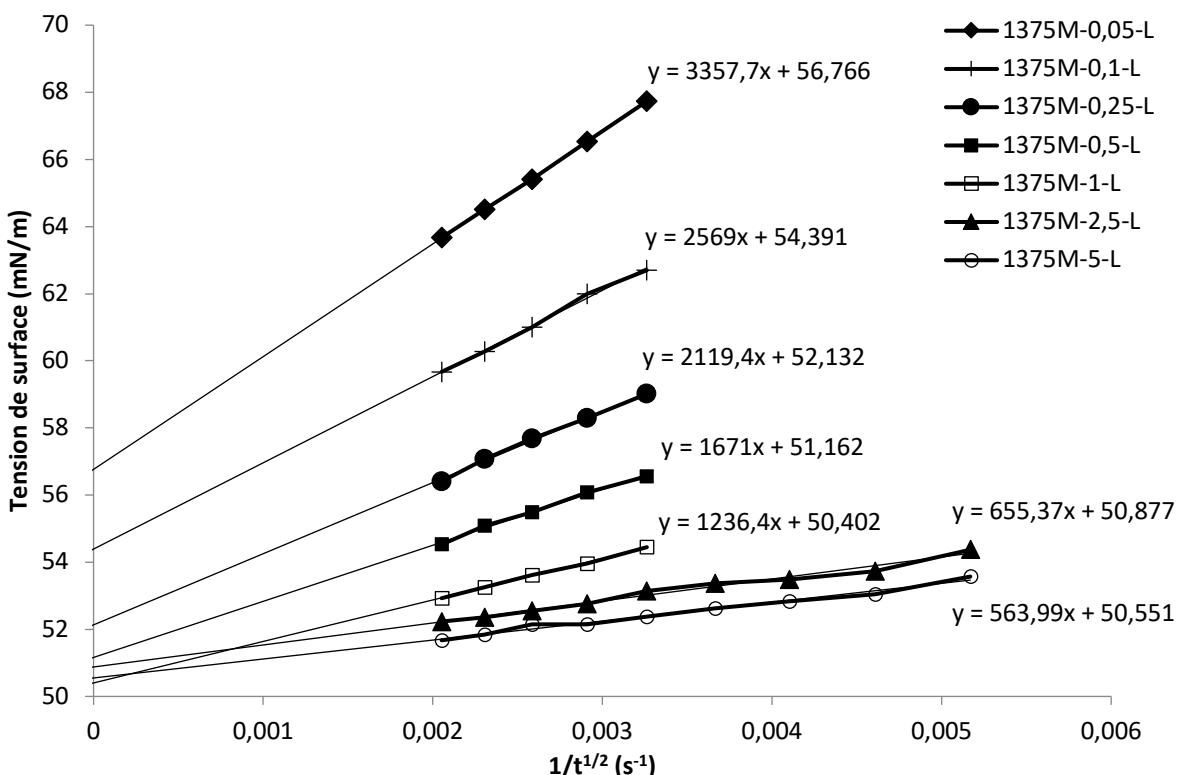


Figure 25: Détermination de la tension de surface à l'équilibre par régression linéaire - Évolution de la tension de surface (mN/m) en fonction de l'inverse de la racine carrée du temps (s⁻¹) pour les échantillons 1375M-(0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5)-L.

Les données de valeur d'équilibre ont ensuite été rassemblées dans la **Figure 26** afin de déterminer la concentration critique des différentes solutions de protéines de lactosérum.

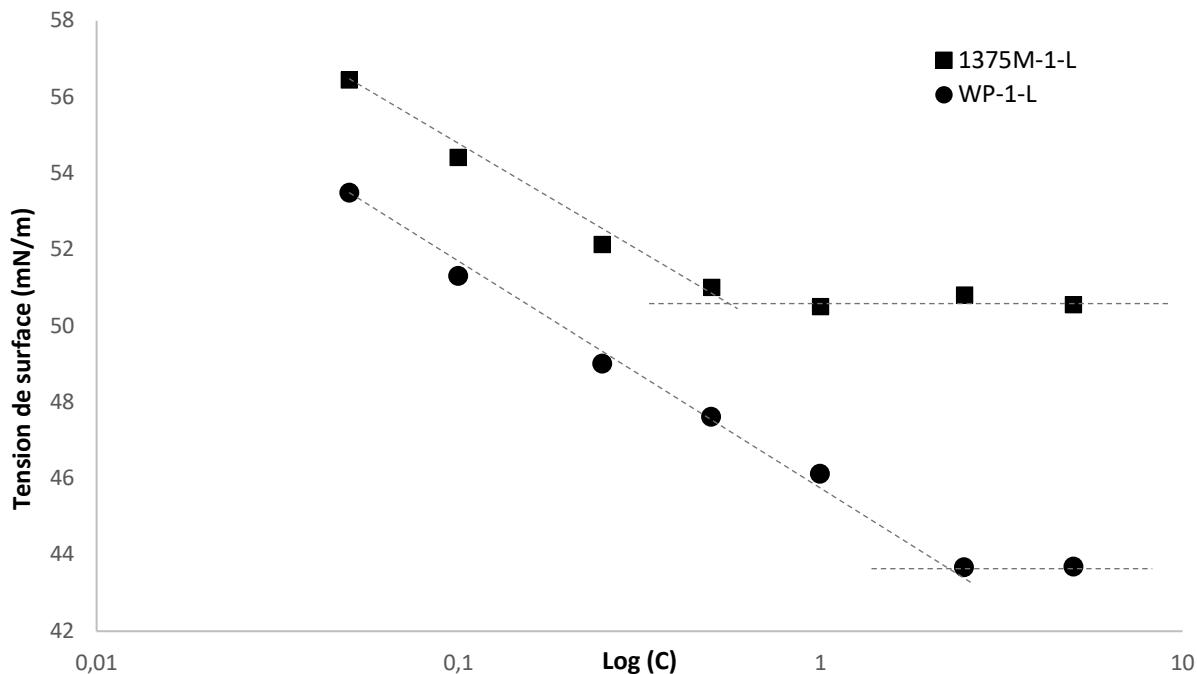


Figure 26: Détermination de la pente de la droite dans la région où l'évolution de la concentration affecte la tension de surface - Évolution de la tension de surface (mN/m) en fonction du logarithme de la concentration (% w/w) pour le 1375M-1-L (carré noir) et le WP-1-L (rond noir)

Pour les protéines non microfluidisées, la valeur de la concentration critique déterminée graphiquement est de 2,5% w/w. Shrestha et al. (2008), qui ont travaillé sur un isolat de protéines de lactosérum, obtenu une concentration critique valant 3% w/w.⁸⁴ En revanche, pour les protéines microfluidisées (1375M-1-L), la concentration critique est atteinte à une concentration beaucoup plus faible située un peu au-dessus de 0,5 % w/w. Une quantité plus petite des protéines microfluidisées est donc nécessaire pour saturer l'interface mais, la tension de surface minimale atteinte n'est pas aussi faible que pour les protéines microfluidisées.

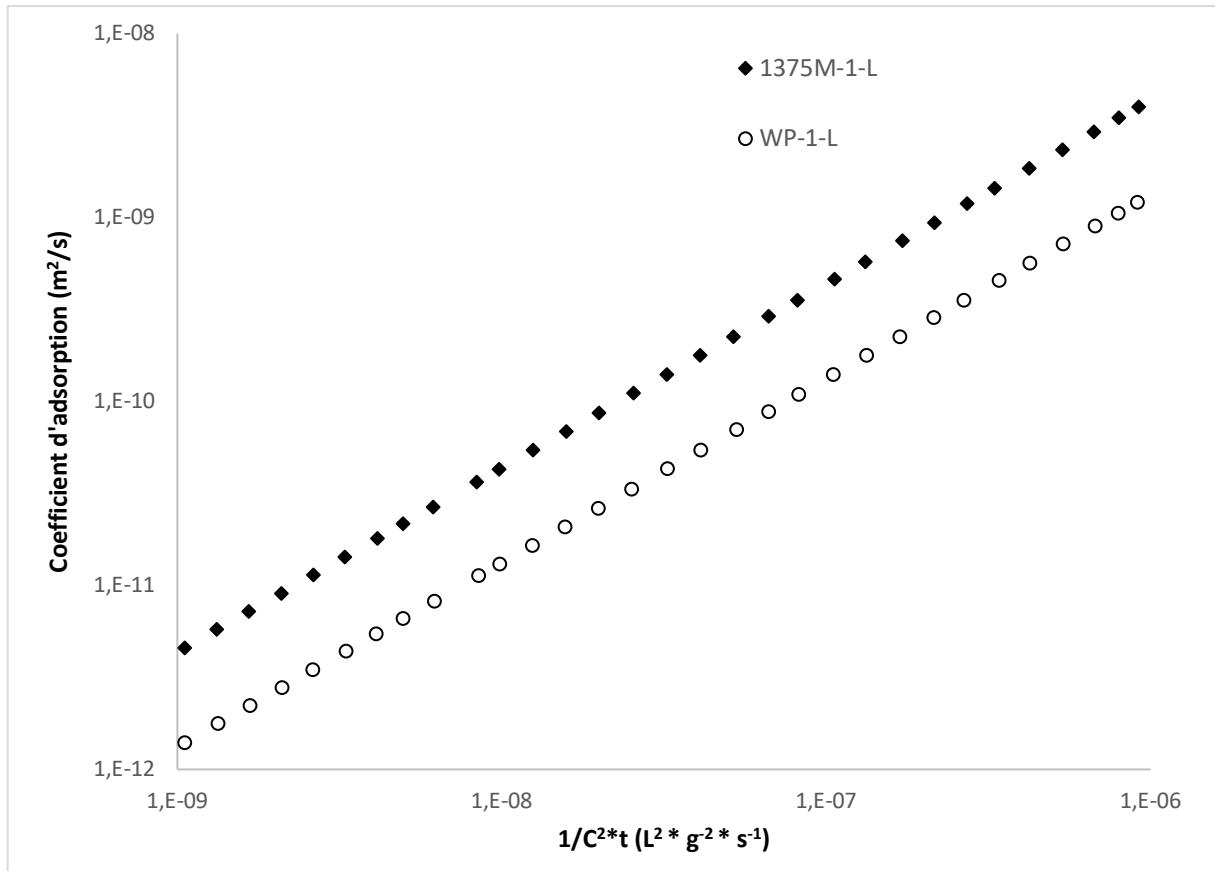


Figure 27: Modèle de Ward et Tordai - Évolution du coefficient d'adsorption (m^2/s) en fonction du terme $1/c^2 \cdot t$ ($L^2 \cdot g^{-2} \cdot s^{-1}$) pour les échantillons WP-1-L (rond blanc) & 1375M-1-L (losange noir).

Le modèle de Ward et Tordai, a été calculé et mis en graphique comme présenté sur la **Figure 27**. Sur celui-ci, un plateau devrait apparaître si : la diminution de tension de surface est à un moment régie et limitée par les phénomènes d'adsorption. Une valeur de coefficient d'adsorption traduisant la vitesse maximale à laquelle cette adsorption est capable de s'opérer serait alors déterminée à partir de ce plateau. Or, il apparaît que peu importe l'échantillon, aucun plateau ne semble se dessiner, ce qui voudrait dire que : à cette concentration en protéines de lactosérum, l'adsorption n'est pas un phénomène limitant dans l'abaissement de la tension de surface. Cette assumption semble logique puisque, dans ce cas précis, une étape limitante dans l'abaissement de la tension de surface est déjà présente, à savoir : la diffusion. De plus, ces conclusions sont en accord avec le travail d'autres auteurs qui précisent qu'à des concentrations faibles en protéines, ce sont les phénomènes de diffusion qui semblent être limitants plus que les phénomènes d'adsorptions.^{67,71}

5. Conclusions et perspectives

Les différents résultats obtenus suggèrent que la microfluidisation a un impact sur les protéines de lactosérum. Des deux hypothèses formulées initialement, l'hypothèse d'une dénaturation des protéines a rapidement été exclue, les analyses DSC n'ayant pas permis de mettre en évidence de phénomène de dénaturation des protéines.

L'étude des différentes propriétés physico-chimiques semble indiquer que tous les changements observés au niveau de ces propriétés semble être le fruit de la deuxième hypothèse formulée à savoir : une désagrégation des agrégats protéiques présents dans la solution de protéines de lactosérum.

La microfluidisation diminue la capacité des protéines à abaisser la tension de surface à l'interface air-eau, et ce, de façon de plus en plus marquée avec l'augmentation de l'âge de la surface probablement, car la désagrégation formerait des néo-agrégats avec une moins bonne distribution des groupement hydrophiles et hydrophobes que les rendent moins efficaces pour abaisser la tension de surface. Cette désagrégation, en revanche, en réduisant de moitié la taille moyenne des agrégats en solution et en rendant leur distribution de taille plus homogène, contribue non seulement à augmenter leur solubilité de près de 10% à 12% mais aussi à augmenter de façon importante de la vitesse d'hydratation des protéines qui passe de 4h à seulement 1h après la microfluidisation. Ces augmentations seraient principalement le résultat de l'augmentation de la surface de contact des protéines avec l'eau liée.⁷⁹ La baisse de la quantité de ponts disulfures est due à la rupture de ceux-ci lors de la désagrégation. Cette rupture est suivie par un réduction des liaison fraîchement brisées conduisant ainsi à l'augmentation de la quantité de liaisons sulphydryles libres ainsi qu'à l'augmentation de l'hydrophobicité de surface.⁵

La pression à laquelle est réalisée la microfluidisation influence l'intensité des modifications des propriétés physico-chimiques. Les traitements à 1375 bars ont ainsi le même type d'effets que ceux à 1000 bars mais, la différence la plus marquée par rapport à l'échantillon natif est toujours à imputer à la pression 1375 bars. Cette différence entre traitement à 1000 bars ou 1375 bars n'est pas constante d'une propriété physico-chimique et est même inexistante dans le cas de la vitesse d'hydratation. Ceci pourrait indiquer que l'effet maximal du traitement est atteint ou que le traitement à moins d'impact sur cette propriété. Le calcul du taux de cisaillement, pour une augmentation de pression de 1000 bars à 1375 bars, n'augmenterait que de 3,9%. Cette valeur semble fort faible au vu des différences parfois importantes observées pour bon nombre de propriétés. Cette approche ne semble donc pas pouvoir constituer une alternative viable à la variable « pression » pour qualifier l'intensité du traitement, et ce, notamment, car elle ne tient pas compte d'autres forces appliquées au produit pendant la microfluidisation et qui semble jouer un impact plus important qu'initiallement prévu tel que : le frottement à grande vitesse, la cavitation, les turbulences, des impacts importants et l'échauffement.

Le nombre de passages dans la chambre de traitement a un effet sur certains paramètres tels que la tension de surface à l'équilibre, la solubilité ou la quantité de liaisons sulphydryles libres. En effet, les échantillons ayant subi cinq passages plutôt qu'un seul présentent, dans certains cas, une différence marquée par rapport aux propriétés des protéines non microfluidisées. Le multi passage n'augmente pas l'intensité du traitement mais permet cependant que des protéines n'ayant pas subi un traitement assez intense (car par exemple dans des zones où le cisaillement est plus faible) au premier passage soient pleinement impactées. Il est donc possible de conclure que certains agrégats protéiques n'ont pas été totalement brisés au premier passage dans la chambre de traitement mais l'ont été lors des passages suivants.

Les modèles de Joos & Rillaerts et de Ward & Tordai, adaptés pour un mélange protéique, soulignent que la diffusion est le phénomène limitant dominant lors de l'abaissement de la tension surface dans des solutions protéiques peu concentrée. De même, la vitesse à laquelle s'effectue cette diffusion est réduite par deux pour les protéines microfluidisées probablement à cause de la conformation non favorable à l'abaissement de la tension de surface des néo agrégats.

Afin de comprendre avec encore plus de finesse les modifications subies par les protéines de lactosérum lors de la microfluidisation, l'analyse de la structure secondaire des protéines par spectrométrie infrarouge pourrait s'avérer très utile.

Les propriétés étudiées dans ce travail sont des facteurs majeurs influençant des propriétés technofonctionnelles omniprésentes dans l'industrie telles que la capacité moussante ou émulsifiante. Une étude approfondie des celles-ci semble donc être la prochaine étape. Les modèles Joos & Rillaerts et de Ward & Tordai joueront un rôle prédominant dans l'analyse de la capacité moussante, celle-ci étant régie par trois facteurs : le transport, la pénétration et la réorganisation des molécules à l'interface air/eau.⁴

Une étude plus approfondie des phénomènes impliqués dans les modifications physico-chimiques des protéines de lactosérum ainsi que la quantification de l'évolution de chacun de ceux-ci en fonction de la pression et de l'équipement utilisés pourrait permettre de créer un nouveau paramètre universel décrivant le traitement subi par les particules dans la chambre de traitement. Ce paramètre permettrait ainsi de s'affranchir des problèmes de reproductibilité inter-appareil inhérent aux techniques de cisaillement à haute pression.

6. Contribution de l'étudiant

Dès le mois de septembre 2020, l'étudiant s'est rendu au laboratoire afin d'effectuer des manipulations préliminaires pour évaluer si la microfluidisation pouvait constituer une nouvelle méthode de modification des propriétés physico-chimiques des protéines de lactosérum.

Une recherche approfondie de la littérature scientifique sur le sujet a permis à l'étudiant d'approfondir ses connaissances sur le sujet, de fixer ses objectifs de recherche et de constituer son plan expérimental.

Avec l'aide du Docteur Jacquet, et de sa condisciple Louise Goffin, l'étudiant a déménagé le microfluidiseur pour l'installer dans le bâtiment « Terra ». Les différentes opérations de raccordement à l'électricité, à l'eau, à l'air comprimé et au système de refroidissement ont également été effectuées.

L'étudiant a ensuite appliqué une série de traitements de microfluidisation à des solutions de protéines de lactosérum. Des analyses méthodiques et rigoureuses ont ensuite été réalisées sur ces solutions.

Les résultats des différentes résultats ont été analysés, des modèles réalisés et, lorsque c'était nécessaire, le plan expérimental a été ajusté sous la supervision des deux promoteurs de l'étudiant.

7. Bibliographie

- (1) Shinde, G.; Kumar, R.; Chauhan, S. K.; Shinde, G.; Subramanian, V.; Nadanasabapathi, S. Whey Proteins: A Potential Ingredient for Food Industry- A Review. *Asian J. Dairy Food Res.* **2018**,
- (2) Totosaus, A.; Montejano, J. G.; Salazar, J. A.; Guerrero, I. A Review of Physical and Chemical Protein-Gel Induction. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2002**, 37 (6), 589–601.
- (3) Mohan, A.; Udechukwu, M. C.; Rajendran, S. R. C. K.; Udenigwe, C. C. Modification of Peptide Functionality during Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. *RSC Adv.* **2015**, 5 (118), 97400–97407.
- (4) Morr, C. V; Ha, E. Y. W. Critical Reviews in Food Science and Nutrition Whey Protein Concentrates and Isolates: Processing and Functional Properties Whey Protein Concentrates and Isolates: Processing and Functional Properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1993**, 33 (6), 431–476.
- (5) Wang, C.; Wang, J.; Zhu, D.; Hu, S.; Kang, Z.; Ma, H. Effect of Dynamic Ultra-High Pressure Homogenization on the Structure and Functional Properties of Whey Protein. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, 57 (4), 1301–1309.
- (6) Xi, J.; He, M. High Hydrostatic Pressure (HHP) Effects on Antigenicity and Structural Properties of Soybean β -Conglycinin. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, 55 (2), 630–637..
- (7) Blayo, C.; Vidcoq, O.; Lazennec, F.; Dumay, E. Effects of High Pressure Processing (Hydrostatic High Pressure and Ultra-High Pressure Homogenisation) on Whey Protein Native State and Susceptibility to Tryptic Hydrolysis at Atmospheric Pressure. *Food Res. Int.* **2016**, 79, 40–53.
- (8) Sha, X.; Hu, Z.; Tu, Z.; Wang, H.; Huang, T.; Zhang, L.; Yang, P. Effect of Dynamic High-Pressure Microfluidization on Functional Properties of Soy Protein Isolate-Soybean Soluble Polysaccharides System. *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions Chinese Soc. Agric. Eng.* **2016**, 32 (17), 281–286.
- (9) Yadav, J. S. S.; Yan, S.; Pilli, S.; Kumar, L.; Tyagi, R. D.; Surampalli, R. Y. Cheese Whey: A Potential Resource to Transform into Bioprotein, Functional/Nutritional Proteins and Bioactive Peptides. *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33 (6), 756–774.
- (10) Encyclopedia of Dairy Sciences | ScienceDirect <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780122272356/encyclopedia-of-dairy-sciences> (accessed May 30, 2021).
- (11) Macwan, S. R.; Dabhi, B. K.; Parmar, S. C.; Aparnathi, K. D. Whey and Its Utilization. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2016**, 5 (8), 134–155.
- (12) Haenlein, G. F. . Encyclopedia of Dairy Sciences. *Small Rumin. Res.* **2004**, 52 (3), 282.
- (13) Morr, C. V. Whey Utilization. In *Whey and Lactose Processing*; Springer Netherlands, **1992**; pp 133–155.
- (14) Wagner, J. Membrane Filtration Handbook: Practical Hints and Tips. *Osmonics* **2001**, 2, 129.
- (15) Butylina, S.; Luque, S.; Nyström, M. Fractionation of Whey-Derived Peptides Using a Combination of Ultrafiltration and Nanofiltration. *J. Memb. Sci.* **2006**, 280 (1–2), 418–426.
- (16) Mulvihill, D. M.; Fox, P. F. Developments in the Production of Milk Proteins. In *New and Developing Sources of Food Proteins*; Hudson, B. J. F., Ed.; Springer US: Boston, MA, **1994**; pp 1–30.
- (17) Kinsella, J. E. Milk Proteins: Physicochemical and Functional Properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1984**, 21 (3), 197–262.
- (18) Sharma, K.; Chauhan, E. S. Multifaceted Whey Protein : Its Applications in Food Industry. **2018**, 8 (October), 262–268.

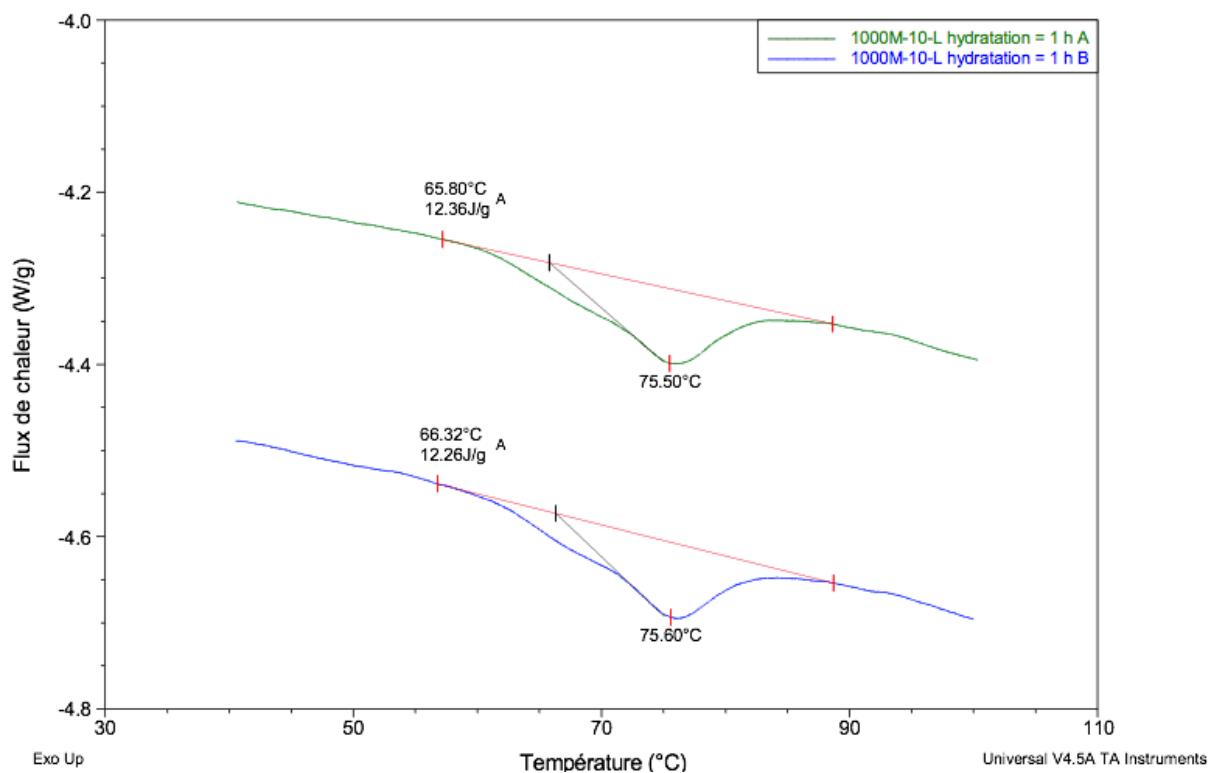
- (19) Onwulata, C. I.; Huth, P. J. *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*; Wiley-Blackwell, **2009**.
- (20) Relkin, P. Thermal Unfolding of β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, and Bovine Serum Albumin. A Thermodynamic Approach. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1996**, *36* (6), 565–601.
- (21) Sawyer, L. β -Lactoglobulin. In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th Edition; McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Eds.; Springer US: Boston, MA, **2013**; pp 211–259.
- (22) Relkin, P.; Mulvihill, D. M. *Unfolding of β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, and Bovine Serum Albumin. A Thermodynamic Approach*; **1996**.
- (23) Iametti, S.; De Gregori, B.; Vecchio, G.; Bonomi, F. Modifications Occur at Different Structural Levels during the Heat Denaturation of β -Lactoglobulin. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *237* (1), 106–112.
- (24) Tolkach, A.; Kulozik, U. Reaction Kinetic Pathway of Reversible and Irreversible Thermal Denaturation of β -Lactoglobulin. *Dairy Sci. Technol.* **2007**, *87* (4–5), 301–315.
- (25) Simons, J. W. F. A.; Kosters, H. A.; Visschers, R. W.; De Jongh, H. H. J. Role of Calcium as Trigger in Thermal β -Lactoglobulin Aggregation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *406* (2), 143–152.
- (26) Verheul, M.; Pedersen, J. S.; Roefs, S. P. F. M.; De Kruif, K. G. Association Behavior of Native β -Lactoglobulin. *Biopolymers* **1999**, *49* (1), 11–20.
- (27) Wang, Q.; Tolkach, A.; Kulozik, U. Quantitative Assessment of Thermal Denaturation of Bovine α -Lactalbumin via Low-Intensity Ultrasound, HPLC, and DSC. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (18), 6501–6506.
- (28) Brew, K. α -Lactalbumin. In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th Edition; McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Eds.; Springer US: Boston, MA, **2013**; pp 261–273.
- (29) Coutinho, P. M.; Deleury, E.; Davies, G. J.; Henrissat, B. An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328* (2), 307–317.
- (30) de Wit, J.; Klarenbeek, G.; Adamse, M. Evaluation of Functional Properties of Whey Protein Concentrates and Whey Protein Isolates.2. Effects of Processing History and Composition. *Netherlands milk dairy J.* **1986**, *40* (1), 41–56.
- (31) Hollmann, O.; Steitz, R.; Czeslik, C. Structure and Dynamics of α -Lactalbumin Adsorbed at a Charged Brush Interface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (10), 1448–1456.
- (32) Kovalska, V.; Kuperman, M.; Losytskyy, M.; Vakarov, S.; Potocki, S.; Yarmoluk, S.; Voloshin, Y.; Varzatskii, O.; Gumienka-Kontecka, E. Induced CD of Iron(II) Clathrochelates: Sensing of the Structural and Conformational Alterations of Serum Albumins. *Metalomics* **2019**, *11* (2), 338–348.
- (33) Paulsson, M.; Dejmek, P. Surface Film Pressure of β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin and Bovine Serum Albumin at the Air/Water Interface Studied by Wilhelmy Plate and Drop Volume. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *150* (2), 394–403.
- (34) Onwulata, C. I.; Huth, P. J. *Whey Processing, Functionality*; **2009**.
- (35) Hurley, W. L.; Theil, P. K. Immunoglobulins in Mammary Secretions. In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th Edition; McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Eds.; Springer US: Boston, MA, **2013**; pp 275–294.
- (36) Braathen, R.; Hohman, V. S.; Brandtzaeg, P.; Johansen, F.-E. Secretory Antibody Formation: Conserved Binding Interactions between J Chain and Polymeric Ig Receptor from Humans and Amphibians. *J. Immunol.* **2007**, *178* (3), 1589–1597.
- (37) Al-Attabi, Z.; D'Arcy, B. R.; Deeth, H. C. Volatile Sulphur Compounds in UHT Milk. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, *49* (1), 28–47.

- (38) Vasbinder, A. J. *Casein - Whey Protein Interactions in Heated Milk*; **2002**.
- (39) Donato, L.; Guyomarc'h, F. Formation and Properties of the Whey Protein/κ-Casein Complexes in Heated Skim Milk - A Review. *Dairy Sci. Technol.* **2009**, *89* (1), 3–29.
- (40) Considine, T.; Patel, H. A.; Anema, S. G.; Singh, H.; Creamer, L. K. Interactions of Milk Proteins during Heat and High Hydrostatic Pressure Treatments - A Review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2007**, *8* (1), 1–23.
- (41) Gulzar, M.; Bouhallab, S.; Jardin, J.; Briard-Bion, V.; Croguennec, T. Structural Consequences of Dry Heating on Alpha-Lactalbumin and Beta-Lactoglobulin at PH 6.5. *Food Res. Int.* **2013**, *51* (2), 899–906.
- (42) Schmid, M.; Krimmel, B.; Grupa, U.; Noller, K. Effects of Thermally Induced Denaturation on Technological-Functional Properties of Whey Protein Isolate-Based Films. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97* (9), 5315–5327.
- (43) Wijayanti, H. B.; Bansal, N.; Deeth, H. C. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13* (6), 1235–1251.
- (44) Rüegg, M.; Moor, U.; Blanc, B. A Calorimetric Study of the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Simulated Milk Ultrafiltrate. *J. Dairy Res.* **1977**, *44* (3), 509–520.
- (45) Baier, S. K.; Decker, E. A.; McClements, D. J. Impact of Glycerol on Thermostability and Heat-Induced Gelation of Bovine Serum Albumin. *Food Hydrocoll.* **2004**, *18* (1), 91–100.
- (46) Oliver, C. M.; Melton, L. D.; Stanley, R. A. Creating Proteins with Novel Functionality via the Maillard Reaction: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, *46* (4), 337–350.
- (47) Kika, K.; Korlos, F.; Kiosseoglou, V. Improvement, by Dry-Heating, of the Emulsion-Stabilizing Properties of a Whey Protein Concentrate Obtained through Carboxymethylcellulose Complexation. *Food Chem.* **2007**, *104* (3), 1153–1159.
- (48) Setiowati, A. D.; Saeedi, S.; Wijaya, W.; Van der Meeren, P. Improved Heat Stability of Whey Protein Isolate Stabilized Emulsions via Dry Heat Treatment of WPI and Low Methoxyl Pectin: Effect of Pectin Concentration, PH, and Ionic Strength. *Food Hydrocoll.* **2017**, *63* (January), 716–726.
- (49) Qi, P. X.; Xiao, Y.; Wickham, E. D. Changes in Physical, Chemical and Functional Properties of Whey Protein Isolate (WPI) and Sugar Beet Pectin (SBP) Conjugates Formed by Controlled Dry-Heating. *Food Hydrocoll.* **2017**, *69*, 86–96.
- (50) de Oliveira, F. C.; Dos Reis Coimbra, J. S.; de Oliveira, E. B.; Rodrigues, M. Q. R. B.; Sabioni, R. C.; de Souza, B. W. S.; Santos, I. J. B. Acacia Gum as Modifier of Thermal Stability, Solubility and Emulsifying Properties of α -Lactalbumin. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *119*, 210–218.
- (51) Foegeding, E. A.; Davis, J. P. Food Protein Functionality: A Comprehensive Approach. *Food Hydrocoll.* **2011**, *25* (8), 1853–1864.
- (52) Guo, M.; Wang, G. *Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications*; **2019**.
- (53) Damodaran, S.; Agyare, K. K. Effect of Microbial Transglutaminase Treatment on Thermal Stability and PH-Solubility of Heat-Shocked Whey Protein Isolate. *Food Hydrocoll.* **2013**, *30* (1), 12–18.
- (54) Jambrak, A. R.; Mason, T. J.; Lelas, V.; Herceg, Z.; Herceg, I. L. Effect of Ultrasound Treatment on Solubility and Foaming Properties of Whey Protein Suspensions. *J. Food Eng.* **2008**, *86* (2), 281–287.
- (55) Chandrapala, J.; Zisu, B.; Palmer, M.; Kentish, S.; Ashokkumar, M. Effects of Ultrasound on the Thermal and Structural Characteristics of Proteins in Reconstituted Whey Protein Concentrate. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, *18* (5), 951–957.

- (56) Shen, X.; Fang, T.; Gao, F.; Guo, M. Effects of Ultrasound Treatment on Physicochemical and Emulsifying Properties of Whey Proteins Pre- and Post-Thermal Aggregation. *Food Hydrocoll.* **2017**, *63*, 668–676.
- (57) Devi, A. F.; Buckow, R.; Hemar, Y.; Kasapis, S. Structuring Dairy Systems through High Pressure Processing. *J. Food Eng.* **2013**, *114* (1), 106–122.
- (58) Harte, F. Food Processing by High-Pressure Homogenization. In *High Pressure Processing of Food: Principles, Technology and Applications*; Balasubramaniam, V. M., Barbosa-Cánovas, G. V., Lelieveld, H. L. M., Eds.; Springer New York: New York, NY, **2016**; pp 123–141.
- (59) Yan, B.; Park, S. H.; Balasubramaniam, V. M. Influence of High Pressure Homogenization with and without Lecithin on Particle Size and Physicochemical Properties of Whey Protein-Based Emulsions. *J. Food Process Eng.* **2017**, *40* (6), e12578.
- (60) Bouaouina, H.; Desrumaux, A.; Loisel, C.; Legrand, J. Functional Properties of Whey Proteins as Affected by Dynamic High-Pressure Treatment. *Int. Dairy J.* **2006**, *16* (4), 275–284.
- (61) Ding, Y.; Kan, J. Optimization and Characterization of High Pressure Homogenization Produced Chemically Modified Starch Nanoparticles. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54* (13), 4501–4509.
- (62) Iordache, M.; Jelen, P. High Pressure Microfluidization Treatment of Heat Denatured Whey Proteins for Improved Functionality. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2003**, *4* (4), 367–376.
- (63) Koo, C. K. W.; Chung, C.; Ogren, T.; Mutilangi, W.; McClements, D. J. Extending Protein Functionality: Microfluidization of Heat Denatured Whey Protein Fibrils. *J. Food Eng.* **2018**, *223*, 189–196.
- (64) Bucci, A. J.; Van Hekken, D. L.; Tunick, M. H.; Renye, J. A.; Tomasula, P. M. The Effects of Microfluidization on the Physical, Microbial, Chemical, and Coagulation Properties of Milk. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101* (8), 6990–7001.
- (65) Graham, D. E.; Phillips, M. C. Proteins at Liquid Interfaces. I. Kinetics of Adsorption and Surface Denaturation. *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, *70* (3), 403–414.
- (66) Graham, D. E.; Phillips, M. C. Proteins at Liquid Interfaces. II. Adsorption Isotherms. *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, *70* (3), 415–426.
- (67) Miller, R.; Fainerman, V. B.; Wüstneck, R.; Krägel, J.; Trukhin, D. V. Characterisation of the Initial Period of Protein Adsorption by Dynamic Surface Tension Measurements Using Different Drop Techniques. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1998**, *131* (1–3), 225–230.
- (68) Miller, R.; Fainerman, V. B.; Makievski, A. V.; Krägel, J.; Grigoriev, D. O.; Kazakov, V. N.; Sinyachenko, O. V. Dynamics of Protein and Mixed Protein/Surfactant Adsorption Layers at the Water/Fluid Interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2000**, *86* (1), 39–82.
- (69) Joos, P.; Rillaerts, E. Theory on the Determination of the Dynamic Surface Tension with the Drop Volume and Maximum Bubble Pressure Methods. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *79* (1), 96–100.
- (70) He, J. S.; Ruan, K. Kinetics of Phase Separation during Pressure-Induced Gelation of a Whey Protein Isolate. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23* (7), 1729–1733.
- (71) Dukhin, S. S.; Kretzschmar, G.; Miller, R. Dynamics of Adsorption at Liquid Interfaces - Theory, Experiment, Application. *Elsevier Sci. B. V.* **1995**, *1*, 600.
- (72) Rouimi, S.; Schorsch, C.; Valentini, C.; Vaslin, S. Foam Stability and Interfacial Properties of Milk Protein-Surfactant Systems. *Food Hydrocoll.* **2005**, *19* (3), 467–478.

- (73) Razafindralambo, H.; Blecker, C.; Delhaye, S.; Paquot, M. Application of the Quasi-Static Mode of the Drop Volume Technique to the Determination of Fundamental Surfactant Properties. *Journal of Colloid And Interface Science*. **1995**, pp 373–377.
- (74) Maubois, J. L.; Lorient, D. Dairy Proteins and Soy Proteins in Infant Foods Nitrogen-to-Protein Conversion Factors. *Dairy Science and Technology*. **2016**, pp 15–25.
- (75) Beveridge, T.; Toma, S. J.; Nakai, S. Determination of SH- and SS- groups in some food proteins using Ellman's reagent. *J. Food Sci.* **1974**, *39* (1), 49–51.
- (76) Ambrosi, V.; Polenta, G.; Gonzalez, C.; Ferrari, G.; Maresca, P. High Hydrostatic Pressure Assisted Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2016**, *38*, 294–301.
- (77) Yuksel, Z.; Avci, E.; Uymaz, B.; Erdem, Y. K. General Composition and Protein Surface Hydrophobicity of Goat, Sheep and Cow Milk in the Region of Mount Ida. *Small Rumin. Res.* **2012**, *106* (2–3), 137–144.
- (78) Tonyali, B.; Cikrikci, S.; Oztop, M. H. Physicochemical and Microstructural Characterization of Gum Tragacanth Added Whey Protein Based Films. *Food Res. Int.* **2018**, *105*, 1–9.
- (79) Cheng J, Ren W, Wang S, Zhang Z, Zhao W, C. F. Effect of Physical Treatments on Soluble Protein of Highly Denatured Defatted Soy Flakes. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, No. 45, 1253–1260.
- (80) Surroca, Y.; Haverkamp, J.; Heck, A. J. R. Towards the Understanding of Molecular Mechanisms in the Early Stages of Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin AB. *J. Chromatogr. A* **2002**, *970* (1–2), 275–285.
- (81) Creamer, L. K.; Bienvenue, A.; Nilsson, H.; Paulsson, M.; van Wanroij, M.; Lowe, E. K.; Anema, S. G.; Boland, M. J.; Jiménez-Flores, R. Heat-Induced Redistribution of Disulfide Bonds in Milk Proteins. 1. Bovine Beta-Lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (25), 7660–7668.
- (82) Sen, M.; Kopper, R.; Pons, L.; Abraham, E. C.; Burks, A. W.; Bannon, G. A. Protein Structure Plays a Critical Role in Peanut Allergen Stability and May Determine Immunodominant IgE-Binding Epitopes. *J. Immunol.* **2002**, *169* (2), 882–887.
- (83) Riebroy, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Erikson, U.; Rustad, T. Acid-Induced Gelation of Natural Actomyosin from Atlantic Cod (*Gadus Morhua*) and Burbot (*Lota Lota*). *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 26–39.
- (84) Shrestha, L. K.; Matsumoto, Y.; Ihara, K.; Aramaki, K. Dynamic Surface Tension and Surface Dilatational Elasticity Properties of Mixed Surfactant/Protein Systems. **2008**, *494* (9), 485–494.
- (85) Wierenga, P. A. *Basics of Macroscopic Properties of Adsorbed Protein Layers Formed at Air-Water Interfaces Based on Molecular Parameters*; **2005**.

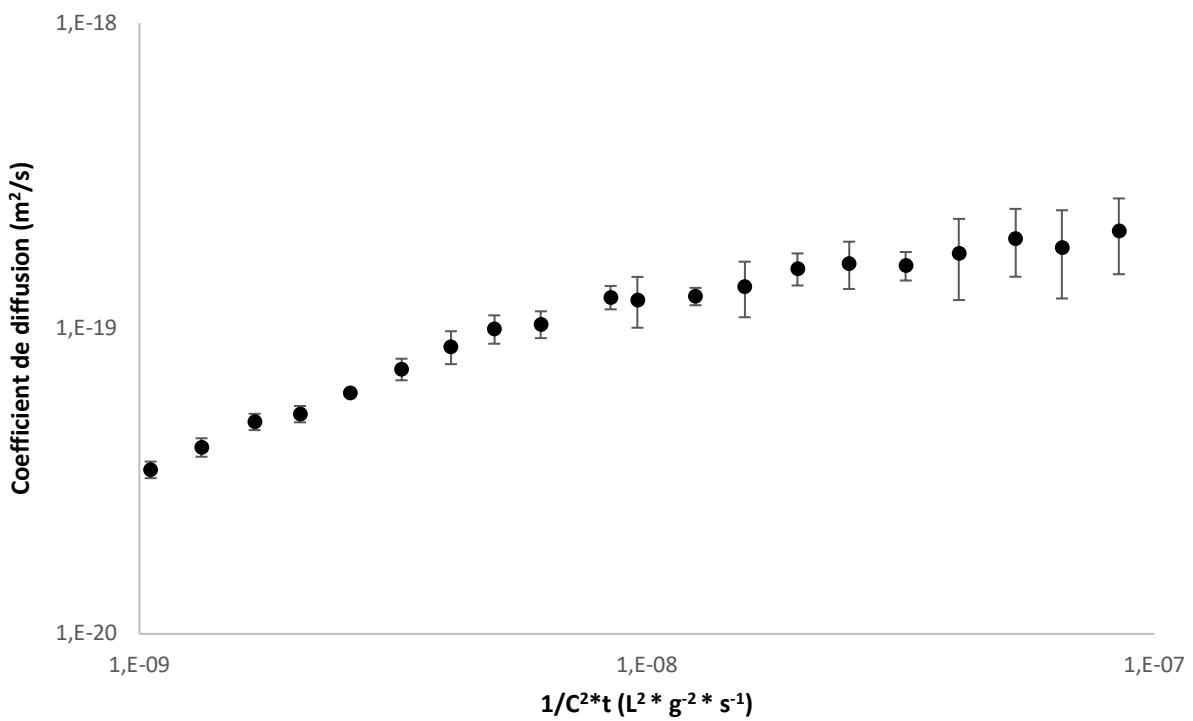
8. Annexes



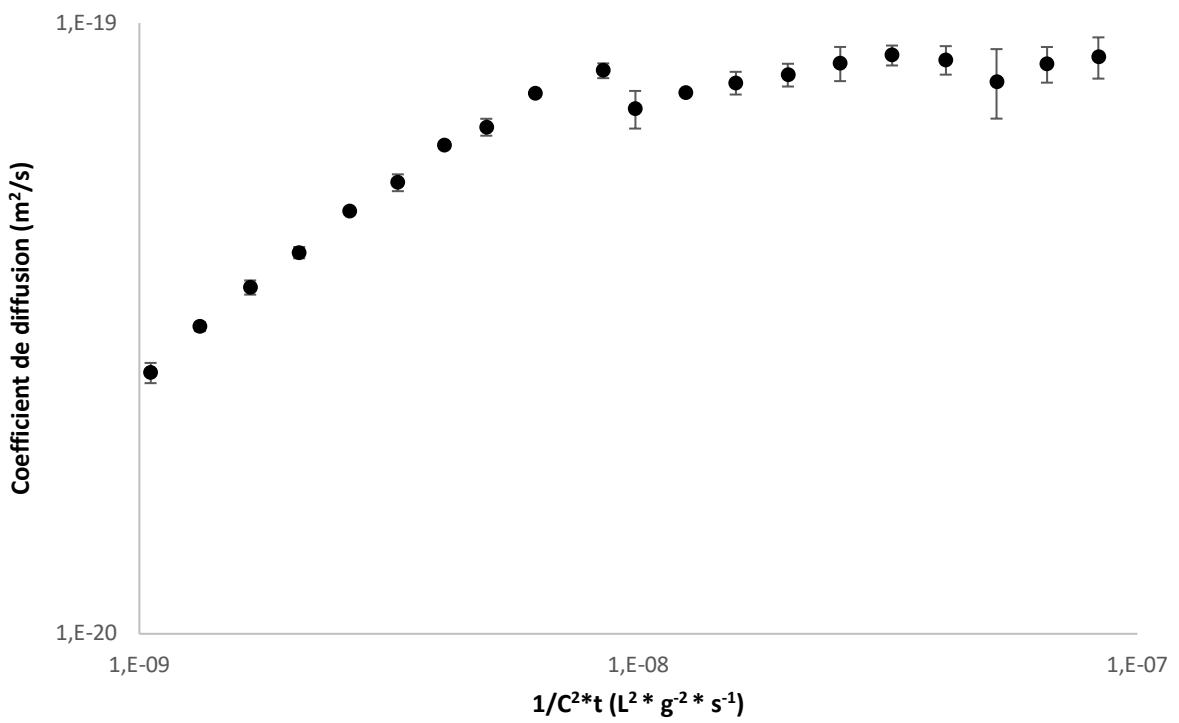
Annexe 1: Flux de chaleur (W/g) en fonction de la température (°c) obtenu par DSC pour deux répétitions d'une solution de 1000M-10-L hydratées 1 heure.

	WP-1-L	1000M-1-L	1375-1-L	1375M-1-L
Liaison SS (μmol/g)	5,07	4,42	4,17	4,21
Écart-type SS (μmol/g)	0,03	0,07	0,42	0,15
CV (%)	0,69	1,57	10,01	3,47
Liaison SH libre (μmol/g)	5,71	6,57	6,72	7,08
Écart-type SH libre (μmol/g)	0,04	0,07	0,03	0,04
CV (%)	0,65	1,07	0,42	0,53

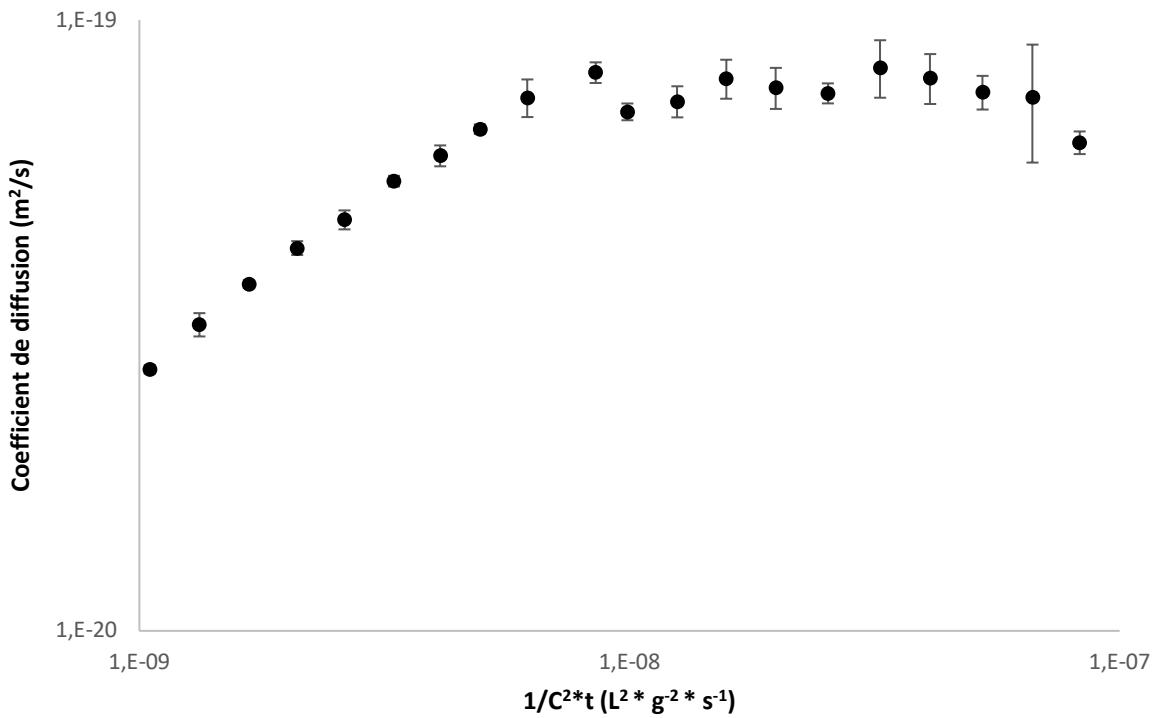
Annexe 2: Quantification des ponts disulfures -S-S- (μmol/g) et des liaisons sulphydryles libres -S-H (μmol/g)



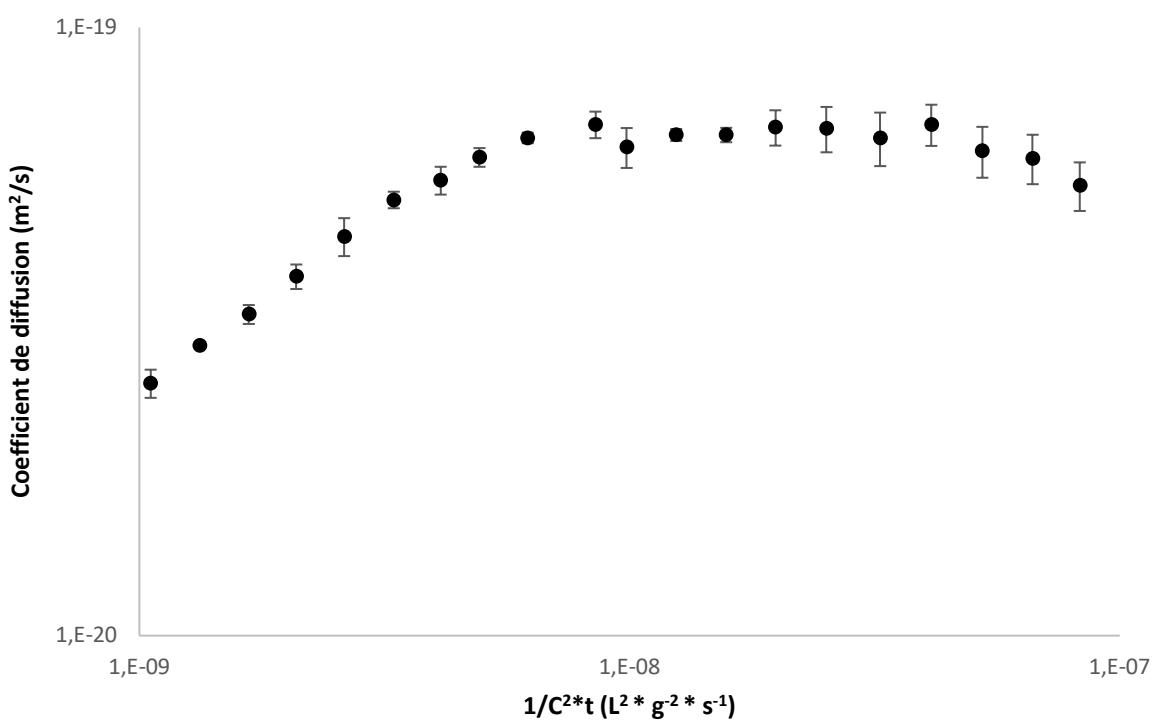
*Annexe 3 : Modèle de Joos & Rillaerts - Évolution du coefficient de diffusion (m^2/s) en fonction du terme $1/c^2*t$ ($L^2 * g^{-2} * s^{-1}$) pour l'échantillon WP-1-L*



*Annexe 4: Modèle de Joos & Rillaerts - Évolution du coefficient de diffusion (m^2/s) en fonction du terme $1/c^2*t$ ($L^2 * g^{-2} * s^{-1}$) pour l'échantillon 1375-1-L*



*Annexe 5: Modèle de Joos & Rillaerts - Évolution du coefficient de diffusion (m^2/s) en fonction du terme $1/c^2*t$ ($L^2 * g^2 * s^{-1}$) pour l'échantillon 1000-I-L*



*Annexe 6: Modèle de Joos & Rillaerts - Évolution du coefficient de diffusion (m^2/s) en fonction du terme $1/c^2*t$ ($L^2 * g^2 * s^{-1}$) pour l'échantillon 1375M-I-L*