



IMPACT DES PROCEDES THERMOMECHANIQUES SUR LA FORMATION D'AGREGATS PROTEIQUES : APPLICATION AUX EMULSIONS ET AUX MOUSSES♦

Radhouane Maargueb¹, Najet Mahmoudi², Anne Desrumaux¹,
Catherine Loisel¹, Alain Riaublanc², Monique Axelos²

¹GEPEA UMR CNRS 6144, ENITIAA, Rue de la Géraudière, BP 82225,
44322 Nantes Cedex 03, France

²URBIA, INRA, rue de la Géraudière BP 71627, Nantes Cedex 03, France.

*Correspondance: desrumau@enitiaa-nantes.fr

Abstract: In order to modify their state of aggregation, the seric protein solutions (pH = 7) at different concentrations (3, 5 and 15 g/L) and different ionic forces (3 and 100 mM) have been treated in an APV plate heat exchanger at 80, 100 and 120 °C, after that in a high pressure homogenizer at 1000, 2000 and 3000 bars. The dimensional range of the obtained aggregates has been characterized through laser granulometry and light dynamic diffusion. In order to establish the modification of functional properties of the seric protein solutions, emulsions and foams have been prepared starting from these solutions treated as mentioned before. The results showed that the thermomechanical treatments that have been used allowed the formation of aggregates whose dimensions were more important than the increase in the ionic strength of the solution. The properties of the emulsions obtained with treated protein solutions are similar, whatever the starting concentration or type of applied treatment was. The treated protein solutions exhibited an improved foaming capacity.

Keywords: *seric proteins, aggregation, thermomechanical treatment, emulsion, foams.*

♦ Paper presented at **COFrRoCA 2006: Quatrième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée**, 28 June – 2 July, Clermont-Ferrand, France

INTRODUCTION

Les protéines du lactosérum, ou protéines solubles du lait, sont très utilisées pour leur propriétés fonctionnelles et nutritionnelles dans l'industrie agroalimentaire (desserts, charcuteries, sauces...). Elles sont constituées majoritairement de β -lactoglobuline (β -lg), d' α -lactalbumine et de sérum albumine bovine (BSA). Il a été démontré par différents travaux que les propriétés fonctionnelles de ces protéines (émulsifiantes, foisonnantes, gélifiantes) du lactosérum étaient majoritairement gouvernées par le comportement de la β -lactoglobuline.

Sous l'effet de la chaleur, la β -lactoglobuline initialement sous forme de dimère se dissocie en monomère, exposant ainsi ses groupes thiols et ses sites hydrophobes, ce qui permet des échanges S-H et S-S [1]. Cette dénaturation conduit généralement à un phénomène d'agrégation voire de gélification si la concentration en protéine est suffisante.

Des études récentes [2, 3] ont montré que l'état d'agrégation de la β -lactoglobuline était donc fonction de sa concentration, du pH, de la force ionique de la solution, de la cinétique de chauffage, et du temps de séjour à haute température. Ces études portent sur l'agrégation des protéines sériques en conditions « statiques » (tubes à essais) [2, 3], c'est à dire loin des conditions de traitements thermomécaniques rencontrées dans les systèmes industriels. Or, l'action combinée de traitements thermiques et mécaniques permettrait également d'améliorer certaines propriétés fonctionnelles [4].

Le but de ce travail est donc d'étudier l'impact de traitements thermomécaniques (échangeur à plaque et homogénéisateur très hautes pressions) sur la formations d'agrégats dans des solutions de β -lactoglobuline, et ceci afin d'améliorer les propriétés fonctionnelles (émulsifiantes et moussantes) de ces solutions.

MATERIEL ET METHODES

Préparation et traitement des solutions aqueuses de protéines sériques

Les solutions protéiques (3g/L à 100 mM, 5g/L à 100 mM et 15g/L à 3 mM) sont obtenues par dissolution de la poudre du lactosérum Prolacta 90 (LACTALIS, France) dans de l'eau déminéralisée à 40 °C sous agitation mécanique à l'aide d'une pale défloculeuse (1500 rpm) pendant 2 heures. Le pH des solutions est ramené par la suite à pH = 7 grâce à l'ajout de NaOH. Afin de garantir une hydratation complète des protéines, les solutions sont placées pendant une nuit à 4 °C avant utilisation.

Les solutions ainsi préparées sont ensuite traitées soit :

- dans un échangeur à plaques (APV), équipé de 19 plaques de chauffage, d'une section chambrage (volume de $5,6 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3$), puis d'une section refroidissement de 19 plaques. 3 températures ont été testées : 80, 100 et 120 °C ; ainsi que 7 débits, et ceci afin de faire varier le temps de séjour dans l'échangeur. La section de refroidissement, fonctionnant avec de l'eau à 5 °C, a permis un refroidissement très rapide des solutions. L'échangeur est équipé de sondes de température, de pression et de sondes de conductimétrie, permettant ainsi d'évaluer le temps de séjour moyen.

- dans un homogénéisateur très hautes pressions STANSTED, équipé d'une valve en céramique, et pouvant monter jusqu'à 3500 bars. La combinaison des effets d'élongation, de cisaillement, de turbulence et de cavitation provoquent un traitement mécanique intense sur un temps de séjour très court estimé à 10^{-3} s [5]. Malgré un refroidissement de la valve par un système de double enveloppe, on observe une brusque montée en température du produit de 20 °C/100 MPa. A la sortie de l'homogénéisateur, les produits ont été placés dans de la glace afin d'assurer un refroidissement rapide.

Caractérisation des solutions protéiques

La poudre initiale est composée de 94 % de protéines, 4 % d'eau, 0,5 % de lactose ainsi que de 3 mg/g de calcium (dosé par spectroscopie d'absorption atomique de flamme), le calcium présent étant lié à l' α -lactalbumine.

Par chromatographie de filtration sur gel nous avons obtenu concernant la composition protéique 70 % de β -lactoglobuline, 20 % de α -lactalbumine et 6 % de Bovine serum albumine, ainsi que des traces d'immunoglobulines et de quelques agrégats initiaux causés par l'atomisation de la poudre.

Caractérisation des agrégats protéiques

Granulométrie laser statique

Des mesures granulométriques ont été réalisées sur les solutions traitées (trois répétitions) par un granulomètre laser Mastersizer S (Malvern Instrument), équipé d'une lentille de Fourier inverse (300RF). Les échantillons ont été placés à 20 °C puis dilués au 1/1000^{ème} pour réaliser cette mesure. Les indices de réfraction de nos milieux sont de 1,33 pour l'eau et 1,54 pour les agrégats protéiques. Grâce à l'utilisation de la théorie de Mie, on accède à la distribution granulométrique de la suspension. L'exploitation des distributions granulométriques permet d'obtenir le diamètre de Sauter (diamètre de la sphère ayant la même surface), d_{32} , ainsi la largeur de la distribution granulométrique notée « span » $= [d_v(0.9) - d_v(0.1)] / d_v(0.5)$.

Diffusion dynamique de la lumière (DDL)

La granulométrie laser ne permettant pas de caractériser la taille des plus petites populations d'agrégats formés. Nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière pour y parvenir. L'ensemble des échantillons a été caractérisé avec un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) à 20 °C.

Caractérisation des propriétés émulsifiantes et foisonnantes des solutions

Mesure des tensions superficielles

Les mesures de tensions superficielles des solutions protéiques ont été réalisées en utilisant un tensiomètre Krüss K12 (Palaiseau, France), équipé d'une plaque de Wilhelmy, après dilution de toutes les solutions à 3g/L. Les mesures ont été réalisées à 20 °C et dupliquées. Elles ont été réalisées sur 7200 s (apparition d'une tension superficielle d'équilibre).

Evaluation de la capacité émulsifiante

Nous avons réalisé des émulsions huile dans eau (20 % vol, huile de tournesol) en utilisant les solutions de protéines traitées. Les concentrations des solutions ont toutes été préalablement ramenées à 3 g/L. Ces émulsions ont été d'abord réalisées à l'aide d'un disperseur rotor/stator ultraturrax (20000 rpm pendant 5 min) puis ont été traitées par homogénéisation hautes pressions à 500 bars.

Les émulsions avant et après passage dans l'homogénéisateur hautes pressions ont été caractérisées par granulométrie laser après addition d'une solution de SDS. La distribution granulométrique obtenue par granulométrie laser, nous a permis d'en déduire le d_{32} et la largeur de la distribution granulométrique de l'émulsion.

Afin d'évaluer la stabilité des émulsions fabriquées par dispersion rotor/stator et après homogénéisation hautes pressions, les émulsions sont centrifugées à 10000 g pendant 20 minutes. L'huile relarguée a été séparée et pesée.

Evaluation de la capacité foisonnante

Les solutions protéiques, ramenées à 3 g/L traitées ont été foisonnées à l'aide d'un batteur électrique (type Kitchen Aid); le battage est effectué à vitesse maximale pendant 5 min à température ambiante. La capacité foisonnante a été évaluée par mesure des masses volumiques des mousses obtenues.

RESULTATS ET DISCUSSION**Distributions granulométriques des agrégats protéiques obtenus sur échangeur APV et à très hautes pressions dynamiques**

Les mesures réalisées par granulométrie laser (figure 1) et DDL confirment la présence d'agrégats protéiques, avec des distributions monomodales. Les figures 2 et 3 indiquent la taille des agrégats exprimée respectivement en diamètre de Sauter (d_{32}) et rayon hydrodynamique (R_h). Conformément à de précédentes études [2], les solutions réalisées avec les forces ioniques les plus élevées donnent des agrégats de taille plus importante (R_h autour de 200 nm, figures 2 et 3). En effet [2] et [3] ont montré qu'en chauffant en absence de cisaillement (tubes à essais), à pH = 7 et à basse force ionique de petits agrégats de forme allongée se formaient alors qu'à forte force ionique des agrégats fractals de taille plus importante étaient créés.

On peut également remarquer, si on compare les solutions à 3 g/L 100 mM et 15 g/L 3 mM (figure 3) à la même température, que les agrégats obtenus à 3 g/L 100 mM sont nettement plus volumineux ; il semble que l'effet force ionique prime sur l'effet concentration.

Les solutions traitées à 80 °C ne présentent pas d'agrégats suffisamment gros pour pouvoir être décelés par granulométrie laser (diamètre inférieur à 50 nm).

Les temps de séjours dans l'échangeur à plaque ont été calculés par suivi de la conductimétrie et par la méthode des tangentes. Nous n'avons pas observé d'effet significatif du temps de séjour sur la taille des agrégats formés (figures 2 et 3), de même que l'on observe pas d'effet de la température de traitement. On a donc un effet « tout ou rien » vraisemblablement lié à la forte énergie d'activation de l'agrégation (300 à 400 kJ/mol d'après [2]).

Concernant les essais réalisés par traitement à très hautes pressions dynamiques, les populations d'agrégats obtenues sont très petites ($R_h < 200$ nm) et multimodales.

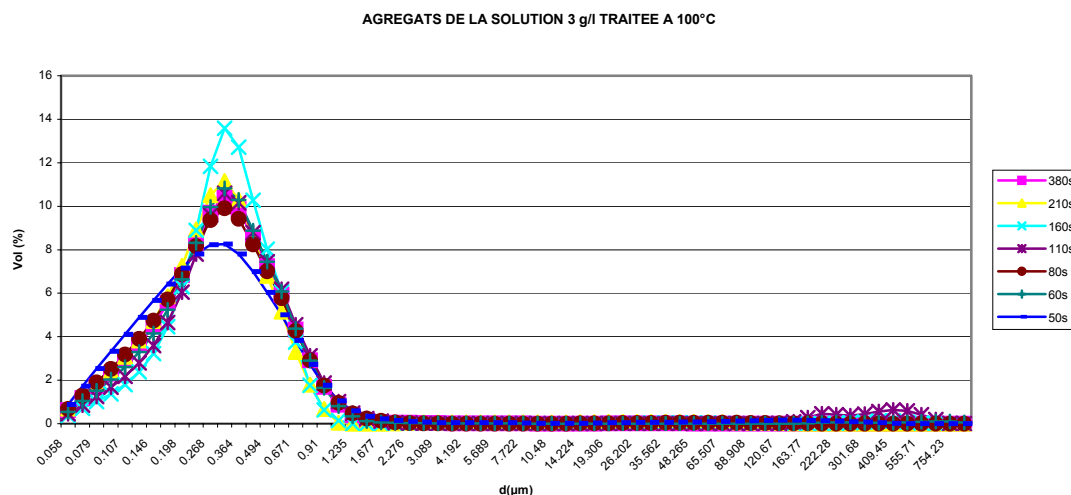


Figure 1. Distribution granulométrique de la solution 3 g/L, 100 °C, 100 mM, traitée dans l'échangeur à plaques pour différents temps de séjour. Mesures réalisées au granulomètre laser

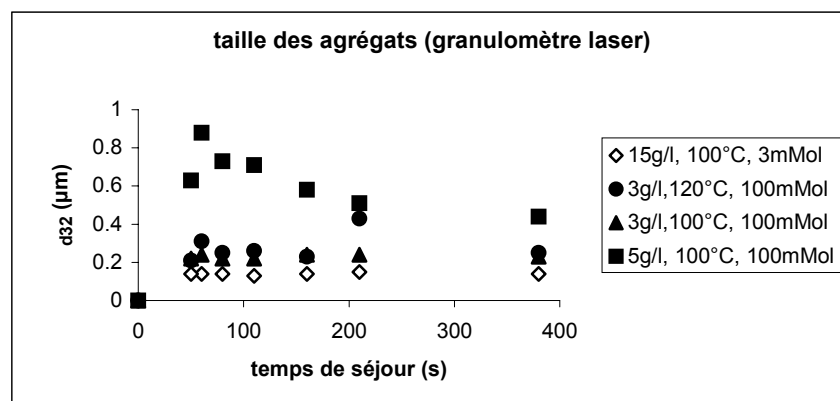


Figure 2. Taille des agrégats mesurée par granulométrie laser, en fonction du temps de séjour dans l'échangeur à plaque APV

Capacité émulsifiantes et moussantes des solutions traitées

Les mesures réalisées sur le tensiomètre à lame ne permettent pas de dégager d'effet significatif des températures et des temps de séjour, ni des forces ioniques et des concentrations de départ sur les valeurs de tensions superficielles à l'équilibre (toutes les valeurs se situent dans la gamme 45-48 dyn/cm).

Concernant les propriétés émulsifiantes des solutions, les mesures réalisées au granulomètre laser avec et sans SDS, montrent que les émulsions obtenues à partir des solutions traitées thermiquement sont moins floculées. De manière intéressante et contrairement à ce qui est observé sur les essais obtenus par chauffage statique (tube à essai), les solutions contenant les plus gros agrégats (solutions à 100 mM) forment des

émulsions de granulométrie très proche de celles à 3 mM (figure 4), voire légèrement inférieure. Pour expliquer les différences de comportement des agrégats obtenus en tube à essai et ceux obtenus par échangeur à plaque, on peut supposer qu'il y a un effet du traitement mécanique (cisaillement en sortie de l'échangeur estimé à 10^4 - 10^5 s⁻¹ au niveau de la vanne de contre-pression).

Les résultats montrent que les émulsions obtenues sont légèrement plus fines que celles réalisées avec la solution non traitée par l'échangeur à plaque (6,1 µm pour 5 g/L, 100 mmol, et 4,5 pour 5 g/L, 100 mmol et 100 °C.

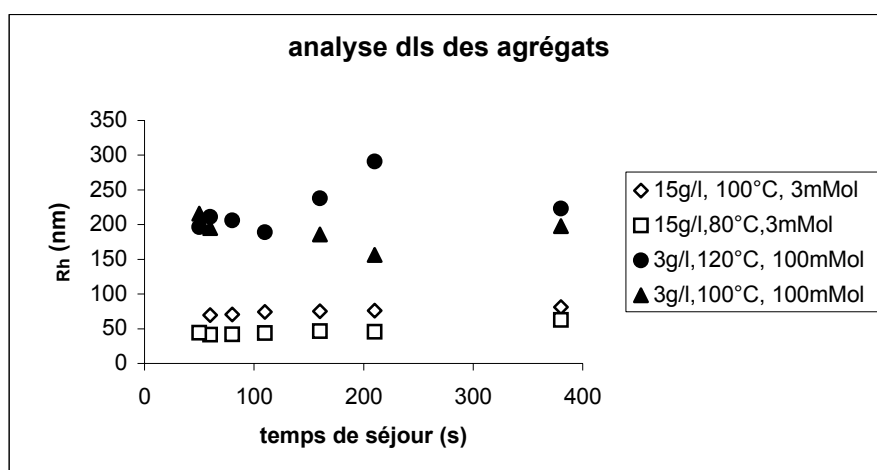


Figure 3. Rayon hydrodynamique (R_h) des agrégats mesurée par DDL, en fonction du temps de séjour dans l'échangeur à plaque APV

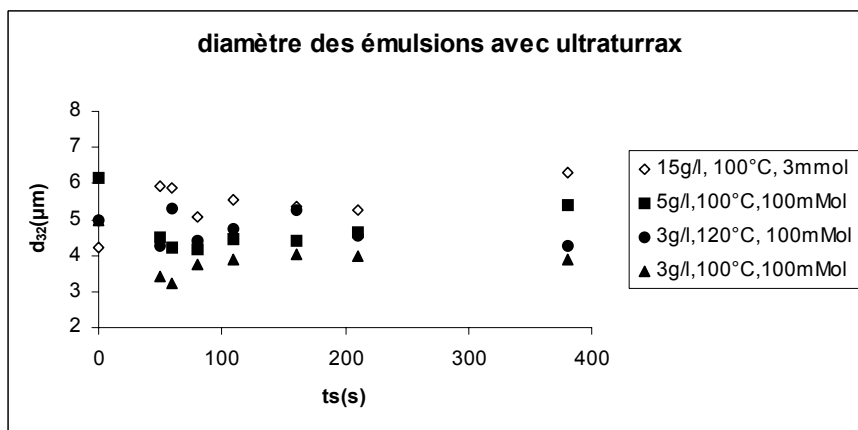


Figure 4. Taille des gouttelettes d'émulsion obtenues après émulsification par rotor/stator. Résultats obtenus par granulométrie laser après dilution dans une solution de SDS, et exprimés en fonction du temps de séjour dans l'échangeur à plaques APV.

Afin de quantifier la stabilité des émulsions, les émulsions sont centrifugées à 10000 rot/min pendant 20 minutes. L'huile relarguée a été séparée et pesée. Aucune différence significative n'a été observée sur les émulsions.

Les émulsions ainsi préparées par rotor/stator ont été traitées par homogénéisation hautes pressions à 500 bars. Les émulsions ainsi obtenues sont très fines, et le traitement

par échangeur à plaque n'a pas d'effet positif, la taille des gouttelettes d'émulsions obtenues étant vraisemblablement trop proche de la taille des agrégats formés (soit environ 1 μm pour des agrégats de 0,2 μm) ce qui ne permettrait pas une adsorption correcte des agrégats autour des gouttelettes de l'émulsion.

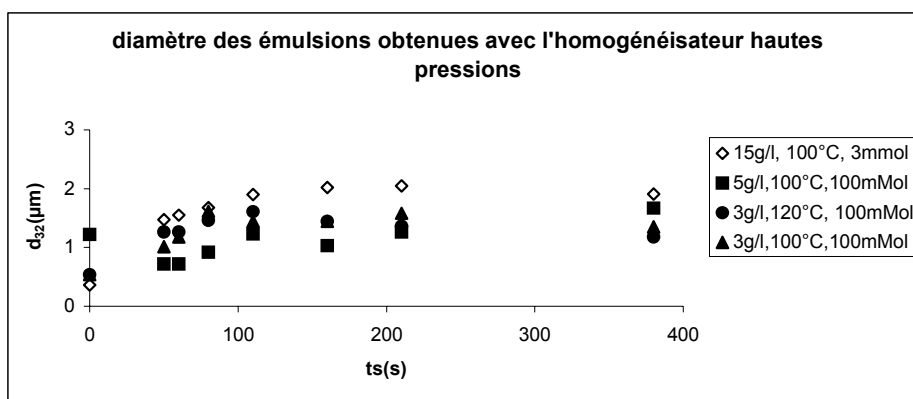


Figure 5. Taille des gouttelettes d'émulsion obtenues après émulsification par homogénéisation hautes pressions. Résultats obtenus par granulométrie laser après dilution dans une solution de SDS, et exprimés en fonction du temps de séjour dans l'échangeur à plaque

Les résultats les plus intéressants concernent l'aptitude au foisonnement des mousses obtenues avec les solutions protéiques traitées sur l'échangeur à plaques. On observe en effet une nette amélioration du pouvoir moussant des solutions (figure 6), qui se traduit par une diminution de la masse volumique donc une expansion plus grande de la mousse, avec là encore un effet « tout ou rien ».

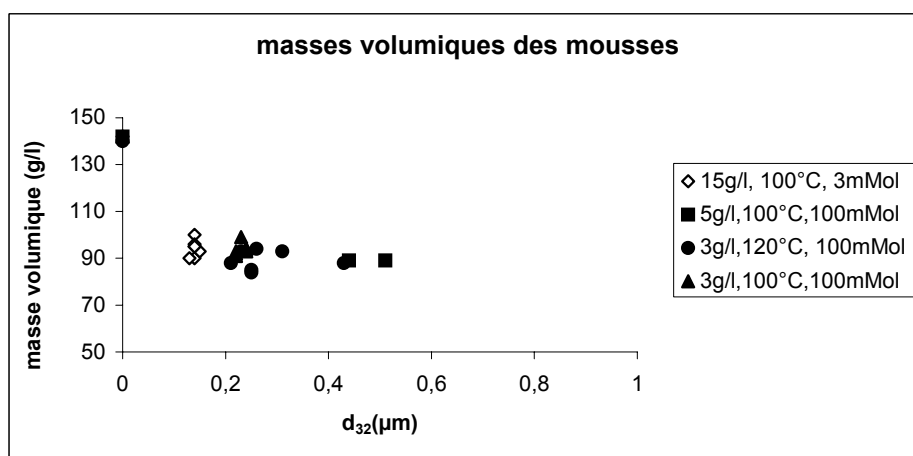


Figure 6. Masses volumiques des mousses (moyennes sur 3 essais) obtenues à partir des solutions traitées en fonction du d_{32} des agrégats (mesure par granulométrie laser, pour un temps de séjour de 200 s).

Le même type de résultat a été obtenu pour les solutions protéiques traitées par homogénéisation à très hautes pressions : masse volumique de 90, 92 et 93 g/L, respectivement pour 1000, 2000 et 3000 bars. Ces masses volumiques sont comparables

à celles des mousses provenant de solutions traitées sur l'échangeur APV. Ces essais doivent être complétés par une analyse structurale des mousses obtenues.

CONCLUSIONS

Cette étude a permis de montrer que les traitements thermomécaniques (échangeur à plaques et homogénéisateur hautes pressions) permettait de provoquer la formation d'agrégats dans la solution de protéines sériques. Les tailles d'agrégats formés dépendent principalement de la force ionique de la solution et ne semble pas corrélées au temps de séjour appliqué dans le cas de l'échangeur à plaques. De manière intéressante, et contrairement aux essais de traitement thermiques réalisés en tubes à essai, alors que les tailles d'agrégats obtenus sont très différents pour les deux forces ioniques testées et entre l'échangeur à plaque et l'homogénéisateur très hautes pressions, les émulsions obtenues à partir de ces solutions ne présentent pas de différences significatives au niveau de leur granulométrie et de leur stabilité. Les mousses obtenues avec les protéines traitées présentent en revanche des masses volumiques plus faibles ce qui est en accord avec les résultats de [4] pour l'homogénéisation hautes pressions. Cette étude doit être maintenant complétée par des mesures de rhéologie interfaciale, ainsi que par une caractérisation plus fine de la structure de ces agrégats.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kazmierki, M., Corredig, M.: Characterization of soluble aggregates from whey proteins isolate, *Food Hydrocolloids*, **2003**, 17, pp 685-692
2. Durand, D., Gimel, J.C, Nicolai, T.: Aggregation, gelation and phase separation of heat denaturated globular proteins. *Physica A*, **2002**, **304**, pp253-265.
3. Baussay, K., Le Bon, C., Nicolai, T., Durand, D., Busnel, J.P.: Influence of the ionic strength on thr heat induced aggregation of the globular protein β -lactoglobulin at pH 7, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2004**, 34, pp 21-28.
4. Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., Legrand, J.: Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high pressure treatment, *International Dairy Journal*, **2006**, 16(4), pp 275-284.
5. Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., Desrumaux, A.: Analysis of a New Type of High Pressure Homogeniser. A. Study of the Flow Pattern, *Chemical Engineering Science*, **2004**, 59(4), pp 843-853.