Influence de l'activité de l'eau sur les interactions lactose / [bêta]-lactoglobuline de poudres laitières modèles lyophilisées

Marie Thomas

▶ **To cite this version:**

Marie Thomas. Influence de l'activité de l'eau sur les interactions lactose / [bêta]-lactoglobuline de poudres laitières modèles lyophilisées. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2004. Français. NNT : 2004INPL065N . tel-01749756

HAL Id: tel-01749756
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749756

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Laboratoire de Physico-chimie et Génie Alimentaires

THESE

Présentée devant l'Institut National Polytechnique de Lorraine
Pour obtenir le grade de

Docteur de l'INPL

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

par

Marie E. C. THOMAS

INFLUENCE DE L'ACTIVITE DE L'EAU SUR LES INTERACTIONS LACTOSE / β-LACTOGLOBULINE DE POUDRES LAITIERES MODELES LYOPHILISEES

Soutenue publiquement, le 7 octobre 2004, devant la commission d'examen

Jury

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Président du jury :

M. Frédéric VILLIERAS	Directeur de recherche, HDR. CNRS-INPL-ENSG

Rapporteurs :

Mme Nathalie CAYOT	Maître de conférences, HDR. ENESAD-Dijon
M. Saïd BOUHALLAB	Chargé de recherche, HDR. INRA-Rennes

Examinateurs :

M. Stéphane DESOBRY	Professeur INPL-ENSAIA (directeur de thèse)
M. Joël SCHER	Maître de conférences, HDR. INPL-ENSAIA (co-directeur de thèse)
M. Gilles VUATAZ	conseiller scientifique, centre de recherche NESTLE, Lausanne

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire de Physico-chimie et Génie Alimentaires de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires. Je tiens à remercier M. HARDY pour m'avoir permis d'effectuer ce travail de doctorat au sein de ce laboratoire.

Cette thèse a été encadrée par Stéphane DESOBRY et Joël SCHER, respectivement professeur et maître de conférences à l'ENSAIA. Je tiens à les remercier pour la confiance qu'ils m'ont accordée pendant ces trois années, pour leurs encouragements lors des difficultés que j'ai pu rencontrer et, plus généralement, pour leur dynamisme et leur enthousiasme.

Je remercie M. BOUHALLAB, chargé de recherche à l'INRA de Rennes, et Mme CAYOT, maître de conférences à l'ENESAD à Dijon d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également M. VILLIERAS, directeur de recherche à l'ENSG et M. VUATAZ, conseiller scientifique chez Nestlé, d'avoir également accepté de prendre part à ce jury.

Merci à Marie-Noëlle MAUCOURT pour avoir repoussé les limites de ce qu'il était possible de faire en matière de gestion de pannes d'appareils et de problèmes de commandes qui n'arrivent pas ; merci aussi pour son soutien moral et ses fameuses « anecdotes » ! Un grand merci aussi à Carole JEANDEL pour son aide technique, sa disponibilité et sa gentillesse.
Merci à Angèle COLAS pour sa sympathie et son aide efficace à la résolution des problèmes financiers, logistiques, administratifs…
Merci à Josiane VILLEMIN pour avoir si bien chouchouté les doctorants et les stagiaires…

Merci à tous les membres permanents du laboratoire pour leurs conseils avisés, que ce soit au sujet d'une question scientifique ou d'une personne à contacter. Un merci particulier à Christian SANCHEZ pour m'avoir apporté un peu de sa rigueur scientifique, qui m'a été précieuse notamment pour l'analyse des spectres infrarouges.

Merci à tous les « jeunes » du laboratoire qui m'ont aidé à relativiser ; je pense tout particulièrement à Benji, Ghozlène, Valérie, Olivier, Muriel, Claire, Sandrine, Reine, Excellent et le sage Michel ; mais aussi à tous les autres chercheurs et stagiaires (et il y en a

eu beaucoup !) qui ont contribué de près ou de loin à rendre l'ambiance de ce travail conviviale.

Mes sincères remerciements s'adressent aussi à tous les techniciens et chercheurs d'autres laboratoires, sans qui ce travail n'aurait pu aboutir :
Mme Odile BARRES, du laboratoire environnement et Minéralurgie, que je remercie pour ses compétences en spectroscopie infrarouge, pour sa disponibilité et son soutien ;
M. VILLASI, M. KOHLER et M. EMERAUX du laboratoire de chimie du solide minéral de l'université Nancy 1 pour leur aide concernant les techniques de microscopie à balayage et de diffraction des rayons X ;
Mme MARCHAL, du laboratoire LABIAL de l'ENSAIA, pour m'avoir permis d'utiliser leur lyophilisateur et en avoir assuré la maintenance.

Merci à tous les profs de sport et de danse du SIUAP qui m'ont permis de relier « le corps et la tête », car c'est important (n'est ce pas Reine ?).

Enfin, et bien sûr, merci à mes « supporteurs » personnels, en particulier Simon, mes parents, mes frères, mes ami(e)s.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

Unités et symboles :

δ : vibration de déformation (en infrarouge)
ΔCp: changement de chaleur spécifique
λ : longueur d'onde (en nm ou Å)
ν : vibration d'élongation (en infrarouge)
τ : temps de relaxation
°C : degré Celsius
2θ : angle de diffraction des rayons X
Å : angström ($=10^{-10}$m)
a_w : activité de l'eau
cf : confère
cm^{-1} : unité de nombre d'onde (en infrarouge)
d(4,3) : diamètre moyen des particules, exprimé en volume
$d_{h,k,l}$: distance entre 2 plans réticulaires d'indices h, k et l.
Da : dalton (équivalent au g/mol)
h : heures
HR : humidité relative
j : jours
K: Kelvin
Kcal : kilocalorie
m.s. : matière sèche
M: mol/l
min : minutes
ml : millilitre
Nd : non déterminé
PM : poids moléculaire
p/p : rapport poids : poids
p/v: rapport poids: volume
P: pression relative
pH : potentiel hydrogène
Tc : température de cristallisation
Tcong : température de congélation de l'eau
Tf : température de fusion
Tg : température de transition vitreuse
Ts : température de solubilité du lactose
v/v: rapport volume: volume
X : fraction massique ou molaire

Techniques / méthodes :

ATD : analyse thermique différentielle
CIE Lab: Commission internationale de l'éclairage L,a,b.
ESCA : Electron Scanning for Chemical Analysis
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
IR : infrarouge

MEB: microscopie électronique à balayage
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Molécules / chimie :

α/β : forme cristalline complexe du lactose, qui peut être α/β 5/3 ou α/β 3/2.
Lα-H_2O : lactose alpha-monohydraté
B(x)+L(y) : poudre produite par mélange de x% de β-lactoglobuline avec y% de lactose (les deux composants ayant été lyophilisés séparément).
BL(x:y) : poudre modèle à x% de β-lactoglobuline co-lyophilisés avec y% de lactose.
Blg : Beta-lactoglobuline
BSA: sérum albumine bovine
HMF: hydroxyméthylfufural
PVP: polyvinyl-pyrrolidone
RBP : Rétinol Binding Protein (famille de protéines capables de lier des molécules telles que le rétinol)
rh-GH: protéine recombinante de l'hormone de croissance
Acides aminés :

Ala (A) : alanine
Leu (L) : leucine
Ile (I) : isoleucine
Gly (G) : glycocolle
Val (V) : valine
Ser (S): sérine
Thr (T): thréonine
Cys (C): cystéine
Met (M): méthionine
Lys (K): lysine
Arg (R) : arginine
His (H): histidine
Trp (W): tryptophane
Pro (P): proline
Asp (D): acide aspartique
Asn (N): asparagine
Glu (E): acide glutamique
Gln (Q): glutamine
Tyr (Y): tyrosine
Phe (F): phénylalanine

Normes / auteurs de théories :

AFNOR: Association française de normalisation
AOAC: Association of Official Analysis Chemists
BET: modèle de Brunauer-Emmet-Teller
GAB : modèle de Guggenheim-Anderson-De Boer
WLF : équation de Williams-Landel-Ferry
GRASP : logiciel de modélisation moléculaire

SOMMAIRE

Introduction générale p.1

Partie 1 : Revue bibliographique p.5

Chapitre I : Les poudres laitières p.5

I.1. Composition et utilisations p.5
I.1.1. β-lactoglobuline p.6
I.1.2. lactose p.8
I.1.3. Propriétés fonctionnelles p.10
I.1.4. Utilisation en tant qu'ingrédients alimentaires p.14
I.2. Interactions entre composants et changements d'états dans les poudres laitières p.15
I.2.1. Changements de phases durant le séchage (atomisation, lyophilisation) p.15
I.2.2. Liaisons avec les molécules d'eau : l'hydratation p.20
I.2.3. Interaction possibles entre protéines et saccharides p.23
I.3. Le système particulaire p.26
I.3.1. Organisation des composants chimiques dans la particule p.26
I.3.2. Structure des particules p.27
I.3.3. Propriétés physiques des poudres laitières p.28

Chapitre II : Cristallisation du lactose lors de la conservation des poudres laitières p.30

II.1. Facteurs influençant la cristallisation p.30
II.1.1. Facteurs environnementaux p.30
II.1.2. Composition de la poudre laitière p.34
II.2. Formes cristallines du lactose produites pendant la conservation d'une poudre laitière p.35
II.3. Conséquences de la cristallisation du lactose dans les poudres laitières p.38
II.3.1. Composition et microstructure de la surface des particules p.38
II.3.2. Propriétés physiques et fonctionnelles des poudres p.39
II.4. Analyse du lactose cristallisé p.40
II.4.1. Analyse thermique différentielle p.40
II.4.2. Diffraction des rayons X p.43

Chapitre III : Autres conséquences de la conservation des poudres laitières p.47

III.1. Réaction de Maillard p.47
III.1.1. Introduction : la réaction de Maillard dans les poudres laitières P.47
III.1.2. La lactosylation p.47
III.1.3. Le brunissement non-enzymatique p.49
III.1.4. Conséquences sur les propriétés physiques et fonctionnelles p.51
III.2. Agglomération des particules p.52
III.2.1. Effondrement de la structure des particules (« collapse ») p.52
III.2.2. Adhérence des particules et mottage (« sticking » et « caking ») p.53
III.2.3. Importance des composants du lait p.55
III.2.4. Conséquences sur les propriétés physiques et fonctionnelles p.55
III.3. Autres conséquences biochimiques et biologiques p.56

Partie 2 : Matériels et méthodes p.57

Chapitre I : Caractérisation des poudres commerciales et production des poudres modèles p.57

I.1. Caractérisation des poudres commerciales p.57
I.1.1 Dosages physico-chimiques p.57
I.1.2. Pureté de la β-lactoglobuline p.58
I.2. Préparation des poudres modèles par lyophilisation p.59
I.2.1. Poudres modèles p.59
I.2.2. Poudres spécifiques p.60

Chapitre II : Conservation des poudres et observation de leurs modifications physico-chimiques p.62

II.1. Etablissement des courbes isothermes de sorption d'eau p.62
II.1.1. Activité de l'eau p.62
II.1.2. courbes isothermes de sorption p.62
II.1.3. Mode opératoire p.63
II.2. Observations macroscopiques et microscopiques p.64
II.2.1. Mesure de couleur p.64
II.2.2. Microscopie électronique à balayage (MEB) p.65

Chapitre III : Analyses thermiques et spectroscopiques des poudres modèles p.66

III.1. Etude de l'état physique du lactose p.66
III.1.1. Analyse thermique différentielle (ATD) p.66
III.1.2. Diffraction des rayons X p.67
III.2. Etude des interactions lactose/β-lactoglobuline par spectroscopie infrarouge p.68
III.2.1. Introduction à la spectroscopie infrarouge p.68
III.2.2. Spectroscopie infrarouge du lactose p.69
III.2.3. Spectroscopie infrarouge des protéines p.72
III.2.4. Mode opératoire p.78
III.2.5. traitement des spectres infrarouges p.78

Partie 3 : Résultats et discussion p.79

Chapitre I : Modifications physico-chimiques des poudres laitières modèles durant leur conservation sous différentes activités de l'eau p.79

I.1. Observation visuelle de l'effondrement des poudres p.79
I.2. Mesure de couleur p.81
I.3. Observation des particules en microscopie électronique à balayage p.82

Chapitre II : Comportement de sorption d'eau et état du lactose lors de la conservation des poudres laitières modèles à différentes activités de l'eau p.88

II.1. Etude du comportement de sorption d'eau des poudres modèles p.88
II.1.1. Courbes isothermes de sorption d'eau à l'équilibre p.88
II.1.2. Evolution des courbes isothermes en fonction du temps de conservation p.95
II.2. Détermination de l'état physique du lactose dans les poudres modèles p.104
II.2.1. Détermination de l'a_w critique de cristallisation p.104
II.2.2. Caractérisation des formes cristallines produites dans les poudres p.112

Chapitre III : Etude des interactions lactose / β-lactoglobuline p.123

III.1. Interactions covalentes p.123
III.2. Etude des interactions non covalentes par spectroscopie infrarouge p.127
III.2.1. Spectre général p.128
III.2.2. Zone spectrale comprise entre 3600 et 3200 cm^{-1} p.129
III.2.3. Zone spectrale comprise entre 1700 et 1600 cm^{-1} p.132

Chapitre IV : Modèle descriptif des interactions développées entre lactose et β-lactoglobuline dans les poudres modèles p.138

IV.1. Les différentes étapes du développement des interactions p.138
IV.1.1. Lyophilisation et conservation sous de faibles activités de l'eau ($0 \leq a_w \leq 0,39$) p.138
IV.1.2. Conservation à l'activité de l'eau précédent la cristallisation ($0,43 \leq a_w \leq 0,59$) p.139
IV.1.3. Conservation avancée et conservation sous de fortes activités de l'eau ($a_w \geq 0,76$) p.145
IV.2. Stabilité des poudres modèles par rapport à la cristallisation du lactose p.147

Conclusion générale p.151

Références bibliographiques p.154

Annexe 1 ..... p.168

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le chiffre d'affaire de la filière laitière française dépasse les 20 milliards d'euros, ce qui représente 20% de celui des industries agroalimentaires en 2003. Cette même année, 490 000 tonnes de poudres de lait entier (hors poudres infantiles) et 250 000 tonnes de poudres de lait écrémé ont été produites par séchage de lait, essentiellement par atomisation. La fabrication de fromages et de produits comme la crème a généré 40 000 tonnes de lactose, 7000 tonnes de protéines de sérum et 50 000 tonnes de caséines (source CNIEL, 2003). Ces poudres laitières de base constituent la première génération de produits laitiers industriels.

Le développement de technologies de séparation et de purification, surtout depuis les années 80, a permis la création d'une seconde génération de poudres laitières, telles que les concentrés et les isolats de protéines sériques, très utilisés en temps qu'ingrédients en formulation alimentaire, grâce à leurs propriétés nutritionnelles et technologiques.

L'émergence de nouveaux traitements (thermiques, enzymatiques...) permet d'améliorer les propriétés fonctionnelles, en particulier des protéines et coïncide avec l'apparition de poudres laitières de troisième génération.

La tendance actuelle est à la séparation au niveau moléculaire, dans le but d'isoler des composés d'intérêt nutritionnel ou bio-fonctionnel (peptides aux propriétés immuno-stimulantes, anti-dépressives...). On peut considérer ces poudres issues de lait comme des produits de quatrième génération.

Les cours mondiaux des poudres de lait et de lactosérum de première génération se dégradent fortement depuis les années 1990, ce qui incite la filière laitière à produire des ingrédients laitiers de plus en plus spécifiques, à forte valeur ajoutée.

Dans ce contexte de recherche scientifique et de développement technologique, force est de constater que si la qualité microbiologique des poudres est parfaitement maîtrisée, les modifications physico-chimiques qui apparaissent pendant leur conservation le sont beaucoup moins, notamment les relations entre le vieillissement des poudres et ses conséquences sur les propriétés fonctionnelles.

Parmi les altérations subies par les poudres laitières, la cristallisation du lactose est particulièrement importante car elle pose des problèmes tant pendant leur production par séchage que pendant leur conservation. En industrie, pour éviter les problèmes d'agglomération (mottage) qui interviennent pendant le séchage par atomisation, on procède à

un ensemencement des produits laitiers par des cristaux de lactose pour forcer la cristallisation. Les produits déshydratés obtenus sont presque cristallisés à 100% ; cependant, il reste toujours une faible part de lactose amorphe et même si elle est de l'ordre du pourcent, sa re-cristallisation peut entraîner des défauts d'écoulement et des problèmes de mottage.
De nombreux paramètres influencent la cristallisation : facteurs de l'environnement, comme la température ou l'humidité relative ; composition de la poudre... Ce phénomène est donc difficile à étudier dans un système alimentaire, souvent très complexe.

Dans cette étude, nous avons produit des poudres laitières simplifiées lyophilisées, constituées de lactose et de β-lactoglobuline ; puis nous les avons conservées sous différentes humidités relatives. Les principaux objectifs de ce travail sont de contribuer à une meilleure compréhension des interactions pouvant se développer entre lactose et β-lactoglobuline à l'état déshydraté et faiblement hydraté, et d'étudier l'influence de ces interactions sur les modifications physico-chimiques qui accompagnent la conservation, en particulier la cristallisation du lactose.

Une revue bibliographique précède la présentation des travaux. Elle comporte une présentation générale des poudres laitières (chapitre I), suivie de deux parties qui concernent les modifications physico-chimiques apparaissant pendant leur conservation : la cristallisation du lactose (partie II) et d'autres dégradations comme la réaction de Maillard ou l'agglomération des particules (partie III).

Les indications concernant les poudres commerciales, la fabrication des poudres modèles et les techniques expérimentales utilisées dans cette étude sont développées dans le chapitre « matériels et méthodes ».

La présentation des résultats s'articule ensuite en quatre chapitres.
Le premier rassemble les observations (macroscopiques et microscopiques) des modifications physico-chimiques subies par les poudres modèles pendant leur conservation.
Le second concerne l'étude des comportements des poudres modèles vis-à-vis de l'eau, à partir de courbes isothermes de sorption ; ainsi que la cristallisation du lactose, principalement étudiée par diffraction des rayons X et analyse thermique différentielle.

Les interactions entre lactose et β-lactoglobuline font l'objet du troisième chapitre. Les liaisons covalentes sont étudiées à travers le brunissement non-enzymatique et les interactions non covalentes sont analysées au moyen de la spectroscopie infrarouge.
Le quatrième et dernier chapitre, enfin, propose un schéma descriptif du développement des interactions lactose / β-lactoglobuline et précise la stabilité des poudres laitières modèles.

La synthèse des résultats donne lieu à une conclusion de l'étude et à une présentation des perspectives de ce travail.

Ce travail a donné lieu à plusieurs publications et communications :

Publications :

Thomas, Marie E. C., Scher J., Desobry, S. Milk powders ageing: effect on physical and functional properties, *Critical reviews in food science and nutrition*, 2004, 44(6).

Thomas, Marie E. C., Scher J., Desobry, S. Lactose / β-lactoglobulin interaction during storage of model whey powders, *Journal of dairy science*, 2004, 87: 1158-1166.

Communications:

Thomas, Marie E. C., Scher J., Desobry, S. 2003.
Influence de la β-lactoglobuline sur la cristallisation du lactose lors de la conservation d'une poudre de lait modèle.
Actes du séminaire 2003 de l'école doctorale RP2E. ISBN 2-9518564-1-5.
Communication par affiche, séminaire de l'école doctorale RP2E du 23 janvier 2003.

Thomas, Marie E. C., Scher J., Desobry, S. 2004.
Mise en évidence d'interactions lactose / β-lactoglobuline lors de la conservation de poudres laitières modèles.
Récents progrès en génie des procédés, 2004, 4. ISBN 2-910239-65-9.
Communication par affiche, 4ème colloque Science et Technologie des Poudres (Compiègne, 4-6 mai 2004)

Thomas, Marie E. C., Scher J., Desobry, S. 2004.
Lactose / β-lactoglobulin interactions during storage of model whey powders.
Communication orale, 2nd international symposium on spray-drying of milk products (Cork, Ireland, 19-21 octobre 2004)

PARTIE 1 :

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les poudres laitières

I.1. Composition et utilisations

Le lait entier ou lait de vache contient, en dehors de l'eau, trois constituants principaux : la matière grasse, le lactose et les protéines, qui peuvent être insolubles comme les caséines, ou solubles, comme l'α-actalbumine ou la β-lactoglobuline. Les caséines, organisées en micelles, sont majoritaires et représentent 75 à 85% des protéines du lait de vache. Parmi les 15-25% de protéines sériques, solubles, la β-lactoglobuline est majoritaire. Le lait contient également des vitamines et des minéraux comme le calcium, le sodium et le magnésium. La composition moyenne du lait de vache est présentée tableau I.1 et les proportions des différentes protéines laitières sont reportées dans le tableau I.2.

Tableau I.1 : Composition chimique moyenne du lait de vache et du lactosérum, d'après Fox (1989).

	Eau (%)	Matière sèche (%)	Protéines (%)			Matière grasse et composés liposolubles (%)	Lactose (%)	Minéraux (%)
			Solubles (sériques)	caséines	total			
Lait de vache	87	13	0,6	2,8	3,4	4	4,8	0,8
Lactosérum	94,5	6,5	0,6	0,2	0,8	0,2	4,8	0,7

Les proportions des différents constituants du lait peuvent varier car elle dépendent de nombreux facteurs, tels que la race bovine, l'origine géographique et l'alimentation de l'animal, la période de lactation, etc. (Rattray et Jelen, 1996).

Tableau I.2 : Les proportions des différentes protéines du lait de vache, d'après Fox (1989).

Protéines de lait			
Protéines solubles (sériques) 15 à 25%		caséines 75 à 85%	
Beta-lactoglobuline	7 à 12%	Caséine α_{S1}	39 à 46%
Alpha-lactalbumine	2 à 5%	Caséine α_{S2}	8 à 11%
Protéose peptone	2 à 4%	Caséine β	25 à 35%
Immunoglobuline	2 à 3%	Caséine κ	8 à 15%
Sérum albumine bovine (BSA)	environ 1%	Caséine γ	3 à 7%

Lors de la production fromagère, le lactosérum, communément appelé « petit lait », résulte de la synérèse des caillés. Le lactosérum est essentiellement composé de lactose et de protéines sériques (tableau I.1).

Le lactosérum a longtemps été considéré comme un déchet par l'industrie laitière qui, à l'origine, le rejetait parfois dans les rivières, causant d'importants problèmes de pollution microbienne. Il a par la suite été séché pour obtenir des poudres utilisées en alimentation animale. L'émergence de nouvelles technologies de filtration et de fractionnement a permis d'autres utilisations du lactosérum, notamment pour la consommation humaine. Les membranes d'ultrafiltration, par exemple, permettent de séparer les protéines sériques du lactose et des autres composants de faible poids moléculaire. La microfiltration élimine les globules gras de plus grande taille ; la diafiltration, avec de l'eau, permet d'éliminer le lactose et d'augmenter la concentration des protéines sériques, alors que l'osmose inverse concentre les minéraux. Les chromatographies échangeuses d'ions sont quant à elles utilisées pour isoler certaines protéines comme l'α-lactalbumine (échange d'anions) ou la lactoferrine (échange de cations) (Huffman, 1996 ; Smithers et Copeland, 1998).
Ces nouvelles technologies de fractionnement permettent donc d'obtenir des poudres laitières avec des compositions très spécifiques, comme le montre le tableau I.3.

Tableau I.3 : Composition de poudres laitières utilisées comme ingrédients en formulation alimentaire. Références: [a]: Haylock (1995), [b]: Huffman (1996), [c]: Mistry et Pulgar (1996).

Poudres laitières	Matière sèche (%)					
	protéines	matière grasse	lactose	minéraux	humidité	cendres
Poudre de lait entier [a]	26,5	27,4	37,7	5,7	2,7	/
Poudre de lait écrémé [b]	38,2	0,9	49,6	8,2	3	/
Caséinate [a]	91,4	0,9	0,2	4,1	3,3	/
Concentrés de protéines sériques 80% [a]	77,9	5,9	6,8	4,6	4,7	/
Concentrés de protéines sériques 50% [b]	53	5	35	/	/	7
Concentrés de protéines sériques 35% [b]	34,5	4	53	/	/	8
Poudre de lactosérum [a]	13	1,1	73	8,2	4,6	/
Isolat de protéines sériques [b]	>90	1	1	/	/	3
Poudre de lait concentrée en protéines [c]	83,5	4	0,8	/	4,9	7,5

I.1.1. Beta-lactoglobuline

La β-lactoglobuline est la protéine soluble majoritaire du lait (par conséquent la plus abondante du lactosérum). De manière générale, on la trouve en proportion importante dans toutes les poudres laitières (tableaux I.2 et I.3).
La β-lactoglobuline est une petite protéine globulaire de 162 acides aminés, de 18300 Da, soluble dans l'eau. Elle est présente dans le lait de nombreux mammifères, mais absente du

lait maternel et de celui des rongeurs. Sa fonction biologique supposée est la stimulation d'une lipase pré-gastrique (Jameson *et al.*, 2002).
Cette protéine fait partie de la classe des RBP (« Retinol binding protein »), regroupée dans la superfamille des lipocalines. (Lefèvre et Subirade, 2001b). Le point isoélectrique de la β-lactoglobuline est de 5,2.

Le volume total de la β-lactoglobuline en solution serait de 21700 $Å^3$. Sa composition en acides aminés est présentée tableau I.4. Cette protéine contient un groupement thiol libre (SH), celui de sa cystéine 121, et deux ponts disulfures (S-S) entre les cystéines situées en position 66 et 160, ainsi qu'entre les cystéines en position 106 et 119 de la chaîne principale de la protéine.

Tableau I.4 : Séquence et composition en acides aminés de la β-lactoglobuline bovine de génotype A, d'après Fox (1989).

Séquence : (1) LIVTQTMKGL DIQKVAGTWY SLAMAASDIS LLDAQSAPLR VYVEELKPTP EGDLEIILQK WENDECAQKK IIAEKTKIPA VFKIDALNEN KVLVLDTDYK KYLLFCMENS AEPEQSLVCQ CLVRTPEVDD EALEKFDKAL KALPMHIRLS FNPTQLEEQC HI (162)

Composition en acides aminés (aa), et nombre d'acides aminés de chaque sorte :

Acides aminés (aa) essentiels	aa particuliers	Autres acides aminés
Met (4), Tyr (4), Phe (4), His (2), Trp (2)	Lys (15)	Asp (11), Thr (8), Ser (7), Glu (16), Pro (8), Gly (3), Ala (14), Cys (5), Val (10), Ile (11), Leu (21), Arg (3), Gln (9), Asn (5)

Sa structure secondaire en solution est majoritairement constituée de feuillets β (50%), ainsi que d'une hélice α à trois tours et de coudes et de structures désordonnées (figure I.1). Sa structure tertiaire présente 9 brins β, dont 8 brins rigides sont organisés sous la forme de deux feuillets β anti-parallèles. Ceux-ci constituent un « tonneau β » ou « baril β ». Plusieurs boucles très flexibles (une soixantaine d'acides aminés) relient ces brins β. L'ensemble de cette organisation spatiale crée une cavité capable de lier des petites molécules hydrophobes comme les acides gras, le cholestérol, les rétinoïdes... (Bertrand et Dufour, 2000 ; Lefèvre et Subirade, 2001b). Les boucles flexibles sont responsables de la stabilité de la protéine native (Jameson *et al.*, 2002).

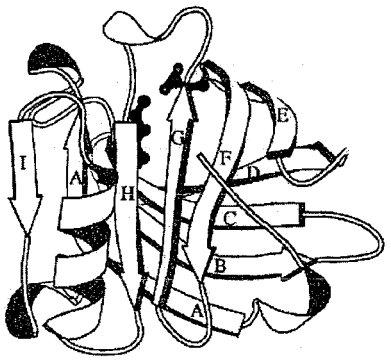


Figure I.1 : Structure tridimensionnelle de la β-lactoglobuline native. Le cœur de la structure en baril β est délimité par les 8 brins β-lactoglobuline de A à H (représentés par des flèches). L'hélice α est schématisée par un ruban s'enroulant sur lui-même.

Dans les conditions physiologiques, la β-lactoglobuline est dimèrique, mais elle peut, selon le pH, présenter plusieurs structures quaternaires :

Monomère ⟷ Octamère ⟷ Dimère ⟷ équilibre mono /dimère ⟷ monomère
pH 3,6 pH 5,2 pH 6,5 pH 7,5

Une augmentation de température peut aussi provoquer la dissociation en monomères, provoquer des échanges entre groupements chimiques S-S et S-H, et aboutir à la formation d'homodimères covalents (Croguennec *et al.*, 2003). La structure quaternaire de la β-lactoglobuline est, comme pour toute protéine, très dépendante des conditions environnementales.

I.1.2. Lactose

Le lactose, qui est le principal sucre contenu dans le lait de la plupart des mammifères, se forme dans les glandes mammaires à partir du glucose et du galactose.
Le lactose est très utilisé dans l'industrie alimentaire. Il sert principalement à renforcer le goût ou la couleur des produits, à diminuer leur coût (apport de matière sèche non sucrante) ou augmenter la durée de conservation des aliments en fixant une partie de l'eau libre.
Dans le domaine pharmaceutique, le lactose α-monohydraté est fréquemment utilisé comme excipient. Il est particulièrement utilisé pour augmenter l'aptitude au tassement de

formulations médicamenteuses lors de la formation de comprimés (Hancock et Shamblin, 1998).

Le lactose est un diholoside : le 4-O-β-D galactopyranosyl-D-glucopyranose. Il existe deux formes anomériques α et β du lactose, qui diffèrent par la configuration stérique de l'atome d'hydrogène et du groupe hydroxyle OH sur le carbone C_1 du glucose. Les structures chimiques de ces deux formes sont présentées figure I.2.

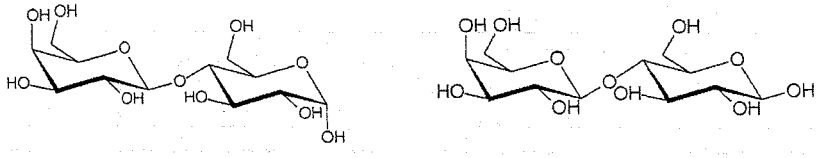


Figure I.2 : Structures du lactose α (à gauche) et du lactose β (à droite).

Les deux formes anomériques α et β sont présentes en solution aqueuse, avec une proportion α /β de 37,3/62,7 environ à 20°C. Cet équilibre dit « de mutarotation » est indépendant de la forme initialement dissoute et ne dépend que de la température de la solution.

Les deux formes α et β ont des solubilités dans l'eau très différentes. A 20°C, on ne dissout que 7,4 g de lactose α dans 100 g d'eau, alors que l'on peut dissoudre 55 g de lactose β dans les mêmes conditions. La mutarotation qui s'établit en solution aqueuse entraîne une solubilité finale de 17 g pour 100 g d'eau (Drapier-Bêche, 1997).

A l'état sec, le lactose peut être amorphe s'il a été séché suffisamment rapidement (par atomisation ou lyophilisation notamment). Il peut également être cristallisé, sous des formes anhydres (α et β) ou monohydratée (α seulement). Le lactose α-monohydraté (Lα-H_2O) est la forme naturellement stable du lactose à température ambiante ; elle peut se présenter en cristaux de nombreuses formes, dont les plus courantes sont le prisme et le « tomahawk ».

La figure I.3 présente les conditions générales de formation des différentes formes du lactose et les principales relations existant entre elles.

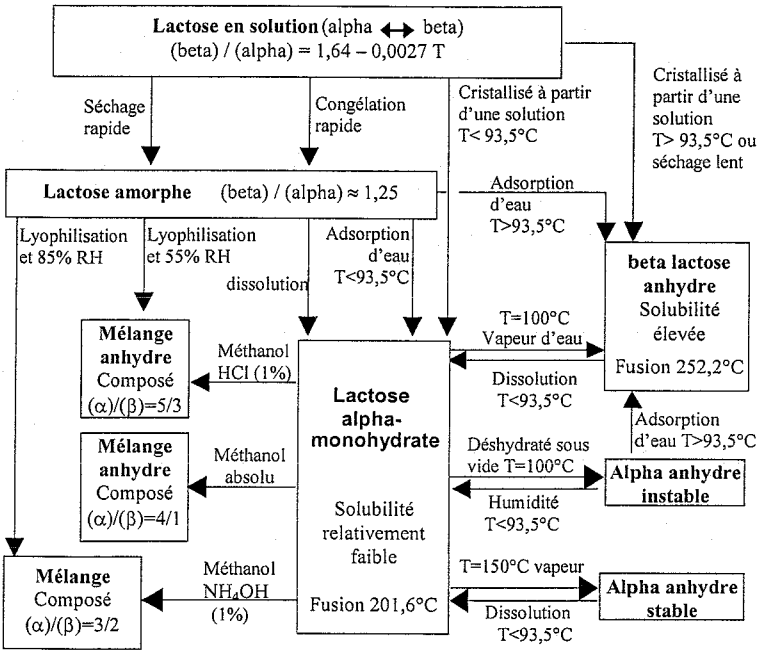


Figure I.3 : Principales relations existant entre les différentes formes cristallines du lactose, d'après Drapier-Bêche (1997) et Jouppila *et al.* (1997).

Comme le montre la figure I.3, il existe des composés moléculaires mixtes α/β 5/3, α/β 3/2 et α/β 4/1. Ces composés moléculaires, qui ont des propriétés thermiques et spectrales différentes de celles des formes cristallines α et β, correspondraient à une association des molécules de lactose α anhydre et β, liées entre elles par des liaisons hydrogène (Drapier-Bêche, 1997).

I.1.3. Propriétés fonctionnelles

Les compositions spécifiques des poudres laitières permettent de les utiliser de manière ciblée, comme ingrédients alimentaires. Ce sont surtout les protéines laitières, qui possèdent des propriétés fonctionnelles particulières, qui confèrent aux poudres des aptitudes intéressantes. Cependant, certaines propriétés comme la mouillabilité sont vraiment caractéristiques des poudres elles-mêmes. Les propriétés aux interfaces paraissent les plus importantes pour l'utilisation des poudres comme ingrédients. Par exemple, l'interface

poudre/eau est essentielle pour la reconstitution de la poudre. Les protéines laitières ont également d'intéressantes propriétés aux interfaces huile/eau (émulsion) et air/eau (mousse).

Solubilité

La solubilité dans l'eau des poudres de lait dépend de différentes étapes telles que la mouillabilité et la dispersibilité. La mouillabilité est définie par le temps nécessaire pour que les particules passent en dessous de la surface du liquide. Cela correspond à la pénétration du liquide à l'intérieur des pores des particules. La dispersibilité correspond à la quantité de particules dispersées dans l'eau sous une faible agitation (Fäldt et Bergenstahl, 1996b). Les différentes étapes de dissolution sont difficiles à étudier séparément et la mesure de la solubilité finale d'une poudre laitière (déterminée après toutes les étapes de dissolution) semble plus fiable pour évaluer son comportement envers l'eau. Le tableau I.5 regroupe quelques méthodes utilisées pour déterminer la solubilité de poudres laitières.

Tableau I.5 : Différentes méthodes utilisées pour mesurer la solubilité de poudres laitières

Auteurs et pays	Paramètres spécifiques	Méthode utilisée	Matériel
Groubet *et al.*, 1999 Nacka *et al.*, 1998 France	Dissolution (1g/l) dans l'eau distillée Centrifugation à **4°C / 3000g** / 15min Dosage des protéines du surnageant avec la méthode BCA (acide bicinchoninic) **Solubilité** = $\frac{\text{teneur en protéines du surnageant}}{\text{teneur totale en protéines}} \times 100$	Adapté de Morr *et al.*, 1985	β-lactoglobuline β-caséine (native et glycosylée)
Szpendowski *et al.*, 1997 Pologne	Dissolution (10g/l) dans NaCl (0.1M) Centrifugation **20000g** / 30min / **T° ambiante** **Filtration** du surnageant (papier Whatman n°1) Dosage de l'azote dans le surnageant (Kjeldahl) **Index d'azote soluble** ('NSI')= $\frac{\text{teneur en protéines solubles}}{\text{teneur totale en protéines}} \times 100$	Adapté de Morr *et al.*, 1985	Caséinates de sodium et de calcium
Moughal *et al.*, 2000 Nouvelle Zélande	Dissolution (2.5% m/m) dans l'eau ou les tampons NaCl et $CaCl_2$, à **40°C** Centrifugation **700g** / 10min Dosage d'azote par la méthode du Kjeldhal	Adapté de Morr *et al.*, 1985	Caséinate de calcium
Baldwin et Ackland, 1991 Nouvelle Zélande	Dissolution dans l'eau à 75°F (**=23.9°C**) Détermination de l'**index de solubilité**= volume (en ml) de sédiments après centrifugation.	Norme ADMI 1979 (méthode 2.17.1a)	Poudre de lait entier
Van Mil et Jans, 1991 Pays Bas	Détermination de l'**index d'insolubilité** = volume de sédiments (en ml) après centrifugation.	Norme IDF International Dairy Federation 129A: 1988 IDF	Poudre de lait entier
Ibrahim *et al.*, 1993 Japon	Dissolution (0,2%) dans l'eau à **20°C** **Filtration** (membrane de 0,45µm) Pas de centrifugation Dosage des protéines par la méthode de Lowry		α-lactalbumine et β-lactoglobuline traitées thermiquement

Propriétés émulsifiantes

Les protéines laitières peuvent stabiliser la surface de gouttelettes lipidiques, dans le lait par exemple. Ces propriétés émulsifiantes rendent les poudres de lait intéressantes pour leur utilisation comme ingrédient. Les propriétés émulsifiantes sont décrites par trois caractéristiques. La capacité émulsifiante est la quantité maximale d'huile qui peut être stabilisée sous forme d'émulsion par les protéines (en g d'huile par g d'émulsifiant). L'activité émulsifiante d'une protéine correspond à la surface de l'interface stabilisée par une concentration donnée d'émulsifiant. Enfin, la stabilité émulsifiante est la durée pendant laquelle l'émulsion reste stable (temps avant l'inversion de phase). Le tableau I.6 présente plusieurs méthodes de détermination de la stabilité d'un émulsifiant.

Tableau I.6 : Différents tests de crémage utilisés pour déterminer la stabilité émulsifiante de poudres laitières.

Auteurs	Méthode utilisée (paramètres spécifiques)	Nature de la phase grasse de l'émulsion	Matériel
Mc Crae *et al.*, 1999 Angleterre	Conservation des émulsions 1 semaine à 4°C observation du *volume de crème* stabilité au crémage= % du volume total	Matière grasse anhydre (4 et 18%)	β-lactoglobuline fraction de protéines sériques
Monahan *et al.*, 1996 USA	Centrifugation à 25°C / 1000g / 30min *Hauteur de la couche de crème* exprimée en % de la hauteur initiale	Huile de maïs (19%)	Isolat de protéines sériques, traité thermiquement
Euston et Hirst, 1999 Nouvelle Zélande	Conservation 24h à 20°C Centrifugation à 20°C /180g / 15 à 30min Dosage de la matière grasse dans 5 ml de la phase aqueuse	Huile de soja (20%)	caséinate de sodium, concentré de protéines de sérum et de lait, poudre de lait écrémé
Srinivasan *et al.*, 2001 USA	*Index de stabilité*= $\frac{\%\ de\ matière\ grasse}{\%\ dans\ l'émulsion\ \ initiale} \times 100$	Huile de soja (30%)	Caséinates de Sodium et de Calcium
Dickinson et Lopez, 2001 Angleterre	Emulsions régulièrement mélangées conservées à 20°C Détermination des *modifications de la taille moyenne des particules* (d_{43}) en fonction du temps	Huile de triglycéride ou tétradécane (20%)	Caséinate de sodium Isolat de protéines sériques
Segall et Goff, 1999 Canada	Conservation des émulsions à 4°C Détermination quotidienne de la *stabilité*= Comparaison de la répartition des tailles moyennes de gouttelettes lipidiques entre le haut et le bas du tube. Les émulsions sont considérées comme stables jusqu'à une différence de 50%	Matière grasse laitière (25%)	Poudre de lait écrémé, hydrolysat et concentré de protéines sériques, caséinate de sodium

La stabilité d'une émulsion laitière dépend beaucoup de l'amphiphilicité des protéines et de leur concentration (Mac Crae *et al.*, 1999 ; Srinivasan *et al.*, 2001).

Propriétés moussantes

Une mousse peut être définie comme un système à deux phases constitué de petites bulles d'air séparées par de fines cloisons de phase liquide. Les propriétés moussantes des poudres laitières sont utiles dans les produits alimentaires qui nécessitent une dispersion air-eau (Chantilly sur le dessus de desserts lactés, mousses charcutières...). Deux caractéristiques décrivent ces propriétés moussantes. Le pouvoir moussant correspond à l'aptitude à stabiliser une interface air/eau et donc à augmenter le volume d'un produit. La stabilité moussante est définie par le temps écoulé avant l'effondrement de la mousse. Une stabilité moussante élevée est généralement recherchée, sauf lors de certains procédés, comme la production de crèmes glacées (Segall et Goff, 1999). Les propriétés moussantes dépendent beaucoup du pH, de la concentration et de la non-agrégation des protéines (Mistry et Hassan, 1991 ; Britten et Lavoie, 1992 ; Belloque et Smith, 1998 ; Dziuba et Darewicz, 2000).

Les protéines laitières ont de meilleures propriétés moussantes que les protéines d'œufs (ovalbumine). Les protéines sériques ont généralement de forts pouvoirs moussants, mais leur stabilité moussante dépend du type de protéine sérique (Huffman, 1996 ; Dziuba et Darewicz, 2000).

Le tableau I.7 regroupe quelques propriétés fonctionnelles et nutritionnelles intéressantes des poudres laitières.

Tableau I.7: Propriétés fonctionnelles (cellules grises) et nutritionnelles de quelques poudres laitières utilisées comme ingrédients en formulation alimentaire (Trp : tryptophane, acide aminé essentiel).

Propriétés	Caséinates	Isolats de protéines	Concentrés de protéines sériques	Lactoferrine	Hydrolysats et peptides de sérum
Solubilité		X	X	X	X
Gélifiantes	X	X	X		
Emulsifiantes	X	X	X		
Foisonnantes		X	X		
Stabilité des mousses		X			
Viscosité	X				
Rétention d'eau	X	X	X		
Anti-synérèse		X	X		
Stabilité thermique	X			X	
Facilement digestible		X			
Source de Trp		X	X		
Hypoallergénique					X
Proche du lait maternel		X		X	
Apport minéral	X				
Lutte contre les pathogènes				X	X

De manière générale, les poudres de caséinates ont de fortes aptitudes à la rétention d'eau et sont très adaptées pour augmenter la viscosité d'un produit. Les protéines sériques, lorsqu'elles sont peu dénaturées (dans le lactosérum doux par exemple) ont une très bonne solubilité, et présentent une bonne aptitude à la texturation, au foisonnement et à la gélification (Cayot et Lorient, 1998).

Le développement de procédés comme l'hydrolyse enzymatique partielle permet d'envisager de nouvelles fonctionnalités pour les poudres laitières. La β-lactoglobuline a par exemple de meilleures propriétés émulsifiantes quand elle est faiblement hydrolysée, ou quand elle a subi une dénaturation limitée et contrôlée, qui n'entraîne pas de perte de solubilité. Par contre, la β-lactoglobuline fortement déplissée fixe moins l'eau que la protéine native (Cayot et Lorient, 1998).

Comme le montre le tableau I.7, ces protéines ont également des propriétés nutritionnelles importantes, en particulier parce qu'elles contiennent des acides aminés essentiels, qui ne sont pas synthétisées par notre organisme. Les concentrés de protéines sériques apportent par exemple du tryptophane. Certains nutritionnistes recommandent une standardisation de la teneur en protéines des produits laitiers pour permettre un apport constant d'acides aminés essentiels issus des protéines laitières (Rattray et Jelen, 1996).

I.1.4. Utilisation en tant qu'ingrédients alimentaires.

Les poudres laitières ont actuellement de nombreuses applications en tant qu'ingrédients alimentaires. De manière générale, le lactosérum déshydraté est un substitut économique de la poudre de lait (« lactoremplaceur »). De plus, l'association du lactosérum à des protéines sériques par mélange ou co-atomisation permet la création d'une gamme de produits à utilisation spécifique.

Ces poudres laitières sont utilisées dans les **produits laitiers**. Dans les yaourts, les protéines sériques améliorent l'onctuosité, la tenue du gel ou évitent la synérèse (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2002). Dans les crèmes glacées, elles augmentent le foisonnement et retardent la fonte.

Les qualités nutritionnelles des protéines sériques, notamment celles de l'α-lactalbumine, permettent une utilisation des isolats de protéines laitières dans les **produits diététiques**, produits de régime, ou boissons énergisantes pour sportifs (Richard, 2000).

L'**alimentation infantile** est aussi une application pour l'α-lactalbumine et la lactoferrine, qui permettent l'élaboration de laits hypoallergéniques, qui contiennent moins de β-lactoglobuline et sont par conséquent plus proches du lait maternel. Le lactosérum déminéralisé et les protéines à faible degré d'hydrolyse sont plus digestibles pour les bébés.

En **boulangerie et biscuiterie**, la β-lactoglobuline remplace le blanc d'œuf pour le foisonnement d'une pâte, le lactosérum délactosé est un agent de dorage, tandis que le perméat de sérum peut retarder le rassissement du pain de mie et améliorer son moelleux.

En **charcuterie et dans les plats cuisinés**, les soupes ou les sauces, les poudres de protéines laitières améliorent la rétention d'eau, l'émulsion, le liant, etc. (Guyonnet, 2001).

Cette liste n'est pas exhaustive et il existe d'autres utilisations plus marginales des poudres laitières, comme par exemple en fermentation, ou pour la stabilisation de ferments en cours de stockage.

I.2. Interactions entre composants et changements d'états dans les poudres laitières

I.2.1. Changements d'états durant le séchage des poudres laitières (lyophilisation, atomisation)

Pendant la production d'une poudre laitière et pendant sa conservation, des transitions de phases peuvent intervenir. Celles-ci vont essentiellement dépendre des paramètres de l'environnement (température, humidité relative...) mais aussi de la composition du produit laitier, notamment en lactose et protéines laitières.

Diagramme de phases simplifié du lait

Le diagramme de phases simplifié du lait apporte d'importantes informations pour comprendre les changements d'états qui interviennent lors de la production et de la conservation d'une poudre laitière (Vuataz, 1999 et 2002). La figure I.4 représente la température du lait en fonction du pourcentage massique de matière sèche laitière.

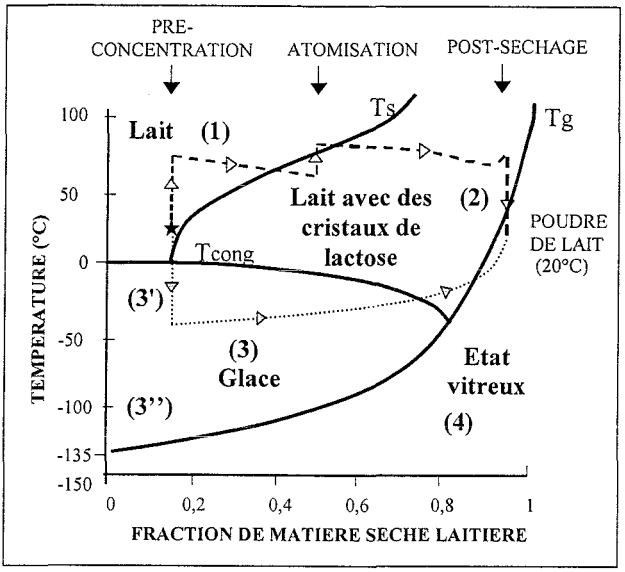


Figure I.4 : Diagramme de phases simplifié d'un lait modèle (changements d'états du lactose et de l'eau). Tcong : courbe de la température de congélation de l'eau. Ts : courbe de la température de solubilité du lactose, adaptée au lait. Tg : température de transition vitreuse du lactose dans le lait. (1) : lait. (2) : lait avec des cristaux de lactose. (3) : cristaux de glace, avec du lait (partie supérieure : 3') ou avec de la matière sèche à l'état amorphe (partie inférieure de la zone : 3''). (4) : lactose amorphe, état vitreux, d'après Vuataz (1999). Les courbes en tirets et en pointillés représentent respectivement les variations de température du lait lors d'une production de poudre par atomisation, et par lyophilisation.

Les trois courbes caractérisant les changements d'états du lactose et de l'eau sont représentées sur le diagramme par des traits continus; les changements liés aux protéines et la matière grasse sont considérées comme moins influents (figure I.4). La première courbe est celle de la température de congélation de l'eau « Tcong ». Elle se produit à 0°C dans l'eau pure, puis diminue lentement lorsque la fraction de matière sèche laitière augmente. Des cristaux de glace apparaissent lorsque la température du produit se situe sous cette courbe. « Ts » est la courbe de solubilité du lactose, adaptée au lait. Des cristaux de lactose apparaissent lorsque le lait est conservé dans les conditions trouvées sous cette courbe. La courbe « Tg » représente la température de transition vitreuse du lactose dans le lait. Sous cette courbe le lactose est amorphe, alors qu'au dessus il est à l'état « caoutchoutique ».

Sur ce diagramme, les trois courbes de solubilité, de transition vitreuse et de congélation, notées Ts, Tg et Tcong délimitent quatre régions numérotées de (1) à (4) correspondant à des états différents du lactose et de l'eau : l'état solide cristallisé, l'état liquide et l'état amorphe. La première région (1) correspond au lait liquide. Dans la région (2), on trouve le lait avec des

cristaux de lactose et du lactose sous forme caoutchoutique. Il y a formation de glace dans la région (3). Les cristaux de glace se trouvent avec du lait dans la partie supérieure de cette zone (3'), et avec des matières sèches à l'état vitreux, dans la partie inférieure de cette zone (3''). Dans la région (4) le lactose est solide et amorphe (Roos, 2002).

Sur ce diagramme de phases, les variations de température accompagnant la production de poudres de lait par atomisation et par lyophilisation ont été représentées. Les tirets correspondent à la production par atomisation et les traits pointillés correspondent à la lyophilisation, respectivement. Avant atomisation, le lait est chauffé pour obtenir un concentré : le lait se situe dans la région (1) du diagramme de phase (figure I.4). Ce concentré est parfois ensemencé avec des cristaux de lactose et refroidi jusqu'à environ 30°C sous la courbe de solubilité pour provoquer la cristallisation, afin d'éviter des problèmes ultérieurs d'agglomération des poudres : le produit se situe alors dans la zone (2) du diagramme. Malgré cette étape, le lactose d'une poudre laitière atomisée n'est jamais cristallisé à 100% (Jayaprakasha *et al.*, 1995). Cela est lié au procédé d'atomisation car la pulvérisation du concentré en fines gouttelettes entraîne un séchage rapide lors duquel les molécules de lactose n'ont pas le temps de s'aligner en structure cristalline (Ozmen et Langrish, 2002). Il en résulte une poudre laitière située dans la région (4), où le lactose est amorphe, au moins partiellement dans le cas où la cristallisation a été forcée avant atomisation. Industriellement, de 0,5 à 5% du lactose est sous forme amorphe contre 95 à 99,5% de cristallisé.
Si la poudre laitière est produite par lyophilisation (courbes en pointillés sur la figure I.4), le lait est d'abord congelé rapidement : il est amené dans la région (3) du diagramme. Puis les cristaux de glace sont sublimés, et la poudre laitière obtenue contient une très forte proportion, voire 100%, de lactose amorphe (région (4)) (Jouppila *et al.*, 1997). Il est important de noter que si les paramètres de la lyophilisation ne sont pas suffisamment maîtrisés, le produit laitier lyophilisé peut se trouver pendant un temps plus important dans la région (2) du diagramme, d'où l'apparition de proportions plus importantes de cristaux de lactose dans la poudre finale.

La transition vitreuse dans les poudres laitières

La transition vitreuse est liée aux modifications de diffusion moléculaire et de viscosité et sépare les états vitreux et caoutchoutique. L'état vitreux est caractérisé par une viscosité très élevée et par une mobilité moléculaire extrêmement faible (Le Meste et Simatos, 1990; Jouppila et Roos, 1994a ; Schentz, 1995 ; Champion *et al.*, 2000).

Les températures de transition vitreuse des protéines laitières sont mesurées par analyse thermique différentielle, avec un calorimètre de type DSC ('Differential Scanning Calorimeter'). Les températures de transitions vitreuses sont plus faciles à déterminer lorsque les protéines sont hydratées. La Tg de la caséine β à une a_w de 0,11 est par exemple de 120°C (Mauer *et al.*, 2000).

Cependant, l'eau est un plastifiant qui diminue la température de transition vitreuse d'une protéine ou d'un polymère car elle favorise la mobilité moléculaire et diminue la viscosité du système. Des modèles mathématiques tels que l'équation de Couchman-Karasz (1978) ont donc été établis pour prédire la Tg d'une protéine, même faiblement hydratée :

$$Tg = \frac{X_p \Delta Cp_p Tg_p + X_s \Delta Cp_s Tg_s}{X_p \Delta Cp_p + X_s \Delta Cp_s} \qquad (1)$$

Avec : X : fraction massique ou molaire
ΔCp : changement de chaleur spécifique massique ou molaire à Tg.
s : solvant et p : protéine

Plus récemment, Matveev *et al.* (1997 et 2000) ont mis au point une méthode de « contribution additive des groupements » pour calculer les températures de transition vitreuse de protéines, notamment à l'état déshydraté. Ce calcul est fondé sur le principe physique de la contribution partielle de chaque acide aminé de la protéine à la Tg globale du système. La température de transition vitreuse de la caséine β anhydre ainsi calculée est de 164°C, celles de l'α-lactalbumine et de la β-latoglobuline sont respectivement de 151°C et 155°C.

La température de transition vitreuse d'une poudre de lait anhydre est 92°C. Elle est proche de celle du lactose pur anhydre (101°C) et n'est pas affectée par les Tg, pourtant plus élevées, des protéines laitières (Jouppila *et al.*, 1997). La Tg d'une poudre de lait dépend donc principalement de la Tg du lactose qu'elle contient. La figure I.5, qui rassemble les courbes de Tg en fonction de l'a_w le prouve.

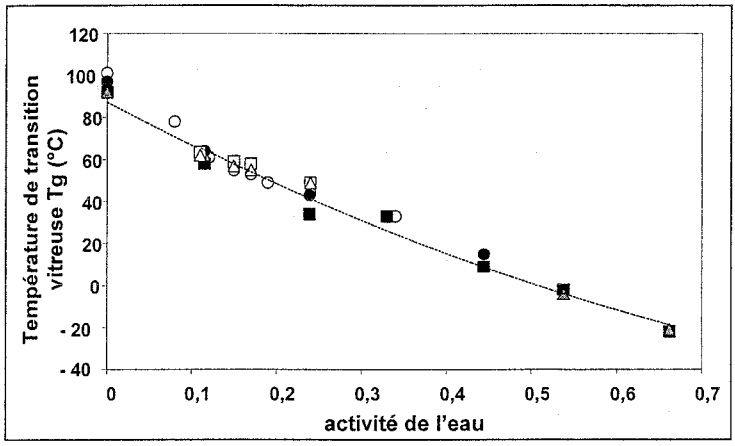


Figure I.5 : Températures de transitions vitreuses (Tg) de poudres laitières en fonction de l'activité de l'eau. ○ Tg du lactose (Lloyd *et al.* 1996). ● Tg du lactose; ▲ Tg de poudre de lait écrémé; ■ Tg de poudre de lait entier (Jouppila et Roos (1994b). △ Tg de poudre de lait écrémé; □ Tg de poudre de lait entier (Vuataz, 1999).

Si l'on représente la Tg de produits laitiers déshydratés en fonction du pourcentage d'eau adsorbé par la matière sèche non grasse, ou en fonction de l'activité de l'eau, on obtient une courbe unique (figure I.5). Cela montre que toutes les poudres laitières contenant du lactose ont des températures de transitions vitreuses similaires en fonction de l'a_w (Vuataz, 1999 ; Jouppila et Roos, 1994a et b).

Les conditions de température et d'humidité relative rencontrées pendant la conservation conduisent les poudres laitières à proximité de leur zone de transition vitreuse. Le dépassement de la zone amorphe du lactose provoque des modifications d'ordre physico-chimique dans les poudres laitières (Vuataz, 1999 ; Roos, 2002 ; Thomas *et al.*, 2004a, b). Comme toutes les poudres laitières ont des Tg proches de celle du lactose, on peut estimer que les altérations qu'elles vont subir pendant leur conservation, qui sont gouvernées par les changements d'état du lactose seront les mêmes. Par contre, l'étendue et la vitesse de ces réactions de dégradation seront influencées par la composition de chaque poudre laitière.
Les dégradations physiques, telles que la cristallisation du lactose, l'effondrement des particules ou le mottage des poudres apparaissent généralement lorsque la température de conservation est supérieure à Tg (Champion *et al.*, 2000 ; Bhandari et Howes, 1999 ; Chung *et al.*, 2000 ; Hennigs *et al.*, 2001). Par contre, des réaction biochimiques comme la réaction de Maillard peuvent également se développer à l'état amorphe, principalement parce que ces

réactions sont directement reliées à la diffusion moléculaire (Schebor *et al.*, 1999 ; Champion *et al.*, 2000). Les modifications chimiques ne sont dans ce cas détectées qu'après un long temps de conservation (un an ou plus), puisque les vitesses de diffusion sont très faibles en dessous de Tg.

Les modifications physico-chimiques qui affectent les poudres laitières dépendent du temps, et sont liées aux changements de viscosité. L'équation WLF de Williams-Landel et Ferry (1955), qui permet le calcul de la variation de viscosité à partir de la différence entre température de conservation et Tg, permet également de déterminer le temps de relaxation de ces réactions en fonction de (T-Tg) (Roos et Karel, 1991 ; Karel et Buera, 1994) :

$$\log\tau - \log\tau_g = \frac{-C_1 \times (T - Tg)}{C_2 + (T - Tg)} \qquad (2)$$

avec:

τ : temps de relaxation d'une modification physique ou (bio)chimique à la température T.
τ_g :temps de relaxation d'une modification physique ou (bio)chimique à la température Tg.
T : température de conservation
Tg : température de transition vitreuse du produit
C_1, C_2 : constantes.

Cependant, la transition vitreuse n'est pas instantanée, et Tg n'est pas une valeur précise ; elle correspond plutôt à un intervalle de température lié aux conditions environnantes du produit et aux cinétiques de montée et descente en température. C'est pourquoi τ_g est plus une approximation qu'un paramètre précis. La prévision avec l'équation WLF des temps de relaxation des réactions d'altérations pendant la conservation de poudres laitières est donc limitée.

Les changements de phases qui interviennent au cours de la conservation des poudres laitières vont modifier les propriétés physiques et fonctionnelles de ces poudres. La qualité, tant organoleptique que microbiologique ou nutritionnelle, des poudres laitières va être altérée.

I.2.2. Liaisons avec les molécules d'eau : l'hydratation

L'eau donne lieu à différentes formes d'hydratation selon la composition et la structure des molécules avec laquelle elle est en contact (Hardy, 1999).

L'hydratation d'une macromolécule correspond à l'établissement d'une interaction qui génère une résistance à l'écoulement des molécules d'eau. D'après Chou et Morr (1979), il existe six types de liaisons de l'eau à une protéine :

L'eau « structurale » est directement liée à la protéine et stabilise sa structure native, car chaque molécule d'eau de ce type serait impliquée dans trois à quatre liaisons hydrogène. L'eau structurale n'est pas disponible pour des réactions chimiques.

L'eau « de monocouche », qui représente 4 à 9% de l'eau qui peut être adsorbée par une protéine interagit par liaisons hydrogène ou interactions dipolaires. Elle n'est pas solvante, mais elle est disponible pour certaines réactions.

L'eau « non congelable » est présente autour des groupements polaires et représente 30 à 50% de l'eau liée par une protéine.

L'eau d'« hydratation hydrophobe » est structurée comme dans la glace ou dans un clathrat de molécules d'eau.

L'eau de liaison « capillaire », maintenue physiquement par des forces de surface, est disponible pour des réactions chimiques, mais peut être éliminée par l'application d'une force.

L'eau « hydrodynamique » a les propriétés physiques de l'eau libre et ne dépend pas de l'activité de l'eau.

Cette liste définissant les interactions des molécules d'eau avec un composé peut paraître actuellement un peu simpliste, étant donné la multitude de techniques élaborées depuis pour étudier l'état de l'eau dans un aliment. En effet, l'eau est définie différemment selon que l'on s'intéresse aux problèmes thermodynamiques, structuraux ou dynamiques. Les techniques thermodynamiques permettent par exemple de différencier l'eau « congelable » et « non-congelable », les courbes isothermes de sorption de définir l'eau « solvante » et « non-solvante » ; et la résonance magnétique nucléaire (RMN) de distinguer l'eau « libre » et l'eau « liée » (Berton, 2002).

D'autres auteurs ont rassemblé tous ces types en trois catégories principales (Schnepf, 1992). Il s'agit de l'eau **« de constitution »**, non congelable, qui correspond environ à l'activité de l'eau nulle. La quantité maximale d'eau de constitution représente 0,03% de l'eau qui peut être adsorbée par la protéine au maximum de l'hydratation.

L'eau **« d'interface »** qui rassemble l'eau « de proximité » et de « multi-couche ». L'eau de proximité correspond aux quelques molécules (une ou deux) très fortement liées à chaque site hydrophile de la protéine par des associations ioniques ou dipolaires, ainsi que l'eau incluse dans des micro-capillarités. Elle correspond à l'activité de l'eau 0,2-0,3. L'eau de multi-couche correspond aux quelques couches d'eau suivantes qui vont recouvrir les molécules

d'eau de proximité, ainsi que les sites moins hydrophiles de la protéines. Ce type d'eau met en jeu des liaison hydrogène entre molécules d'eau et entre eau et solvant ; il correspond à une activité de l'eau allant jusqu'à 0,6.

L'eau « **en vrac** » (« bulk phase ») enfin, correspond aux molécules d'eau les plus éloignées des composants non-aqueux. Son comportement est similaire à celui de l'eau dans une solution saline et les liaisons hydrogène entre molécules d'eau sont prédominantes (Michot *et al.*, 2002).

En pratique les différents « états » de l'eau ne peuvent pas être considérés séparément et ils peuvent évoluer selon la macromolécule considérée et les facteurs environnementaux comme la température (Schnepf, 1992).

En ce qui concerne le comportement d'un produit alimentaire vis-à-vis de l'air humide qui l'entoure, il peut être décrit par les courbes isothermes de sorption d'eau, qui représentent la relation existant entre la teneur en eau d'un produit et son activité de l'eau pour une température fixée. La classification officielle des courbes de sorption est celle de l'IUAP. Cependant, le modèle mathématique d'interprétation des courbes isothermes le plus connu est celui de Brunauer, Emmett et Teller (1938), qui décrit cinq types de courbes isothermes de sorption, représentées figure I.6.

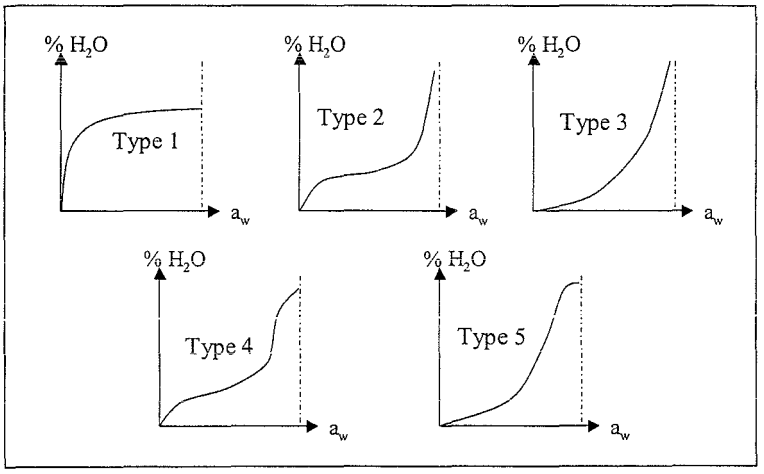


Figure I.6: Les cinq types de courbes isothermes de sorption, d'après Brunauer, Emmett et Teller (1938).

On recense plus d'une centaine d'équations permettant de modéliser les isothermes de sorption d'eau des aliments. Les deux modélisations les plus fréquemment utilisées sont les

théories BET (Brunauer, Emmet et Teller, 1938) et GAB (Guggenheim, Anderson et DeBoer). Toutes deux reposent sur un schéma d'adsorption de vapeur d'eau sous forme de couches multiples sur une surface énergiquement homogène et infinie. Le modèle BET met en jeu les paramètres de masse absorbée à la monocouche Xm et une constante énergétique C et permet de décrire les courbes isothermes pour des pressions relatives d'eau (P/P_0) comprises entre 0,05 et 0,3. Le modèle GAB est une extension locale de la théorie BET et permet de modéliser les courbes isothermes jusqu'à des activités de l'eau égales à 0,9.

Les courbes isothermes de sorption d'eau sigmoïde (type 2) et de type 4 sont les plus fréquentes pour un produit alimentaire (Mathlouthi et Rogé, 2003).

La théorie BET a été utilisée pour modéliser les courbes isothermes de sorption de lactose amorphe (Costantino *et al.*, 1997). La théorie GAB semble par contre moins adaptée étant donné que l'isotherme du lactose est irrégulier lorsque le lactose cristallise sous des a_w intermédiaires, ce qui biaise le calcul.

I.2.3. Interactions possibles entre protéines et saccharides

Les différentes interactions possibles avec des protéines.

Il existe plusieurs types d'interactions inter- et intramoléculaires avec des protéines, qui sont communes à tous types de macromolécules biologiques. Elles sont schématisées figure I.7.

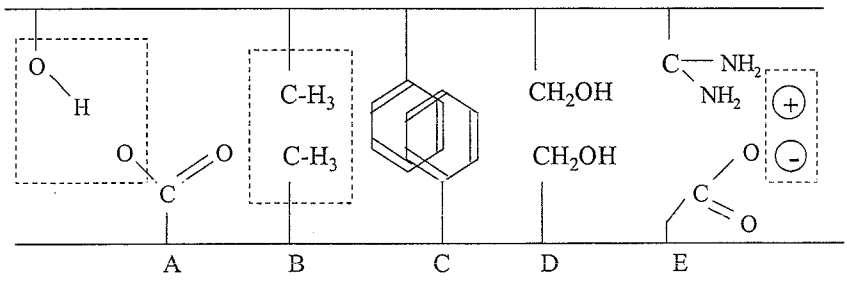


Figure I.7 : Forces moléculaires impliquées dans les interactions avec des protéines. Liaisons hydrogène (A), hydrophobes (B et C), forces de Van der Waals (D) et électrostatiques (E).

Les interactions hydrophobes apparaissent entre des groupements non polaires comme les noyaux aromatiques de certains acides aminés, qui peuvent former un empilement ou les

groupements méthyles (figure I.7, B et C). Plus que de réelles interactions, il s'agit plutôt d'une organisation spatiale qui permet de minimiser les contacts avec l'eau.

Les liaisons électrostatiques, attractives ou répulsives, sont également appelées paires d'ions ou ponts salins et proviennent de l'association de deux groupes protéiques ioniques de charges opposées (figure I.7, E). Dans les protéines, les liaisons électrostatiques apparaissent par exemple entre un groupement de chaîne latérale acide (acide aspartique) chargé négativement, et un groupement aminé de charge positive. Ces interactions ne participent que faiblement à la stabilisation des structures protéiques (Voet *et al.*, 1998).

Les liaisons de Van der Waals sont des associations non covalentes entre des molécules électriquement neutres (figure I.7, D). Elles se forment à partir d'interactions électrostatiques entre dipôles, ou à partir d'interactions dipôlaires induites par un dipôle, parce qu'un dipôle permanent peut induire un moment dipolaire sur un groupe d'atomes voisins et créer une interaction attractive (Voet *et al.*, 1998).

Les liaisons hydrogène sont un cas particulier d'interactions dipolaires, qui se produit entre un groupe donneur faiblement acide et un atome accepteur porteur d'une paire d'électrons non partagée (figure I.7, A). Les donneurs et accepteurs peuvent être des atomes très électronégatifs, comme l'oxygène O ou l'azote N. Les liaisons hydrogène sont préférentiellement linéaires et la distance entre donneur et accepteur est comprise entre 2,7 et 3,1 Å (Howell, 1992). Les liaisons hydrogène sont impliquées dans la conformation des protéines, dans lesquelles elles font généralement partie de réseaux, où chaque donneur est lié à de multiples accepteurs, et inversement. Les groupements internes d'une protéine qui peuvent établir des liaisons hydrogène s'organisent de manière à maximiser le nombre de liaisons créées.

Dans le cas de liaisons hydrogène avec des molécules d'eau ou des saccharides, le groupement hydroxyle O-H est impliqué. L'atome d'oxygène du groupement OH est hybridé en sp^3, ce qui correspond à un arrangement tétrahédrique de deux paires d'électrons et un proton. Le groupement OH peut donc être à la fois accepteur de 2 liaisons hydrogène, ou donneur d'une liaison hydrogène (Michot *et al.*, 2002). Généralement, une chaîne latérale d'acide aminé acide joue le rôle d'accepteur de liaison hydrogène d'un ou deux groupements OH, tandis que les groupements donneurs de liaisons hydrogène proviennent généralement des groupements amides (NH_2) de la chaîne principale de la protéine, ou éventuellement de la chaîne latérale des asparagines ou glutamines.

Le schéma général de la liaison hydrogène peut être représenté comme :

(NH) ⟶ O-H ⟶ O=C
donneur de proton accepteur

La géométrie planaire des donneurs et accepteurs est fixée, alors que la liaison O-H a une liberté de torsion, d'où plusieurs positions possibles pour le proton et les deux paires d'électrons. Cette torsion semble permettre d'optimiser les liaisons hydrogène formées (Weis, 1996).

Les interactions entre protéines et (poly)saccharides.

De nombreux auteurs ont étudié les facteurs qui permettent de maintenir la structure native des protéines car celle-ci est cruciale, par exemple pour le maintien d'activités enzymatiques, ou pour la stabilité d'un principe actif utilisé en médecine (Jiang et Nail, 1998 ; Burin *et al.*, 2004). Comme de nombreux procédés tels que la congélation ou la lyophilisation génèrent des contraintes importantes qui dénaturent les protéines, certaines molécules protectrices sont utilisées pour conserver, au moins partiellement, la structure native des protéines. C'est le cas par exemple des saccharides, dont le rôle cryo-protecteur est à présent bien connu (Dong *et al.*, 1995 ; Carpenter *et al.*, 1998 ; Arakawa et al., 2001 ; Souillac *et al.*, 2002 ; Imamura *et al.*, 2003). Certains saccharides comme le glucose permettent même le maintien de la structure quaternaire d'enzymes comme la lactate déshydrogénase (Anchordoquy *et al.*, 2001). Plusieurs conditions doivent être réunies pour permettre le maintien de la structure protéique par un saccharide. Avant tout, la création d'un réseau amorphe de sucre semble indispensable car le mannitol, qui cristallise pendant la lyophilisation, est incapable de maintenir la structure de protéines comme l'hormone de croissance rh-GH (Costantino *et al.*, 1998 ; Izutsu et Kojima, 2002). De plus, l'établissement d'interactions directes entre protéines et saccharides, notamment par liaisons hydrogène, est essentiel pour la stabilisation de la structure protéique (Kreilgaard *et al.*, 1998 ; Jiang et Nail, 1998 ; Izutsu et Kojima, 2002 ; Souillac *et al.*, 2002). Il semble que les saccharides comme le lactose interagissent avec les groupements polaires des protéines par liaisons hydrogène, et se substituent aux molécules d'eau éliminées lors du séchage ou de la lyophilisation (Allison *et al.*, 1999 ; Arakawa *et al.*, 2001).

Les liaisons hydrogène sont caractéristiques des interactions entre les protéines comme les lectines, capables de fixer des sucres, et les groupements OH des sucres. A l'inverse, les

liaisons hydrogène entre les sucres et les groupements OH des protéines sont peu fréquentes car le coût énergétique d'une telle liaison est trop élevé, en terme d'entropie (Weis, 1996). Il faut remarquer, enfin, que les molécules d'eau sont aussi médiatrices de liaisons hydrogène entre protéines et sucres (Schnepf, 1992).

I.3. Le système particulaire

I.3.1. Organisation des composants chimiques dans la particule

Dans le lait entier atomisé, le lactose amorphe forme une matrice continue dans laquelle les protéines, la matière grasse et les vacuoles (micro-pores) d'air sont réparties (Aguilar et Ziegler, 1994b). Dans cette matrice les molécules d'eau sont à la fois liées au lactose et aux protéines. Une part importante de la matière grasse du lait entier est présente sous forme d'une émulsion de fines gouttelettes lipidiques, dont les tailles ne dépassent pas 15 à 20 µm (Mac Kenna, 1997). Une faible part de globules gras subissent une coalescence, et génèrent une fraction de « matière grasse libre ». Celle-ci peut donc être définie comme la part de matière grasse non émulsifiée, qui se retrouve fréquemment à la surface des particules et dans les pores et capillaires (Aguilar et Ziegler, 1994a). Pendant le séchage des poudres laitières, l'air est occlus dans la matrice, ce qui peut générer des vacuoles. L'air peut aussi pénétrer à l'intérieur de la particule dans les quelques heures qui suivent le séchage, à cause de la dépression créée localement lors du refroidissement (King, 1965). Les vacuoles d'air sont réparties dans toute la particule et peuvent même générer des particules creuses lorsque la teneur en protéine est importante (Aguilar et Ziegler, 1994a ; Mistry et Hassan, 1992). Fäldt et Sjohölm (1996) ont utilisé l'ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) pour quantifier les proportions des différents atomes présents à la surface de particules de poudres de lait entier. Ils en ont déduit la composition chimique de la surface : 55% de matières grasses, 15% de lactose et 30% de protéines. Ils ont trouvé une composition similaire quelle que soit la taille de l'équipement utilisé (pilote, industriel...). De manière générale, que la poudre soit lyophilisée ou atomisée, la matière grasse est présente en forte proportion à la surface des poudres laitières. Les protéines laitières sont également souvent sur-représentées à la surface de particules, ce qui signifie que la concentration des protéines en surface est supérieure à la proportion de protéines dans la composition moyenne de la poudre (Millqvist-Fureby *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 2002).

I.3.2. Microstructure des particules

La microscopie électronique à balayage (MEB) est l'une des techniques les plus utilisées pour évaluer à la fois la taille des particules, leurs formes et leur morphologie microscopique, c'est-à-dire la présence de pores ou d'irrégularités de surface. La figure I.8 (a, b) présente par exemple deux photographies de MEB de poudres de lait.

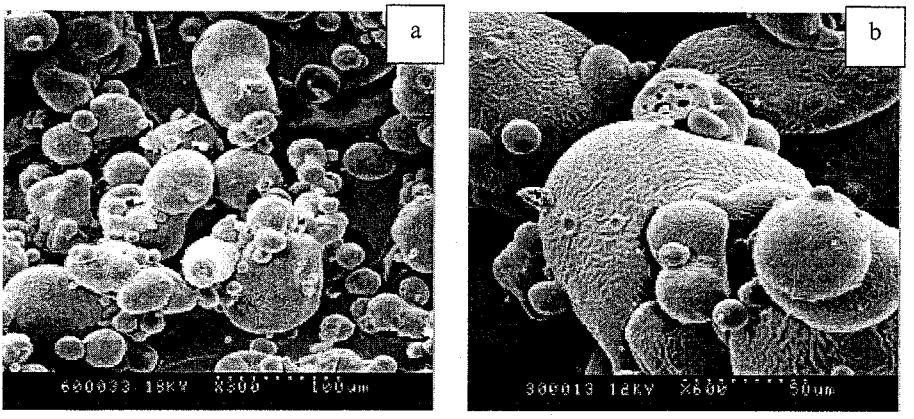


Figure I.8 a et b : Photographies en microscopie électronique à balayage (MEB) de particules de poudres de lait écrémé produites par atomisation.

Le diamètre moyen d'une particule de poudre de lait produite par atomisation peut varier de 10 à 250 µm environ (King, 1965 ; Aguilar et Ziegler, 1994b). Ces particules sont généralement de forme sphérique, comme l'indique la figure I.8 b (Aguilar et Ziegler, 1994a ; Mac Kenna, 1999 ; Yetismeyen et Deveci, 2000).

La microstructure de la surface des particules dépend fortement de la composition chimique de la poudre. Les poudres laitières contenant de fortes teneurs en protéines ont des surfaces présentant de larges bosses. Selon Aguilar et Ziegler (1994a), les protéines laitières sont à l'origine du phénomène car elles augmentent la viscosité du concentré avant atomisation, ce qui diminue la diffusion des bulles d'air dans le produit lors de l'atomisation et crée une matrice poreuse, des particules plus grosses, avec des surfaces moins lisses (Yetismeyen et Deveci, 2000). Lorsque la teneur en lactose est élevée et celle en protéines est faible, la viscosité du concentré de lait entier est plus faible, ce qui génère des particules plus rondes, avec des surfaces lisses (Aguilar et Ziegler, 1994a). Au contraire, Mistry *et al.* (1992) qui ont séché du lait écrémé par atomisation ont montré qu'une concentration élevée en lactose génère des particules dont la surface est très ridée. Cette contradiction apparente entre les

deux études pourrait s'expliquer par la différence de teneur en matière grasse du lait, différente dans les deux études.

La microstructure des particules de poudres laitières dépend aussi beaucoup du procédé utilisé pour leur production, et particulièrement des températures de l'air dans le sécheur, qui peuvent être à l'origine de la dénaturation thermique des protéines laitières. Selon Millqvist-Fureby *et al.* (2001), même un faible degré de dénaturation (4% de protéines rendues insolubles) peut influencer le film protéique qui se forme à la surface des gouttelettes atomisées et provoquer la formation de rides à la surface des particules de poudres.

I.3.3. Propriétés physiques des poudres laitières.

L'aptitude à l'écoulement sous forme de particules individuelles, également appelée «coulabilité», est probablement la propriété physique la plus importante d'une poudre. De nombreux problèmes pratiques apparaissent lorsque la coulabilité d'une poudre diminue : difficulté de transport, défauts de dosages, formation de structures en arches qui provoquent l'obstruction de silos... La coulabilité d'une poudre est directement liée à deux propriétés : la cohésion et la compressibilité.
La cohésion dépend elle-même de plusieurs paramètres physiques, tels que la forme et la taille des particules, la porosité, l'hygroscopicité, l'activité électrostatique, etc (Scher, 1998). La cohésion d'une poudre est inversement proportionnelle à sa coulabilité, bien que dans la littérature, il y ait souvent confusion entre ces deux termes.
La compressibilité d'une poudre, qui correspond à son aptitude à être compactée dans un volume plus restreint, est déterminée par la différence entre la densité vrac (aérée) et la densité tassée. La densité vrac, ou densité apparente est la masse du solide rapportée au volume occupé par la poudre. La densité tassée comprend le volume d'air piégé dans les particules, mais pas le volume des vides qui les entourent (Carr, 1965 ; Aguilar et Ziegler, 1994b; Yetismeyen et Deveci, 2000).

L'aptitude à l'écoulement des poudres peut être déterminée par de nombreuses techniques, qui peuvent être directes ou indirectes. Les méthodes directes regroupent surtout des mesures de rhéologie qui consistent à déterminer le comportement à l'écoulement sous contrainte. Elles sont par exemple effectuées avec des cellules de cisaillement de Jenicke (Prentice, 1992 ;

Teunou *et al.*, 1999). Parmi les méthodes indirectes, on peut citer celle des indices de Carr, qui peuvent être réalisées avec un testeur de poudres de type Hosokawa. Cet appareil donne une note générale à la poudre, qui définit son écoulement et son inondabilité, c'est-à-dire son aptitude à s'ébouler (Carr, 1965).

II. Cristallisation du lactose lors de la conservation des poudres laitières

Lors de la conservation de poudres laitières, le lactose joue un rôle majeur puisque ses changements d'états influencent fortement la plupart des autres modifications physico-chimiques subies par la poudre. La transition du lactose amorphe à l'état cristallisé perturbe particulièrement l'organisation des composants et leur comportement par rapport aux molécules d'eau.

Dans les poudres laitières fraîchement produites par lyophilisation le lactose est très majoritairement amorphe. Pendant la conservation une augmentation de température ou d'humidité relative, qui amène le système dans la zone caoutchoutique, va provoquer la cristallisation du lactose, qui se déroule en deux étapes.
La nucléation hétérogène primaire puis secondaire a d'abord lieu : de petits cristaux sont formés à partir de nuclei, qui sont de petits défauts de structure ou des micro-impuretés présentes dans la matrice amorphe. La deuxième étape est la croissance cristalline, lors de laquelle les cristaux se propagent en mettant en jeu des phénomènes de diffusion.

II.1. Facteurs influençant la cristallisation

II.1.1. Facteurs environnementaux

Température

La cristallisation du lactose se produit entre la température de transition vitreuse (Tg) et la température de fusion (Tf) du lactose (Roos, 1995 ; Lloyd *et al.*, 1996 ; Kedward *et al.*, 1998). La figure I.9 représente la vitesse de la réaction de cristallisation et celles de ses deux étapes de développement : nucléation et croissance.

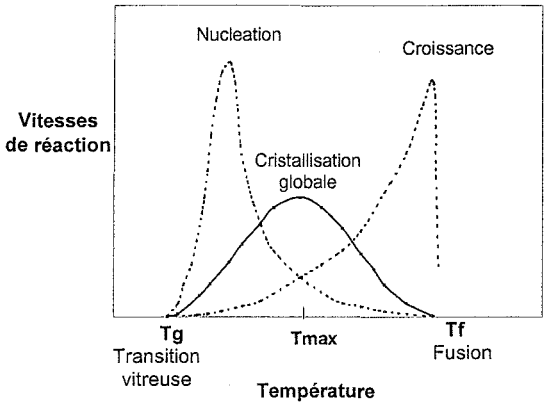


Figure I.9 : Vitesse globale de cristallisation du lactose (nucléation et croissance) en fonction de la température. Tmax est la température où la vitesse de cristallisation est maximale. Tg est la température de transition vitreuse et Tf celle de fusion des cristaux formés. Si le lactose est anhydre, Tg=101°C et Tf est d'environ 220°C. Si le lactose contient 17% d'eau, Tg=-37°C , Tmax=24°C et Tf vaut toujours 220°C environ, d'après Jouppila *et al.*, 1997.

La figure I.9 montre que la vitesse de cristallisation n'est pas constante entre Tg et Tf. La nucléation est favorisée lorsque la température de conservation est proche de Tg, mais dans ce cas la croissance cristalline est défavorisée car la viscosité est élevée et la diffusion moléculaire faible. Lorsque la température de conservation est plus élevée, la diffusion moléculaire et la vitesse globale de cristallisation augmentent. Enfin, lorsque la température de conservation est proche de celle de fusion, la nucléation est limitée car la vitesse d'érosion des cristaux devient supérieure à celle de la propagation des cristaux à cause des fortes diffusion et mobilité moléculaire. La température Tmax où la vitesse de cristallisation est la plus élevée se situe légèrement en dessous de la température médiane entre Tg et Tf (Kedward *et al.*, 1998 et 2000).

Humidité relative (HR)

L'eau joue un rôle important dans la cristallisation du lactose. Le lactose amorphe est hygroscopique, ce qui se traduit par une augmentation rapide de sa teneur en eau quand il est conservé sous de fortes humidités relatives (>50%) (Jouppila et Roos, 1994a ; Teunou *et al.*, 1999). La cristallisation se produit alors, en même temps qu'une libération d'eau, car les formes cristallines du lactose, monohydratées ou anhydres, sont moins hygroscopiques et moins hydratées que le lactose amorphe (Jouppila *et al.*, 1997 ; Jouppila et Roos ; 1994a et 1994b).

Ce phénomène est visible sur les courbes isothermes de sorption d'eau de poudres contenant du lactose : celles-ci présentent une diminution brutale de la teneur en eau (« cassure » de la courbe). Cette libération d'eau est nette sur la figure I.10, qui regroupe les courbes isothermes de sorption d'eau de quelques poudres laitières.

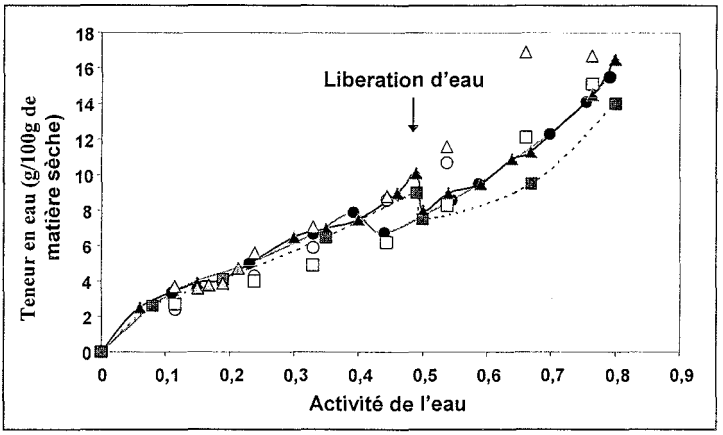


Figure I.10 : Courbes isothermes de sorption d'eau de poudres laitières à 20°C. ▲ poudre de lait écrémé; ▩ poudre de lait entier (Berlin *et al.*, 1968). ● Lactose (Elisée, 1992). ○ Lactose; △ poudre de lait écrémé; □ poudre de lait entier (Jouppila et Roos, 1994a) ; ▲ poudre de lait écrémé (Kockel *et al.*, 2002). La libération d'eau visible sur les courbes isothermes à environ 50% HR correspond à la cristallisation du lactose et n'est pas visible si les points ne sont pas suffisamment proches.

L'eau libérée lors de la cristallisation va augmenter la vitesse de la réaction, qui s'auto-amplifie. Cet effet est encore accentué parce que l'eau libérée joue un rôle de plastifiant et abaisse la température de transition vitreuse de la poudre (Bhandari et Howes, 1999).

Jouppila *et al.* (1997) ont démontré que dans la poudre de lait écrémé, la courbe représentant l'étendue de la cristallisation du lactose en fonction de l'humidité relative (HR) de conservation a une forme parabolique.

Cette courbe est reportée figure I.11. Lorsque l'humidité relative ambiante est peu importante, la diffusion moléculaire est lente, et la proportion de lactose qui cristallise est faible. L'étendue de cristallisation du lactose est maximale à environ 70% HR, ce qui correspond à une teneur en eau de 17%. A forte humidité relative la cristallisation du lactose est au contraire très limitée car la présence d'eau est excessive et dissout les cristaux formés. La dissolution dépend des solubilités spécifiques des formes cristallines générées (Vuataz, 1999).

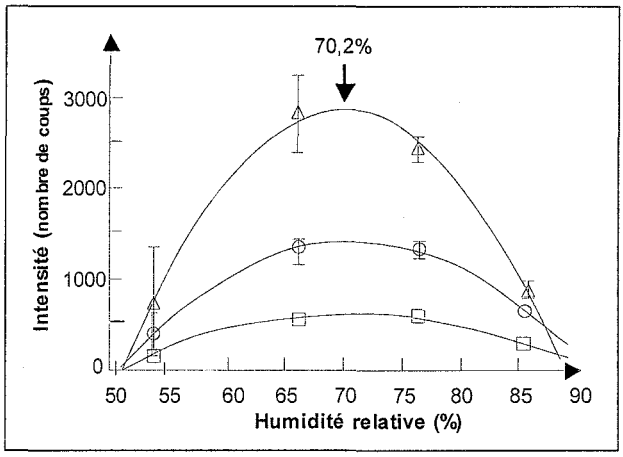


Figure I.11: Etendue de la cristallisation du lactose dans une poudre de lait écrémé en fonction de l'humidité relative de conservation. L'étendue de la cristallisation correspond à l'augmentation de l'intensité des pics de diffraction des rayons X aux angles de 19° ○, 20°△ et 22°□. Le maximum est obtenu sous 70% HR environ, d'après Joupila *et al.*, 1997.

Jouppila et Roos (1994b) ont indiqué que dans les poudres de lait, la teneur en eau critique, au dessus de laquelle la cristallisation du lactose se produit est de 6 à 8,5 g pour 100 g de poudre, à 20°C. Actuellement le Codex Alimentarius préconise des teneurs en eau maximales de 5% (p/p) pour les poudres de lait entier et écrémé, et de 8% pour les caséinates alimentaires, qui ont une température de transition vitreuse plus élevée.

Temps

Les paramètres de température et d'humidité ne suffisent pas pour décrire le phénomène de cristallisation. Le temps est également un facteur important (Jouppila *et al.*, 1997). Selon Vuataz (1999), il est essentiel de considérer les cinétiques de cristallisation pour prévenir les changements d'état du lactose, d'où la nécessité d'établir des diagrammes de phase dynamiques pour comprendre les transitions qui se produisent pendant la conservation. La figure I.12 présente dans une poudre laitière modèle le délai avant cristallisation du lactose sous la forme β-anhydre. Cette figure correspond à la région (2) du diagramme de phase simplifié du lait (figure I.4).

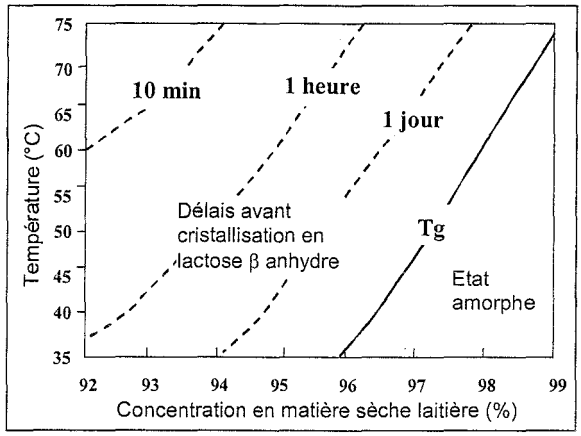


Figure I.12 : Délais avant cristallisation de lactose β-anhydre dans une poudre de lait modèle. Les lignes en pointillés relient les points où le délai avant cristallisation est de 10 minutes, 1 heure, 1 jour.

Plus la teneur en eau et la température sont élevées, plus la cristallisation se produit rapidement. A 6% d'eau (94% de matière sèche laitière), la cristallisation débute après un jour à 35°C, après une heure à 52°C et après 10 minutes seulement à 74°C (figure I .12).

Schentz (1995) et Roos et Karel (1991) ont montré que le délai avant cristallisation du lactose amorphe est relié à la différence entre les températures de conservation et de transition vitreuse (T-Tg). Concernant les temps de relaxation du phénomène de cristallisation, ils sont modélisés par l'équation WLF (Williams Landel Ferry, 1955), établie pour les phénomènes dépendant de la diffusion (équation 2). Cependant cette équation n'est plus valide pour des températures proches de Tg. Il n'existe donc pas de modélisation du temps de cristallisation qui permette de prédire la stabilité de poudres laitières dans la zone de transition vitreuse.

II.1.2. Composition de la poudre laitière

Présence de protéines laitières

Jouppila et Roos (1994b) ont étudié la température de cristallisation du lactose (Tc) dans une poudre de lait, en fonction de l'a_w de conservation. Tc diminue lorsque l'a_w augmente, dès les faibles a_w dans une poudre de lactose, mais seulement quand la teneur en eau atteint 9% dans une poudre de lait. Ce retard de cristallisation serait lié à la présence de protéines laitières. En effet, le lactose pur cristallise dès 40% HR (à 20°C) alors que la cristallisation dans une poudre de lait ne semble apparaître qu'à 50% HR, si l'on en juge par les courbes isothermes

de sorption de ces produits (figure I.10). L'encombrement stérique des protéines et les interactions qu'elles développent avec l'eau et les autres composants pourraient être en cause dans ce phénomène.

Influence de la matière grasse

Les poudres de lait entier adsorbent moins et moins rapidement l'eau que les poudres de lait écrémé à cause de l'hydrophobicité de la matière grasse. Comme la quantité d'eau adsorbée est moindre, la présence de matière grasse prévient aussi la diminution de Tg sous la température de conservation et, par conséquent, la cristallisation du lactose. Par exemple, la cristallisation du lactose apparaît plus tard dans une poudre de lait entier que dans une poudre de lait écrémé lorsqu'elles sont conservées à 66% HR ou plus (Jouppila et Roos, 1994a).

II.2. Formes cristallines du lactose produites pendant la conservation d'une poudre laitière.

Il existe plusieurs formes cristallines de lactose, avec des propriétés physiques, thermiques ou spectrales différentes. Plusieurs études fondamentales concernent la cristallisation du lactose à partir d'une solution (Smart, 1988 ; Garnier *et al.*, 2002a et 2002b). Cependant, les conditions de cristallisation dans une poudre sont trop différentes pour pouvoir les comparer à ce cas.
D'autres auteurs ont cherché à déterminer quelles formes cristallines étaient produites dans des poudres de lactose ou des poudres laitières, selon les conditions de conservation. Le tableau I.8 regroupe les résultats de plusieurs de ces études.

Tableau I.8 : Formes cristallines du lactose produites lors de la conservation de poudres de lait ou de lactose, selon les conditions expérimentales.

CONDITIONS	Lyophilisation (L) ou atomisation (A)	Lα-H_2O	α/β 5/3	β	référence
39% HR - 25°C	Lait écrémé - A			X	Vuataz, 1999
40% HR - 60°C	Lait écrémé - A			X et α anh	Vuataz, 2002
20 à 30% HR - 70°C	Lait entier - A			X	Vuataz, 2002
44% HR - 24°C	Lactose – L	X	X	X	Jouppila *et al.*, 1998
49% RH - 25°C	Lait écrémé – A			X	Vuataz, 1999
50% HR - 25°C	Lactose – A	X		X	Briggner *et al.*, 1994
57% HR - 25°C	Lactose – A	X		X	Sebhatu *et al.*, 1994
55% HR - 25°C	Lactose L et A	X		X	Bushill *et al.*, 1965
55% HR - 25°C	Lait entier L et A	X	X		Bushill *et al.*, 1965
55% HR - 25°C	Lactose – A	X		X	Stubberud Forbes, 98

54% HR - 24°C	Lactose – L	X	X		Jouppila *et al.*, 1998
54% - 24°C - 576 h	Lait écrémé – L		X		Jouppila *et al.*, 1997
57% HR - 25°C	Lactose – A	X		X	Sebhatu *et al.*, 1994
57,5% HR - 25°C	Lactose – A	X		X	Schmitt *et al.*, 1999
57,2% HR - 25°C	Lait écrémé – A	X			Vuataz,1999
66% HR - 24°C	Lactose – L	X	X		Jouppila *et al.*, 1998
66%HR- 24°C-120 h	Lait écrémé - L		X		Jouppila *et al.*, 1997
75% HR - 25°C juste après cristallisation	Lactose – A	X		X	Sebhatu *et al.*, 1994
75% HR - 25°C -24h	Lactose – L	X		X	Corrigan *et al.*, 2002
76% HR - 24°C	Lactose – L	X	X		Jouppila *et al.*, 1998
76%HR- 24°C - 72 h	Lait écrémé - L		X		Jouppila *et al.*, 1997
77% HR - 21°C	Lait entier - A	X			Aguilar et Ziegler, 1994b
86% HR - 24°C -72h	Lait écrémé - L	X	α/β 4/1		Jouppila *et al.*, 1997

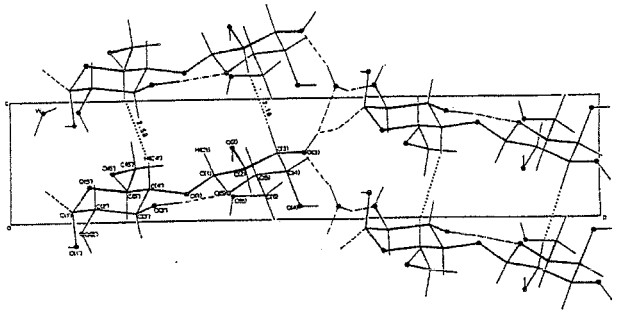
Les formes cristallines du lactose observées dans ces études sont très variables à cause des différentes conditions expérimentales : la température d'étude est par exemple de 21, 24 ou 25°C. De manière générale, plus l'humidité relative de conservation est élevée plus la croissance des cristaux α-monohydratés est favorisée. Le lactose β anhydre et les composés moléculaires mixtes α/β (5/3 notamment) sont plus fréquemment observés dans des poudres de lait entier ou écrémé qui contiennent des protéines laitières, alors que le lactose α-monohydraté est souvent produit dans les poudres de lactose. Il n'a pas encore été démontré que le mode de production des poudres influence le type de cristaux formés. Plusieurs études concordent et semblent montrer, par exemple, que le lactose lyophilisé ou atomisé cristallise en α-monohydraté et β anhydre quand la poudre est conservée à des températures de 21 à 25°C et des humidités relatives comprises entre 50 et 57% (tableau I.8). Par contre, l'étude de Jouppila *et al.* (1998) est en désaccord car ces auteurs ont détecté dans une poudre de lactose lyophilisée des formes de lactose α-monohydraté et α/β 5/3.

Il faut noter que les formes cristallines produites dépendent beaucoup du temps de conservation d'une poudre. Il est donc difficile de comparer les résultats d'auteurs qui déterminent les cristaux formés immédiatement après cristallisation (Sebhatu *et al.*, 1994) et ceux qui les déterminent après plusieurs jours de conservation (Jouppila *et al.*, 1997). Angberg (1995) et Vuataz (2002) ont indiqué qu'une mutarotation pouvait intervenir entre les formes α et β selon l'humidité relative de conservation. Figura (1993) a même montré que la mutarotation pouvait apparaître à l'état amorphe. Ainsi, le temps compris entre la production des poudres et la cristallisation du lactose ; et le délai entre le phénomène de cristallisation et

l'analyse des cristaux va influencer le résultat de l'analyse. Cela pourrait expliquer les apparentes contradictions du tableau I.8 et la difficulté de comparer ces résultats.

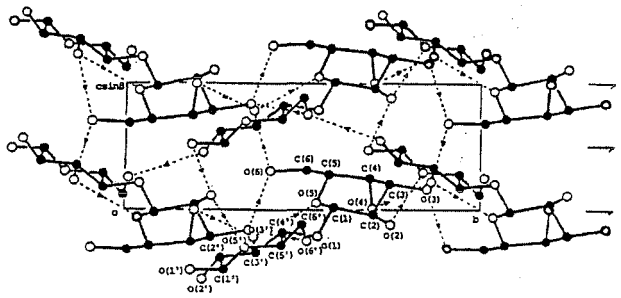
Les structures cristallographiques des cristaux de lactose les plus répandus, qui sont le lactose α-monohydraté et le lactose β anhydre, sont connues. Les deux cristaux appartiennent au système monoclinique, et leurs mailles élémentaires contiennent deux molécules.

La maille élémentaire du lactose α-monohydraté a pour paramètres a=7,983 Å, b=21,562 Å, c=4,824 Å et β=109,57° avec un volume de 782,3 $Å^3$. Les molécules d'eau sont insérées entre les chaînes de molécules de disaccharides de telle façon que l'eau engage des liaisons hydrogène avec quatre molécules de lactose. Chaque molécule de lactose α-monohydraté est impliquée dans une liaison hydrogène intra-moléculaire, et 9 liaisons avec 4 autres molécules de lactose. Le lactose α-monohydraté est ainsi constitué d'un empilement infini de feuillets entre lesquels s'insèrent les molécules d'eau (Garnier *et al.*, 2002b). La figure I.13 représente schématiquement cette organisation cristalline.



Figures I.13 : Vue du plan (bc) du cristal de lactose α-monohydraté, l'axe a étant perpendiculaire au plan (d'après Drapier-Bêche, 1997).

La maille élémentaire du lactose β anhydre a pour paramètres a=4,954 Å, b=13,349 Å, c=10,839 Å et β=91,31° avec un volume de 716,7 $Å^3$. Le réseau complexe de liaisons hydrogène a été récemment redéterminé. Chaque molécule de lactose β anhydre est impliquée dans une liaison intra-moléculaire, et 14 liaisons hydrogène avec 8 molécules de lactose voisines (Garnier *et al.*, 2002a). Ce réseau de liaisons hydrogène organisent les molécules de lactose β anhydre en chaînes finies. La figure I.14 schématise cet arrangement moléculaire.



Figures I.14 : Vue du plan (bc) du cristal de lactose β anhydre, l'axe a étant perpendiculaire au plan (d'après Drapier-Bêche, 1997).

II.3. Conséquences de la cristallisation du lactose dans les poudres laitières

II.3.1. Composition et microstructure de la surface des particules

Lorsque les poudres laitières sont conservées au dessus de Tg, la cristallisation est le principal phénomène responsable de la modification de la composition chimique de la surface des particules. Pendant la conservation, le stress provoqué par la cristallisation du lactose à l'intérieur de la particule force la migration de la matière grasse vers la surface de la particule (Fäldt et Bergenstahl, 1995 ; Mac Kenna, 1997). La cristallisation génère un réseau de micro-fissures capillaires dans toute la particule, par lequel les gouttelettes lipidiques sont expulsées.

La microstructure des particules de poudres laitières est également très perturbée par la cristallisation du lactose. Tout d'abord, les surfaces des particules sont déformées. Des cristaux sont nettement visibles à la surface des particules observées par microscopie électronique à balayage, comme le montre la figure I.15 (Lai et Schmidt, 1990 ; Aguilar et Ziegler, 1994b).

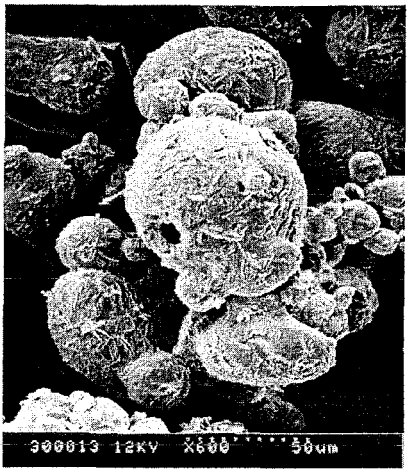


Figure I.15 : Photographie de microscopie électronique à balayage d'une poudre de lait produite par atomisation et conservée sous une humidité relative de 75%. La surface des particules présente des cristaux de lactose.

De plus les particules s'agglomèrent jusqu'à former dans certains cas un solide continu, et non plus divisé (Aguilera *et al.*, 1995). Cette agglomération provient du fait que l'eau libérée lors de la cristallisation diminue la viscosité à la surface des particules et permet au lactose de diffuser et cristalliser entre les particules, formant des ponts solides (Aguilar et Ziegler, 1994b ; Rennie *et al.*, 1999).

II.3.2. Propriétés physiques et fonctionnelles des poudres

La cristallisation provoque des modifications qui altèrent les propriétés physiques et fonctionnelles des poudres laitières.

Aptitude à l'écoulement

Les poudres laitières contenant des matières grasses s'écoulent moins bien (elles sont plus cohésives) que les poudres écrémées, même lorsque la teneur en matière grasse de la surface des particules est faible, de l'ordre de 2 à 3% (Buma, 1971 ; Rennie *et al.*, 1999). Pendant la conservation, la cristallisation du lactose entraîne une diminution des capacités d'écoulement des poudres de lait, probablement à cause de la migration des matières grasses à la surface des particules, mais aussi à cause des forces d'enchevêtrement développées entre les particules qui présentent des cristaux à leur surface (King, 1965 ; Mistry *et al.*, 1992 ; Celestino *et al.*, 1997b ; Jayaprakasha *et al.*, 1995).

Mouillabilité, dispersibilité et solubilité

Tout d'abord, la modification de la composition chimique de la surface des particules altère la réhydratation des poudres laitières (King, 1965 ; Jouppila et Roos, 1994a ; Cayot et Lorient, 1998). La matière grasse qui a migré en surface des particules crée une barrière hydrophobe qui réduit le nombre d'interactions protéines-eau. La mouillabilité des poudres laitières est de ce fait particulièrement diminuée, de même que les vitesses de dispersion et de dissolution (Fäldt et Bergenstahl, 1996b ; Mac Kenna, 1997 ; Millqvist-Fureby *et al.*, 2001). De plus, la cristallisation du lactose semble être à l'origine d'une dénaturation des protéines laitières, qui rend ces dernières moins solubles (Zbikowski *et al.*, 1993 ; Huffman, 1996 ; Szpendowski, 1997). La dénaturation des protéines peut engendrer leur agrégation, comme c'est le cas pour des protéines en solution ; c'est-à-dire qu'elles interagissent via des liaisons non-covalentes, notamment hydrophobes et forment des agrégats (Monahan *et al.*, 1996 ; Gezimati *et al.*, 1997 ; Dziuba et Darewicz, 2000). Dans les poudres laitières conservées sous forte humidité relative, il est donc possible que la cristallisation du lactose diminue la solubilité, à cause de la dénaturation des protéines et de leur agrégation (Schebor *et al.*, 1997 ; Yetismeyen et Deveci, 2000).

II.4. Analyse du lactose cristallisé

Il existe de nombreuses techniques analytiques pour étudier le lactose. Parmi elles, on peut citer le dosage du lactose dans les produits laitiers liquides par cryométrie, ou chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Drapier-Bêche, 1997). La polarimétrie et la chromatographie en phase gazeuse sont adaptées au dosage des formes α et β du lactose, après re-dissolution de la poudre (Roetman et Schaick, 1975). La résonance magnétique nucléaire au deuterium a permis d'observer la différence de mobilité de l'eau lors de la transition amorphe/cristallisé (Lai et Schmidt, 1990). D'autres techniques sont utilisées pour l'étude de l'état du lactose dans une poudre. Il s'agit notamment de l'analyse thermique différentielle (DSC) et de la spectroscopie infrarouge. La diffraction des rayons X permet la détermination des différentes formes cristallines dans une poudre de lactose cristallisée.

II.4.1. Analyse thermique différentielle (DSC)

L'analyse thermique différentielle est une technique de calorimétrie qui permet de détecter les changements d'états d'un produit, qui s'accompagnent d'une libération ou d'une absorption de chaleur, équivalente à une variation d'énergie mesurée par calorimétrie différentielle. Une réaction exothermique correspond à une différence d'enthalpie positive : c'est le cas de la

cristallisation. Une réaction endothermique correspond à une différence d'enthalpie négative : c'est le cas de la fusion. L'analyse thermique différentielle consiste à faire subir un balayage de température à un échantillon de poudre, pour déterminer les températures de changement d'états et le flux d'énergie qui leur est associé.

La figure I.16 représente la courbe caractéristique du lactose amorphe, obtenue par analyse thermique différentielle.

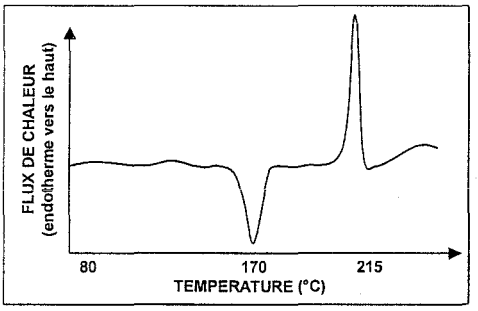


Figure I.16 : Thermogramme caractéristique du lactose amorphe, d'après Sebhatu *et al.*, 1994.

Le lactose amorphe va cristalliser au cours de l'analyse, ce qui génère sur son thermogramme un pic de exothermique de cristallisation généralement observé à 170°C, puis un pic de fusion endothermique des cristaux formés pendant l'analyse, à environ 210-215°C.

La figure I.17 représente la courbe caractéristique du lactose α-monohydraté, obtenue par analyse thermique différentielle.

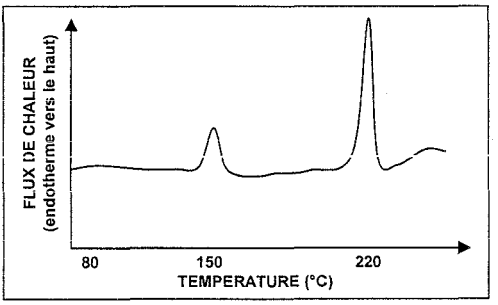


Figure I.17 : Thermogramme du lactose cristallisé α-monohydraté, d'après Sebhatu *et al.*, 1994.

Ce thermogramme présente un pic de fusion des cristaux α à 220°C, ainsi qu'un pic endothermique à 150°C. Ce dernier correspond à la libération de l'eau incluse dans la structure des cristaux qui sont, rappelons-le, monohydratés.

La figure I.18 rassemble les courbes caractéristiques du lactose α et β anhydres, obtenues par analyse thermique différentielle.

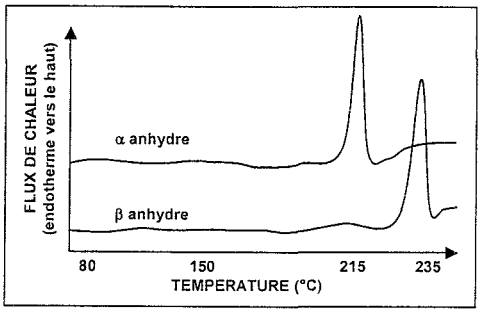


Figure I.18 : Thermogrammes du lactose cristallisé α anhydre (courbe du haut) et du lactose β anhydre (courbe du bas), d'après Sebhatu *et al.*, 1994.

Le thermogramme caractéristique du lactose α anhydre présente un pic de fusion à 215°C (figure I.18, courbe du haut), et celui du lactose β anhydre indique un pic de fusion à 235°C environ (figure I.18, courbe du bas).

Dans la littérature, et comme le montrent les résultats rassemblés dans le tableau I.9, la température des pics caractéristiques des thermogrammes du lactose peuvent varier légèrement selon les auteurs.

Tableau I.9 : Températures caractéristiques des thermogrammes issus de l'analyse thermique différentielle de lactose, déterminées par différents auteurs.

forme α monohydratée		α anhydre	β anhydre	Mode de	Vitesse	Références
T° de libé--ration d'eau	T° de fusion	T° de fusion	T° de fusion	production de la poudre	d'analyse	
135-147°C	218°C		235°C	sur rouleau	10°C/min	Angberg, 1995
140°C	210-215°C		230°C	atomisation	10°C/min	Stubberud et Forbes, 1998
154°C	221°C	216°C		atomisation	15°C/min	Itoh *et al.*, 1977
145°C	216°C		228°C	lyophilisation	5°C/min	Figura, 1993
152°C (onset)	204°C (onset)	216°C (onset)		atomisation	20°C/min	Chidavaenzi *et al.*, 1997
150°C	220°C		235°C	atomisation	10°C/min	Corrigan *et al.*, 2002
150°C	215-225°C		230-240°C	atomisation	10°C/min	Darcy et Buckton, 1997
145°C	215°C	215°C		atomisation	10°C/min	Buckton *et al.*, 1998
144°C	213°C	210°C	224°C	atomisation	5°C/min	Gombas *et al.*, 2003
150°C	220°C	220°C	230°C	atomisation	10°C/min	Sebhatu *et al.*, 1994

Le tableau I.9 est en accord avec les études de Figura (1993), qui montrent que les températures mesurées en ATD dépendent fortement de la vitesse de balayage en température lors de l'analyse. Plus la vitesse est rapide, plus les pics sont détectés à des températures élevées. Le procédé de fabrication de la poudre n'influence pas les thermogrammes obtenus car les températures des pics caractéristiques sont similaires, que la poudre soit produite par atomisation ou par lyophilisation.

La mutarotation entre les formes α et β anhydres peut se produire même à l'état amorphe, particulièrement lors de la montée en température pendant l'analyse (Angberg, 1995). Cette technique n'est donc pas la plus adaptée pour la détermination précise des formes cristallines du lactose dans une poudre. Le tableau I.9 indique aussi que les températures de fusion des cristaux α formés pendant l'ATD à partir de lactose amorphe sont généralement plus faibles que les températures de fusion des cristaux α monohydratés ; probablement parce que les cristaux formés en cours d'analyse sont α anhydres.

II.4.2. Diffraction des rayons X

Les cristaux sont des arrangements périodiques tridimensionnels d'atomes. Ils peuvent être considérés comme un réseau de mailles élémentaires, qui peuvent être de 14 types différents (réseaux de Bravais). Les atomes s'organisent ainsi en plans réticulaires plus ou moins denses qui sont désignés par leurs coordonnées (h, k, l) dans un système de repérage de l'espace. Les corps cristallins peuvent être considérés comme des assemblages de plans réticulaires plus ou moins denses, parallèles et séparés par des distances (d_{hkl}) caractéristiques de la nature du réseau. Comme le cristal est organisé de manière périodique, la quantité de rayonnement diffusée est importante dans certaines directions de l'espace où les rayons diffusés sont en phase : c'est le phénomène de diffraction. La diffraction est observée lorsqu'il y a création d'interférences constructives, c'est-à-dire lorsque la loi de Bragg est vérifiée :

$$2d_{hkl}.\sin\theta = n\lambda \qquad (3)$$

avec λ : longueur d'onde du rayonnement incident
θ : angle entre le vecteur d'onde et le plan hkl
d_{hkl} : distance entre les deux plans d'indices (h, k, l)
n : nombre entier correspondant à l'ordre de la réflexion.

La relation (3) implique que la longueur d'onde du rayonnement doit être du même ordre de grandeur que les paramètres du réseau, ce qui est le cas pour les rayons X avec les cristaux de lactose.

Cette technique d'analyse a permis de suivre l'état amorphe ou cristallisé d'une poudre de lactose au cours de procédés comme le broyage (Otsuka *et al.*, 1991 ; Briggner *et al.*,1994) ; ou dans une poudre de lait, lors de sa conservation (Jouppila *et al.*, 1997). Dans le domaine pharmaceutique, Gombas *et al.* (2003) ont pu quantifier avec une précision inférieure à 1% le degré de cristallinité d'une poudre de lactose. Cette technique a également permis d'étudier l'influence de plusieurs additifs comme le PVP (polyvinylpyrrolidone), sur la cristallisation du lactose (Stubberud et Forbes, 1998 ; Corrigan *et al.*, 2002).

La figure I.19 représente les spectres caractéristiques du lactose amorphe et cristallisé.

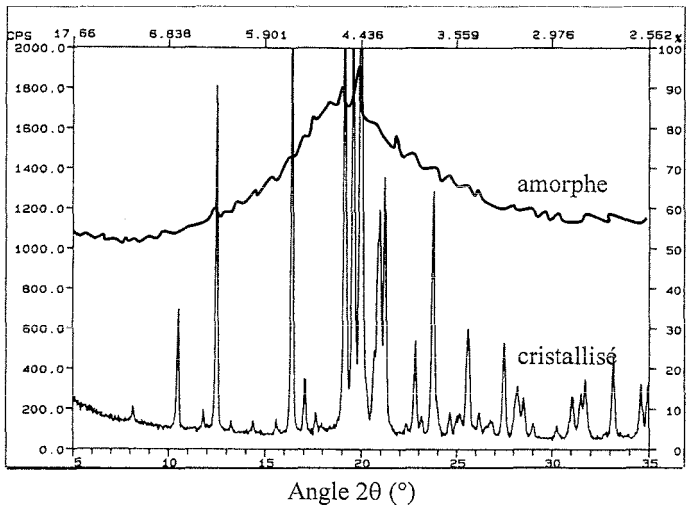


Figure I.19 : Spectres de diffraction des rayons X du lactose amorphe et cristallisé, d'après Briggner *et al.*, 1994.

L'état amorphe, qui correspond à un arrangement aléatoire des molécules, génère une faible dispersion cohérente du signal photonique (Drapier-Bêche, 1997). Le spectre de diffraction des rayons X d'un tel produit ne présente donc pas de pics fins bien résolus, mais plutôt un large maximum de faible intensité (figure I.19). C'est pourquoi de nombreux auteurs ont utilisé cette propriété pour caractériser l'état amorphe de la poudre de lactose (Otsuka *et al.*, 1991) et de la poudre de lait (Jouppila *et al.*, 1997).

Les différentes formes cristallines du lactose génèrent des spectres de diffraction caractéristiques, puisque l'angle de diffraction (θ) d'un faisceau diffracté par un plan cristallographique dépend de la structure cristalline du produit analysé. Les spectres de diffraction caractéristiques des différentes formes cristallines du lactose sont présentés figure I.20.

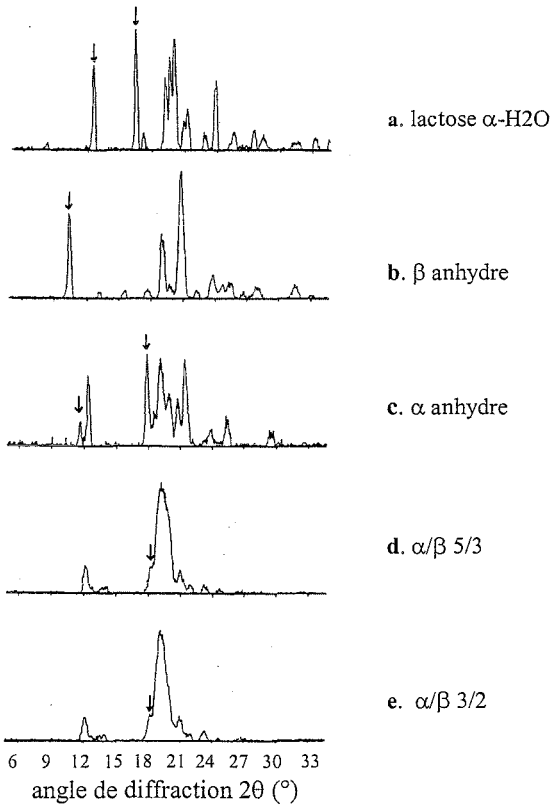


Figure I.20 : Spectres de diffraction des rayons X caractéristiques du lactose α-monohydraté (a), du lactose β anhydre (b), du lactose α anhydre (c) ; et des formes complexes α/β 5/3 (d) et α/β 3/2 (e) d'après Drapier-Bêche (1997). Les flèches indiquent les pics caractéristiques, rassemblés tableau I.10.

Le tableau I.10 présente les valeurs des angles θ de diffraction des différentes formes cristallines du lactose, correspondant à la figure I.20.

Tableau I.10 : Angles de diffraction des pics caractéristiques des formes cristallines du lactose et éventuels pics communs entre les formes, d'après drapier-Bêche, 1997.

Forme cristalline	Angle θ (°)	d_{hkl} (Å)	Pics communs
Lactose α-monohydraté	16,4°	5,41	-
	12,5°	7,08	α/β 5/3 et 3/2
Lactose β anhydre	10,5°	8,43	-
Lactose α anhydre	18°	4,93	α/β 5/3 et 3/2
	11,6°	7,43	-
Composés α/β 5/3 et 3/2	18,2°	4,87	α anhydre

Bien que certaines formes cristallines aient des pics communs, il est possible de définir des pics de diffraction spécifiques à chacune. La forme α-monohydratée diffracte fortement à l'angle θ=16,4° ; les formes α et β anhydres diffractent spécifiquement aux angles 11,6° et 10,5°, respectivement. Il n'y a que les composés α/β 5/3 et 3/2 qui ne présentent pas de pics vraiment caractéristiques et dont la détection est un peu plus délicate.

II.4.3. Spectroscopie infrarouge

L'état cristallisé du lactose peut également être déterminé par spectroscopie infrarouge. Le principe de cette technique et son application pour l'analyse du lactose dans le moyen infrarouge seront développées dans la partie matériels et méthodes.

III. Autres conséquences de la conservation de poudres laitières.

III.1. La réaction de Maillard

III.1.1. Introduction : la réaction de Maillard dans les poudres laitières

La réaction de Maillard, qui peut se développer entre des protéines et des sucres réducteurs est fréquente dans les produits laitiers, qui contiennent ces deux constituants. La réaction de Maillard comporte deux grandes étapes complexes. La première débute par la condensation de lactose sur certains acides aminés des protéines laitières (lactosylation), et mène notamment à la formation de furfurals et réductones, qui sont des composés carbonylés très réactifs. La deuxième étape comporte à la fois des réactions de dégradations (comme celle de Strecker) et de condensation. Elles entraînent la synthèse de produits de scission (tels les pyrazines et aldéhydes) qui sont volatils et odorants ; et des composés polymérisés de poids moléculaire élevé tels que les mélanoïdines qui sont responsables du brunissement non-enzymatique.
Bien que cette réaction soit essentiellement étudiée en solution dans l'eau ou dans le lait, et à hautes températures, elle est également connue pour se développer dans les poudres. Un environnement déshydraté augmente même la vitesse de cette réaction (optimum sous une a_w d'environ 0,7), surtout dans les produits lyophilisés et dans les systèmes dont la structure est effondrée, à cause de la forte concentration locale des réactants (Buera et Karel, 1995 ; Morgan *et al.*, 1998 ; Schebor *et al.*, 1999 ; Burin *et al.*, 2000).
La réaction de Maillard nuit donc à la qualité des poudres laitières, à cause du jaunissement de la poudre ou de l'apparition d'arômes « cuits », mais aussi parce que les propriétés nutritionnelles sont affectées : certains acides aminés essentiels ne sont plus disponibles puisqu'ils sont liés au lactose, et la digestibilité des protéines laitières est diminuée (El et Kavas, 1997 ; Guyomarc'h *et al.*, 2000). La réaction de Maillard pose enfin des problèmes de sécurité alimentaire puisqu'elle peut augmenter le caractère allergène des protéines, et parce qu'elle peut générer des composés cancérigènes (Friedman, 1996). Jones *et al.* (1998) ont montré que les produits de la réaction de Maillard sont formés dès l'atomisation, mais se développent aussi pendant la conservation de poudres de lait entier.

III.1.2. La lactosylation

La première étape de la réaction de Maillard est la lactosylation. Cette réaction a en particulier été étudiée sur la β-lactoglobuline (Nacka *et al.*, 1998 ; Morgan *et al.*, 1998). Cette réaction

correspond à la formation d'une base de Schiff entre les fonctions carboxyles réductrices (OH) du lactose, et les groupements amines (NH_2) de la protéine (Guyomarc'h *et al.*, 2000). Cette étape génère un composé d'Amadori stable, comme par exemple le ε–N-desoxylactulosyl-D-lysine, dans le cas de la réaction avec un résidu lysine. La figure I.21 précise le déroulement de cette réaction.

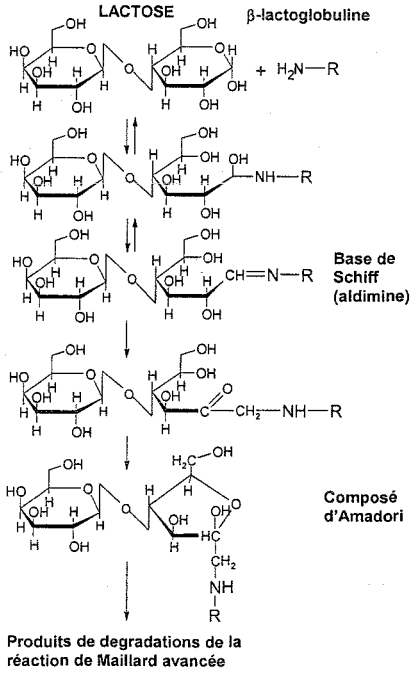


Figure I.21 : Lactosylation de la β-lactoglobuline: formation de ε–N-desoxylactulosyl-D-lysine (communément appelé « lactulosyl-lysine »).

La β-lactoglobuline subit souvent une lactosylation multiple, due à la réactivité préférentielle de certains résidus lysines exposés à sa surface (Burr *et al.*, 1996 ; Morgan *et al.*, 1998 ; French et Harper, 2001 ; Chevalier *et al.*, 2002). En moyenne, la lactosylation à l'état déshydraté effectuée à 60°C mène à la condensation de 7,7 molécules de lactose par β-lactoglobuline et produit des formes lactosylées hétérogènes (Morgan *et al.*, 1998 et 1999 ; Gauthier *et al.*, 2001 ; French et Harper, 2002).

La température, surtout lorsqu'elle dépasse 20°C, augmente fortement la vitesse de lactosylation (Fairise *et al.*, 1999). L'humidité relative favorise aussi la réaction de Maillard, surtout aux activité de l'eau proches de 0,6-0,7, tandis qu'une forte humidité relative dilue les

composés réactifs (Troyano *et al.*, 1994 ; Morgan *et al.*, 1999). La lactosylation dépend enfin de la protéine impliquée dans la réaction. Par exemple, la lactosylation de la caséine β semble moins dépendre de la teneur en eau, que la lactosylation de la β-lactoglobuline. Cela semble lié à l'hydrophobicité plus importante de la caséine β, qui serait accessible au lactose de manière identique quelle que soit la teneur en eau (Guyomarc'h *et al.*, 2000).

La lactosylation est suivie de nombreuses autres réactions chimiques qui produisent des composés de dégradation variés. Parmi ceux-ci, la furosine (furoyle-méthyle-lysine) est un indicateur des dommages thermiques subis par une poudre laitière. Sa teneur est reliée, de manière non proportionnelle, à la quantité de β-lactoglobuline lactosylée (Friedman, 1996 ; Van Renterghem et De Block, 1996 ; Villamiel et Corzo, 2000 ; Fenaille *et al.*, 2003). L'hydroxyméthyl-furfural (HMF) est un produit de dégradation avancée qui est également un bon indicateur de la réaction de Maillard (Troyano *et al.*, 1994 ; Mistry et Pulgar, 1996 ; Villamiel et Corzo, 2000).

III.1.3. Le brunissement non-enzymatique

Le brunissement non-enzymatique est également un indicateur visible de l'avancement de la réaction de Maillard. Le brunissement d'une poudre laitière pendant sa conservation est dû à la fois à de petites molécules (les composés d'Amadori) et à des molécules de haut poids moléculaire comme les mélanoïdines, formées par polymérisation de composés de dégradation avancée (Morales et Van Boekel, 1998).
L'étendue du brunissement est liée à la teneur en lactose des poudres laitières et la vitesse de brunissement non-enzymatique dépend fortement de la température et de l'activité de l'eau de la poudre (Mistry et Pulgar, 1996 ; Burin et al, 2000).

La figure I.22 représente les vitesses de brunissement d'un système modèle en fonction de (T-Tg) et décrit donc l'influence des paramètres de température et d'a_w sur le brunissement.

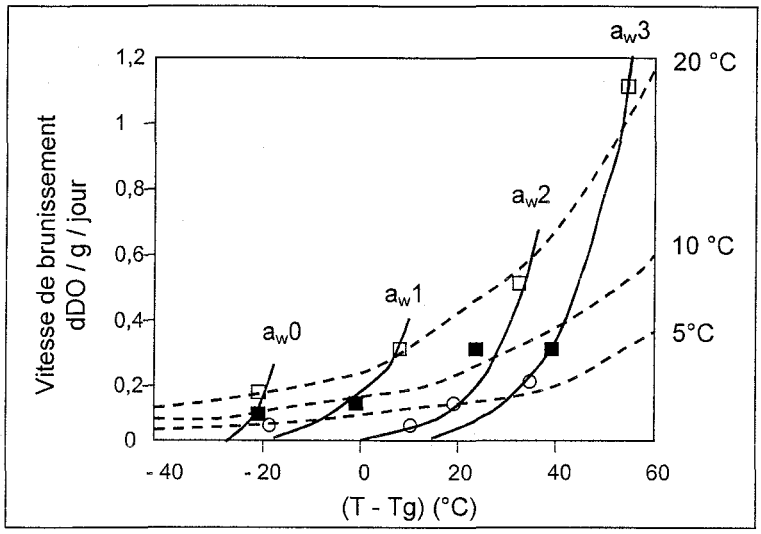


Figure I.22 : Vitesse de brunissement non-enzymatique d'un système modèle en fonction de la différence (T-Tg) entre les températures de conservation et de transition vitreuse. Le modèle est constitué de maltodextrine, xylose et lysine. Les températures d'expérience sont — ○ — · 5°C; — ■ — 10°C; — —□— ·20°C . Les lignes continues représentent les vitesses de brunissement pour des activités de l'eau données, telles que : $a_w0<a_w1<a_w2<a_w3$. A 23°C on a $a_w0=0,54$, $a_w1=0,66$; $a_w2=0,77$; $a_w3=0,86$ (Roos et Himberg, 1994).

Pour une température expérimentale donnée (courbes en pointillés), la vitesse de brunissement augmente avec l'a_w de l'échantillon. Pour des échantillons conservés à une même humidité relative (courbes en traits pleins), la vitesse de réaction augmente avec la température de conservation (Karmas et Karel, 1994 ; Roos et Himberg, 1994).

La vitesse de brunissement étant très liée à la viscosité du système, elle dépend aussi de la température de transition vitreuse d'un échantillon (Karel et Buera, 1994). Cependant, si un système est placé dans des conditions d'a_w et de température différentes, mais qui sont telles qu'un écart constant (T-Tg) existe entre les températures de conservation et de transition vitreuse, la vitesse de brunissement n'est pas identique (figure I.22). Elle augmente avec l'augmentation de la température de stockage, ou lorsque le système est en présence de moins d'eau (diminution d'a_w). L'accélération du brunissement n'est pas seulement lié à un écart précis de température au-delà de Tg. La vitesse de brunissement n'est donc pas uniquement corrélée à la Tg de l'échantillon, mais elle dépend également de la modification des coefficients de diffusion, ou des conditions de conservation car celles-ci peuvent orienter les réactions multiples de la dégradation de Maillard et les produits formés (Karmas *et al.*, 1992 ; Roos et Himberg, 1994 ; Buera et Karel, 1995 ; Burin *et al.*, 2000).

Pour mesurer le brunissement non-enzymatique d'une poudre laitière, plusieurs techniques sont possibles. Certains auteurs ont dosé par des méthodes spectrophotométriques des composés de dégradation comme les pigments bruns qui absorbent à la longueur d'onde spécifique de 420 nm (Karmas *et al.*, 1992). D'autres utilisent un appareil de mesure des paramètres colorimétriques L, a et b (Celestino *et al.*, 1997b ; Nielsen *et al.*, 1997). Pour la mesure de la couleur des poudres de lait, les paramètres L et b sont principalement utilisés (Stapelfeldt *et al.*, 1997). Les variations du paramètre b au cours de la conservation d'une poudre laitière dépendent cependant des conditions choisies pour la mesure: lorsque la mesure est effectuée directement sur la poudre, la valeur de b d'une poudre de lait entier augmente pendant sa conservation, alors que lorsque la mesure est effectuée sur le lait reconstitué à partir de la poudre, la valeur de b peut au contraire diminuer (Celestino *et al.*, 1997b ; Stapelfeldt *et al.*, 1997).

Il faut noter que la valeur de b d'une poudre de lait fraîchement produite peut être très variable, car ce paramètre dépend de nombreux facteurs tels que la teneur en matière grasse du lait, les conditions climatiques, etc. (Rattray et Jelen, 1996).

III.1.4. Conséquences sur les propriétés physiques et fonctionnelles

Solubilité

La réaction de Maillard altère les propriétés fonctionnelles des poudres de lait, en particulier leur solubilité (Van Mil et Jans, 1991 ; Zbikowski *et al.*, 1993 ; Celestino *et al.*, 1997a ; Schebor *et al.*, 1997). Par exemple, Stapelfeldt *et al.* (1997) ont établi une corrélation entre la perte de solubilité d'une poudre de lait entier lors de sa conservation et l'augmentation de sa teneur en hydroxyméthyl-furfural (HMF). La lactosylation, première étape de la réaction, ne semble pas directement responsable de cette diminution de solubilité car les fractions solubles et insolubles de la β-lactoglobuline présentent le même degré de lactosylation (Morgan *et al.*, 1999).

Lors de la conservation de poudres laitières, des groupements sulfhydryles libres sont exposés à la surface des protéines et peuvent être oxydés en ponts disulfures intra ou inter-moléculaires (Gezimati *et al.*, 1997 ; Arakawa *et al.*, 2001). Cette réaction peut entraîner la polymérisation des protéines entre elles, ou avec d'autres composés de dégradation de Maillard. Cayot et Lorient (1998) ont par exemple constaté que la quantité de β-lactoglobuline polymérisée ou de polymères de β-lactoglobuline/α-lactalbmine augmente pendant la conservation d'isolats de protéines sériques. Les agrégats de hauts poids

moléculaires ainsi formés semblent à l'origine de la diminution de la solubilité des poudres laitières pendant leur conservation (Baldwin et Ackland, 1991 ; Van Mil et Jans, 1991 ; Zbikowska et Szerszunowicz, 1999 ; Dziuba et Darewicz, 2000).

Propriétés émulsifiantes et moussantes

Les propriétés émulsifiantes des poudres laitières vont être altérées par les interactions protéines-protéines liées à la réaction de Maillard, car celles-ci mènent à la formation d'agrégats (Euston et Hirst, 1999). De nombreuses études montrent que le déplissement partiel des protéines qui a lieu lors de leur lactosylation augmente leur aptitude à stabiliser des surfaces, donc leurs propriétés émulsifiantes et moussantes (Ibrahim *et al.*, 1993 ; Hunt et Dalgleish, 1994 ; Nacka *et al.*, 1998). Cependant, cette lactosylation « douce » n'est possible que dans des conditions expérimentales contrôlées, très différentes de celles de la production puis de la conservation classique des poudres laitières. A l'état déshydraté, les protéines ont par exemple tendance à être fortement lactosylées (Morgan *et al.*, 1999).

La réaction de Maillard va donc diminuer la solubilité et les propriétés émulsifiantes et moussantes des poudres laitières pendant leur conservation.

III. 2. Agglomération des particules

L'agglomération des particules est un problème crucial pour les industriels car une poudre laitière qui présente un mauvais écoulement est considérée comme de mauvaise qualité par les consommateurs. Le terme « agglomération » regroupe l'effondrement de la structure des particules ('collapse' en anglais), l'adhérence ('stickiness') et le mottage ('caking'). Dans la littérature, les auteurs sont parfois en désaccord sur la définition des termes d'agglomération car les trois phénomènes : effondrement, adhérence et mottage, sont très liés et interviennent souvent simultanément dans une poudre. Il semble néanmoins que l'effondrement soit la première étape d'agglomération, au cours de laquelle les particules s'écrasent, augmentant le nombre de contacts entre elles. Les particules ont alors tendance à être plus cohésives (collage) avant d'adhérer fortement les unes aux autres (mottage) (Chuy et Labuza, 1994 ; Thomas *et al.*, 2004a).

III.2.1. Effondrement de la structure des particules ('collapse')

La structure d'une poudre s'effondre lorsque ses particules ne sont plus assez rigides pour supporter leur propre poids. Le volume des vacuoles inclus dans les particules diminue alors,

jusqu'à une déstructuration complète dans les cas les plus extrêmes (Chuy et Labuza, 1994 ; Aguilera *et al.*, 1995 ; Lloyd *et al.*, 1996 ; Rennie *et al.*, 1999). L'effondrement est lié à la transition vitreuse d'une poudre et aux changements de viscosité qui l'accompagnent, car lorsque la viscosité atteint 10^6-10^8 Pa.s, la fluidisation du matériau est possible, d'où sa densification par des forces capillaires (Downton *et al.*, 1982; Bhandari et Howes, 1999 ; Champion *et al.*, 2000).

La température où l'effondrement de la poudre se produit semble dépendre de la méthode expérimentale utilisée (Levi et Karel, 1995 ; Newell *et al.*, 2001).

Il ne semble pas possible de mesurer une température précise d'effondrement, puisque ce phénomène n'est pas instantané. L'effondrement, qui a souvent été étudié est en fonction de la différence (T-Tg) entre la température d'étude et la température de transition vitreuse, apparaît généralement à une température de 10 à 20°C supérieure à Tg. Comme Tg, la température d'effondrement diminue lors d'une conservation sous forte humidité relative à cause de l'effet plastifiant de l'eau (Chuy et Labuza, 1994 ; Levi et Karel, 1995 ; Champion *et al.*, 2000). Les particules de toutes les poudres laitières sont effondrées lorsque l'activité de l'eau dépasse 0,55. En pratique, l'a_w critique d'effondrement des particules d'une poudre correspond à l'activité de l'eau obtenue lorsque sa température de conservation égale sa température de transition vitreuse (Chuy et Labuza, 1994). Comme la température de transition vitreuse, la température d'effondrement est augmentée en présence de molécules de fort poids moléculaire qui améliorent ainsi la stabilité de la poudre. Une poudre de lait infantile contenant des maltodextrines a par exemple une température d'effondrement plus élevée qu'une poudre de lait classique (Chuy et Labuza, 1994). Comme tous les phénomènes liés à la transition vitreuse, l'effondrement est dépendant du temps, et sa vitesse suit une équation de type WLF (Levi et Karel, 1995 ; Champion *et al.*, 2000).

III.2.2. Adhérence des particules et mottage (« sticking » et « caking »)

L'eau adsorbée par les poudres laitières au cours de leur conservation provoque l'adhérence puis le mottage des particules, qui peuvent être considérés comme le début et l'état avancé d'un même phénomène d'agglomération (Chung *et al.*, 2000). L'eau condensée à la surface des particules dissout les composants laitiers et diminue localement la viscosité et la température de transition vitreuse, ce qui va favoriser la cohésion des particules (Prentice, 1992 ; Lloyd *et al.*, 1996 ; Bhandari et Howes, 1999 ; Rennie *et al.*, 1999 ; Teunou et

Fitzpatrick, 1999). L'eau forme des ponts liquides inter-particulaires, dont la force est cinquante fois plus importante que celle des interactions de Van der Waals (Aguilera *et al.*, 1995 ; Netto *et al.*, 1998). La diffusion moléculaire et la cristallisation du lactose sont amplifiées, spécialement au niveau des ponts liquides. La cristallisation du lactose se produit entre les particules, formant des ponts solides, qui augmentent le mottage des poudres et modifient leur rhéologie : les particules deviennent plus dures (Teunou et Fitzpatrick, 1999 ; Rennie *et al.*, 1999 ; Özkan *et al.*, 2002 et 2003).

Les méthodes utilisées pour mesurer la température d'adhérence des poudres (« sticky point ») sont généralement rhéologiques. Il s'agit par exemple de pénétrométrie effectuée sur les poudres mottées ou du suivi des modifications de l'écoulement des poudres avec un capteur mécanique ou optique (Chuy et Labuza, 1994 ; Lockemann, 1999 ; Hennigs *et al.*, 2001 ; Özkan *et al.*, 2002 et 2003).

Plusieurs auteurs s'accordent sur le fait que la température d'adhérence suit les mêmes variations que Tg, sans être exactement superposable à la courbe de Tg en fonction de l'activité de l'eau (Champion *et al.*, 2000 ; Hennigs *et al.*, 2001). Ozmen et Langrish (2002) ont montré que la différence entre ces deux courbes est surtout due à la technique utilisée, qui est calorimétrique pour la détermination de Tg, et mécanique pour la température d'adhérence.

L'équation (4) utilisée pour la détermination de la Tg du lactose a donc été adaptée par Hennigs *et al.* (2001) pour le calcul de la température d'adhérence de poudres de lait écrémé (équation (5)).

$$Tg = \frac{w_L \cdot Tg(l) + k \cdot w_W \cdot Tg(w)}{w_L + k \cdot w_W} \qquad (4)$$

$$Tc = \frac{Tg(mp) + k \cdot X \cdot Tg(w)}{1 + k \cdot X} + d \qquad (5)$$

avec : Tg: Température de transition vitreuse du lactose
w_L and w_W: Fractions massiques du lactose et de l'eau
k: Indice de courbure (= 7,4 pour du lactose pur)
Tg(l): Température de transition vitreuse du lactose anhydre
Tg(w): Température de transition vitreuse de l'eau.
Tc: Température d'adhérence
Tg(mp): Température de transition vitreuse du lait écrémé anhydre
X: fraction de l'eau par rapport à la matière sèche.
d: coefficient de différence de température (=23,3 K pour les poudres de lait écrémé).

Si l'on compare ces deux modèles, on constate que bien qu'un coefficient de différence de température «d» soit ajouté à l'équation (4), l'indice de courbure (k) est identique à celui utilisé pour le calcul de la Tg du lactose. Le lactose est donc le composé principalement responsable du caractère collant d'une poudre laitière.

Le temps de relaxation de ce phénomène, enfin, est proportionnel à la différence (T-Tg) ; il suit donc l'équation WLF (Aguilera *et al.*, 1995).

III.2.3. Importance des composants du lait

Le lactose et la matière grasse influencent particulièrement l'agglomération des particules de poudres laitières.

Lactose

Le lactose est le composant principalement responsable du caractère collant des poudres laitières (Hennigs *et al.*, 2001). Le rapport lactose amorphe/cristallisé augmente aussi la tendance d'une poudre à s'agglomérer car le lactose amorphe est plus hygroscopique que ses formes cristallines (Chuy et Labuza, 1994 ; Jouppila et Roos, 1994b ; Jayaprakasha, 1995).

Matière grasse laitière

La présence de matière grasse influence directement l'agglomération des particules de poudres laitières et les poudres de lait entier sont plus cohésives que les poudres de lait écrémé (Buma, 1971 ; Rennie *et al.*, 1999).

La matière grasse laitière à la surface des particules est partiellement liquide à température ambiante et forme des ponts liquides, qui augmentent la surface de contact entre les particules. Une observation de microscopie confocale effectuée par Mac Kenna (1997) confirme ce fait : de nombreux globules gras sont visibles aux points de contacts entre les particules de poudres de lait entier. Les ponts liquides formés peuvent devenir solides si la matière grasse recristallise (Buma, 1971 ; Rennie *et al.*, 1999).

III.2.4. Conséquences sur les propriétés physiques et fonctionnelles

Densité

Plusieurs auteurs relient le phénomène d'agglomération à l'augmentation de la densité vrac d'une poudre laitière, ainsi qu'à l'augmentation de densité des particules, c'est-à-dire que les particules ne se tassent pas uniquement sous leur propre poids mais elles sont également déformées lors de l'effondrement, ce qui se traduit par une diminution de la porosité et du volume d'air inclus dans la particule (Aguilar et Ziegler, 1994b ; Lloyd *et al.*, 1996).

Aptitude à l'écoulement

L'agglomération non maîtrisée des particules et leur déformation diminuent fortement la coulabilité d'une poudre laitière, car les particules dont les formes sont devenues irrégulières peuvent s'enchevêtrer les unes aux autres et développer des forces mécaniques qui ralentissent l'écoulement (Prentice, 1992). La formation des ponts liquides qui accompagne les phénomènes de mottage est la principale source de cohésion d'une poudre (Buma, 1971 ; Prentice, 1992).

Dispersibilité et solubilité

L'effondrement des particules et le mottage altèrent complètement la microstructure des poudres laitières et par conséquent les propriétés de dissolution, qui sont directement liées à la surface de contact entre particules et eau (Fäldt et Bergenstahl, 1996b). Les relations entre la structure des poudres de lait et leur aptitude à la re-dissolution, encore peu étudiées, semblent complexes car des poudres laitières avec des structures similaires ont parfois des propriétés fonctionnelles très différentes (Mistry et Hassan, 1991). Les déformations de la micro-structure des particules semblent plus altérer les premières étapes de la dissolution (dispersibilité, mouillabilité) que la solubilité (Downton *et al.*, 1982 ; Yetismeyen et Deveci, 2000).

Le mottage génère aussi d'importantes contraintes mécaniques, qui peuvent perturber la structure des molécules et altérer la solubilité des protéines. Belloque et Smith (1998) ont détecté par résonance magnétique nucléaire (RMN) une ouverture de la structure native de la β-lactoglobuline lors de l'application de forces de cisaillement. Bien que cette expérience soit conduite en solution, il est possible qu'une dénaturation protéique se produise lors de l'effondrement des particules (Celestino *et al.*, 1997b ; Mac Kenna *et al.*, 1999 et 2000).

III. 3. Autres conséquences biochimiques et biologiques

De nombreuses autres modifications, notamment biochimiques et biologiques, interviennent pendant la conservation de poudres laitières et altèrent les propriétés physiques et fonctionnelle de ces poudres. Parmi celles-ci, on peut citer l'oxydation de la matière grasse, les réactions enzymatiques telles que la lipolyse ou la protéolyse, le développement de moisissures et de micro-organismes lorsque la poudre est conservée sous forte humidité relative (Celestino *et al.*, 1997a et 1997b ; Mac Cluskey *et al.*, 1997 ; Liang *et al.*, 2000 ; Thomas *et al.*, 2004a).

PARTIE 2 :

MATERIELS ET METHODES

I. Caractérisation des poudres commerciales et production des poudres modèles

I.1. Caractérisation des poudres commerciales

Les poudres commerciales utilisées dans cette étude sont le lactose alpha-monohydraté (Prolabo, France) et la beta-lactoglobuline (Davisco, Eden Prairie, MN, USA).

I.1.1. Dosages physico-chimiques

Plusieurs dosages physico-chimiques ont été réalisés sur les échantillons de poudres commerciales afin de les caractériser.

Teneur en eau

La teneur en eau des poudres a été déterminée selon la norme AOAC 927.05. Environ 1 g de poudre a été mélangé à du sable de Fontainebleau préalablement séché et placé dans des coupelles métalliques de 5 cm de diamètre environ. Les coupelles sont placées dans une étuve à 103°C dont l'atmosphère est asséchée par la présence de cristaux de silicium, jusqu'à stabilisation du poids des échantillons, c'est-à-dire 5h pour la poudre de β-lactoglobuline et 6h30 pour le lactose.

Activité de l'eau

L'activité de l'eau des poudres commerciales a été déterminée en plaçant des échantillons d'environ 1 g de poudres quelques jours à 20°C sous des a_w comprises entre 0,11 et 0,54 selon la méthode des micro-climats (Landrock et Proctor, 1951). La régression linéaire obtenue à partir des quantités d'eau adsorbées et désorbées par la poudre en fonction de son a_w de conservation ont permis de calculer l'a_w où la variation de poids de l'échantillon est nulle (c'est-à-dire son a_w initiale).

Taux de cendres

La teneur en cendres a été déterminée suivant la nome officielle AACC 08-01, par minéralisation de 1 à 1,5 g de poudre à 550°C pendant 12h dans un four Nagat (Trignac, France). Le poids restant après minéralisation permet le calcul du taux de cendres.

Matière grasse

La teneur en matière grasse a été déterminée suivant la méthode de Röse-Gottlieb en utilisant un butyromètre de Pien. A 1 g de poudre ont été ajoutés 10 ml d'eau et 1 ml d'ammoniaque concentré (23°Be). Après agitation, 10 ml d'alcool éthylique à 95°, 25 ml d'éther diéthylique puis 25 ml d'éther de pétrole sont ajoutés successivement, avec à chaque étape une agitation

douce du butyromètre et un dégazement. Après 2h environ de décantation, la phase supérieure éthérée est transférée dans un ballon préalablement taré, puis évaporée sous une hotte aspirante. Le ballon est finalement séché à 103°C pendant 30 minutes avant d'être pesé. La teneur en matière grasse est exprimée en g pour 100 g de poudre.

Minéraux

La concentration en éléments sodium, potassium, calcium et magnésium a été déterminée par spectroscopie d'absorption atomique après solubilisation des cendres de 1 g de poudre en milieu acide. Les cendres sont traitées avec 10 ml d'acide chlorhydrique (1N) puis complétées à 100 ml avec de l'eau distillée. Le dosage du magnésium et du calcium nécessite l'ajout de 10 ml de solution de chlorure de lanthane ($LaCl_3$). L'appareil utilisé est un spectromètre d'absorption atomique AAS 1100 (Perkin-Elmer, Wellesley, Ma, USA) alimenté par une flamme air-acétylène.

Le tableau II.1 présente l'ensemble des résultats physico-chimiques :

Tableau II.1 : Caractéristiques physico-chimiques des poudres commerciales utilisées pour l'étude.

	LACTOSE	BETA-LACTOGLOBULINE
Protéines (%)	/	93,2 ±1
Matière grasse (%)	/	0,3 ±0,1
Cendres (%)	0,1 ±0,07	2,3 ±0,1
Teneur en eau (%)	4,3 ±0,3	5,1 ±0,3
Minéraux: (mg/100g poudre)		
Mg	0,6 ±0,3	2,2 ±0,3
Ca	3,3±0,3	18,6 ±1
Na	8,9±0,5	32 ±1
K	8±0,5	47,4 ±1
a_w	0,29±0,2	0,12±0,2

I.1.2. Pureté de la β-lactoglobuline

Dosage des protéines

La teneur en protéines totales a été dosée selon la méthode de Kjeldahl. Une minéralisation préalable est effectuée par ajout de 2 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4), de 1 ml d'eau oxygénée (H_2O_2) et d'environ 1 g de catalyseur (Na_2SO_4 + $CaSO_4$ + Se), sur des échantillons de 0,5 à 1 g de poudre. Après un chauffage à 400°C pendant 2h, la teneur en azote est

déterminée par titrimétrie par de l'acide sulfurique 0,01 N. La distillation a été effectuée au moyen d'un appareil semi-automatique GERHARDT (Paris, France). Les résultats sont exprimés en g d'azote pour 100 g de matière sèche et correspondent à la moyenne de trois essais indépendants. La teneur en protéines totales a enfin été calculée en multipliant le résultat par un facteur de transformation de 6,38.

La teneur en protéines de la poudre commerciale de β-lactoglobuline est de 93,2%.

Teneur en β-lactoglobuline

La poudre commerciale de β-lactoglobuline a été analysée au centre de recherche Nestlé à Lausanne (équipe de C. Schmitt) par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les résultats nous indiquent que les protéines contenues dans ce lot de poudre sont majoritairement de la β-lactoglobuline de génotype A et B (98,2%) et très peu d'alpha-lactalbumine (1,6%). La poudre de protéine Davisco utilisée pour cette étude est donc très pure.

Courbe de solubilité en fonction du pH

Les courbes de solubilité de ce lot de poudre en fonction du pH ont été déterminées au laboratoire, à partir de dosages d'azote et de dosage par spectrophotométrie. Les résultats montrent que la solubilité de la β-lactoglobuline est minimale (agrégation maximale d'environ 13%) pour un pH de 5.

I.2. Préparation des poudres modèles par lyophilisation

I.2.1. Poudres modèles

Les poudres laitières modèles (**poudres BL**) ont été préparées par co-lyophilisation de solutions de lactose (Prolabo, France) avec des quantités croissantes de solutions de β-lactoglobuline (Davisco, MN, USA).

Des solutions à 10% (p/v) de lactose et de β-lactoglobuline ont été préparées dans de l'eau distillée. Les solutions ont été agitées jusqu'à dissolution complète des composés. Les solutions ont ensuite été soit lyophilisées directement, soit mélangées extemporanément pour obtenir des ratios β-lactoglobuline : lactose de 2:98, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70 et 40:60 (v/v). Ces ratios ont été choisis car ils sont proches de ceux du lactosérum (qui contient environ 10-15% de protéines et jusqu'à 75-80% de lactose) et des concentrés de protéines sériques (qui

peuvent contenir 30-40% de protéines sériques). Le ratio 2:98, enfin, correspond environ au rapport molaire 1:1.

Des fractions de 75 ml des différentes solutions ont été réparties dans des ballons de 500 ml afin d'être congelées rapidement dans un bain réfrigérant à -30°C. Les échantillons congelés ont été conservés 12h à -30°C puis lyophilisés pendant 48h avec un appareil Lyovac GT3 (Leybolg-Heraeus®, Orsay, France). Les échantillons de poudre ont ensuite été conservés une semaine dans un dessicateur, sur du P_2O_5 pour achever leur déshydratation. Il a été vérifié que le temps nécessaire pour atteindre l'état sec était inférieur à 1 semaine.
Les poudres obtenues sont donc soit du lactose (L) et de la β-lactoglobuline (B) lyophilisés, soit des « **poudres modèles BL** » qui, selon leur composition, ont été appelées : **BL(2:98), BL(5:95), BL(10:90), BL(20:80), BL(30:70) et BL(40:60)**.

Tous les échantillons séchés ont subit une analyse thermique différentielle pour garantir l'état amorphe du lactose qu'ils contiennent. Les lots de poudres ne satisfaisant pas cette condition ont été écartés.

I.2.2. Poudres spécifiques

Des échantillons ont également été produits par mélange de poudres de lactose et de β-lactoglobuline lyophilisées séparément. Les poudres obtenues sont appelées « B+L ». Par exemple, le mélange de x % de β-lactoglobuline avec y % de lactose lyophilisé a été appelé B(x)+L(y).

Des tests de pH ont été menés sur plusieurs poudres. Le pH des solutions a été modifié avant l'étape de lyophilisation, par ajout de NaOH (0,1M) à une solution de lactose ; et par ajout de HCl (0,1M) à une solution de lactose et β-lactoglobuline (B:L(10:90)).

Enfin, une poudre modèle spécifique a été produite à partir de β-lactoglobuline modifiée chimiquement par des sulfites. Pour cela, du Na_2SO_3 a été ajouté à une solution à 10% de β-lactoglobuline, qui a ensuite été agitée plusieurs heures à température ambiante. D'après Fenaille *et al.*, 2003), chaque molécule de β-lactoglobuline possède 17 sites possibles pour la lactosylation. Nous avons donc introduit dans la solution une proportion de 20 moles de

Na_2SO_3 par mole de protéine pour bloquer ses sites réactifs. Le mélange avec la solution de lactose a été effectué juste avant la lyophilisation.

II. Conservation des poudres et observation de leurs modifications physico-chimiques

Pour assurer leur stabilité après lyophilisation, les poudres sont maintenues sur du $\mathbf{P_2O_5}$, ce qui correspond à une activité de l'eau environ égale à 0. Dans la présentation des résultats, cet état est appelé « **avant conservation** » , ou « **conservation à a_w nulle** ». Les poudres placées dans ces conditions sont les « t0 », témoins des expériences de conservation.

Les poudres ont alors été conservées pendant 3 mois à 20±1°C sous des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,95.

II.1. Etablissement des courbes isothermes de sorption d'eau

II.1.1. Activité de l'eau

Lorsqu'un échantillon est conservé dans une enceinte à une température constante et sous une pression relative d'eau (P/P_0) donnée, il s'équilibre avec son environnement, jusqu'à ce qu'il y ait égalité des potentiels chimiques de l'eau en phase vapeur et de l'eau qu'il contient. L'activité de l'eau (a_w) est la grandeur thermodynamique traduisant cet équilibre. En assimilant la vapeur d'eau à un gaz parfait, on considère que l'a_w est sensiblement égale à la pression relative de vapeur d'eau : $a_w \approx P / P_0$.
A l'équilibre, l'activité de l'eau correspond environ à l'humidité relative ambiante et on a :
$a_w \approx HR / 100$

II.1.2. Courbes isothermes de sorption

Les courbes isothermes de sorption représentent l'évolution de la teneur en eau d'un échantillon placé à une température fixée, en fonction de son a_w de conservation.
Les isothermes de sorption des protéines et de la plupart des produits alimentaires sont de type II selon la classification BET (Brunauer, Emmet et Teller, 1938) ; c'est-à-dire de forme sigmoïde. Ils sont généralement déterminés par la méthode des microclimats (Landrock et Proctor, 1951).

II.1.3 Mode opératoire

Les échantillons des poudres étudiées, préalablement séchés sur du P_2O_5, ont été placés 12 semaines à 20±1°C dans des enceintes hermétiques contenant des solutions salines saturées, correspondant à des humidités relatives d'équilibre comprises entre 11% et 95%. La figure II.1 schématise le montage effectué et le tableau II.2 présente les sels utilisés dans cette étude et l'activité de l'eau des solutions correspondantes à 20°C.

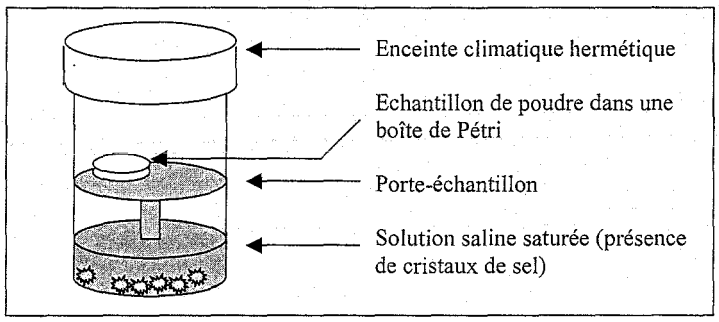


Figure II.1 : Schéma de l'enceinte climatique utilisée pour la mesure de sorption de l'eau

Tableau II.2 : Sels choisis pour l'établissement des courbes isothermes de sorption d'eau à 20°C, et activité de l'eau (a_w) correspondante, d'après Greenspan (1977)

Sels	a_w correspondante	Sels	a_w correspondante
LiCl	0,113	$Mg(NO_3)_2$	0,545
CH_3COOK	0,231	NaBr	0,587
$MgCl_2$	0,331	NaCl	0,756
NaI	0,392	KCl	0,851
K_2CO_3	0,432	KNO_3	0,946

Deux à trois échantillons de 0,5 à 1 g de toutes les poudres étudiées ont été placés à chaque activité de l'eau. La quantité d'eau adsorbée par les échantillons a été mesurée par gravimétrie avec une précision de 0,1 mg. Les échantillons ont en général été pesés chaque semaine, sauf dans le cas des études cinétiques où les pesées ont parfois été effectuées après plusieurs heures ou plusieurs jours. Lorsque l'équilibre a été atteint, les courbes isothermes de sorption d'eau ont été établies à partir du pourcentage d'eau adsorbée à chaque a_w (g d'eau pour 100 g de matière sèche).

II.2. Observations macroscopiques et microscopiques

II.2.1. Mesure de couleur

Principe

L'évolution de la couleur des poudres a été mesurée en utilisant un appareil microflash® 200d (Datacolor International). Ce colorimètre permet de déterminer les paramètres de l'espace chromatique CIE L*a*b*, définit par la commission internationale de l'éclairage. Ce système de paramètres L, a et b a pour avantage de représenter des différences égales de couleur perçue par des distances égales sur le diagramme de chromaticité (contrairement à l'espace Xxy). Le paramètre L correspond à la clarté (luminance), tandis que a et b sont les indices chromatiques vert-rouge et bleu-jaune. Comme l'indique la figure II.2, plus ces indices sont négatifs plus les échantillons sont verts et bleus, plus ils sont positifs et plus les échantillons sont rouges et jaunes, respectivement.

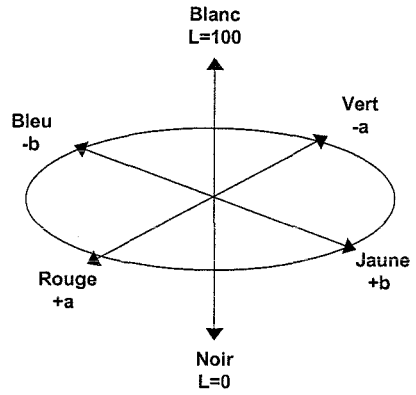


Figure II.2 : Schéma de l'espace chromatique CIE L*a*b*.

Mode opératoire

Des échantillons de 5 à 10g de poudres ont été répartis dans des boîtes de Pétri transparentes. La mesure de couleur a été effectuée avant conservation sur les poudres sèches, et après 2 mois de stockage des échantillons à 20°C sous des a_w comprises entre 0,39 et 0,85.

Après calibration de l'appareil avec les étalons noir puis blanc, la cellule de l'appareil est directement appliquée sous la boîte de Pétri contenant la poudre pour effectuer la mesure. Les résultats sont la moyenne de 4 mesures de couleur.

II.2.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'observation des échantillons de poudres a été réalisée au laboratoire de chimie minérale à la faculté des sciences – UHP Nancy 1 – Vandoeuvre-Lès-Nancy

Principe

Un faisceau très fin d'électrons, accélérés sous une tension de 10 à 30 kV balaie la surface d'un échantillon où se produisent des interactions détectées par un capteur. Les électrons secondaires et/ou rétro-diffusés sont recueillis en synchronisant la détection (mesure d'une intensité) au balayage du faisceau incident. On obtient ainsi une image de la surface. Le contraste dépend du type d'électrons sélectionnés, de la tension d'accélération appliquée et de la nature des atomes présents.

Le contraste topographique est lié est lié au taux d'électrons secondaires et à leur accès au détecteur, en fonction de la topographie. On parle par exemple de « contraste d'angle » pour distinguer les bords d'une sphère où les reliefs apparaissent plus brillants et les creux plus sombres.

Le contraste chimique est lié au facteur de diffusion de l'atome donc au numéro atomique : plus l'atome est lourd, plus le nombre d'électrons rétro-diffusés est important et plus la zone correspondante sera brillante.

Mode opératoire

Les échantillons de poudres à analyser ont été fixés sur un ruban adhésif double face monté sur un support. Une fine couche de carbone de 10 nm, puis un mélange or/palladium sont pulvérisés à la surface des particules. Les observations ont été réalisées sous vide secondaire ($\sim 10^{-5}$ torr) par rétro-diffusion des électrons secondaires (tension d'accélération de 17 kV) au moyen d'un microscope électronique à balayage Hitachi S2500.

Les échantillons observés au MEB sont des poudres lyophilisées de lactose, de β-lactoglobuline et des poudre modèles contenant 10, 20, 30 et 40% de β-lactoglobuline , qui ont été conservées 3 mois sous des a_w comprises entre 0,11 et 0,76.

III. Analyses thermiques et spectroscopiques des poudres modèles

III.1. Etude de l'état physique du lactose

L'état du lactose et les différentes formes cristallines générées dans les poudres modèles a été étudié par analyse thermique différentielle et diffraction des rayons X.

III.1.1. Analyse thermique différentielle (DSC)

Principe

Lors d'une réaction chimique ou d'un changement d'état physique (cristallisation, fusion, transition vitreuse ...), de la chaleur est soit libérée, soit absorbée. Cette chaleur correspond à une variation d'énergie qui peut être quantifiée par analyse thermique différentielle (appelée ATD dans le présent travail pour plus de facilité, mais qui correspond à la technique de DSC). Un balayage en température permet de déterminer les températures critiques auxquelles ces variations se produisent (températures de changement d'état), ainsi que la quantité d'énergie dégagée (transformation exothermique) ou consommée (transformation endothermique). Par ailleurs l'analyse est dite « différentielle » car le flux de chaleur mesuré au niveau d'un point de référence constitué par une capsule vide est soustrait à celui de l'échantillon (Figure II.3).

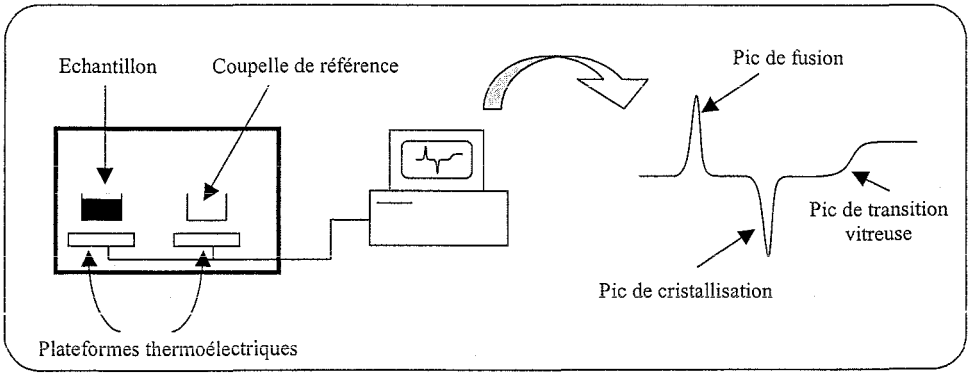


Figure II.3 : Schéma de principe de la DSC et exemple théorique de thermogramme

Les échantillons sont placés sur des plate-formes thermoélectriques qui permettent les transferts de chaleur à partir d'un four à température programmable. La différence de température entre le four, l'échantillon et la référence est contrôlée par des thermocouples de surface fixés sous les plate-formes thermoélectriques (Ozmen et Langrish, 2002).

Mode opératoire

Au cours de cette étude, les analyses sont réalisées avec un calorimètre Perkin-Elmer de type Pyris 1 (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, USA), commandé par le logiciel Pyris manager 2.0. L'appareil est calibré avec de l'indium.

Les échantillons, de 3 à 5 mg, ont été placés dans des capsules en aluminium de 50 µl non scellées. Deux répétitions au minimum ont été réalisées pour chaque échantillon. La référence est l'air (capsule en aluminium vide).

Le programme de température utilisé lors de la phase de caractérisation des poudres est le suivant : Après 1 minute à 25°C, l'échantillon est chauffé de 25 à 250°C à la vitesse de 10°C par minute, puis il est laissé 1 minute à cette température.

Chaque échantillon a subi au minimum une, et jusqu'à trois répétitions dans le cas de thermogrammes irréguliers.

III.1.2. Diffraction des rayons X

Les analyses de diffraction des rayons X ont été réalisées au laboratoire de chimie du solide minéral à la faculté des sciences Nancy 1 - UHP à Vandoeuvre-Lès-Nancy.

Mode opératoire

Les spectres de diffraction des rayons X des échantillons de poudres ont été déterminés avec un diffractomètre Philips MPD avec système X'Pert Pro, utilisé sans monochromateur, avec un accélérateur de rayons X à anticathode de cuivre, d'une tension de 40 kV et 40 mA. Les échantillons ont été exposés aux radiations K_α du cuivre (longueurs d'onde de $K_{\alpha1}$=1,54056 Å et $K_{\alpha2}$=1,54439 Å avec un ratio $K_{\alpha2}/K_{\alpha1}$ de 0,5) et la fente de divergence a une largeur de 1°.

Le diffractomètre a été réglé pour balayer de manière continue les angles Θ de 5° à 50°.

Le spectre obtenu représente l'intensité des pics de diffraction de la radiation K_α en nombre de coups ('counts') par intervalle de temps, en fonction de l'angle de diffraction Θ en degré.

Les mesures ont été effectuées sur des échantillons d'environ 800 mg de poudre, compactés sur un porte-échantillon tournant spécifique à l'appareil.

Les échantillons étudiés sont des poudres de lactose, de β-lactoglobuline et la poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline BL(10:90) conservées entre 18 jours et 2 mois à 20°C sous des a_w

nulle, intermédiaires (de 0,43 et 0,54) et forte (a_w=0,76). L'expérience a été répétée une fois pour chaque échantillon.

III. 2. Etude des interactions lactose/ β-lactoglobuline par spectroscopie infrarouge

Les analyses de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont été effectuées au laboratoire environnement et minéralurgie – ENSG-INPL à Vandoeuvre-Lès-Nancy.

III.2.1. Introduction à la spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge met en jeu des échanges d'énergie entre une molécule et un rayonnement électromagnétique et permet de quantifier les transitions entre des niveaux d'énergie vibrationnelle d'une molécule ou d'un atome. Il existe trois domaines d'infrarouge : le proche infrarouge (14283-4000 cm^{-1}) ; le moyen infrarouge (4000-400 cm^{-1}), le plus souvent exploité en chimie organique ; et le lointain infrarouge (400-10 cm^{-1}).

Il existe deux conditions principales pour qu'une radiation soit absorbée par une molécule : le faisceau incident doit être de même fréquence qu'une transition rotationnelle, vibrationnelle, électronique ou nucléaire de la molécule considérée et cette dernière doit posséder un dipôle permanent ou induit. Une énergie de 1 à 20 kcal/mole, qui correspond à l'intervalle de nombres d'onde 7000-350 cm^{-1} dans le domaine infrarouge, est suffisante pour entraîner la vibration de la molécule ou du groupe d'atomes ; ce que permet d'observer la spectroscopie dans l'infrarouge (Bertrand et Dufour, 2000).
Il existe plusieurs modes de vibration dans un groupe d'atomes : des vibrations d'élongation symétriques ou anti-symétriques, qui affectent la longueur d'une liaison atomique ; et des vibrations de déformation angulaires qui se produisent dans le plan d'une molécule ou hors du plan. La figure II.4 représente schématiquement ces modes de vibration.

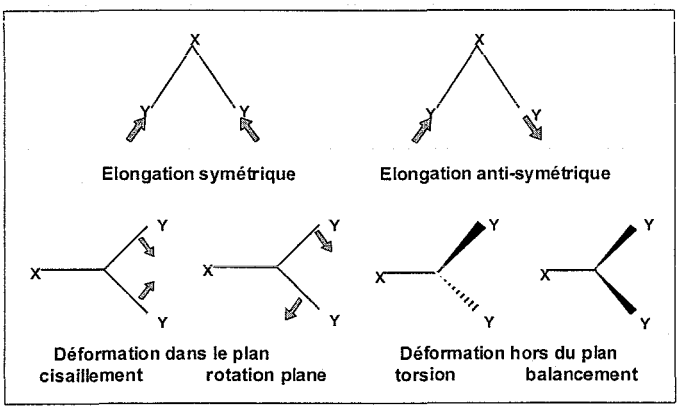


Figure II.4 : Les différents modes de vibration des liaisons inter-atomiques, d'après Dana (1999).

Dans un oscillateur, la constante de force est toujours plus grande pour les élongations que pour les déformations, c'est pourquoi les nombres d'ondes d'élongation sont toujours plus élevés que ceux de déformation.

Selon les atomes des groupement et les modes de vibration mis en jeu, la fréquence de vibration sera différente (Drapier-Bêche, 1997). Il est donc possible de corréler la fréquence de vibration avec la structure moléculaire en considérant une approche purement empirique, où les fréquences de vibration de certains groupes d'atomes peuvent être considérées comme indépendantes du reste de la molécule. En considérant les collections de spectres avec un même groupe d'atomes en commun, il est possible de trouver une ou plusieurs bandes d'absorption qui restent relativement constantes par rapport au reste de la molécule et peuvent être attribuées à ce groupe d'atomes en particulier. La figure regroupant les corrélations fréquence-structure de groupements chimiques caractéristiques est donnée en annexe 1.

III.2.2. Spectroscopie infrarouge du lactose

La spectroscopie est une technique d'analyse de routine utilisée par exemple en industrie pharmaceutique pour la caractérisation des excipients (Lane et Buckton, 2000). Plusieurs auteurs ont utilisé la spectroscopie dans le proche infrarouge pour étudier l'état cristallisé du lactose. Gombas *et al.* (2003) ont par exemple quantifié le degré de cristallinité d'une poudre de lactose α-monohydraté. De récentes études de l'état amorphe des sucres on également fait appel à la spectroscopie dans le moyen infrarouge (Ottenhof *et al.*, 2003 ; Wolkers *et al.*, 2004).

La figure II.5 compare les spectres infrarouges (région 4000-100 cm^{-1}) de tréhalose amorphe et cristallisé.

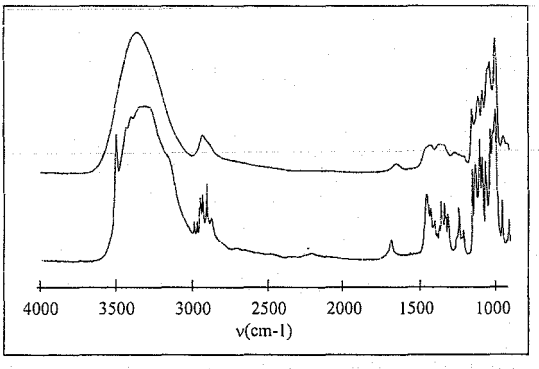


Figure II.5 : Comparaison de spectres infrarouges de tréhalose amorphe et cristallisé, d'après Wolkers *et al.*, 2004.

Le spectre du tréhalose amorphe présente de larges bandes d'absorption, alors que le spectre du tréhalose cristallisé présent des bandes plus fines, avec des pics plus intenses et mieux résolus. Wolkers *et al.* (2004) expliquent cette différence par l'homogénéité plus importante des interactions intermoléculaires dans l'état cristallisé, qui diminue la dispersion des niveaux vibrationnels. Ces auteurs ont également montré que le spectre infrarouge du tréhalose amorphe est similaire au spectre de cette molécule en solution. Les interactions par liaisons hydrogène intermoléculaires sont comparables à celles de l'état liquide.

La comparaison des spectres infrarouges de plusieurs mono et polysaccharides a permis de définir plusieurs régions caractéristiques de leurs spectres infrarouges.
La figure II.6 présente le spectre infrarouge du lactose α-monohydraté et ses différentes régions caractéristiques.

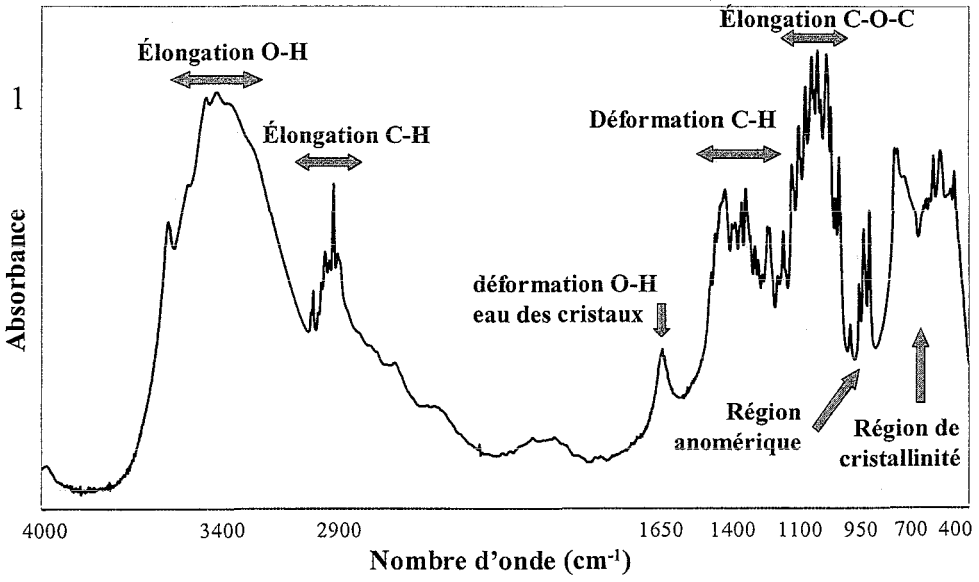


Figure II.6 : Spectre dans le moyen-infrarouge de lactose cristallisé α-monohydraté, à 20°C, et ses bandes de vibration caractéristiques.

La bande observée vers 3600-3200 cm^{-1} correspond à la vibration de la liaison C-O-H. La position et la forme de cette bande d'élongation OH (νOH) permettent de déterminer si les groupements hydroxyles OH sont libres, ou impliquées dans des liaisons hydrogène (Otsuka

et al., 1991). Lutz et van der Maas (1994) ont démontré que la position de la bande des νOH est corrélée à la distance entre deux atomes d'oxygène, et donc directement liée à la longueur des liaisons hydrogène (et à leur force). La largeur de cette bande d'absorption est aussi reliée à l'implication des OH dans des liaisons hydrogène (Bertrand et Dufour, 2000).

Les fines bandes observées à 3000-2800 cm^{-1} sont dues à l'élongation des liaisons C-H. Les deux bandes les plus distinctes pourraient être dues aux deux types de liaisons C-H présentes dans la molécule de lactose : celles des cycles glucose et galactose, et celles de la fonction méthyle alcool extérieure au cycle (Drapier-Bêche, 1997).

Le pic présent à 1700-1600 cm^{-1} est dû à la vibration d'élongation des liaisons O-H des molécules d'eau de cristallisation (Otsuka *et al.*, 1991).

Les bandes présentes à 1500-1200 cm^{-1} sont caractéristiques des vibrations de déformation des liaisons C-H dans la molécule.

La région 1200-950 cm^{-1} contient des bandes très couplées qui font principalement intervenir les vibrations d'élongation C-C et C-O, qu'elles soient endo- ou exocycliques, ainsi que les élongations non symétriques de la liaison C-O-C des cycles éther du lactose (Bertrand et Dufour, 2000).

Les vibrations inférieures à 950 cm^{-1} sont fortement couplées. Elles traduisent la vibration de l'ensemble de la molécule de lactose. **La région 950-750 cm^{-1}**, dite « anomérique », serait caractéristique de la configuration des glucides (anomères α et β) et représentative des formes pyrane et furane (Bertrand et Dufour, 2000).

La région 750-400 cm^{-1} enfin, est appelée « région de cristallinité » et caractérise les formes amorphes et cristallines des polysaccharides. Cette région est cependant délicate à interpréter car elle présente des modes de vibration fortement couplés, d'où des interférences et des recouvrements de bandes.

Bertrand et Dufour (2000) ont montré que les pics caractéristiques des spectres infrarouges des monosaccharides se situent aux nombres d'ondes : 1156, 1117, 1046, 1020 et 982 cm^{-1}, alors que ceux des polysaccharides apparaissent à 1137, 1056, 997, 990 et 926 cm^{-1}.

La comparaison des spectres infrarouges des différentes formes cristallines du lactose, purifiées, a permis à Drapier-Bêche (1997) de définir plusieurs pics caractéristiques.
Les résultats sont regroupés dans le tableau II.3.

Tableau II.3 : Bandes infrarouges caractéristiques des formes cristallisées du lactose, selon Drapier-Bêche (1997).

Nombre d'onde	Forme du lactose correspondante
1464 cm^{-1}	α/β 5/3
1425 cm^{-1}	Lα-H_2O
1435 cm^{-1}	Lα anhydre
1405 cm^{-1}	α/β 5/3 et 3/2
1325 cm^{-1}	α/β 5/3 et 3/2
1180 cm^{-1}	α/β 5/3 et 3/2
950 cm^{-1}	Lβ anhydre
915 cm^{-1}	Lα-H_2O et Lα anhydre
900 cm^{-1}	Lα-H_2O
670 cm^{-1}	Lα-H_2O

III.2.3. Spectroscopie infrarouge des protéines

La spectroscopie dans le moyen infrarouge est souvent utilisée pour l'étude des protéines, car l'analyse des spectres donne d'importantes informations sur la structure, en particulier secondaire, des protéines. En effet, la liaison peptidique qui relie les acides aminés constituant la protéines a des caractéristiques propres, différentes de celles des liaisons chimiques inter-atomiques simples ou doubles. Les conformations possibles de cette liaison peptidique sont limitées, d'où l'organisation du squelette carboné des protéines en structures secondaires répétitives, qui sont principalement les hélices α, les brins β qui s'organisent en feuillets, et les coudes. Le spectre infrarouge d'une protéine va donc présenter des bandes de vibration associées aux liaisons peptidiques, qui seront utiles pour la détermination de la structure secondaire des protéines (Singh, 2000b).

Le spectre infrarouge de la β-lactoglobuline lyophilisée est présenté figure II.7. Les bandes caractéristiques des protéines sont indiquées sur la figure et rassemblées dans le tableau II.4 qui précise les modes de vibration et les principales liaisons impliquées.

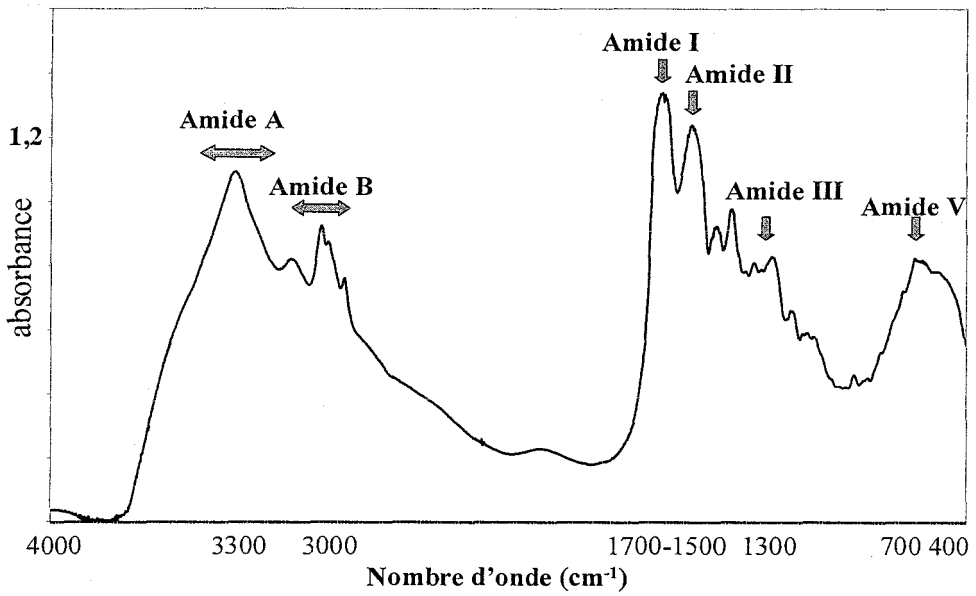


Figure II.7 : Spectre infrarouge d'une poudre de β-lactoglobuline lyophilisée, à 20°C, et ses bandes caractéristiques.

Tableau II.4 : Bandes caractéristiques de l'absorption de la liaison peptidique dans le moyen infrarouge. δ : déformation ; ν : élongation ; τ : torsion.

Nom de la bande	Nombre d'onde (cm^{-1})	Modes de vibration
Amide A	3300	ν(N-H)
Amide B	3050	ν(N-H)
Amide I	1700-1600	ν(C=O) et ν(C-N) δ(C-C-N)
Amide II	1600-1500	ν(C-N) δ(N-H)
Amide III	1300	δ(N-H) ν(C-C)
Amide V	~660	τ(C-N)

Dans le moyen infrarouge, les vibrations d'élongation de la liaison N-H se traduisent généralement par **deux pics (bandes amides A et B) autour de 3250 cm^{-1}**. Les bandes amides A et B sont peu sensibles à la structure secondaire des protéines. Elles présentent cependant un intérêt pour l'étude de la force des liaisons hydrogène, comme la bande des νOH (cf III.3.2, p.71).

Le mode de vibration de la bande **amide I entre 1700 et 1600 cm^{-1}** est essentiellement attribuable à une élongation du groupement C=O. La largeur à mi-hauteur de cette bande

donne une indication de la proportion de structures désordonnées, car plus cette bande est large, plus elle contient de structures désordonnées. Par exemple, la bande amide I de la caséine en solution dans l'eau, qui contient 75% de structures désordonnées présente une largeur de 60 cm^{-1}, alors que la myoglobine qui contient très peu de structures désordonnées (moins de 22%) se caractérise par une largeur de bande à mi-hauteur de 36 cm^{-1} (Bertrand et Dufour, 2000).

La bande **amide II qui se situe à 1600-1500 cm^{-1}** caractérise principalement une combinaison de l'élongation C-N et du balancement dans le plan du groupement N-H.

La bande **amide III, dont le nombre d'onde de vibration est proche de 1300 cm^{-1}** est complexe car les chaînes latérales des acides aminés des protéines présentent aussi des contributions dans cette région. Le balancement dans le plan du groupement N-H et l'élongation des liaisons C-C contribuent principalement à l'absorption de cette bande (Bertrand et Dufour, 2000). Les modes de vibration associés aux bandes amides I, II, et III sont sensibles à la structure secondaire des protéines et sont couramment utilisés pour l'étude de leur conformation. La conformation des protéines est à l'origine du déplacement de ces bandes (amides I, II et III), bien que plusieurs auteurs attribuent aussi ce déplacement à la force des liaisons hydrogène (Dong *et al.*, 1995 ; Krimm, 2000).

D'autres bandes amides de faible intensité, comme la bande amide V peuvent aussi caractériser les protéines, mais elles ne seront pas précisées dans cette étude.

Les modes de vibration de la bande amide III sont complexes, mais ils présentent l'avantage de ne pas interférer avec les vibrations des groupements OH de l'eau. L'observation des variations d'absorbance du spectre infrarouge dans la région proche de 1300 cm^{-1} semble permettre d'évaluer la structure secondaire des protéines. D'après Singh (2000a), l'intensité du pic à 1320 cm^{-1} est liée à la présence de structures en hélice α, et l'intensité du pic à 1240 cm^{-1} est due aux feuillets β. L'augmentation de la proportion de structures désordonnées serait responsable d'un élargissement de la bande de 1240 cm^{-i} à 1260 cm^{-i}.

Dérivation d'ordre 2

Généralement, la bande amide I est préférentiellement analysée pour obtenir des informations tant qualitatives que quantitatives sur la conformation des protéines. La bande amide I résulte de la somme des contributions des différentes structures secondaires des protéines, qui ont chacune des fréquences de vibrations de C=O spécifiques. Il est nécessaire d'utiliser des outils mathématiques pour résoudre ce problème de recouvrement et pour pouvoir distinguer les modes de vibration dus aux différentes structures secondaires. Parmi les méthodes de

déconvolution du spectre infrarouge, le calcul des dérivées secondes (dérivée d'ordre 2) du spectre apparaît comme la plus objective car elle n'implique pas de choisir des valeurs de paramètre de calcul (Dong *et al.*, 1995). La figure II.8 montre l'intérêt de cette méthode de calcul.

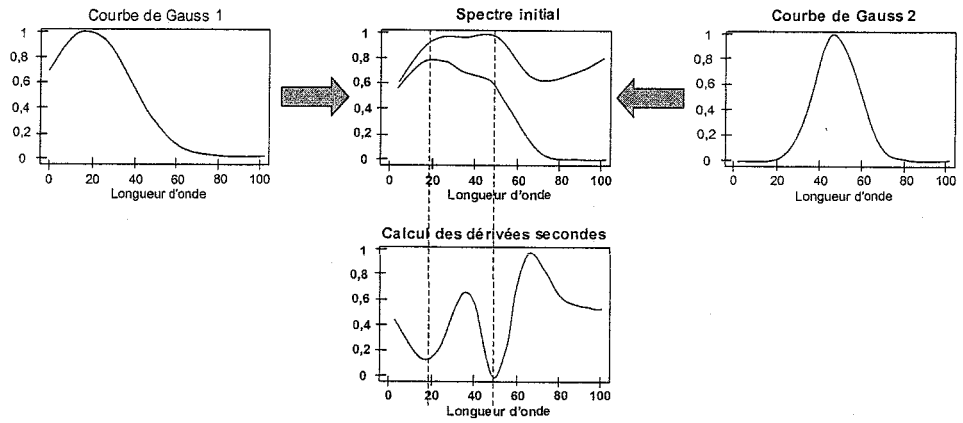


Figure II.8 : Illustration de l'effet de la dérivation d'ordre 2. Les spectres initiaux (au milieu, cadre du haut) sont constitués de la somme des courbes de Gauss 1 et 2. Le résultat du calcul des dérivées secondes correspondantes est présenté dans le cadre du bas. Selon Bertrand et Dufour, 2000.

Les spectres situés au centre de la figure II.8 sont issus de la somme des courbes de Gauss 1 et 2. Même si l'un des spectres possède une ligne de base qui diminue régulièrement en fonction de la longueur d'onde, les dérivées secondes des deux spectres (cadre du bas) sont parfaitement superposables. Il faut noter que le signe des variations des dérivées secondes est opposé à celui des spectres originaux, c'est-à-dire qu'un pic de dérivée seconde est orienté vers le bas. Une bande d'absorbance du spectre infrarouge original correspond donc à la somme des contributions des pics de dérivées secondes qui, eux, sont repérés vers le bas.
Le calcul des dérivées secondes des spectres infrarouges de plusieurs protéines a permis d'attribuer les pics à des structures secondaires de protéines, comme le montre le tableau II.5.

Tableau II.5 : Nombres d'ondes des pics de dérivées secondes caractéristiques de la bande amide I de spectres infrarouges, et structures secondaires protéiques correspondantes.
* : feuillets β intermoléculaires. ° : feuillets β intramoléculaires.

Nombre d'onde (en cm^{-1}) Solution / état déshydraté		Protéines étudiées	Structure correspondante	Références
1613		BSA	Agrégats (feuillets β inter)	Dong *et al.*, 1995
1616	1615	α-chymotrypsinène	Feuillets β inter*	Dong *et al.*, 1995
	1615-1630	Lysozyme	Feuillets β intra°	Allison *et al.*, 1999

1624		β-lactoglobuline	Feuillets β intra°	Dong *et al.*, 1995
1627	1627	BSA	Feuillets β intra°	Imamura *et al.*, 2002
1628		β-lactoglobuline dans D_2O	Feuillets β inter*	Lefèvre et Subirade, 2001b
1630		Rh-Dnase	Feuillets β intra°	Souillac *et al.*, 2002
1632		β-lactoglobuline dans D_2O	Feuillets β intra°	Lefèvre et Subirade, 2001b
1635	1638	α-chymotrypsinène	Feuillets β intra°	Dong *et al.*, 1995
1636-1648	1636	BSA	Structures désordonnées	Imamura *et al.*, 2002
1648		β-lactoglobuline dans D_2O	Hélices α ou structures désordonnées	Lefèvre et Subirade, 2001b
1649		β-lactoglobuline	Structures désordonnées	Dong *et al.*, 1995
1649	1649	α-chymotrypsinène	Structures désordonnées	Dong *et al.*, 1995
1654		Rh-Dnase	Hélice α	Souillac *et al.*, 2002
1655		Lysozyme	Hélice α	Allison *et al.*, 1999
1656	1659	α-chymotrypsinogène	Hélice α	Dong *et al.*, 1995
1657	1657	BSA	Hélice α	Imamura *et al.*, 2002
1664		β-lactoglobuline	Coudes	Dong *et al.*, 1995
1668	1669	α-chymotrypsinogène	Coudes	Dong *et al.*, 1995
1677		β-lactoglobuline	Coudes	Lefèvre et Subirade, 2001b
1677	1679	α-chymotrypsinogène	Coudes	Dong *et al.*, 1995
1680	1680	BSA	Structures désordonnées	Imamura *et al.*, 2002
1682	1680	β-lactoglobuline	Agrégats feuillets β	Dong *et al.*, 1995
	1680-1700	β-lactoglobuline	Feuillets β inter*	Allison *et al.*, 1999
1683		β-lactoglobuline dans D_2O	Feuillets β anti-parallèles	Lefèvre et Subirade, 2001b
1691	1691	BSA	Feuillets β inter*	Imamura *et al.*, 2002
1694		β-lactoglobuline	Feuillets β inter*	Dong *et al.*, 1995
1698		Rh-IGF I	Feuillets β inter*	Souillac *et al.*, 2002
1699		α-chymotrypsinogène	Feuillets β inter*	Dong *et al.*, 1995

La figure II.9 présente les spectres de dérivées secondes de deux protéines alimentaires en solution : le lysozyme (II.9a) et l'ovalbumine (II.9b). Les différents types de structure secondaires de ces protéines sont indiqués sur la figure.

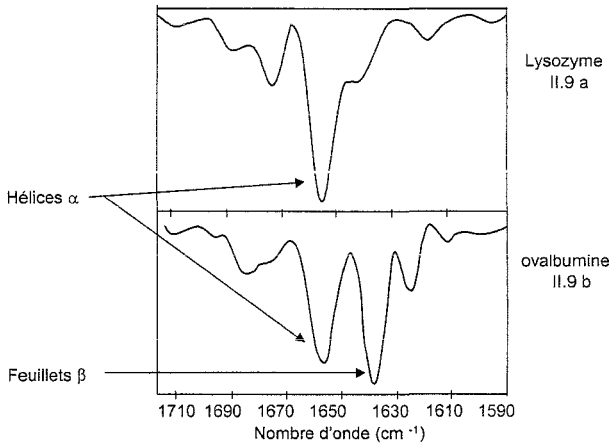


Figure II.9 a et b : Spectres de dérivées secondes de la bande amide I (1700-1600 cm^{-1}) du lysozyme (a) et de l'ovalbumine (b), en solution à 20°C, d'après Izutsu et Kojima (2002).

Le lysozyme a une structure majoritairement constituée de feuillets β, et l'ovalbumine contient des structures en hélice α et feuillets β (Izutsu et Kojima, 2002). Les spectres des dérivées sont en accord avec ce résultat car ils présentent respectivement un pic principal de dérivées secondes à 1655 cm^{-1} (lysozyme, figure II.9a) et deux pics à 1655cm^{-1} et 1635 cm^{-1} (ovalbumine, figure II.9b). Les spectres des deux protéines indiquent également la présence de coudes et de structures désordonnées (1785-1775 cm^{-1}) et une faible agrégation (faibles pics à 1620 cm^{-1} et 1695-1690 cm^{-1}).
La position des pics de dérivées secondes d'un type de structure secondaire est variable, car elle dépend de nombreux facteurs. Par exemple, la position du pic de l'hélice α dépend du nombre d'acides aminés impliqués dans l'hélice, et la position de la bande des feuillets β dépend de la longueur des brins β et du nombre de brins constituant un feuillet (Bertrand et Dufour, 2000).

La figure II.10 présente le spectre de dérivées secondes de la bande amide I de la β-lactoglobuline en solution.

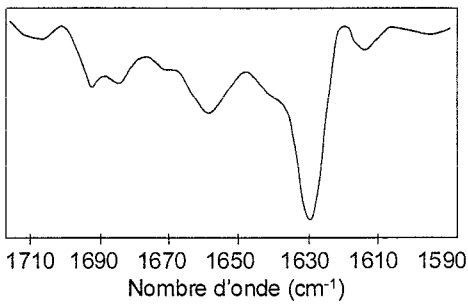


Figure II.10 : Dérivées secondes de la bande amide I de la β-lactoglobuline en solution dans un tampon potassium phosphate à 20°C, d'après Izutsu et Kojima, 2002.

Le spectre de dérivées secondes de cette protéine présente principalement un pic à environ 1630 cm^{-1}, qui traduit la forte proportion de feuillets β dans sa structure.

En ce qui concerne la bande amide II, l'attribution des pics de dérivées secondes aux différents types de structure a été beaucoup moins étudiée. Les hélices α génèreraient un pic

de dérivées à 1550-1545 cm^{-1}, les feuillets β un pic à 1530-1520 cm^{-1}, et les coudes un pic à 1555 cm^{-1} environ (Krimm, 2000 ; Bertrand et Dufour, 2000).

III.2.4. Mode opératoire

Une centaine de mg d'échantillon de poudre à analyser sont dilués extemporanément à 15% (p/p) dans du KBr anhydre (Bromure de potassium), transparent aux rayons infrarouges ; la référence étant du KBr seul.
Les spectres ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier BRUKER IFS 55, qui emploie la technique de réflexion diffuse dans le moyen infrarouge (entre 4000 et 400 cm^{-1}). L'accessoire utilisé pour la réflexion diffuse est fabriqué par Harrick et est réglé pour éliminer la réflexion spéculaire. Une accumulation de 200 spectres par échantillon est réalisée en 2 minutes environ et la résolution spectrale est de 2 cm^{-1}.

III.2.5. Traitement des spectres infrarouges

La première étape du traitement des spectres bruts consiste à soustraire les signaux de la vapeur d'eau et du CO_2 atmosphérique.
L'étude approfondie des spectres infrarouges nécessite ensuite un second traitement, qui comporte plusieurs étapes. Il a été effectué avec le logiciel Origin version 6.1. Les spectres ont tout d'abord été lissés en utilisant un algorithme de Savitzky-Golay de degré 4, avec une fenêtre de 11 points. Ils ont ensuite été redressés en corrigeant leur ligne de base en 4 points.
Lorsque l'absorbance des différentes bandes vibrationnelles a été directement comparée, la région du spectre correspondante a été au préalable sélectionnée et normalisée selon la moyenne des valeurs d'absorbance de la bande et leur écart-type, selon l'équation :

Valeur normalisée= (valeur – moyenne des valeurs de la bande) / écart-type des valeurs

Le calcul des dérivées secondes d'une bande vibrationnelle a également été effectué à partir des spectres lissés, corrigés en ligne de base et normalisés. La dérivation d'ordre 2 a été accompagnée d'un lissage de degré 4 sur une fenêtre de 11 points.

PARTIE 3 :

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Modifications physico-chimiques des poudres laitières modèles durant leur conservation sous différentes activités de l'eau

Les poudres lyophilisées de lactose, de β-lactoglobuline et des mélanges des deux composants ont été conservées trois mois à 20°C sous des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,85. Des observations visuelles, des mesures de couleur et de la microscopie électronique à balayage ont été effectuées pour évaluer les modifications physico-chimiques de ces poudres.

I. 1. Observation visuelle de l'effondrement des poudres

L'aspect macroscopique des poudres de lactose, de β-lactoglobuline et des poudres modèles contenant 10 à 40% de β-lactoglobuline a été observé après lyophilisation et après conservation à 20°C sous des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,85.
Les photographies de ces poudres conservées trois mois sous une activité de l'eau de 0,11 sont reportées figure III.1.

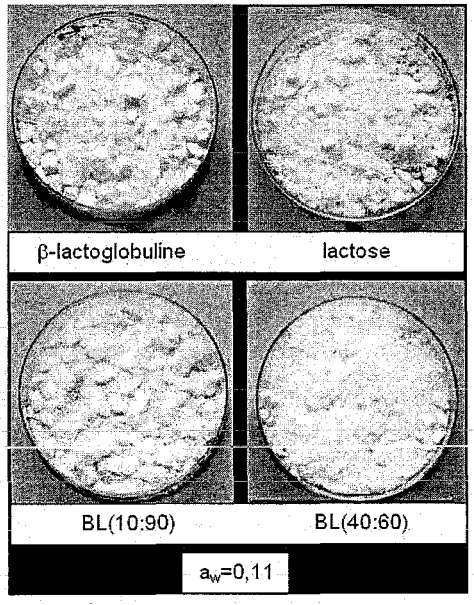


Figure III. 1. Photographies de poudres de β-lactoglobuline, de lactose et des poudres modèles BL(10:90) et BL(40:60) à 10% et 40% de β-lactoglobuline, respectivement. Les poudres ont été conservées trois mois à 20°C sous une activité de l'eau de 0,11.

Après lyophilisation comme après trois mois de conservation à des a_w inférieures ou égales à 0,39, la structure macroscopique de toutes les poudres étudiées se ressemble. Celle-ci est

représentée par la figure III.1, obtenue après trois mois de conservation sous une a_w de 0,11. Comme le montre cette figure, les poudres ont des textures très expansées et aérées.

La poudre de β-lactoglobuline garde cet aspect pendant toute la durée de conservation, quelle que soit l'activité de l'eau ; par contre, la texture des poudres contenant du lactose évolue fortement. Les particules de la poudre de lactose conservée sous une a_w de 0,39 commencent à adhérer fortement entre elles. La poudre devient plus cohésive, probablement à cause des ponts liquides formés par la présence d'eau (Downton *et al.*, 1982). Pour des activités de l'eau supérieures à 0,43, les particules s'agglomèrent fortement, jusqu'à créer des ponts solides. On peut penser que le point d'adhérence (« sticking point ») est dépassé : les particules subissent des déformations plastiques, qui leur permettent de coller entre elles (cohésion) ou à d'autres matériaux (adhésion) (Aguilar et Ziegler, 1994 ; Fäldt et Bergenstahl, 1995 ; Rennie *et al.*, 1998 ; Ozmen et Langrish, 2002). De plus, la texture de la poudre de lactose conservée à des a_w supérieures à 0,39 est complètement effondrée (« collapse ») : avant conservation, l'échantillon de poudre couvre la totalité de la surface de la boîte plastique, alors qu'après conservation sous des a_w supérieures à 0,39, la poudre s'affaisse et n'en couvre plus le fond. Cet effondrement est visible sur la figure III.2, qui montre la différence de texture d'une même quantité de poudre de lactose conservée sous des activités de l'eau de 0,23 et 0,76.

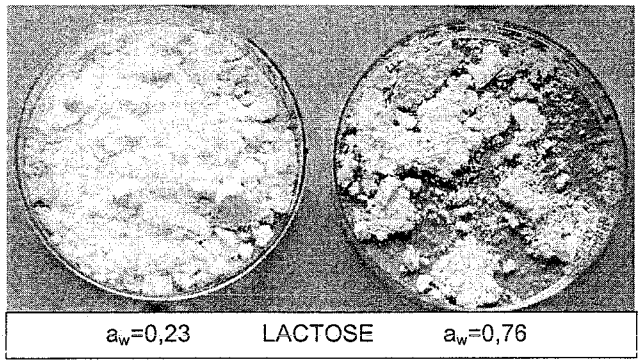


Figure III. 2. Photographies d'une poudre de lactose conservée 3 mois à 20°C sous des activités de l'eau de 0,23 et 0,76.

Les poudres modèles contenant du lactose ont toutes un comportement similaire. Cependant, l'activité de l'eau à partir de laquelle l'effondrement de structure et l'agglomération des particules sont observés dépend de la teneur en β-lactoglobuline de la poudre. Les photographies de BL(20:80) et de BL(40:60) conservées sous des a_w de 0,43 et de 0,54, rassemblées figure III.3, illustrent bien cette différence.

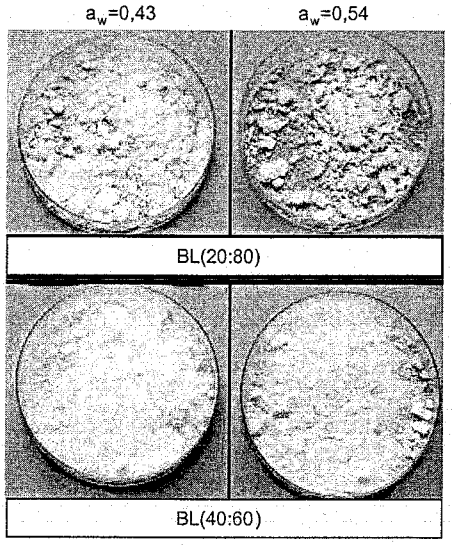


Figure III. 3. Photographies de poudres modèles BL(20:80) et BL(40:60) (avec 20% et 40% de β-lactoglobuline respectivement) après trois mois de conservation à 20°C, sous des activités de l'eau de 0,43 et 0,54.

La texture des poudres modèles contenant de 10 à 30% de β-lactoglobuline est altérée lorsque l'a_w de conservation dépasse 0,43 ; alors que la texture de BL(40:60) n'est toujours pas modifiée à une activité de l'eau de 0,54. La présence de quantités croissantes de β-lactoglobuline peut maintenir la structure de la poudre modèle et éviter l'effondrement des particules.

L'effondrement de la structure et le mottage d'une poudre se produisent peu avant la cristallisation (Levi et Karel, 1995 ; Buckton et Darcy, 1996). Comme nous n'observons pas ces phénomènes à une même a_w dans toutes les poudres modèles, on peut émettre l'hypothèse que l'a_w de cristallisation aussi est décalée selon la teneur en β-lactoglobuline de la poudre.

I. 2. Mesure de couleur

L'observation des poudres au niveau macroscopique a également permis de constater une modification de la couleur de celles contenant à la fois du lactose et de la β-lactoglobuline. Ces poudres restent blanches après deux mois de conservation à 20°C sous de faibles activités de l'eau alors qu'elles jaunissent lorsqu'elle sont conservées à des a_w élevées (supérieures à 0,54). Même une observation visuelle permet de déceler le brunissement des poudres

modèles. Celui-ci est très courant dans les poudres laitières et se produit généralement au cours de leur production et de leur conservation (Celestino *et al.*, 1997a).

Pour mesurer objectivement ce changement de couleur nous avons suivi le paramètre colorimétrique b, caractéristique de l'indice chromatique bleu-jaune, avant et après 2 mois de conservation des poudres sous une a_w de 0,76. Le tableau III.1 rassemble ces valeurs du paramètre b.

Tableau III.1 : Valeurs du paramètre colorimétrique b de poudres de lactose, de β-lactoglobuline et de poudres modèles contenant 10, 20 et 40% de β-lactoglobuline, avant conservation et après 2 mois à 20°C sous une a_w de 0,76. L'écart-type maximum entre deux valeurs est de ±0,3.

	lactose	BL(10:90)	BL(20:80)	BL(40:60)	β-lactoglobuline
Avant conservation	2,3	3,8	3,7	3,2	2,2
A une a_w de 0,76	1,9	8,1	7,1	8,8	1,7

Le tableau III.1 confirme qu'un brunissement s'est développé dans toutes les poudres contenant lactose et β-lactoglobuline, alors que le paramètre b évolue peu pendant la conservation des composants lyophilisés individuellement, ce qui signifie que ces poudres ne jaunissent pas. Ce résultat montre que des modifications physico-chimiques mettant en jeu les deux composants interviennent au niveau moléculaire pendant la conservation des poudres modèles.

I. 3. Observation des particules en microscopie électronique à balayage (MEB)

Les poudres de lactose, de β-lactoglobuline et les poudres modèles contenant de 10 à 40% de cette protéine ont été observées avec la technique de microscopie électronique à balayage après trois mois de conservation sous différentes a_w.

Les photographies des poudres lyophilisées de lactose, β-lactoglobuline et de BL(10:90) conservées sous une faible activité de l'eau de 0,23 sont présentées figure III.4.

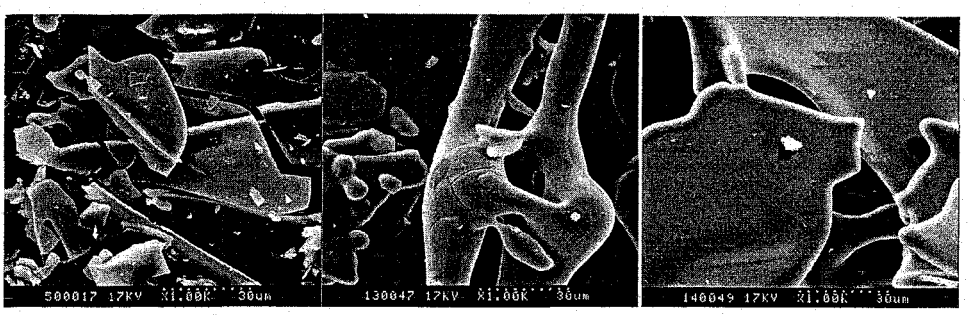


Figure III.4 : Photographies de microscopie électronique à balayage (MEB) de poudres modèles conservées 3 mois à 20°C et sous une activité de l'eau de 0,23. **A gauche** : poudre de β-lactoglobuline. **Au milieu** : poudre de lactose. **A droite** : poudre modèle BL(10:90).

Contrairement aux poudres produites par atomisation, les particules de la figure III.4 ne sont pas sphériques (Aguilar et Ziegler, 1994b). Celles de β-lactoglobuline sont de forme lamellaire, tandis que celles des poudres modèles et du lactose ont des formes variées, généralement irrégulières. Néanmoins, plus la poudre contient de β-lactoglobuline et plus sa structure tend à être lamellaire. Les surfaces des particules de toutes les poudres conservées sous une faible activité de l'eau (inférieure à 0,39) sont lisses, comme le montre la figure III.4. Cette caractéristique est liée à l'état amorphe du lactose dans les poudres. Millqvist-Fureby (1999) a obtenu des clichés similaires pour des poudres de sérum albumine bovine (BSA) co-lyophilisée avec du lactose.

Après trois mois de conservation, l'intégrité des particules de β-lactoglobuline est maintenue, quelle que soit l'a_w considérée. L'hydratation de cette poudre ne modifie pas sa structure. Par contre, la structure de la poudre de lactose est très altérée après conservation à forte activité de l'eau, comme le montre la figure III.5 du lactose conservé trois mois sous une a_w de 0,76.

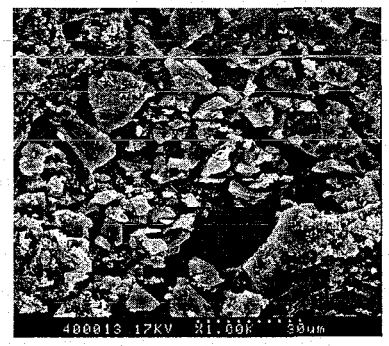
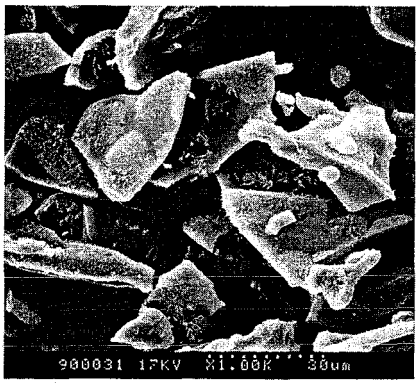


Figure III.5 : Photographie de microscopie électronique à balayage d'une poudre de lactose conservée 3 mois à 20°C sous une activité de l'eau de 0,76.

Après conservation de la poudre de lactose sous une forte activité de l'eau, les particules sont déformées, rugueuses et des cristaux sont visibles à leur surface (figure III.5). Les poudres se sont tellement agglomérées qu'elles ont formé un solide compact. Il a fallu broyer cette poudre avec une spatule pour procéder à l'analyse par MEB, ce qui explique la différence de granulométrie de ces particules par rapport aux photographies précédentes. D'après Lai et Schmidt (1990) et Aguilar et Ziegler (1994b) ces modifications sont caractéristiques de la cristallisation du lactose.

Les particules de poudres modèles contenant de 10 à 40% de β-lactoglobuline ont également été observées par MEB après trois mois de conservation sous des activités de l'eau élevées (supérieures à 0,43).



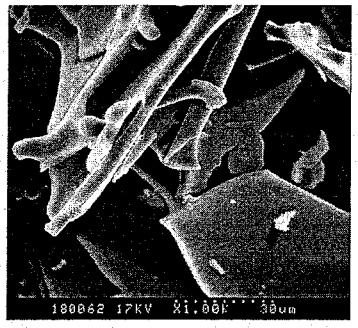
a_w=0,54

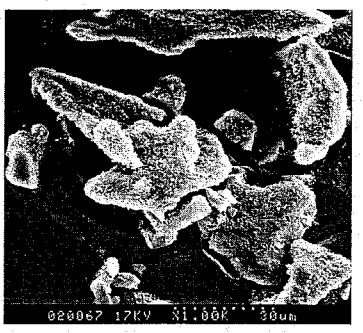
Figure III.6 : Photographie de microscopie électronique à balayage de la poudre modèle BL(10:90) conservée 3 mois à 20°C sous une activité de l'eau de 0,54.

La photographie de la poudre BL(10:90) montre que des cristaux de lactose se développent à la surface des particules après 3 mois de conservation sous une a_w de 0,54 (figure III.6), alors qu'elles sont lisses jusqu'à une a_w de conservation de 0,43. Il semble donc possible de déterminer l'a_w critique des poudres modèles, à partir de laquelle les cristaux de lactose apparaissent à la surface des particules.

Les photographies obtenues par microscopie électronique à balayage des poudres BL(30:70) et BL(40:60) conservées 3 mois respectivement sous les a_w 0,43-0,54 ; et 0,54-0,59 sont présentées figure III.7 et III.8.

a_w=0,43



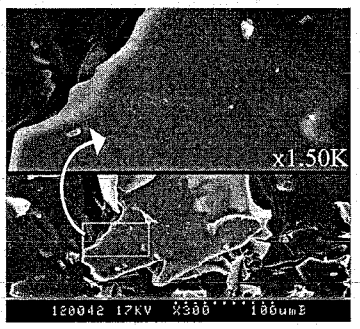


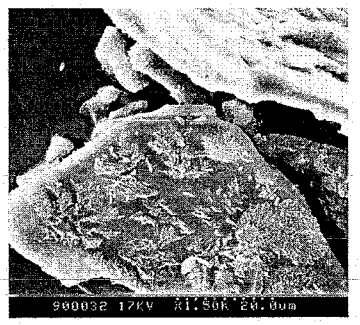
a_w=0,54

Figure III.7 : Photographie de microscopie électronique à balayage de la poudre modèle BL(30:70) conservée 3 mois à 20°C sous des activités de l'eau de 0,43 et 0,54.

Les particules de la poudre à 30% de β-lactoglobuline conservée sous une a_w de 0,43 ont des surfaces lisses, alors que des cristaux de lactose apparaissent nettement lorsque la poudre est placée à une a_w de 0,54 (III.7). Les poudres contenant de 10 à 30% de β-lactoglobuline suivent donc une évolution similaire en fonction de l'a_w de conservation. Par contre, les particules des poudres à 40% de β-lactoglobuline ont toujours des surfaces lisses caractéristiques d'un état amorphe à une a_w de 0,54. Ce n'est que lorsque l'a_w de conservation est supérieure ou égale à 0,59 que des cristaux de lactose sont visibles à la surface des particules (III.8).

a_w=0,54





a_w=0,59

Figure III.8 : Photographie de microscopie électronique à balayage de la poudre modèle BL(40:60) conservée 3 mois à 20°C sous les activités de l'eau de 0,54 et de 0,59.

Ainsi, l'a_w critique d'apparition des cristaux de lactose dépend de la teneur en β-lactoglobuline des poudres modèles. La poudre de lactose cristallise à une a_w de 0,43 ; les poudres modèles avec 10 à 30% de β-lactoglobuline cristallisent apparemment lorsque l'a_w atteint 0,54. Enfin, des cristaux apparaissent à la surface des particules des poudres avec 40% de β-lactoglobuline lorsque l'activité de l'eau est de 0,59.

On peut cependant se demander si dans les poudres modèles l'apparition de cristaux de lactose est simultanée dans toute la particule, ou si une cristallisation interne à la particule apparaît, avant que les cristaux ne migrent vers la surface. Plusieurs auteurs ont en effet déjà étudié par Electron Scanning for Chemical Analysis (ESCA) la composition de surface de poudres de protéines co-lyohilisées avec des saccharides, ou des poudres laitières industrielles (Millqvist-Fureby, 1999 ; Kim *et al.*, 2002). Ils ont constaté une répartition de protéines plus importante à la surface des particules, par rapport à la composition générale de la poudre. Dans nos poudres modèles, si une proportion importante de β-lactoglobuline se trouve à la surface des particules, elle peut limiter la diffusion des cristaux, d'où une a_w critique d'apparition de cristaux qui ne correspond pas réellement à l'a_w de cristallisation du lactose.

Des observations faites par microscopie électronique à balayage effectuées sur nos poudres vont dans ce sens. Les photographies de MEB des poudres de lactose et de BL(30:70) conservées trois mois sous une a_w de 0,59 sont par exemple présentées figures III.9 et III.10.

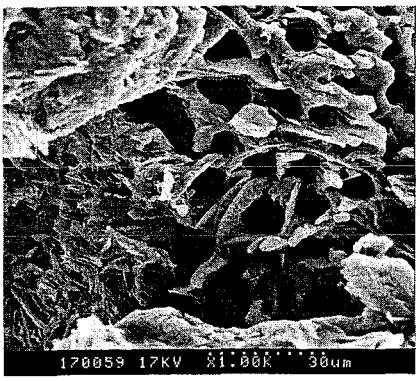


Figure III.9 : Photographie de microscopie électronique à balayage d'un échantillon de poudre de lactose conservé 3 mois sous une a_w de 0,59.

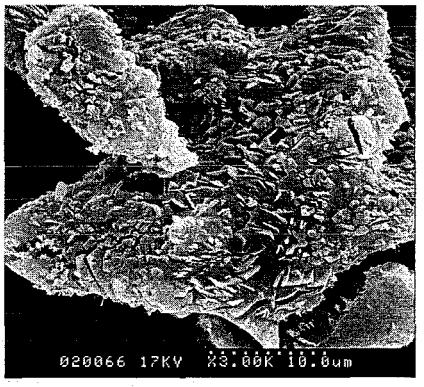


Figure III.10 : Photographie de microscopie électronique à balayage d'un échantillon de poudre BL(30:70) conservé 3 mois sous une a_w de 0,59.

Ces photos ont été obtenues avec un fort grossissement (x1000 et x3000). Elles montrent donc des détails de la structure des cristaux de lactose qui peuvent se développer à la surface des particules. Une particule complètement cristallisée de la poudre de lactose (figure III.9) présente une structure très organisée spatialement avec une répartition de motifs réguliers, caractéristiques de l'état cristallin. Cette photographie montre qu'une migration intense des molécules de lactose s'est produite pour aboutir à cette réorganisation complète des

particules. La figure III.10 montre le détail de la surface d'une particule de la poudre BL(30:70). Dans cette poudre, la cristallisation du lactose est étendue car il y a apparition de nombreux cristaux en surface de la particule, mais celle-ci conserve sa structure générale. Les modifications de morphologie liées à la cristallisation, qui sont plus lentes dans cette poudre indiquent que la présence de β-lactoglobuline peut ralentir la migration des cristaux ; d'où une a_w de cristallisation observable visuellement qui peut être différente de l'a_w réelle d'apparition des cristaux.

D'après Darcy et Buckton (1997), l'a_w de cristallisation dans une poudre peut être différente si le phénomène d'effondrement (collapse) de la structure est évité. La densité plus faible des poudres modèles contenant la protéine pourrait être responsable d'une a_w de cristallisation plus forte. Berlin *et al.* (1968) ont montré auparavant que le lait « foam spray », moins dense que le lait atomisé, cristallise à une activité de l'eau plus élevée. Ceci est lié à la texture de la poudre, qui influence le comportement de sorption d'eau.

II. Comportement de sorption d'eau et état du lactose lors de la conservation des poudres laitières modèles à différentes a_w.

Nous avons choisi de conserver les poudres laitières modèles sous différentes a_w comprises entre 0,11 et 0,95 car la présence d'eau est l'un des paramètres qui influence le plus les modifications physico-chimiques qui peuvent intervenir. Il est donc essentiel d'étudier dans un premier temps le comportement des poudres par rapport à l'eau, et dans un deuxième temps de le comparer aux changements d'états du lactose. Comme nous l'avons déjà souligné dans la bibliographie, la cristallisation du lactose amorphe est en effet un phénomène déterminant de la stabilité des poudres.

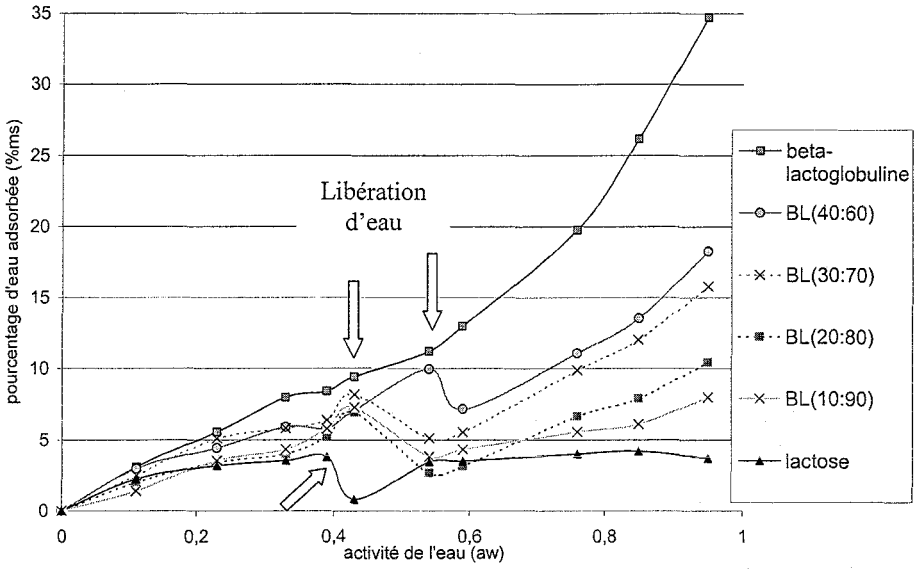
II. 1. Etude du comportement de sorption d'eau des poudres modèles.

II.1.1. Courbes isothermes de sorption d'eau à l'équilibre

Comparaison des différentes poudres étudiées

Des échantillons de lactose, de β-lactoglobuline et des poudres modèles de 10 à 40% de β-lactoglobuline : BL(10:90), BL(20:80), BL(30:70) et BL(40:60) ont été placés trois mois aux différentes a_w de conservation, comprises entre 0,11 et 0,95. Après cette durée de conservation, tous les échantillons ont atteint leur teneur en eau d'équilibre. Les courbes isothermes de sorption ont été déterminées et sont comparées figure III.11.

Les courbes isothermes sont répétables, avec un écart-type moyen de 0,37 qui correspond à la taille des symboles utilisés sur la figure III.11. Les courbes isothermes de toutes les poudres modèles étudiées sont bien distinctes les unes des autres.



Figue III.11 : Comparaison des courbes isothermes de sorption d'eau des poudres modèles de lactose, BL(10:90), BL(20:80), BL(30:70), BL(40:60) et de β-lactoglobuline. Les courbes sont obtenues après 3 mois de conservation à 20°C. Les trois flèches indiquent la libération d'eau à une a_w>0,39 pour le lactose ; à une a_w>0,43 pour les poudres contenant de 10 à 30% de β-lactoglobuline ; et à une a_w>0,54 pour la poudre modèle à 40% de β-lactoglobuline. L'écart-type moyen est de 0,37% et correspond à la taille des symboles de la figure.

La courbe obtenue pour la β-lactoglobuline est de forme sigmoïde, régulière, de type II selon la classification BET. Elle est caractéristique du comportement de sorption d'eau de nombreuses protéines et produits solubles (Mathlouthi et Rogé, 2003). La β-lactoglobuline lyophilisée est très hygroscopique car quelle que soit l'activité de l'eau considérée, elle adsorbe plus d'eau que toutes les autres poudres étudiées. Plus la teneur en protéine est forte dans les poudres modèles, plus la quantité d'eau qu'elles adsorbent est élevée, surtout aux a_w de conservation supérieures à 0,60.

Les courbes isothermes de sorption d'eau de toutes les poudres modèles contenant du lactose ont des formes irrégulières. Les teneurs en eau des poudres évoluent faiblement entre les activités de l'eau 0,39 et 0,59, ce qui se traduit par une « cassure » sur la courbe. Les poudres modèles ont en réalité libéré de l'eau au cours de leur conservation, à ces a_w. Si l'on compare les courbes des poudres modèles contenant du lactose, on remarque que l'a_w de libération d'eau (indiquée par des flèches sur la figure III.11) augmente selon la quantité de β-lactoglobuline dans la poudre modèle.

Le phénomène de libération d'eau par des poudres contenant du lactose a été fréquemment décrit dans la littérature (Berlin *et al.* 1968 ; Jouppila *et al.*, 1997 ; Stubberud et Forbes, 1998). Les auteurs l'expliquent par la cristallisation du lactose. Avant conservation, le lactose atomisé ou lyophilisé est amorphe et très hygroscopique. Il adsorbe des quantités d'eau importantes, qui augmentent la mobilité moléculaire et provoquent la cristallisation. Les formes cristallines du lactose, peu hygroscopiques, sont anhydres (pour les formes α ou β), ou monohydratées (forme α seulement). La poudre qui était amorphe et très hydratée au début de la conservation va donc libérer l'eau en excès lors de la cristallisation. Ce phénomène de libération d'eau peut être détecté même pour de très faibles quantités de lactose amorphe (0,5%) si on utilise une microbalance (Buckton et Darcy, 1995).

La libération d'eau, observée sur nos courbes isothermes de sorption d'eau correspond apparemment à la cristallisation du lactose dans les poudres modèles. Les courbes isothermes étudiées permettent en tous cas d'affirmer l'existence d'une a_w critique de libération d'eau dans les poudres modèles, variable selon leur teneur en protéine. L'a_w critique du lactose est de 0,43 ; celle des poudres modèles avec 10 à 30% de β-lactoglobuline est de 0,54 ; alors que l'a_w critique de la poudre à 40% de β-lactoglobuline est de 0,59.

Interactions lactose/β-lactoglobuline

Pour mettre en évidence des interactions entre lactose et β-lactoglobuline, nous avons étudié l'additivité des comportements de sorption d'eau des deux composants des poudres modèles. Le comportement de sorption d'eau des poudres modèles a été comparé à celui de poudres (B+L), dont les deux composants sont mélangés après une lyophilisation séparée. Les poudres B(10)+L(90) et B(40)+L(60) ont par exemple été produites par mélange de 10% de poudre de β-lactoglobuline lyophilisée et de 90% de poudre de lactose lyophilisée ; et par mélange de 40% de β-lactoglobuline et de 60% de lactose lyophilisés, respectivement. Les courbes isothermes de sorption des poudres modèles et des poudres mélangées ont été établies après neuf semaines de conservation et comparées aux courbes calculées par addition des comportements de sorption d'eau du lactose lyophilisé et de la β-lactoglobuline lyophilisée. Les courbes expérimentales et celles déterminées par calcul des poudres à 10% de β-lactoglobuline sont comparées figure III.12. Celles de la poudre avec 40% de β-lactoglobuline sont comparées figure III.13.

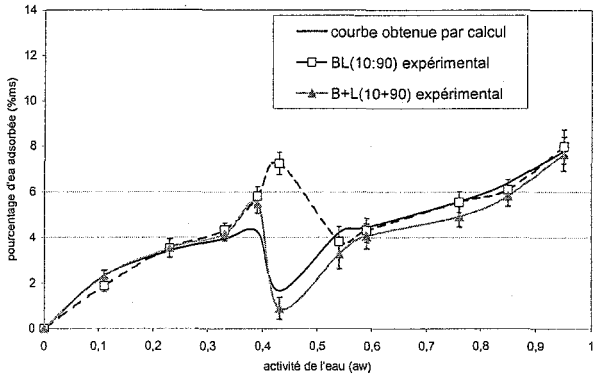


Figure III.12 : Courbes isothermes de sorption d'eau expérimentales et obtenues par calcul (à partir des isothermes de sorption du lactose et β-lactoglobuline) de poudres à 10% de β-lactoglobuline, après neuf semaines de conservation à 20°C. Les courbes expérimentales sont celles de la poudre modèle BL(10:90) et de la poudre B(10)+L(90) produite par mélange.

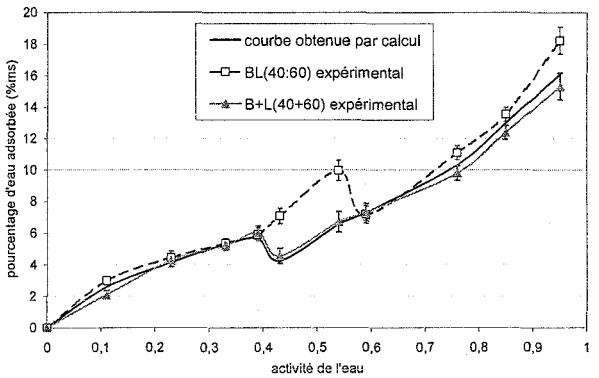


Figure III.13 : Courbes isothermes de sorption d'eau expérimentales et obtenues par le calcul de poudres à 40% de β-lactoglobuline après 9 semaines de conservation à 20°C. Les courbes expérimentales sont celles de la poudre modèle BL(40:60) et de B(40)+L(60) produite par mélange de lactose et de β-lactoglobuline lyophilisés.

Sur ces deux figures, les courbes isothermes de sorption des poudres mélangées (B+L) sont similaires aux courbes obtenues par calcul, c'est-à-dire qu'elles correspondent à la somme des comportements du lactose et de la β-lactoglobuline. Il y a additivité des comportements de sorption d'eau de ces deux composants. Au contraire, les poudres modèles ont des comportements de sorption spécifiques, qui diffèrent de la courbe obtenue par calcul, surtout aux activités de l'eau comprises entre 0,39 et 0,59. Les poudres modèles adsorbent plus d'eau que prévu à l'a_w qui précède la cristallisation ; c'est-à-dire à une a_w de 0,43 pour BL(10:90) et à une a_w de 0,54 pour BL(40:60).

La libération d'eau qui accompagne la cristallisation se produit clairement à des a_w plus élevées que le calcul le prévoyait. Les poudres BL(10:90) et BL(40:60) libèrent de l'eau aux a_w de 0,54 et 0,59 respectivement, alors que l'a_w « théorique » de libération d'eau est de 0,43 pour les deux poudres. Il n'y a pas additivité des comportements de sorption d'eau des deux composants dans les poudres modèles.

Les différences évidentes de comportement de sorption d'eau des poudres modèles par rapport aux poudres mélangées et aux courbes isothermes calculées mettent en évidence des interactions entre lactose et β-lactoglobuline pendant la conservation des poudres. Ces interactions moléculaires stabilisent apparemment les poudres modèles vis-à-vis de la cristallisation du lactose.

En 1994 (a, b), Jouppila et Roos ont observé un report de l'a_w de cristallisation dans des poudres de lait entier et écrémé, par rapport au lactose pur. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que la présence de protéine pouvait être à l'origine du phénomène. Le résultat de notre étude est en accord avec cette idée et n'avait encore jamais été clairement démontré entre deux composants laitiers. La présence de carboxy-méthyl cellulose peut aussi reporter l'a_w de cristallisation du lactose (Berlin *et al.*, 1972, Karmas *et al.*, 1992). Costantino *et al.* (1998) ont également observé que la co-lyophilisation avec une protéine (rh-GH) peut augmenter l'a_w de cristallisation du tréhalose et du lactose. Les auteurs expliquent généralement ce phénomène par la théorie de la transition vitreuse car l'incorporation de molécules de haut poids moléculaire au lactose augmente la viscosité et par conséquent augmente la température de transition vitreuse du système (Tg). Le dépassement de Tg, obligatoire pour que le lactose cristallise, nécessite alors la présence d'un plus grand nombre de molécules d'eau, c'est-à-dire d'une activité de l'eau plus élevée pour le système qui contient ces grosses molécules (Le Meste et Simatos, 1990). Cependant, de nombreux auteurs ont aussi démontré que l'inhibition de la cristallisation dans des systèmes contenant des sucres co-lyophilisés avec des polymères comme le PVP (poly(vinyl)pyrrolidone), avec des protéines comme l'hormone de croissance humaine, ou avec du tréhalose, n'est pas liée à une augmentation de Tg du système. D'autres facteurs, comme la modification de l'environnement moléculaire dans les systèmes co-lyophilisés pourrait plutôt être à l'origine de ce phénomène (Stubberud *et al.*,1996 ; Mazzobre *et al.*, 2001). Shamblin *et al.* (1996) ont émis l'hypothèse que le développement d'interactions, ou au contraire la séparation de phases qui peuvent intervenir entre les composants seraient à l'origine de l'inhibition de la cristallisation. Costantino *et al.* (1998) ont étudié l'inhibition de la cristallisation du saccharose par des protéines. Ils rapportent que les molécules inhibitrices sont souvent hydrophiles, qu'elles peuvent établir des interactions

comme des liaisons hydrogène fortes, ce qui pourrait limiter la diffusion, les collisions et l'orientation spatiale des molécules de saccharose.

Influence de la modification du pH par la β-lactoglobuline

Nous avons déterminé si la modification du pH causée par la présence de β-lactoglobuline était à l'origine du décalage de l'a_w critique dans les poudres modèles.

Nous avons dans un premier temps mesuré la modification de l'environnement ionique induite par la présence de β-lactoglobuline dans les poudres. Pour cela, le pH de solutions de lactose, de β-lactoglobuline et de mélange des deux composants dans de l'eau distillée a été mesuré, à partir de poudres commerciales et lyophilisées.

La figure III.14 représente le pH de solutions à 10% dans l'eau, reconstituées à partir des poudres commerciales et après lyophilisation, en fonction du pourcentage de β-lactoglobuline.

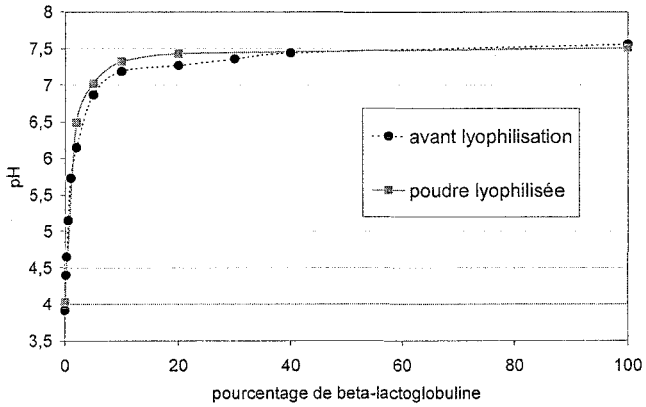


Figure III. 14 : pH de solutions de lactose/β-lactoglobuline à 10% (p/v) avant lyophilisation, et de poudres lyophilisées remises en solution, en fonction du pourcentage de β-lactoglobuline. Les écarts-types sont de la même taille que les symboles utilisés sur la figure.

La figure III.14 montre que le pH à 20°C d'une solution de lactose commercial à 10% dans de l'eau distillée est de 3,92 ; alors que celui de la β-lactoglobuline dans les mêmes conditions est de 7,56. La présence de β-lactoglobuline tamponne facilement la solution avant lyophilisation, puisque dès 5% de β-lactoglobuline, les solutions ont un pH proche de celui de la protéine. La présence de β-lactoglobuline modifie donc fortement l'environnement ionique du milieu. Par contre, la différence de pH entre solutions contenant plus de 10% de cette protéine est minime. Après lyophilisation, l'augmentation de pH avec la teneur en β-lactoglobuline est similaire, bien que les pH de ces solutions soient légèrement supérieurs à

ceux obtenus pour les poudres commerciales, peut être à cause d'un déplissement partiel de la protéine durant la lyophilisation. La modification de l'environnement ionique par la β-lactoglobuline peut être à l'origine de la différence d'a_w de cristallisation observée dans les poudres modèles mais cette hypothèse est moins évidente dans les poudres BL(30:70) et BL(40:60) à forte teneur en β-lactoglobuline qui, après remise en solution, ont des pH très proches: 7,36 et 7,44 respectivement.

Dans un second temps, des essais de modification de pH ont été effectués sur des solutions de lactose et de β-lactoglobuline, avant leur lyophilisation. Le pH d'une solution de lactose a été ajusté à 7,5 (pH proche de la solution de β-lactoglobuline) par ajout de HCl ; et celui d'une solution contenant 10% de β-lactoglobuline et 90% de lactose a été ajusté à 4 (pH du lactose). Les poudres de lactose et BL(10:90) correspondantes, obtenues après lyophilisation ont été conservées à différentes activités de l'eau. Les courbes isothermes de sorption d'eau correspondantes sont présentées figures III.15 et III.16

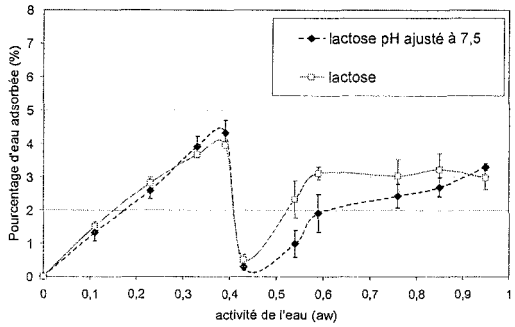


Figure III. 15. Courbes isothermes de sorption d'eau obtenues après 9 semaines de conservation de poudres de lactose « normal » (pH≈4) et de lactose dont le pH a été ajusté à 7,5 avant lyophilisation, par ajout de NaOH.

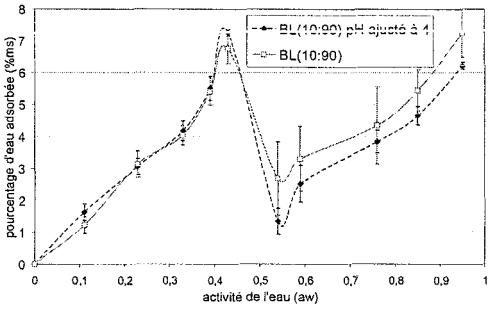


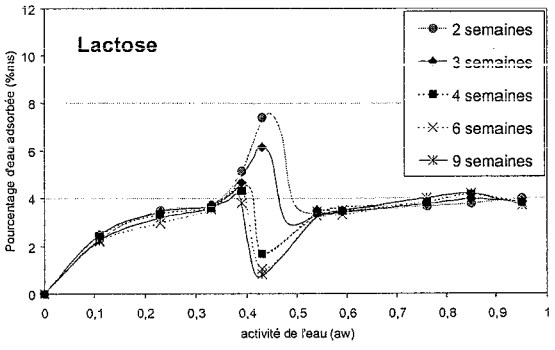
Figure III. 16. Courbes isothermes de sorption d'eau obtenues après 9 semaines de conservation des poudres BL(10:90) « normale » (pH≈7,5) et BL(10:90) dont le pH a été ajusté à 4 avant lyophilisation, par ajout de HCl.

Les figures III.15 et III.16 montrent que les poudres de lactose et BL(10:90) dont les pH ont été ajustés à 7,5 et à 4 respectivement ont des comportements de sorption d'eau similaires aux poudres de lactose et BL(10:90) étudiées précédemment. L'a_w de libération d'eau est identique, que le pH soit modifié ou non. La modification de l'environnement ionique généré par la β-lactoglobuline n'est donc pas responsable du décalage de l'a_w critique observé dans les poudres modèles. Seule la teneur en eau adsorbée par la poudre, au-delà de l'a_w critique, est différente lorsque le pH est modifié. Ceci pourrait provenir de la création de formes cristallines différentes dans ces poudres : formes anhydres plutôt que monohydrates, par exemple. La quantité d'eau adsorbée peut également dépendre de la taille des cristaux formés (Mathlouti et Rogé, 2003). Plus la surface spécifique développée par les cristaux est élevée, plus la quantité d'eau adsorbée est importante.

II.1.2. Evolution des courbes isothermes de sorption en fonction du temps de conservation

Etude de la mise en équilibre des poudres

Les poudres contenant de 0 à 40% de β-lactoglobuline ont été conservées 12 semaines à 20°C, à des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,95. La quantité d'eau adsorbée par chaque échantillon a été déterminée chaque semaine. Les courbes isothermes de sorption d'eau des poudres de lactose et des poudres modèles contenant 2, 5, 10, 20, 30 et 40% de β-lactoglobuline sont représentées figure III.17. La poudre de β-lactoglobuline, qui atteint son équilibre de sorption en trois jours, n'a pas été représentée.



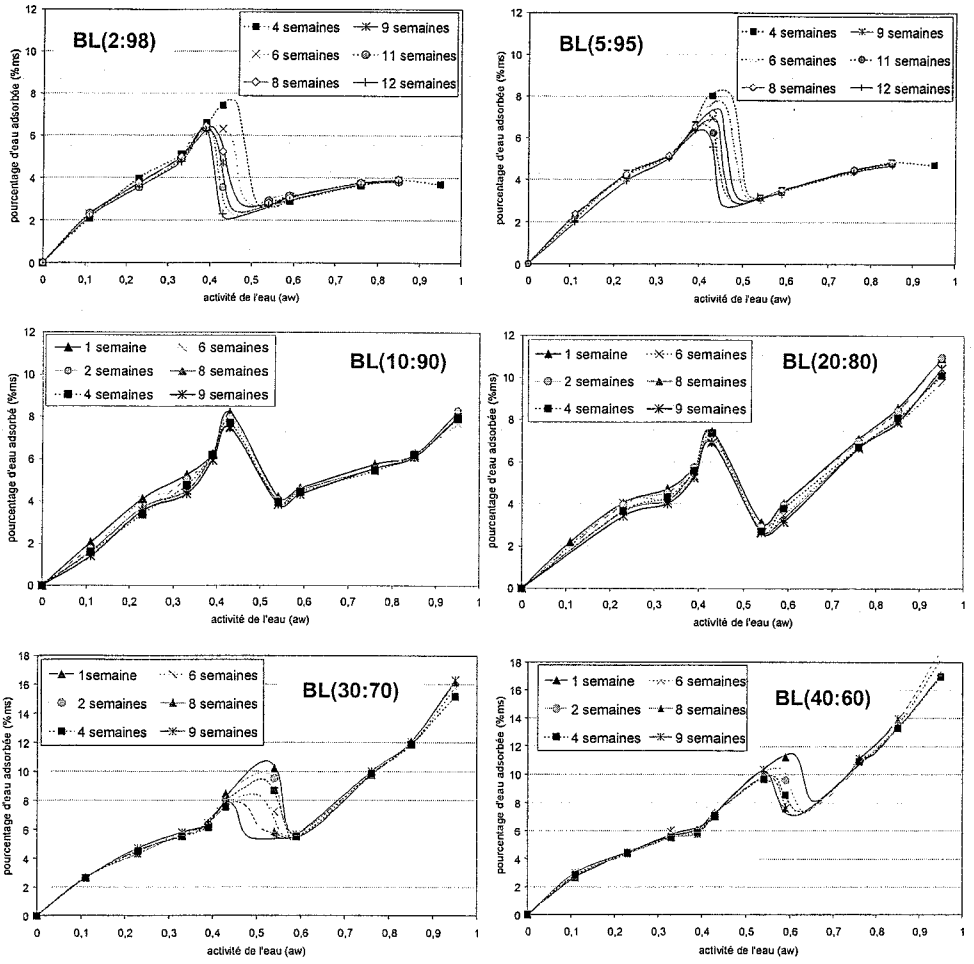


Figure III. 17 : Courbes isothermes de sorption d'eau du lactose lyophilisé et des poudres modèles contenant 2, 5, 10, 20, 30 et 40% de β-lactoglobuline établies après une à 12 semaines de conservation à des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,95.

Les trois premiers graphes de la figure III.17 (lactose, BL(2:98) et BL(5:95)) correspondent aux poudres dont les isothermes de sorption à l'équilibre présentent une a_w critique de 0,43. Dans la poudre de lactose, la libération d'eau apparaît nettement à l'a_w 0,43 entre la troisième et la quatrième semaine de conservation, alors qu'il faut respectivement 6 et 11 semaines pour les poudres modèles à 2% et à 5% de β-lactoglobuline.

Les trois graphes suivants de la figure III.17 (BL(10:90), BL(20:80) et BL(30:70)) correspondent aux poudres ayant une a_w critique de l'ordre de 0,54. Elles montrent que les courbes isothermes de sorption d'eau des poudres modèles contenant 10 et 20% de β-

lactoglobuline sont quasiment superposables entre la première et la neuvième semaine de conservation. Le comportement de sorption d'eau est inchangé pendant cette période, ce qui signifie que l'équilibre de sorption d'eau est atteint dès la première semaine. Par contre, la teneur en eau de la poudre à 30% de β-lactoglobuline conservée sous une activité de l'eau de 0,54 diminue fortement de la première à la huitième semaine de conservation, puis plus faiblement jusqu'à la neuvième semaine, où l'équilibre est atteint.

Le dernier graphique est celui de la poudre BL(40:60), dont l'a_w critique est de 0,59, a une teneur en eau qui diminue fortement à cette a_w jusqu'à la huitième semaine de conservation.

Pour toutes les poudres modèles ayant une même a_w critique, plus la teneur en β-lactoglobuline est importante, plus la durée de mise en équilibre de la poudre est longue. Ce résultat indique que les molécules de β-lactoglobuline présentes dans les poudres limitent les phénomènes de diffusion et de migration des molécules d'eau.

Il est cependant important de souligner que pour toutes les poudres étudiées, l'équilibre de sorption aux activités de l'eau comprises entre 0 et 0,39 et entre 0,76 et 0,95 est atteint dès la première semaine. Seule la stabilisation des teneurs en eau aux activités de l'eau proches de l'a_w critique des poudres est plus longue, indiquant qu'un phénomène particulier se produit à cette a_w.

La mise en équilibre de deux poudres modèles a été comparée à celle de poudres produites par mélange de lactose et de β-lactoglobuline lyophilisés séparément. Les poudres modèles choisies pour l'étude sont BL(10:90) dont la courbe isotherme est stable dès la première semaine de conservation et BL(40:60) qui atteint son équilibre de sorption d'eau après 8 semaines environ.

Les figures III.18a et III.18b regroupent les isothermes de sorption de la poudre modèle (10:90) et de la poudre mélangée B(10)+L(90) respectivement. Rappelons que les poudres produites par mélange ont une a_w critique de 0,43, identique à celle d'une poudre de lactose pur.

La figure III.18 (cf §I) montre qu'après une semaine de conservation la courbe isotherme de sorption de la poudre mélangée B(10)+L(90) est similaire à celle de la poudre modèle BL(10:90), mais elle libère ensuite graduellement de l'eau jusqu'à la huitième semaine de conservation.

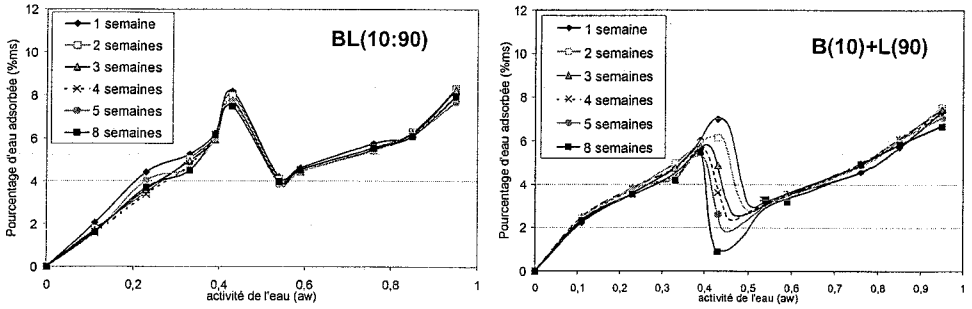


Figure III. 18. Courbes isothermes de sorption d'eau établies après 1, 2, 3, 4, 5 et 8 semaines de conservation de poudres à 10% de β-lactoglobuline, modèle (graphique de gauche) et produite par mélange (graphique de droite), sous des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,95.

La figure III.19 regroupe les courbes isothermes de sorption obtenues à différents temps de conservation de la poudre modèle BL(40:60) et de la poudre mélangée B(40)+L(60).

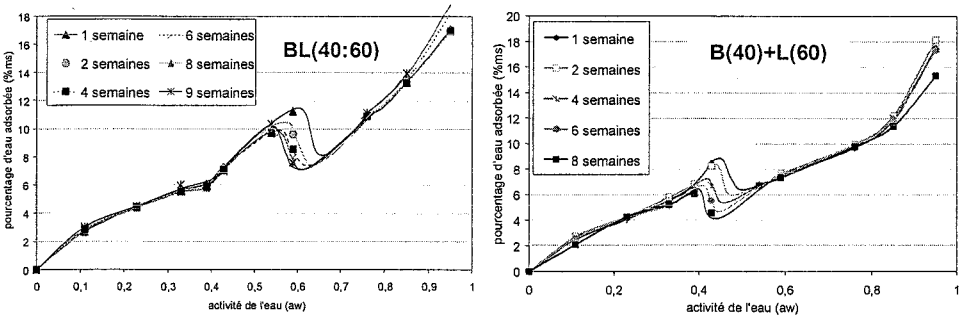


Figure III.19 : Courbes isothermes de sorption d'eau établies après 1, 2, 4, 6 et 8 semaines de conservation à 20°C sous des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,95 de poudres à 40% de β-lactoglobuline, modèle (graphique de gauche) et produite par mélange (graphique de droite).

Les deux poudres libèrent de l'eau de manière graduelle jusqu'à la huitième semaine de conservation environ (figure III.19). Le temps observé pour atteindre l'équilibre de sorption est relativement long dans ces poudres car la présence d'une forte quantité de β-lactoglobuline ralentit la diffusion des molécules d'eau.

Les poudres mélangées B(10)+L(90) et B(40)+L(60) ont donc une cinétique de mise en équilibre similaire, qui est gouvernée par la distance physique entre les particules des deux types de poudre ; et pas par la teneur en β-lactoglobuline de la poudre.

II.1.3. Cinétique de la cristallisation

Temps de latence avant cristallisation

Le suivi en fonction du temps de la teneur en eau des poudres modèles conservées à différentes activités de l'eau a permis de déterminer le temps écoulé avant la cristallisation dans chaque échantillon. Ce temps de latence a été établi à partir de l'observation des courbes isothermes de sorption d'eau. Il est défini comme le temps après lequel la teneur en eau d'une poudre, à une a_w donnée, devient inférieure à la teneur en eau à l'a_w précédente sur la courbe isotherme. C'est à dire lorsqu'une « cassure » apparaît nettement sur la courbe isotherme de sorption d'eau. Ce critère a été choisi car il est répétable et parce que la diminution de la teneur en eau de certaines poudres est parfois trop graduelle pour déterminer précisément par gravimétrie le début de cristallisation.

Les temps de latence avant la cristallisation des poudres modèles contenant de 0 à 40% de β-lactoglobuline conservées à des activités de l'eau comprises entre 0,43 et 0,76 sont représentés figure III.20.

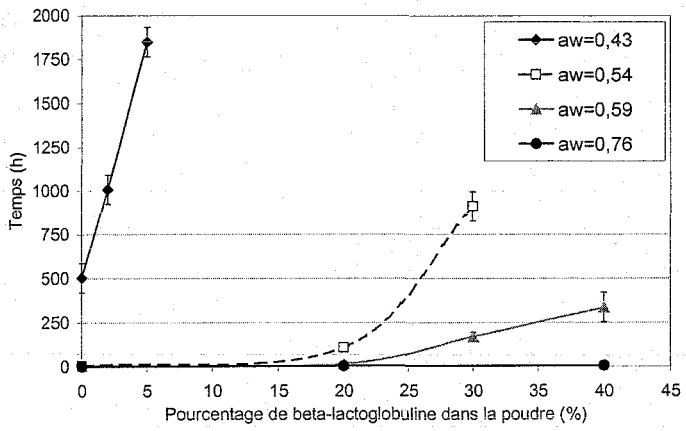


Figure III.20. Temps de latence avant cristallisation observé dans les poudres modèles conservées à 20°C et sous une a_w de 0,43, 0,54, 0,59 et 0,76 en fonction de leur teneur en β-lactoglobuline.

De manière générale, le temps de latence avant la cristallisation diminue lorsque l'a_w de conservation des poudres augmente. Ceci est lié à l'augmentation de la mobilité moléculaire à cause de la présence d'eau à forte a_w, qui accélère l'arrangement des molécules de lactose en un réseau cristallin. La figure III.20 montre aussi que le temps avant cristallisation augmente avec l'augmentation de la teneur en β-lactoglobuline de l'échantillon. L'encombrement stérique de la protéine défavorise l'organisation des molécules de lactose en réseau. De plus,

le poids moléculaire important de la β-lactoglobuline (18300 Da) tend à augmenter la viscosité du système (et sa température de transition vitreuse), ce qui limite les phénomènes de diffusion. Cependant, le temps avant cristallisation n'augmente pas de la même manière avec les quantité croissantes de β-lactoglobuline, selon l'a_w que l'on considère. A une a_w de 0,43, la présence de seulement 2% de β-lactoglobuline dans la poudre modèle double le temps avant cristallisation, par rapport à la poudre de lactose. A cette a_w, même de faibles teneurs en β-lactoglobuline ont un net effet retardateur de cristallisation. A une a_w de 0,54, l'augmentation du temps avant cristallisation est beaucoup moins sensible à l'augmentation de la teneur en β-lactoglobuline dans la poudre, et ce jusqu'à 20%. Au-delà de 25% de β-lactoglobuline, le délai avant cristallisation augmente nettement. Sous une a_w de 0,59, c'est l'augmentation de la teneur en β-lactoglobuline de 30 à 40% qui augmente le plus le temps avant cristallisation. Sous une a_w de 0,76, les teneurs en β-lactoglobuline jusqu'à 40% n'influencent pratiquement pas le temps avant cristallisation.

Ainsi, plus l'a_w de conservation est élevée, plus la proportion de β-lactoglobuline doit être importante dans la poudre modèle pour augmenter de manière significative le délai avant cristallisation. C'est lorsque l'a_w de conservation est la plus proche de l'a_w critique de cristallisation du lactose (a_w=0,43) que l'influence de la β-lactoglobuline sur le temps avant cristallisation est la plus nette ; elle apparaît dès l'introduction de faibles teneurs.

Cinétiques de libération d'eau à l'a_w critique

La diminution de la teneur en eau des poudres conservées à différentes activités de l'eau a été étudiée en fonction du temps pour estimer la vitesse de diffusion, selon la teneur en β-lactoglobuline des poudres modèles. La diminution de la teneur en eau des poudres de lactose, BL(2:98) et BL(5:95), ainsi que celle des poudres mélangées B(10)+L(90) et B(40)+L(60) est représentée figure III.21 en fonction du temps de conservation sous une activité de l'eau de 0,43.

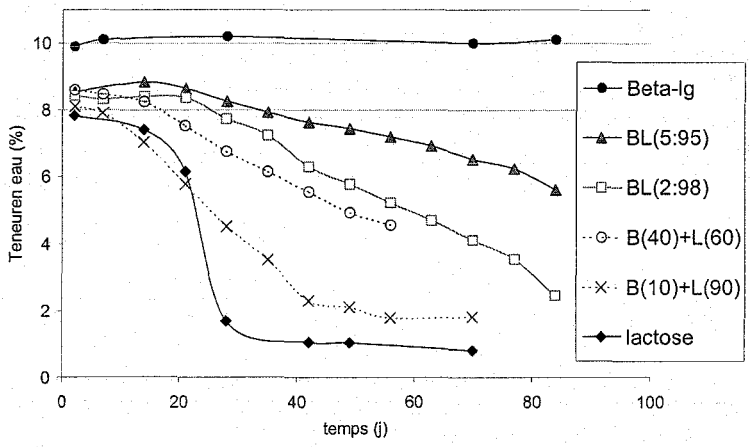


Figure III.21 : Evolution de la teneur en eau d'échantillons de poudres de β-lactoglobuline, de lactose, de BL(2:98) et BL(5:95) et des poudres produites par mélange B(10)+L(90) et B(40)+L(60), en fonction du temps de conservation sous une activité de l'eau de 0,43 et 20°C. Les écarts-types sont de la taille des symboles.

La figure III.21 montre que la présence de β-lactoglobuline dans les poudres, même en faible quantité (2 et 5%) modifie complètement l'allure de la courbe de libération d'eau en fonction du temps. La courbe obtenue pour le lactose a une forme de sigmoïde très marquée, avec une diminution rapide de la teneur en eau, surtout entre le 20ème et le 30ème jour de conservation sous une a_w de 0,43. Au contraire, la perte d'eau des poudres BL(2:98) et BL(5:95) est très progressive en fonction du temps, ce qui suggère un mécanisme de cristallisation plus graduel que dans la poudre de lactose. Plus la teneur en β-lactoglobuline est importante, et moins la poudre modèle libère de l'eau, ce qui est certainement lié à la forte hygroscopicité de la β-lactoglobuline.

La libération d'eau par la poudre B(10)+L(90) est proche de celle de B(40)+L(60) qui contient plus de protéines. La libération d'eau par ces poudres est plus lent que pour le lactose, mais elle est néanmoins plus marquée que pour les poudres co-lyophilisées. Ceci indique, comme nous l'avons vu précédemment, que la cinétique de libération d'eau dans les poudres mélangées est plus gouvernée par la distance physique entre les particules que par la teneur en β-lactoglobuline. Le développement de la cristallisation du lactose est visiblement différent selon le mode de préparation de la poudre. La différence d'a_w de cristallisation entre poudres co-lyophilisées et poudres mélangées provient de la différence de proximité des

molécules. Dans les poudres mélangées, les composants ne sont pas intimement en contact, et les phénomènes comme la diffusion et la mobilité moléculaire ne sont pas aussi limités que lorsque les composants sont co-lyophilisés. Tout semble indiquer que la proximité des composants dans la poudre modèle, co-lyophilisée, permet l'établissement d'interactions entre lactose et β-lactoglobuline, qui sont à l'origine de la stabilisation de la poudre vis-à-vis de la cristallisation.

La figure III.22 représente la teneur en eau des poudres de lactose et des poudres modèles à 5, 20 et 30% de β-lactoglobuline en fonction du temps de conservation à une a_w de 0,54. La cinétique des poudres à 20 et 30% de protéine ne peut être étudiée qu'à une a_w de 0,54 car elles ne libèrent pas d'eau à une a_w de 0,43.

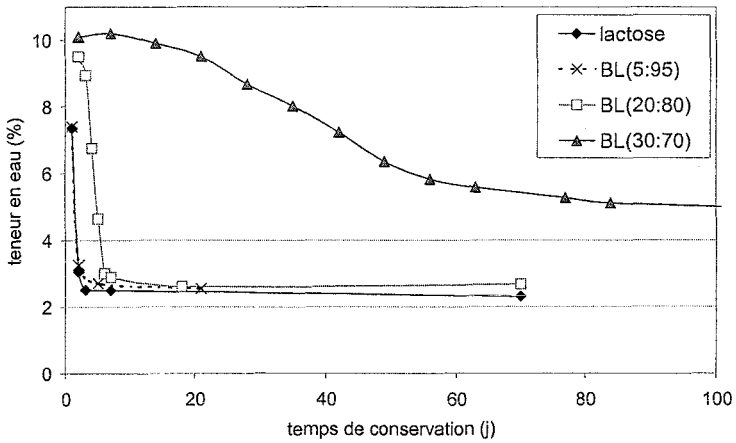


Figure III.22 : Evolution de la teneur en eau d'échantillons de poudres de lactose et de poudres modèles à 5, 20 et 30% de β-lactoglobuline, en fonction du temps de conservation sous une activité de l'eau de 0,54.

La figure III.22 montre que sous une a_w de 0,54 les cinétiques des poudres à 5% et même à 20% de β-lactoglobuline sont proches de celle du lactose. La présence de protéine ralentit la libération d'eau qui accompagne la cristallisation, mais le phénomène est d'autant plus net que la teneur en protéine dépasse 20%.

Vitesse du phénomène dans les poudres

Les valeurs des pentes maximum des tangentes aux courbes des figures III.21 et III.22 ont été calculées. Elles correspondent aux vitesses maximum de libération d'eau par chaque poudre et sont reportées figure III.23 en fonction du pourcentage de β-lactoglobuline de la poudre.

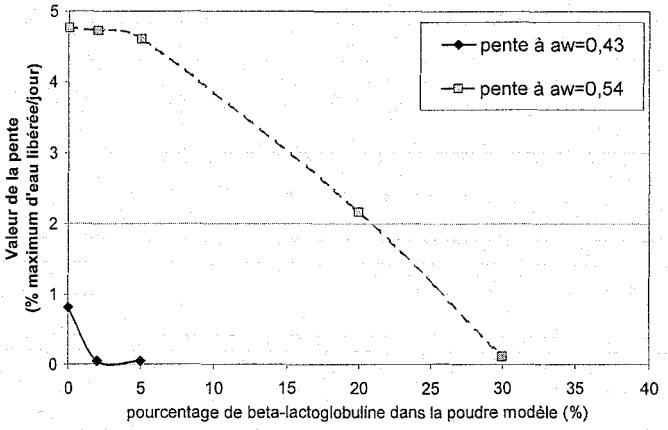


Figure III.23 : Vitesse maximum de libération d'eau par les poudres modèles conservées sous des a_w de 0,43 et 0,54, en fonction de leur teneur en β-lactoglobuline. La vitesse correspond à la pente de la tangente à la courbe de teneur en eau en fonction du temps de conservation (% d'eau libérée par jour).

Sous une a_w de 0,43 la vitesse maximum de libération d'eau est fortement diminuée dès l'introduction de faibles teneurs en β-lactoglobuline dans la poudre modèle ; par contre, à une a_w de 0,54 la vitesse de libération d'eau reste élevée pour de faibles teneurs en β-lactoglobuline (jusqu'à environ 10%). La vitesse maximum de libération d'eau peut être grossièrement assimilée à la vitesse de diffusion de l'eau à l'intérieur des poudres. Elle est donc également un indicateur de la vitesse de croissance cristalline (et de diffusion moléculaire) dans chaque échantillon. Si l'on tient compte de ces hypothèses, on peut estimer que comparativement à une a_w de 0,54, la diffusion moléculaire sous une a_w de 0,43 est fortement ralentie dès les faibles teneurs en β-lactoglobuline.

Donc, que l'on considère le temps de latence avant cristallisation ou la vitesse de développement du phénomène dans les poudres (correspondant à la vitesse de libération d'eau), on note que c'est à une a_w de 0,43 que la cristallisation est la plus limitée par la présence de β-lactoglobuline, même en faible quantité. Des modifications particulières interviennent dans les poudres modèles contenant 10 à 30% de β-lactoglobuline, conservées à des activités de l'eau proches de l'a_w critique de la cristallisation du lactose. Les interactions établies entre lactose et β-lactoglobuline modifient les vitesses de diffusion à l'intérieur des

particules, et par conséquent la cristallisation du lactose. Les modifications de l'environnement apportées par la protéine, ne sont pas les seules responsables du décalage de l'a_w de cristallisation observé sur les courbes isothermes de sorption d'eau.

Knudsen *et al.* (2002) ont constaté un processus de cristallisation plus lent dans une poudre de lait entier avec 26-29% de protéines, que dans une formule infantile avec 12% de protéines. Mazzobre *et al.* (2001) ont également montré que les temps pour atteindre 50% de cristallisation du lactose dans un système lactose:trehalose (80:20) sont plus longs que pour du lactose pur. Cependant, ce phénomène n'est pas clairement discuté et les auteurs étudient plus souvent le délai avant cristallisation que le temps du processus de cristallisation lui-même (Shamblin *et al.*, 1996 ; Knudsen *et al.*, 2002).

Forbes *et al.* (1998) ont montré que dans des systèmes atomisés, la catalase semble inhiber plus longtemps la cristallisation du lactose que l'insuline et ils ont expliqué ce résultat par la différence d'hygroscopicité de ces deux protéines. Dans les poudres modèles, la cristallisation est plus graduelle que dans les poudres de lactose et ceci peut aussi être lié aux capacités différentes du lactose et de la β-lactoglobuline à former des liaisons avec l'eau. En effet, quelle que soit l'activité de l'eau considérée, la β-lactoglobuline adsorbe de l'eau beaucoup plus vite que le lactose. On peut émettre l'hypothèse que si l'eau est préférentiellement adsorbée par la protéine dans les poudres modèles, elle retarde la croissance cristalline.

II.2. Détermination de l'état physique du lactose dans les poudres modèles

II.2.1. Détermination de l'a_w critique de cristallisation

Plusieurs techniques (ATD, diffraction des rayons X et analyse infrarouge) ont été utilisées pour étudier l'état amorphe ou cristallisé du lactose dans les poudres et vérifier que l'a_w critique de libération d'eau repérée sur les courbes isothermes de sorption correspond à la cristallisation.

Analyse thermique différentielle (ATD)

La caractérisation de l'état physique du lactose a été menée par analyse thermique différentielle. Les mesures ont été effectuées avec un calorimètre différentiel. Les thermogrammes de la poudre de lactose avant conservation et après conservation sous différentes activités de l'eau sont rassemblés figure III.24.

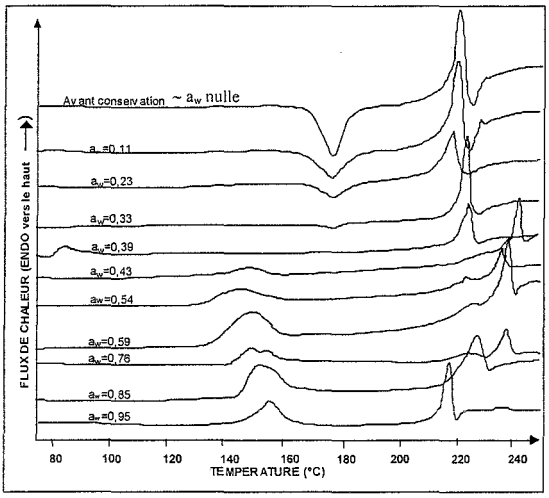


Figure III.24. Comparaison des thermogrammes issus de l'analyse thermique différentielle des échantillons de lactose avant conservation (courbe du haut), et après 12 semaines de conservation à 20°C sous des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,95.

La courbe ATD du lactose avant conservation présente un pic exothermique à environ 175°C et un pic endothermique à 218°C (figure III.24, courbe du haut). Ces pics correspondent respectivement à la cristallisation du lactose amorphe, qui se produit au cours de la montée en température, et à la fusion des cristaux de lactose α formés. Ces thermogrammes sont en accord avec ceux obtenus par Corrigan *et al.* (2002) pour du lactose amorphe produit par atomisation, ainsi qu'avec Figura (1993) pour du lactose amorphe produit par lyophilisation. Avant conservation, les échantillons de lactose lyophilisés sont amorphes. Les courbes obtenues après 12 semaines de conservation à des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,33 comportent également des pics exothermes de cristallisation du lactose à 175°C, ce qui prouve que le lactose conservé sous ces a_w est toujours amorphe.

Le thermogramme du lactose conservé sous une a_w de 0,39 présente un pic de fusion des cristaux de forme α à 222°C, et un pic endothermique à 84°C, de forme irrégulière. Selon Darcy et Buckton (1997) et Buckton *et al.* (1998), ce pic pourrait correspondre à la libération de molécules d'eau piégées dans la structure effondrée de la poudre.

Le thermogramme du lactose conservé à une activité de l'eau de 0,43 présente un faible épaulement à 150°C et un pic de fusion de formes cristallines β anhydres à 242°C. Le faible épaulement indique la présence de cristaux α monohydratés qui libèrent la molécule d'eau incluse dans leur structure à 150°C. Les échantillons de lactose conservés sous une a_w de 0,43

sont donc principalement cristallisés sous les formes α monohydratées et β anhydres. Ce résultat est en accord avec ceux de Jouppila *et al.* (1998) et Buckton *et al.* (1998) qui ont démontré que des échantillons de lactose conservés à 44% d'humidité relative présentent très nettement les caractéristiques des formes de lactose β (résultats obtenus par ATD et spectroscopie infrarouge).

Les échantillons de lactose conservés à des activités de l'eau comprises entre 0,55 et 0,95 contiennent tous du lactose α-monohydraté car les courbes présentent des pics endothermiques à 150°C. Il semble que les échantillons contiennent également d'autres formes cristallines si l'on en juge par les températures (entre 220 à 240°C) et la forme des pics de fusion irrégulières. Bien que la mutarotation des formes α et β puisse apparaître au cours de la montée en température pendant l'analyse et modifier la proportion des différentes formes cristallines (Angberg, 1995), ces résultats sont en accord avec ceux de Corrigan *et al.* (2002), Buckton *et al.* (1998) et Darcy et Buckton (1997). Ces auteurs ont montré que le lactose conservé à des activités de l'eau supérieures à 0,55 cristallise principalement sous les formes α et β anhydres, avant de subir une mutarotation en lactose α monohydraté à l'état solide, au cours du temps.

Les échantillons de lactose conservés à des a_w supérieures ou égales à 0,43 sont donc cristallisés, ce qui correspond à l'a_w de libération d'eau observée sur les courbes isothermes de sorption d'eau du lactose (figure III.11). D'après ces mêmes courbes de sorption, nous nous attendions à ce que le lactose conservé à a_w 0,39 soit amorphe. En fait, le thermogramme indique plutôt qu'une première étape d'altération s'est produite car la structure de la poudre de lactose a commencé à s'effondrer ; par contre, l'échantillon n'est pas encore cristallisé. Selon les courbes isothermes de sorption d'eau et les résultats de la littérature, la température d'effondrement du lactose (« collapse ») est de 10 à 15°C supérieure à la température de transition vitreuse Tg, alors que la température de cristallisation est parfois 50°C supérieure à Tg (Jouppila et Roos, 1994a ; Champion *et al.*, 2000). Pendant la conservation, l'effondrement apparaît avant la cristallisation (Buckton et Darcy, 1996 ; Newell *et al.*, 2001). En conséquence, l'a_w d'effondrement de la structure est plus basse que l'a_w de cristallisation. Corrigan *et al.* (2002) ont rapporté que la structure effondrée du lactose pouvait rester stable plus d'un an, parce que la libération d'eau par ce type de structure est très lente (Darcy et Buckton 1997). Cela explique la stabilité de la teneur en eau de l'échantillon de lactose conservé à une activité de l'eau de 0,39.

Les thermogrammes des poudres modèles contenant des quantités croissantes de β-lactoglobuline de 0 à 20%, avant conservation, sont comparés figure III.25.

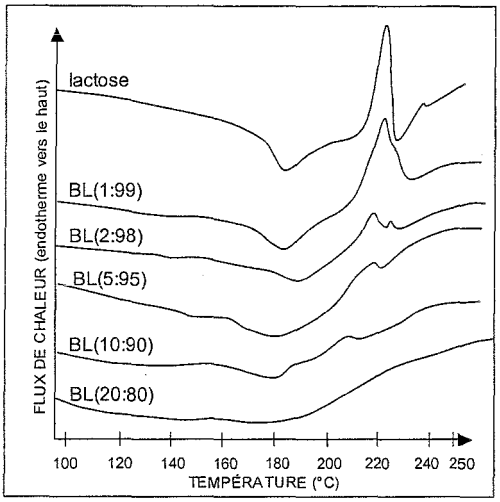


Figure III.25. Comparaison des thermogrammes de poudres modèles contenant des quantités croissantes de 0 à 20% de β-lactoglobuline, avant conservation.

Les thermogrammes du lactose et de la poudre contenant 1% de β-lactoglobuline présentent un pic exothermique à 175°C dû à la cristallisation du lactose amorphe et un pic de fusion des cristaux α formés, à environ 218°C. Par contre, la figure III.25 montre de manière très nette que plus la poudre contient de β-lactoglobuline, plus l'amplitude des pics est faible. Le thermogramme devient plat et difficile à interpréter à partir d'une concentration de 5% de β-lactoglobuline. En fait, le comportement thermodynamique de la protéine prédomine sur celui du lactose et masque les variations d'enthalpie de l'échantillon de poudre. Cela est probablement lié au poids moléculaire très différent des deux composants : le PM de la protéine est 50 fois plus élevé que celui du lactose. Corrigan *et al.* (2002) ont également constaté que l'analyse thermique différentielle de lactose atomisé avec 20% de PEG 4000 (polyéthylène glycol) ne présente pas de pic exothermique de cristallisation, alors qu'une analyse par diffraction des rayons X montre l'état amorphe du lactose.

Après cette constatation, la poudre BL(10:90) a été conservée une semaine à une a_w de 0,85 et 20°C, conditions qui sont très favorables à la cristallisation du lactose, pour repérer les

différences générées au niveau des thermogrammes. La figure III.26 compare un échantillon de BL(10:90) avant conservation, et après conservation une semaine sous une a_w de 0,85.

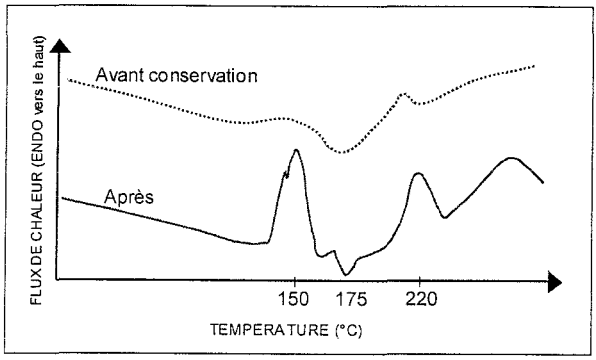
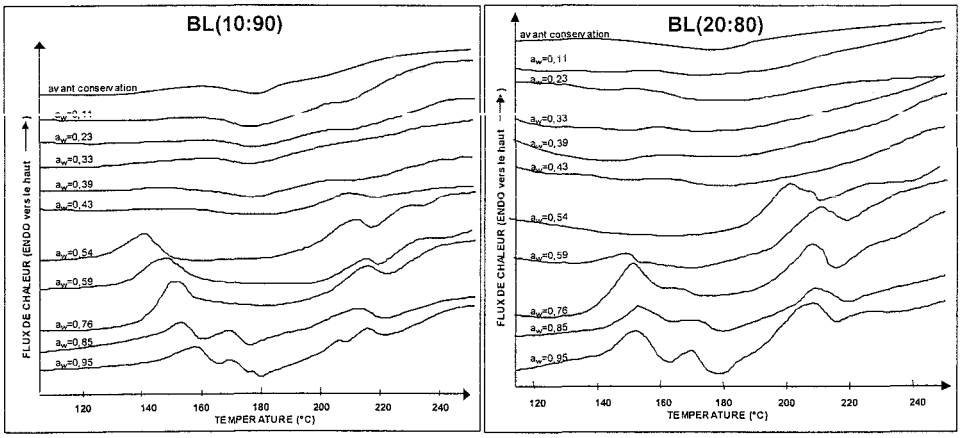


Figure III.26. Comparaison des thermogrammes de la poudre modèle BL(10:90) avant conservation et après une semaine de conservation à 20°C sous une activité de l'eau de 0,85.

Les deux courbes présentent des différences importantes. Le pic exothermique de cristallisation (175°C) disparaît et celui de fusion des cristaux α augmente. On repère également le pic endothermique à 150°C, dû à la présence de lactose α-monohydraté qui libère l'eau incluse dans sa structure à cette température. Malgré la présence de β-lactoglobuline qui masque partiellement l'analyse thermique, des différences importantes sont repérables sur les thermogrammes après la cristallisation du lactose. Les poudres modèles ont donc été analysées avec cette méthode thermique différentielle. Leurs thermogrammes sont reportés figure III.27.



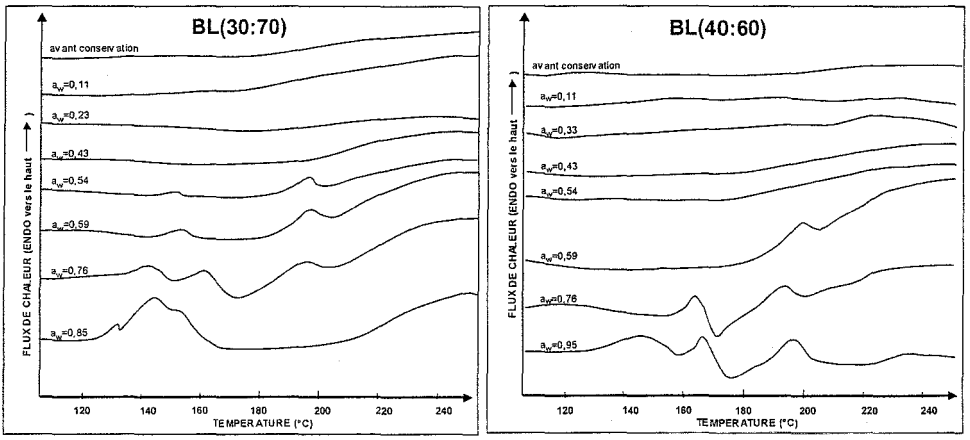


Figure III.27 : Comparaison des thermogrammes issus des analyses thermiques différentielles des poudres modèles à 10, 20, 30 et 40% de β-lactoglobuline, avant conservation et après 12 semaines à 20°C sous des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,95.

Les thermogrammes de la poudre BL(10:90) conservée sous des activités de l'eau comprises entre 0,11 et 0,43 présentent un faible pic exothermique à 180°C, qui indique que tous les échantillons contiennent du lactose amorphe. Lorsque les a_w de conservation sont comprises entre 0,54 et 0,95 les thermogrammes présentent un net pic endothermique à 140-150°C, qui correspond à la libération d'eau incluse dans la structure des cristaux de lactose α-monohydraté (figure III.27). Les échantillons de poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline contiennent donc du lactose amorphe jusqu'à une a_w de conservation de 0,43 et sont tous cristallisés aux a_w supérieures ou égales à 0,54.

Les fortes teneurs en β-lactoglobuline contenues dans les poudres à 20 et 30% de β-lactoglobuline rendent les résultats encore plus difficiles à interpréter (figure III.27). Les courbes obtenues sont relativement plates lorsque l'a_w de conservation est inférieure à 0,43. Par contre, lorsque l'a_w atteint 0,54 et plus, le thermogramme présente clairement des pics de fusion des cristaux de lactose α et β, aux températures supérieures à 215°C. Ainsi, le lactose est amorphe jusqu'à une a_w de 0,43, puis cristallisé à des activités de l'eau égales ou supérieures à 0,54. Les résultats de l'analyse thermique différentielle de la poudre BL(40:60) sont présentés figure III.27. Les thermogrames ne présentent pas de pics caractéristiques lorsque l'a_w de conservation est inférieure ou égale à 0,54, par contre d'importantes différences endothermiques apparaissent à partir de l'a_w 0,59.

Ainsi la libération d'eau par les poudres modèles, observée sur les courbes isothermes de sorption (figure III.11), est liée à la cristallisation car l'a_w de libération d'eau correspond à l'a_w de « transition » observée d'après les thermogrammes. Cependant, la présence de β-lactoglobuline rend l'analyse thermique délicate à interpréter, d'où la vérification de ce résultat par d'autres méthodes.

Diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge

La diffraction des rayons X et la spectroscopie dans le moyen infrarouge ont été utilisées pour déterminer l'état amorphe ou cristallisé du lactose dans les poudres contenant de la β-lactoglobuline. Des échantillons de la poudre BL(10:90) conservés 12 semaines à a_w 0,43 et 0,54 ont été analysés par ces deux techniques. Les spectres de diffraction des rayons X sont comparés figure III.28.

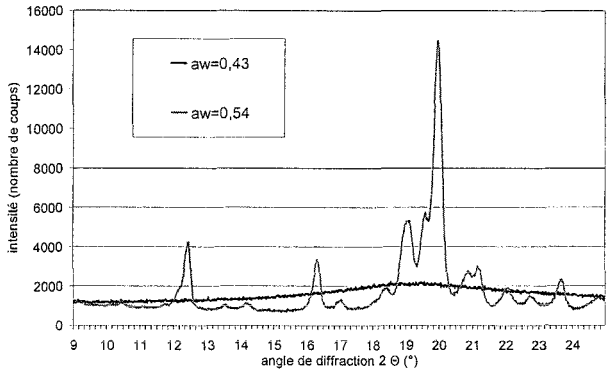


Figure III.28 : Spectre de diffraction des rayons X de la poudre modèle BL(10:90) à 10% de β-lactoglobuline conservée 12 semaines à 20°C sous des activités de l'eau de 0,43 et 0,54.

Le spectre de la poudre BL(10:90) conservée sous une activité de l'eau de 0,43 ne possède pas de pics bien définis. Il présente une bande large, de faible intensité. Ce spectre est caractéristique d'une substance amorphe, qui produit une faible dispersion du signal photonique (Briggner *et al.*, 1994 ; Drapier-Bêche, 1997). Par contre, le spectre de la poudre BL(10:90) conservée sous une a_w de 0,54 présente des pics bien résolus qui sont dus à la diffraction des rayons X par des formes cristallines. Cette analyse montre sans ambiguïté que, après 12 semaines de conservation, le lactose contenu dans la poudre BL(10:90) est amorphe à une a_w de conservation de 0,43 et cristallin à une a_w de 0,54.

Des mesures de spectroscopie dans le moyen infrarouge ont été réalisées sur des poudres de lactose et BL(10:90) conservées 12 semaines sous une a_w de 0,43. Les spectres sont comparés figure III.29.

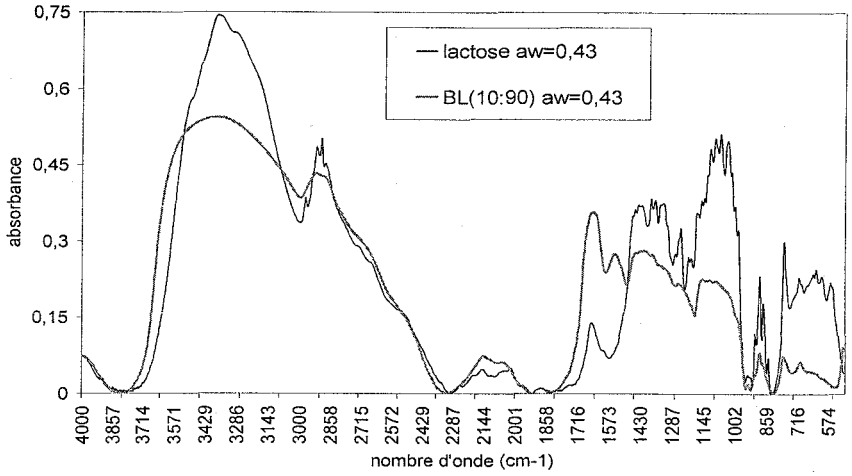


Figure III.29 : Comparaison des spectres infrarouges du lactose et de la poudre modèle BL(10:90) conservés 12 semaines sous une activité de l'eau de 0,43.

D'après la littérature, les spectres infrarouges de substances amorphes sont faiblement résolus, alors que les substances cristallines génèrent des bandes vibrationnelles bien définies (Drapier-Bêche, 1997 ; Ottenhof *et al.*, 2003). La figure III.29 montre que le lactose pur conservé sous une a_w de 0,43 génère un spectre infrarouge très résolu, qui présente de nombreux pics. Le lactose est donc cristallin à une a_w de 0,43. Au contraire, le spectre de BL(10:90) est faiblement résolu, il ne présente pas de pics nets. Le lactose contenu dans la poudre BL(10:90) est donc resté amorphe à une activité de l'eau de 0,43.

La comparaison de l'analyse thermique différentielle avec les spectres infrarouges et de diffraction des rayons X permet d'affirmer que toutes ces méthodes sont adaptées pour la détermination de l'état du lactose dans les poudres modèles. Ce résultat est intéressant car il montre qu'un appareillage lourd comme le diffractomètre de rayons X, souvent cité comme référence pour certifier l'état cristallin dans une poudre, n'est pas forcément indispensable. L'analyse thermique différentielle est facile à mettre en œuvre et peut être adaptée à la détection de l'état cristallin du lactose, bien que la présence de quantités importantes de β-lactoglobuline rende l'interprétation plus difficile. Même une observation par microscopie électronique à balayage peut être pertinente, bien qu'elle ne permette qu'une étude qualitative.

Toutes les analyses de l'état du lactose dans les poudres modèles sont concordantes. La cristallisation du lactose et la libération d'eau visible sur les courbes isothermes de sorption d'eau ont lieu simultanément. Cela signifie que l'a_w de cristallisation du lactose pur est 0,43; celle des poudres modèles contenant 10 à 30% de β-lactoglobuline est 0,54. Enfin, l'a_w de cristallisation de la poudre modèle avec 40% de β-lactoglobuline est 0,59. La présence de β-lactoglobuline dans les poudres modèles modifie leur comportement de sorption d'eau et décale l'a_w de cristallisation à des valeurs plus élevées par rapport au lactose.

D'après Lane et Buckton (2000), la libération d'eau par les poudres de lactose se produit peu de temps avant la cristallisation, et se poursuivrait légèrement après la fin de la cristallisation. Nous ne sommes pas en mesure de confirmer cette hypothèse car les activités de l'eau utilisées pour établir les courbes isothermes de sorption d'eau sont éloignées et nous détectons une libération d'eau et une cristallisation simultanées. Il faudrait poursuivre l'étude avec un appareillage plus précis notamment au niveau de la gravimétrie, tel que le DVS (Dynamic Vapour Sorption) pour éclaircir ce point.

II.2.2. Caractérisation des formes cristallines produites dans les poudres

Les analyses par ATD, spectroscopie infrarouge et surtout de diffraction des rayons X permettent de déterminer les différentes formes cristallines du lactose produites dans les poudres modèles au cours de leur conservation.

A l'a_w critique de début de cristallisation

Nous avons étudié l'influence de la β-lactoglobuline sur les formes cristallines du lactose en déterminant par diffraction des rayons X le type de cristaux formés dans les poudres conservées à l'a_w où elles commencent à cristalliser. Le diagramme de diffraction des rayons X de la poudre de lactose conservée 18 jours sous une a_w de 0,43 a été comparé figure III.30 à celui de la poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline conservée sous une a_w de 0,54.

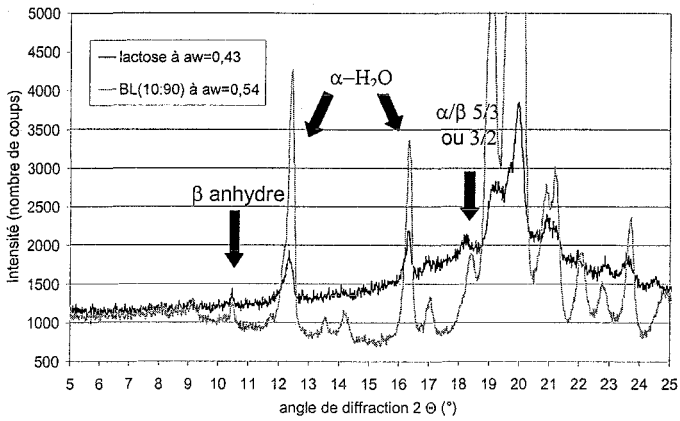


Figure III.30 : Spectres de diffraction des rayons X de poudres de lactose et de BL(10:90) conservées 18 jours à 20°C respectivement sous des activités de l'eau de 0,43 et de 0,54. Les différentes formes cristallines visibles sur le spectre sont indiquées par des flèches.

L'état d'avancement de la cristallisation n'est pas parfaitement identique dans les poudres car l'intensité des pics est différente (figure III.30). Cependant, l'intensité maximum des pics est suffisamment faible par rapport à celle des poudres fortement cristallisées (conservées sous une a_w de 0,76) pour considérer qu'il s'agit du **début de la cristallisation du lactose**. La figure III.30 indique que les deux poudres considérées présentent des pics majoritaires aux angles 2θ=12,5° et 16,4° ; un pic moins important à 18,3° ; et un dernier, presque négligeable, à 10,5°. Ces pics correspondent respectivement au lactose α-monohydraté, au(x) composé(s) moléculaire(s) α /β 5/3 et/ou 3/2 ; et au lactose β anhydre (cf bibliographie). La comparaison de ces diagrammes de diffraction des rayons X montre bien qu'au début de la cristallisation les mêmes formes cristallines de lactose sont produites dans la poudre de lactose et la poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline, BL(10:90).

La présence de β-lactoglobuline n'influence pas les formes cristallines de lactose générées dans les poudres modèles pendant leur conservation. Celles-ci ne sont pas responsables des différences d'a_w critique observées.

Après conservation sous une activité de l'eau élevée (a_w de 0,76)

Les analyses ATD, de spectroscopie dans le moyen infrarouge, et de diffraction des rayons X, effectuées sur les poudres de lactose et les poudres BL(10:90) conservées sous leur a_w de début de cristallisation, et sous une a_w de 0,76 ont permis de suivre les différentes formes

cristallines du lactose, développées dans les poudres depuis le début de cristallisation, jusqu'à la cristallisation étendue, dans les poudres conservées à forte activité de l'eau.

Des analyses ATD des poudres de lactose et de la poudre modèle BL(10:90) avec 10% de β-lactoglobuline ont été effectuées à différents temps de conservation, aux activités de l'eau de début de cristallisation et à forte a_w. Les courbes obtenues pour le lactose sont comparées figure III.31 et celles pour BL(10:90) figure III.32.

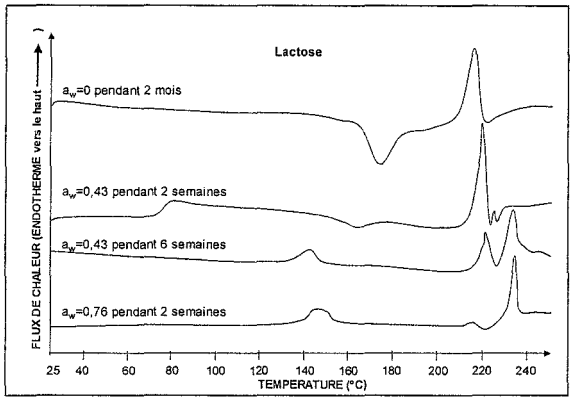


Figure III.31 : Thermogrammes obtenus après analyse thermique différentielle d'échantillons de lactose conservés 2 mois à a_w proche de 0, 2 semaines et 6 semaines sous une a_w de 0,43 ; et 2 semaines sous une a_w de 0,76.

La courbe du lactose à a_w nulle de la figure III.31 indique qu'avant conservation, et même après deux mois à cette a_w, la poudre de lactose est amorphe (cf §I). Les formes cristallines qui se développent à une a_w de 0,43 évoluent entre la deuxième et la sixième semaine de conservation. Après deux semaines, la poudre contient encore une fraction non négligeable de lactose amorphe (pic exothermique à 172°C). Cependant, le lactose a commencé à cristalliser. La température du pic de fusion un peu élevée (221°C) peut être liée à l'apparition de composés moléculaires complexes tels que les formes α/β 5/3 ou 3/2 ; d'autant plus qu'un pic de fusion inconnu apparaît à 225°C. La courbe ATD présente également un pic endothermique à environ 80°C qui indique une évaporation d'eau, probablement liée à une structure effondrée de la poudre.

Après six semaines de conservation sous une a_w de 0,43, la courbe ATD indique une cristallisation complète (figure III.31). Deux pics de fusion de cristaux de taille équivalente

sont visibles à 221°C et 234°C. Ils correspondent probablement à la fusion de cristaux α, et de lactose β anhydre, respectivement.

Après deux semaines de conservation à forte activité de l'eau (0,76), le thermogramme présente un pic à 150°C dû à la présence de lactose α monohydraté, et deux pics de fusion à 216°C et 235°C, caractéristiques des formes α et β. La proportion des formes de lactose β semble très majoritaire dans cette poudre de lactose.

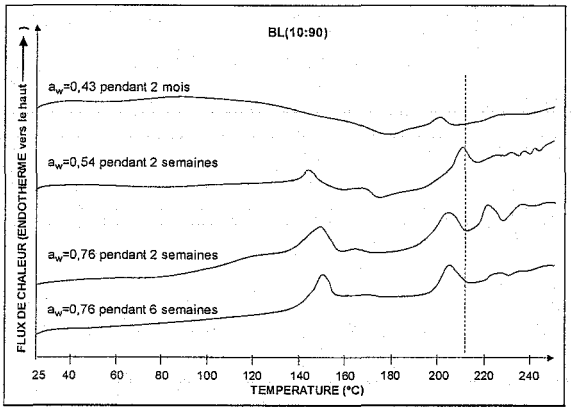


Figure III.32 : Thermogrammes obtenus après analyse thermique différentielle d'échantillons de poudre modèle BL(10:90) conservés 2 mois à a_w nulle, 2 mois sous une a_w de 0,43, et 2 semaines sous des a_w de 0,43 et 0,76.

Après conservation jusqu'à une activité de l'eau de 0,43, les poudres modèles à 10% de β-lactoglobuline (figure III.32) présentent des thermogrammes caractéristiques du lactose amorphe : les courbes ont un pic exothermique de cristallisation à 178°C, et un pic de fusion du lactose α à 200°C, dû aux cristaux formés pendant l'analyse. Il est important de rappeler que l'amplitude des pics observés est faible car la présence de β-lactoglobuline masque l'analyse thermique.

Après conservation sous une a_w de 0,54, la courbe ATD présente un pic à 145°C qui caractérise le lactose α monohydraté et un seul pic de fusion dont la température, assez atypique (210°C), laisse présumer la présence de lactose α monohydraté avec d'autres formes cristallines complexes.

Après deux semaines de conservation de BL(10:90) sous une a_w de 0,76, l'analyse thermique différentielle indique la présence de cristaux de lactose α monohydraté, qui libèrent de l'eau à 150°C, et fondent à 205°C (figure III.32) et de cristaux β anhydres, car un deuxième pic de

fusion apparaît à 220°C. Après six semaines de conservation sous une a_w de 0,76, la poudre contient toujours du lactose α monohydraté et du β anhydre, mais la proportion de β diminue au profit de la forme α.

Les figures III.31 et III.32 semblent indiquer qu'à l'activité de l'eau de début de cristallisation les formes complexes α/β 5/3 ou α/β 3/2, et le lactose α monohydraté sont principalement formées. Les analyses thermiques différentielles correspondent aux observations établies à partir de la diffraction des rayons X. Après conservation à forte activité de l'eau on retrouve surtout des formes α monohydraté et β anhydre dans les poudres, mais dans des proportions différentes. Figura (1993) a cependant montré que la surface des pics de fusion obtenus par ATD n'est pas directement proportionnelle à la quantité de chaque forme cristalline présente dans la poudre.

L'analyse des échantillons de poudres conservés sous une a_w de 0,76 a donc été effectuée en utilisant la diffraction des rayons X, qui a l'avantage de permettre de déterminer (approximativement, car l'appareil n'a pas été spécifiquement calibré) les proportions des différents types de cristaux. Les diagrammes de diffraction des rayons X des poudres de lactose et de BL(10:90) conservées 18 jours sous une a_w de 0,76 sont présentés figure III.33 et III.34. Pour rappel, les diagrammes des mêmes poudres, conservées sous une a_w de 0,43 et qui ont déjà été commentés sont représentés sur les figures. Rappelons qu'à l'a_w de début de cristallisation (c'est-à-dire à une a_w de 0,43 pour le lactose et de 0,54 pour la poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline), les formes cristallines produites, identiques, sont principalement du lactose α monohydraté, des formes complexes α/β 5/3 ou α/β 3/2 et, très minoritairement, du lactose β anhydre.

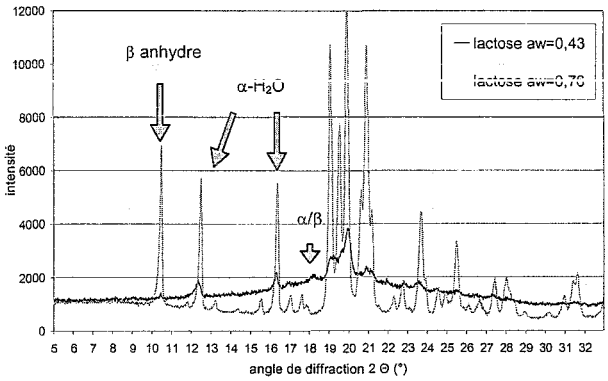


Figure III.33 : Spectres de diffraction des rayons X d'une poudre de lactose conservée 18 jours à 20°C sous des activités de l'eau de 0,43 et 0,76.

Après conservation sous une a_w de 0,76 la poudre de lactose ne présente plus de formes α/β 5/3 ou α/β 3/2. Par contre, les formes α monohydratée et β anhydre se sont beaucoup développées, car le spectre présente des pics de diffraction importants au doublet d'angles 2θ=12,5° et 16,4° et à l'angle 2θ=10,5°, respectivement.

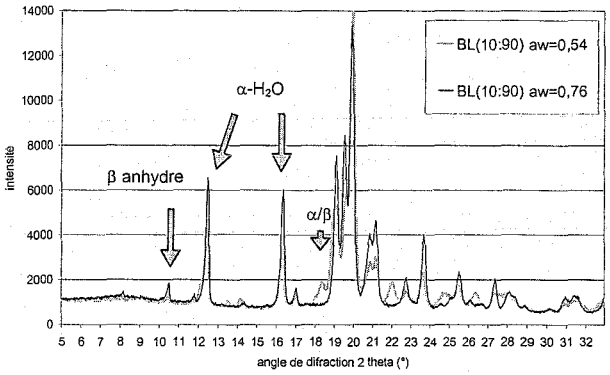


Figure III.34 : Spectres de diffraction des rayons X de la poudre modèle BL(10:90) conservée 18 jours à 20°C sous des activités de l'eau de 0,54 et 0,76.

Après conservation sous une a_w de 0,76, le diagramme de diffraction des rayons X de BL(10:90) ne présente plus que des pics principaux aux angles 2θ=12,5° et 16,4°, et un pic faible à 10,5° (figure III.10). La poudre contient donc comme forme cristalline majoritaire le lactose α monohydraté et une faible proportion de cristaux de lactose β anhydre, mais ne contient plus de formes complexes α/β.

Les résultats obtenus par diffraction des rayons X, résumés tableau III.2, sont cohérents par rapport à l'analyse thermique différentielle de ces échantillons. Il semble que l'ATD soit une méthode adaptée à la détermination des formes cristallines présentes dans une poudre à forte teneur en lactose, malgré le risque de mutarotation en cours d'analyse.

Tableau III.2 : Résumé des formes cristallines du lactose observées par analyse thermique différentielle, diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge, dans les poudres de lactose et BL(10:90) après conservation à l'a_w de début de cristallisation et sous une a_w de 0,76. (Nd : non déterminé)

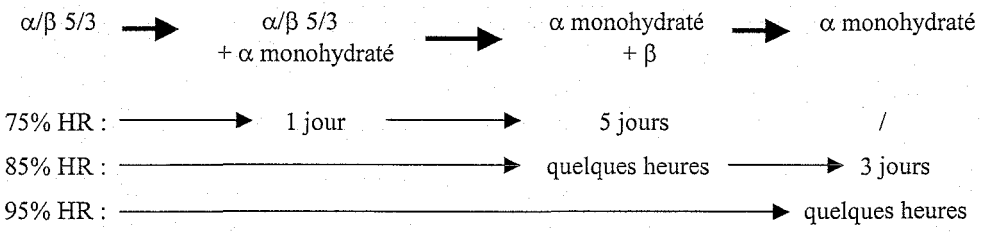
		ATD	Diffraction RX	Infrarouge
Conservation sous l'a_w de début de cristallisation, soit : a_w de l'ordre de 0,43	Lactose	Collapse, α-H_2O et α/β 5/3. Puis α-H_2O et β	α-H_2O et α/β 5/3 (forme β quasiment négligeable)	Nd
a_w de l'ordre de 0,54	BL(10:90)	α-H_2O et α/β 5/3 ?	α-H_2O et α/β 5/3 (forme β quasiment négligeable)	Nd
Conservation sous une a_w de 0,76	Lactose	α-H_2O et β, puis α-H_2O	α-H_2O et β	α-H_2O et peu de forme β
	BL(10:90)	α-H_2O et β, puis α-H_2O et moins de β	α-H_2O et peu de β	α-H_2O et très peu de forme β

Au début de la cristallisation, les mêmes formes de lactose sont produites dans les poudres. Après conservation sous forte activité de l'eau, les formes cristallines de lactose α monohydraté et β anhydre sont détectées, dans des proportions différentes selon la poudre considérée. La poudre de lactose contient plus de lactose β anhydre que de forme α après 18 jours de conservation sous une a_w de 0,76, alors que BL(10:90) contient très peu de forme β anhydre.

De manière générale, de nombreux auteurs ont remarqué que la cristallisation en forme β anhydre est plus fréquente dans les poudres de lactose que dans les poudres de lait contenant des protéines (Jouppila *et al.*, 1997; Vuataz, 2002). L'effondrement de la structure de la poudre de lactose qui intervient peu avant la cristallisation peut orienter le type de formes cristallines produites. L'eau piégée dans la structure peut favoriser la mutarotation et conduire à une proportion de cristaux β anhydres ou α/β 5/3 plus importante dès le début de la cristallisation de la poudre de lactose, par rapport à la poudre modèle dont la structure est maintenue du fait de la présence de β-lactoglobuline. L'analyse thermique différentielle de la poudre de lactose conservée sous une a_w de 0,43 montre en effet qu'après six semaines, la libération d'eau par la structure effondrée n'est plus visible, mais une proportion importante de lactose β est apparue si l'on en juge par la taille importante du pic de fusion à 234°C.

Buckton *et al.* en 1998 ont aussi rapporté que les structures effondrées du lactose généraient plus de formes β que les structures intactes.

D'après Jouppila *et al.* (1998), les formes cristallines produites ne dépendent pas directement de la proportion initiale α/β. Elles seraient plutôt définies par l'étape de nucléation. Les travaux de Drapier-Bêche (1997) réalisés au laboratoire peuvent nous aider à comprendre l'évolution des différentes formes cristallines dans nos poudres. Elle montre que le composé moléculaire α/β 5/3 conservé sous de fortes humidités relatives comprises entre 75 et 95% à 20°C subit des phénomènes de mutarotation. En fonction du temps de conservation, le composé est d'abord transformé en forme α monohydratée, puis en β anhydre selon le schéma :



Les composés moléculaires α/β présents dans nos poudres à une a_w de 0,43 sont probablement transformés pour aboutir après conservation sous une a_w de 0,76 aux formes de lactose α monohydratée et β anhydre uniquement.

Le développement de la forme α monohydratée est souvent observée lorsque la conservation a lieu sous forte activité de l'eau (supérieure à 0,55 à 25°C). Il est probable qu'après un temps de conservation long, la forme cristalline privilégiée dans nos poudres soit le lactose α monohydraté (Angberg, 1995).

Informations supplémentaires apportées par analyse infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une autre méthode qui permet d'analyser les différentes formes cristallines du lactose présentes dans une poudre laitière.

Les pics des spectres infrarouges des poudres de lactose, de la poudre modèle BL(10:90) avec 10% de β-lactoglobuline et de la poudre mélangée B+L(10+90) conservées 18 jours sous une a_w de 0,76 ont été comparés à ceux qui caractérisent les formes cristallines du lactose reportés dans la littérature (cf matériel et méthodes).

Les spectres de lactose, de BL(10:90) et de B(10)+L(90) ne présentent pas les pics à 1464, 1405, 1325 et 1180 cm^{-1}, dus aux formes cristallines complexes α/β 5/3 et 3/2 (Drapier Bêche, 1997). Par contre, ils présentent plusieurs caractéristiques du lactose α monohydraté, telles que des pics à 680 cm^{-1}, à 920, 1299 et 3450 cm^{-1}, ainsi qu'une série de quatre pics de 1430 à 1320cm^{-1}. L'absence de pic à 850 cm^{-1} et la régularité du spectre dans la région 800-700 cm^{-1} sont deux preuves supplémentaires de la présence de cristaux de lactose α-monohydraté. Enfin, les spectres présentent une bande de vibration très caractéristique du lactose β anhydre à 950 cm^{-1}. Cette bande est beaucoup plus intense dans la poudre de lactose et la poudre mélangée B(10)+L(90), que dans la poudre modèle BL(10:90). L'analyse des spectres infrarouge est donc cohérente avec les analyses précédentes effectuées par ATD ou diffraction des rayons X. Les résultats de ces analyses sont reportés dans le tableau III.2.

La zone spectrale 1500-500 cm^{-1} des spectres IR des poudres de lactose, de BL(10:90) et de la poudre formée par mélange B(10)+L(90) conservées 18 jours sous une a_w de 0,76 a également été comparée figure III.35 car elle donne d'autres informations que les structures cristallines.

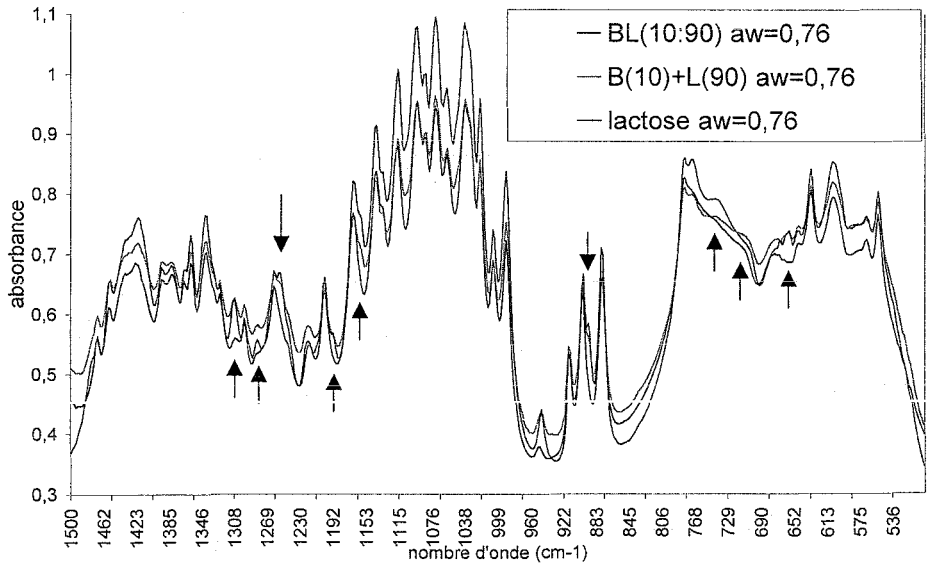


Figure III. 35 : Région 1500-500 cm^{-1} des spectres infrarouges des poudres de lactose, BL(10:90) et B(10)+L(90) conservées à 20°C 18 jours sous une a_w de 0,76. Les flèches indiquent les nombres d'onde où apparaissent des affaiblissements d'absorbance du spectre de BL(10:90).

Bien que tous ces spectres présentent les mêmes bandes de vibration caractéristiques du lactose cristallisé, plusieurs différences d'intensité (de ces bandes) peuvent être observées. Les variations d'intensité des bandes de vibration de la poudre mélangée B(10)+L(90) sont, comme on pouvait s'y attendre, similaires à celles du lactose. Par contre, le spectre infrarouge de la poudre BL(10:90) présente des diminutions d'intensité dans plusieurs régions, qui se traduisent par des affaiblissements de pics, ou par la disparition d'épaulements de pics. Ces différences apparaissent dans plusieurs régions du spectre IR. Une différence est relevée dans la région anomérique (1000-800 cm^{-1}) ; deux dans la région de cristallinité (700-500 cm^{-1}), 4 dans les bandes de vibration des liaisons C-H (1500-1280 cm^{-1}, puis à 2960 cm^{-1}) ; et enfin une dans la bande des vibrations des liaisons O-H de l'eau (3450 cm^{-1}) (figure III.35).

La région du spectre IR présentant le plus grand nombre d'affaiblissement de pics est celle des vibrations des groupements C-H . Cela laisse présumer un assemblage différent des molécules de lactose dans BL(10:90) par rapport à l'organisation dans la poudre de lactose. La présence de β-lactoglobuline perturbe les vibrations C-H des cycles de lactose. Il est possible que des liaisons hydrogène soient établies entre les groupements amines NH_2 des liaisons peptidiques de la β-lactoglobuline et les groupements C-H du lactose, comme l'illustre la figure III.36.

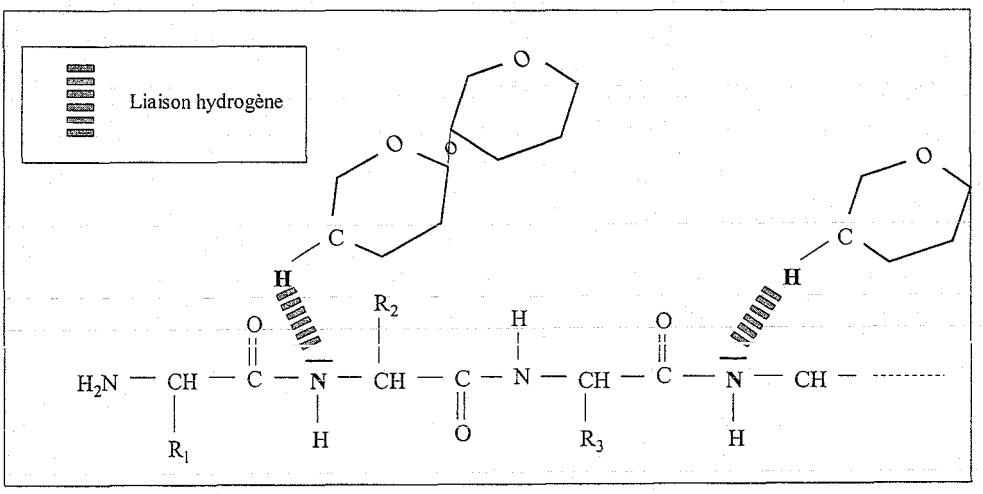


Figure III.36 : Représentation schématique des liaisons hydrogène pouvant se développer entre les doublets électroniques de l'azote de la chaîne principale de la β-lactoglobuline et les atomes d'hydrogène exocycliques du lactose.

L'affaiblissement de ces pics est peut-être aussi lié à la proportion plus faible de lactose β anhydre dans la poudre BL(10:90). En effet, l'organisation et le nombre de liaisons hydrogène

établies entre les molécules de lactose sont différents selon la forme cristalline du lactose. Le lactose α-monohydraté forme des feuillets de molécules, alors que les cristaux β forment des chaînes de molécules. L'arrangement des formes cristallines dans la poudre modèle BL(10:90) qui contient moins de lactose β anhydre peut donc être différent. Il n'est pas exclu que les nombres d'onde suivants, qui correspondent à des affaiblissements d'intensité du spectre de BL(10:90) puissent être attribués à des bandes caractéristiques de la forme du lactose β anhydre : 3480, 1306, 1280, 1253, 1193, 1159, 893, 769, 742 et 656 cm^{-1}.

Il est intéressant de comparer les techniques d'ATD, de diffraction des RX et de spectroscopie IR, car elles apportent des informations complémentaires.
La diffraction des rayons X apparaît comme la méthode la plus fiable pour détecter les différentes forme cristallines du lactose, y compris les formes un peu particulières telles que les composés moléculaires α/β 5/3 ou 3/2.
L'ATD semble moins pertinente pour cette analyse, du fait de la mutarotation qui peut modifier la proportion des différentes formes cristallines en cours d'analyse. Cependant, cette méthode permet de détecter d'autres modifications thermodyamiques importantes pour la compréhension du phénomène de cristallisation. C'est le cas par exemple de la détection à 80-110°C d'eau piégée qui révèle un effondrement préalable de la structure de la poudre.
L'analyse par spectroscopie infrarouge, enfin, est aussi une méthode utile pour déterminer les formes cristallines présentes dans les échantillons. De plus, elle donne d'autres indications, concernant par exemple l'arrangement tridimensionnel des molécules de lactose par liaisons hydrogène. C'est une méthode qui mérite d'être développée pour déterminer les interactions des composants et leur organisation.

III. Etude des interactions lactose/β-lactoglobuline

Plusieurs travaux ont suggéré l'existence d'interactions entre protéines et sucres dans des mélanges co-lyophilisés (Souillac et al, 2002). Ces interactions peuvent être de deux types. Il peut s'agir de liaisons covalentes qui impliquent la « polymérisation » des deux molécules, ou non covalentes. Dans ce dernier cas, les deux molécules interagissent via des forces électrostatiques, des forces hydrophobes, ou par des liaisons hydrogène.

III. 1. Interactions covalentes

L'interaction covalente la plus probable entre lactose et β-lactoglobuline est la formation d'une base de Schiff entre les fonctions carboxyles (OH) du lactose, et les groupements amines (NH_2) de la protéine. Cette réaction chimique est la première étape de la réaction de Maillard. Elle correspond à la lactosylation de la β-lactoglobuline. Cette réaction a été essentiellement étudiée en solution et à fortes températures. Cependant elle est connue pour se développer également dans les poudres. Un environnement peu hydraté augmente même la vitesse de cette réaction, surtout dans les produits lyophilisés et dans les systèmes dont la structure est effondrée, à cause de la forte concentration locale des réactants (Buera et Karel, 1995 ; Morgan *et al.*, 1998, 1999, Schebor *et al.*, 1999, Burin *et al.*, 2000). En moyenne, la lactosylation à l'état déshydraté mène à la condensation de 7,7 molécules de lactose par β-lactoglobuline (Gauthier *et al.*, 2001). La conséquence indirecte de l'étape de lactosylation est l'apparition d'un brunissement non-enzymatique dans les poudres, dû à la polymérisation des produits de dégradation avancée de la réaction de Maillard.

La couleur des poudres modèles conservées deux mois à des activités de l'eau comprises entre 0,39 et 0,76 a donc été mesurée afin de vérifier l'apparition d'un brunissement non-enzymatique, qui démontrerait l'existence d'interactions covalentes entre lactose et β-lactoglobuline. Les variations du paramètre colorimétrique b correspondant à l'indice chromatique « jaune » (système L, a, b), ont été particulièrement étudiées, car ce paramètre est celui qui caractérise le mieux le brunissement des poudres laitières (Nielsen *et al.*, 1997 ; Stapelfeldt *et al.*, 1997).

Les mesures du paramètre b des poudres modèles sont reportées figure III.37 en fonction de l'a_w de conservation.

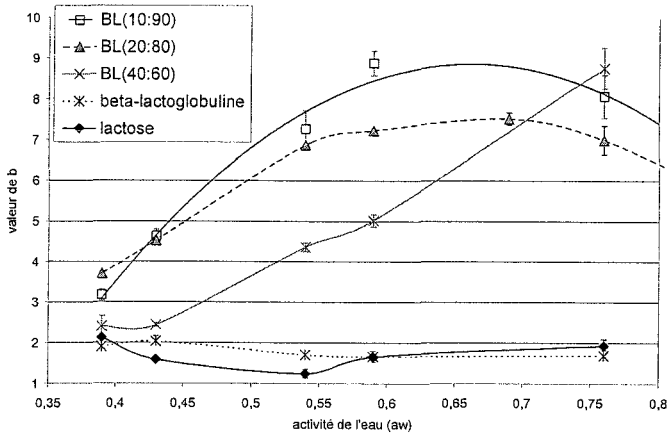


Figure III.37 : Indice chromatique « b » des poudres de lactose, de β-lactoglobuline et des poudres modèles BL(10:90), BL(20:80) et BL(40:60) après 2 mois à 20°C, en fonction de l'a_w de conservation.

Le paramètre b des poudres de lactose et de β-lactoglobuline ne varie pas, quelle que soit l'activité de l'eau à laquelle les poudres sont conservées. Ces poudres ne subissent pas de brunissement non-enzymatique (pas de jaunissement). Au contraire, l'indice chromatique des poudres BL(10:90) et BL(20:80) évolue fortement selon l'a_w de conservation. Pour les activités de l'eau comprises entre 0,39 et 0,69, plus l'a_w est élevée et plus b augmente. Le paramètre b diminue ensuite lorsque l'a_w de conservation est supérieure à 0,7 (figure III.37). Cette évolution de l'indice chromatique « jaune » d'une poudre contenant protéine et lactose, en fonction de l'a_w, est caractéristique d'un brunissement non-enzymatique. En effet, les mesures de b de la poudre modèle BL(20:80) ont été comparées à la courbe théorique de la vitesse de réaction de Maillard en fonction de l'a_w proposée par Labuza (1970) (figure III.38).

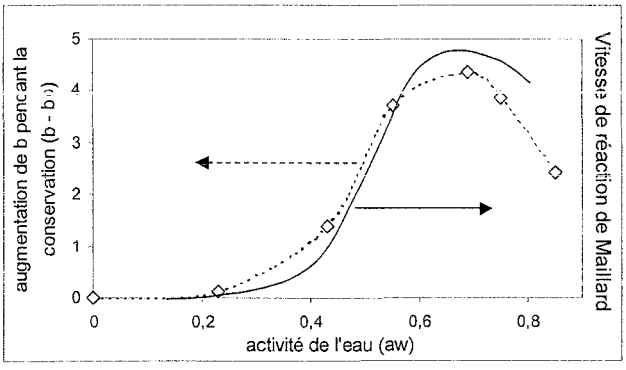


Figure III.38 : Comparaison de l'évolution du paramètre b de la poudre BL(20:80) après 2 mois à 20°C et de la vitesse théorique de la réaction de Maillard selon Labuza (1970), en fonction de l'a_w de conservation.

Le profil de la courbe du paramètre b de la poudre BL(20:80) en fonction de l'activité de l'eau est en accord avec le profil modèle proposé par Labuza. Le jaunissement détecté est un brunissement non-enzymatique, caractéristique du développement de la réaction de Maillard.

Les variations de b (figure III.37) de la poudre à 40% de β-lactoglobuline semblent un peu différentes, la diminution de b à forte a_w n'étant pas encore décelée à une a_w de 0,76. La forte teneur en β-lactoglobuline de cette poudre est probablement à l'origine de l'évolution différente du brunissement par rapport à la vitesse théorique de la réaction de Maillard. En effet, la présence de β-lactoglobuline peut à la fois ralentir les phénomènes de diffusion et limiter l'effondrement de la poudre. Or Burin *et al.* (2000 et 2004) ont montré que le brunissement d'une poudre de lactosérum est corrélé à l'effondrement de sa texture. La présence d'une quantité importante de β-lactoglobuline dans la poudre BL(40:60) peut donc déplacer la vitesse maximum de la réaction de Maillard à une activité de l'eau plus importante que l'a_w 0,6-0,7 généralement constatée. D'après Kinsella et Fox (1986), le brunissement le plus important est mesuré à l'a_w où l'eau est libérée lors de la cristallisation. C'est pourquoi il est mesuré à une a_w de 0,55 dans une poudre de lactosérum qui contient peu de protéines et à une a_w de 0,6-0,7 dans une poudre de lait. Enfin, les points expérimentaux peu nombreux dans cet intervalle d'a_w, ne permettent pas de repérer sur la figure III.37 l'évolution « classique » de b en fonction de l'a_w (c'est à dire une augmentation suivie d'une diminution de b, pour une a_w croissante).

Pour préciser ces différences de brunissement selon les poudres, nous avons reporté figure III.39 les mesures de b en fonction du % de β-lactoglobuline des poudres conservées sous des a_w de 0,39 à 0,59.

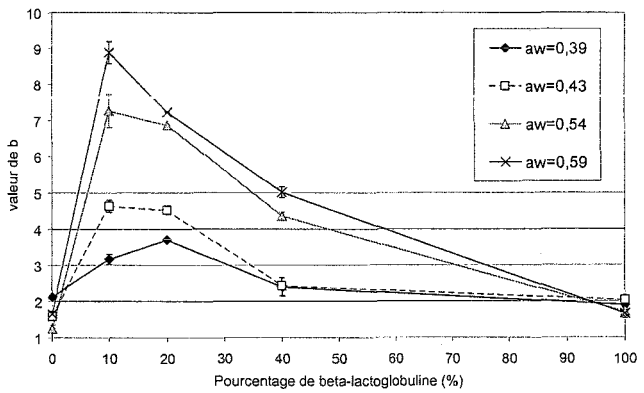


Figure III.39 Valeur de b mesurée dans les poudres modèles conservées 2 mois à 20°C aux activités de l'eau 0,39, 0,43, 0,54 et 0,59, en fonction de la teneur en β-lactoglobuline de la poudre.

La figure III.39 montre que l'optimum de brunissement, qui correspond à une vitesse importante de réaction de Maillard, est mesuré pour des poudres modèles contenant jusqu'à environ 20% de β-lactoglobuline. Au contraire, le brunissement est beaucoup moins étendu dans les poudres à 40% de β-lactoglobuline car cette teneur importante en protéine limite la diffusion.

Le brunissement non-enzymatique qui s'est développé dans les poudres modèles prouve qu'une étape de lactosylation de la β-lactoglobuline a eu lieu précédemment. Des liaisons covalentes se sont donc formées entre lactose et β-lactoglobuline et peuvent être à l'origine du décalage de l'a_w de cristallisation pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le développement compétitif de liaisons covalentes entre β-lactoglobuline et lactose par rapport aux liaisons hydrogène lactose-lactose peut perturber l'organisation des molécules de lactose en réseau cristallin. De plus, la modification de la surface de la protéine et de son environnement proche, à cause de la lactosylation, peut influencer la cristallisation autour des protéines. La modélisation de la surface d'une molécule de β-lactoglobuline lactosylée par dix molécules de lactose a été effectuée par French et Harper (2001) avec le logiciel GRASP. Ils ont montré que la lactosylation sur les groupements NH_2 libres des résidus acides aminés les plus réactifs augmente significativement le caractère hydrophile de la surface de la protéine lactosylée. L'interaction préférentielle des molécules d'eau avec la β-lactoglobuline lactosylée plutôt qu'avec le lactose pourrait défavoriser la cristallisation. Le développement de liaisons covalentes entre lactose et β-lactoglobuline lors de la réaction de Maillard peut donc expliquer, au moins en partie, le décalage de l'a_w de cristallisation des poudres modèles.

Pour tester l'influence de la réaction de Maillard sur le décalage de l'a_w critique, la β-lactoglobuline native a ensuite été mise en présence de sulfites car cette molécule réagit avec les fonctions amines NH_2 libres de la protéine et empêche la réaction de Maillard dans les poudres modèles. Cette réaction de protection a été effectuée avant le mélange avec la solution de lactose, qui précède la préparation de la poudre modèle par lyophilisation. Une poudre « BL(10:90)+sulfites » a été préparée de cette manière, puis conservée 9 semaines à différentes activités de l'eau. La courbe isotherme de sorption d'eau correspondante a été comparée à celle d'une poudre BL(10:90) figure III.40.

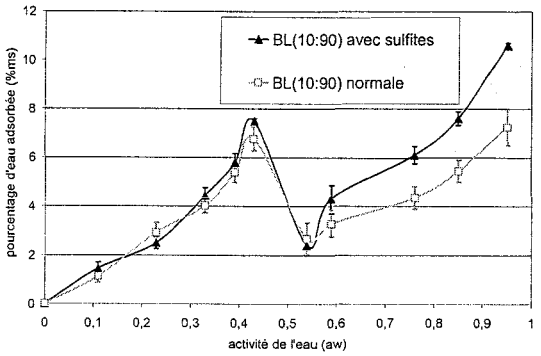


Figure III.40 : Courbes isothermes de sorption d'eau de poudres modèles BL(10:90) « normale » et lyophilisée après réaction avec des sulfites. Les courbes sont obtenues après 9 semaines à 20°C.

Comme le montre cette figure, les courbes isothermes de sorption sont très proches, sauf en deuxième partie de la courbe, mais c'est probablement à cause de la capacité de sorption d'eau particulière des sulfites et des formes cristallines produites. L'a_w critique de libération d'eau est la même dans les deux poudres. Bien que la réaction de Maillard ait été bloquée par réaction préalable avec les sulfites (ce qui se traduit par une absence de brunissement de cette poudre), la cristallisation se produit toujours à une a_w plus élevée que dans la poudre de lactose. Ce résultat est logique car dans la poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline, il y a 465 moles de lactose pour une mole de protéine. L'« excès » de lactose est tel qu'il masque l'effet possible de la lactosylation même si une vingtaine de molécules se condensent sur la β-lactoglobuline.

Les liaisons covalentes établies entre lactose et β-lactoglobuline lors de la réaction de Maillard n'influent pas significativement sur le décalage de l'a_w de cristallisation observé dans les poudres modèles.

III.2. Etude des interactions non covalentes par spectroscopie infrarouge

L'étude d'éventuelles liaisons non covalentes entre lactose et β-lactoglobuline a été menée en utilisant la technique de spectroscopie dans le moyen infrarouge (4000-400 cm^{-1}). Les poudres lyophilisées de lactose, de β-lactoglobuline et la poudre modèle BL(10:90) à 10% de

β-lactoglobuline ont été analysées après conservation sous les activités de l'eau de 0, 0,43 et 0,76.

III.2.1. Spectre général

Les spectres des poudres conservées à activité de l'eau nulle et sous une a_w de 0,76 sont comparés et présentés respectivement figure III.41 et figure III.42.

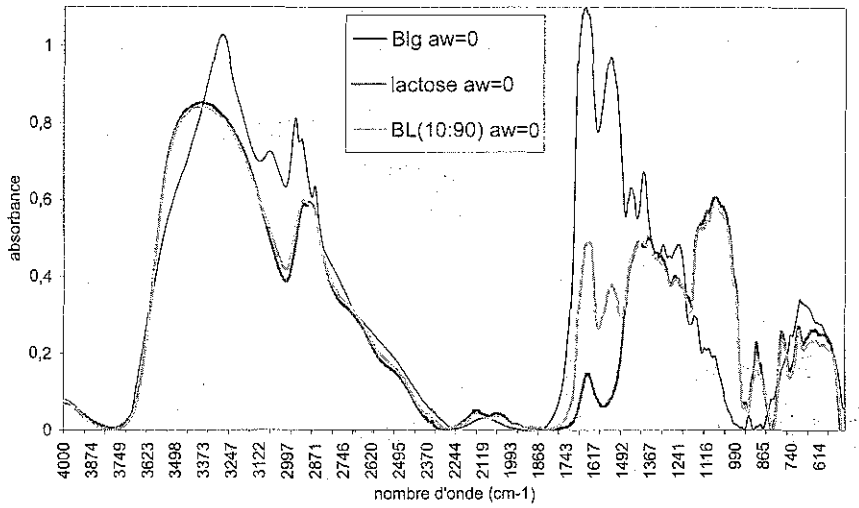


Figure III. 41. Spectres infrarouges des poudres de β-lactoglobuline (Blg), de lactose et de la poudre modèle BL(10:90) conservées à activité de l'eau nulle à 20°C.

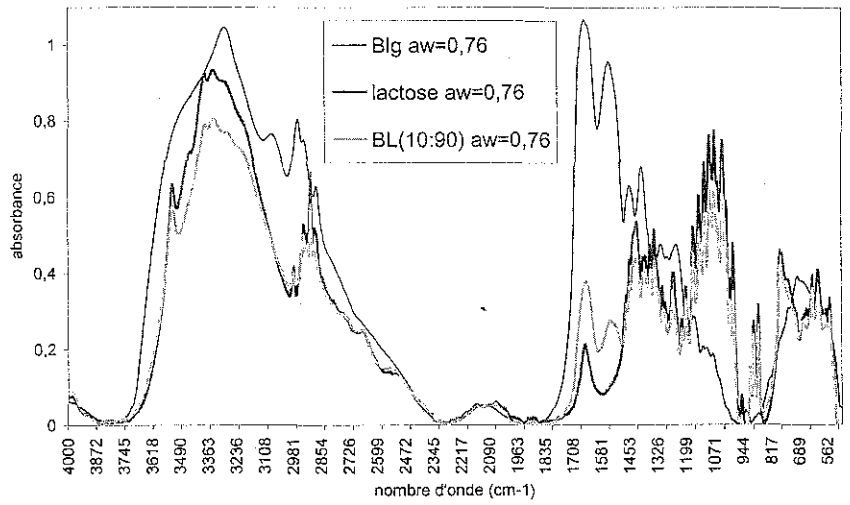


Figure III. 42. Spectres infrarouges des poudres de β-lactoglobuline (Blg), de lactose et de la poudre modèle BL(10:90) conservées 18 jours à 20°C sous une activité de l'eau de 0,76.

Les trois spectres de la figure III.41 sont faiblement résolus, avec des bandes de vibration peu définies, ce qui est caractéristique de l'état amorphe des composants. La figure III.41 montre que les spectres infrarouges de la β-lactoglobuline et du lactose sont différents, surtout dans les régions 3600-2500 cm^{-1} et 1800-700 cm^{-1}. Le spectre infrarouge de la poudre modèle BL(10:90), qui contient les deux molécules, est surtout semblable à celui du lactose. Ces deux spectres sont presque superposables, sauf dans la région 1700-1500 cm^{-1}, où des bandes de vibration plus caractéristiques de la β-lactoglobuline (amides I et II) apparaissent sur le spectre de BL(10:90).

Sur la figure III.42 on voit qu'après cristallisation du lactose, c'est-à-dire après conservation sous une a_w de 0,76, la résolution spectrale des poudres contenant du lactose est fortement augmentée. Cependant, l'allure générale des spectres est inchangée par rapport à ceux obtenus sous activité de l'eau nulle : le spectre de BL(10:90) est presque identique à celui du lactose, hormis la région 1700-1500 cm^{-1}. Quelles que soient les conditions de conservation, le spectre de BL(10:90) présente donc la « signature » de celui du lactose, associée aux bandes amides I et II de la β-lactoglobuline.

III.1.2. Zone spectrale comprise entre 3600 et 3200 cm^{-1}

Dans la région 3600-3200 cm^{-1} se trouvent la bande des vibrations d'élongation des groupements O-H (νOH) et la bande amide A des protéines, qui correspond aux vibrations des liaisons N-H. La région 3600-3200 cm^{-1} des spectres du lactose, de la β-lactoglobuline et de la poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline à activité de l'eau nulle et conservées 18 jours sous une a_w de 0,76 est présentée figure III.43. Les spectres des poudres de lactose et de BL(10:90) conservées 6 semaines sous une activité de l'eau de 0,43 sont également reportés sur la figure. Le temps de conservation a été plus long à cette a_w pour que les différences entre les deux poudres, dont l'une est cristallisée et l'autre pas, soient nettes sur le spectre. Les positions (nombre d'onde) des maxima de cette bande sont reportées dans le tableau III.3 avec la teneur en eau des poudres.

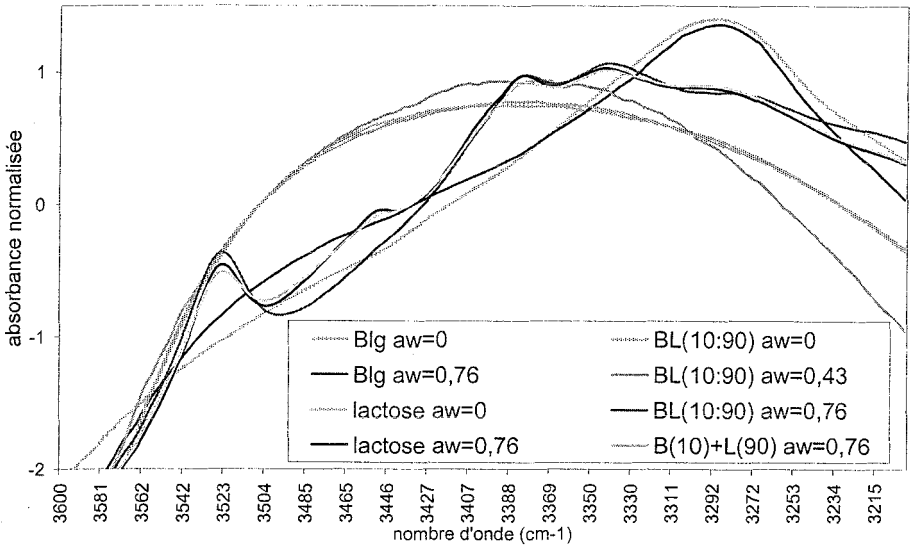


Figure III.43 : Position de la bande visible dans la région 3600-3200 cm^{-1} des spectres infrarouges des poudres de lactose, β-lactoglobuline, des poudres à 10% de β-lactoglobuline co-lyophilisée BL(10:90) et produite par mélange B(10)+L(90) ; après conservation aux activités de l'eau de 0 et/ou 0,43 et/ou 0,76.

Tableau III.3 : Nombres d'ondes des maxima de la bande des vibrations d'élongation des liaisons O-H des poudres de lactose, de BL(10:90), B(10)+L(90) et de la β-lactoglobuline aux a_w 0, 0,43 et 0,76. Le tableau indique également les teneurs en eau correspondantes.

	$a_w \approx$ nulle - 18 jours		a_w 0,43 - 6 semaines		a_w 0,76 – 18 jours	
	Maxi	% d'eau	maxi	% d'eau	Maxi	% d'eau
Lactose	3376,5 cm^{-1}	≈0	3376,5cm^{-1}	1,15%	3341,8 cm^{-1}	3,4%
β-lactoglobuline	3289,7 cm^{-1}	≈0	/	/	3289,7 cm^{-1}	18,4%
BL(10:90)	3390,0 cm^{-1}	≈0	3374,6cm^{-1}	7,5%	3341,8 cm^{-1}	5,5%
B(10)+L(90)	/	/	/	/	3341,8 cm^{-1}	5,4%

La figure III.43 et le tableau III.3 montrent que la forme générale et la position du maximum de la bande varient selon la composition de la poudre et les conditions de conservation.

La comparaison des courbes de la **β-lactoglobuline** à activité de l'eau nulle et après conservation sous une **a_w de 0,76** montre **l'effet de l'hydratation** sur cette bande. A a_w nulle, seule la bande amide A de la β-lactoglobuline est visible à 3289,7 cm^{-1}. Après conservation sous une a_w de 0,76, un épaulement important apparaît dans la région 3500-3340 cm^{-1}. Il est

dû aux vibrations νO-H des molécules d'eau que la protéine a adsorbées. La largeur de la bande νOH est donc directement liée à l'hydratation de la poudre.

La forme et la position du maximum de la bande νOH sont aussi corrélées à l'**état amorphe ou cristallisé** du **lactose**. Sous une activité de l'eau nulle la poudre de lactose est amorphe et son spectre infrarouge présente une bande régulière, due aux liaisons hydrogène « aléatoires » du système amorphe. Sous une a_w de 0,76, le lactose est très cristallisé et la bande νOH change complètement de forme : elle présente de faibles pics à son sommet et le maximum global de la bande est fortement décalé vers de faibles nombres d'ondes (3341,8 cm^{-1}) (figure III.43). Les variations des nombres d'ondes des maxima de la bande νOH sont généralement attribuées aux modifications des liaisons hydrogène. Lutz et van der Maas (1994) ont montré qu'il existe une corrélation positive entre la distance entre deux atomes d'oxygène (dO....O), qui est liée à la longueur d'une liaison hydrogène et donc à sa force, et la fréquence de vibration de l'élongation O-H (νOH). Ainsi, la vibration νOH d'un groupement OH impliqué dans une liaison hydrogène apparaît généralement à un nombre d'onde plus faible qu'un groupement OH « libre », non lié par ce type de liaison. Dans notre étude, la diminution de la position du maximum de la bande νOH pendant la conservation du lactose sous une forte a_w est probablement liée à sa cristallisation, c'est-à-dire à l'organisation spatiale des molécules en un réseau, maintenu essentiellement par des liaisons hydrogène inter-moléculaires (Ottenhof, 2003 ; Garnier *et al.*, 2002a).

Si l'on considère la poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline, la différence entre les spectres à nulle et a_w de 0,76 est la même que pour le lactose, à savoir : la bande est de forme régulière lorsque le lactose est amorphe, et devient beaucoup plus découpée, avec un décalage de son maximum à 3341,8 cm^{-1} lorsque le lactose qu'elle contient est cristallisé. Des liaisons hydrogène fortes se développent lors de la cristallisation. Le nombre d'onde similaire obtenu pour les νOH du lactose, de BL(10:90) et B(10)+L(90) conservées sous une a_w de 0,76 indique que les forces mises en jeu dans les liaisons hydrogène au sein de ces poudres sont équivalentes.

La comparaison des bandes νOH indique également que la poudre à 10% de β-lactoglobuline conservée sous une a_w de 0,43 présente une bande spécifique, différente des autres. Cette bande est fine malgré la forte hydratation de cette poudre. Conservée sous une a_w de 0,43, la poudre BL(10:90) se trouve donc dans un état particulier, qui correspond à une modification au niveau des liaisons hydrogène.

III.2.3. Zone spectrale comprise entre 1700 et 1600 cm^{-1}

La région 1700-1600 cm^{-1} des spectres infrarouges, qui présente des différences importantes selon les poudres, a également été étudiée.

Absorbance de la bande

La région 1700-1600 cm^{-1} correspond à la fois à la bande amide I de la β-lactoglobuline (vibration de la liaison C=O de la liaison peptidique) et à la bande des vibrations de cisaillement des O-H de l'eau de constitution du lactose, également appelée eau de cristallisation. Il s'agit des molécules d'eau qui participent à la structuration du lactose (Wolkers *et al.*, 2004). La figure III.44 présente l'absorbance des bandes situées dans cette région, pour toutes les poudres étudiées.

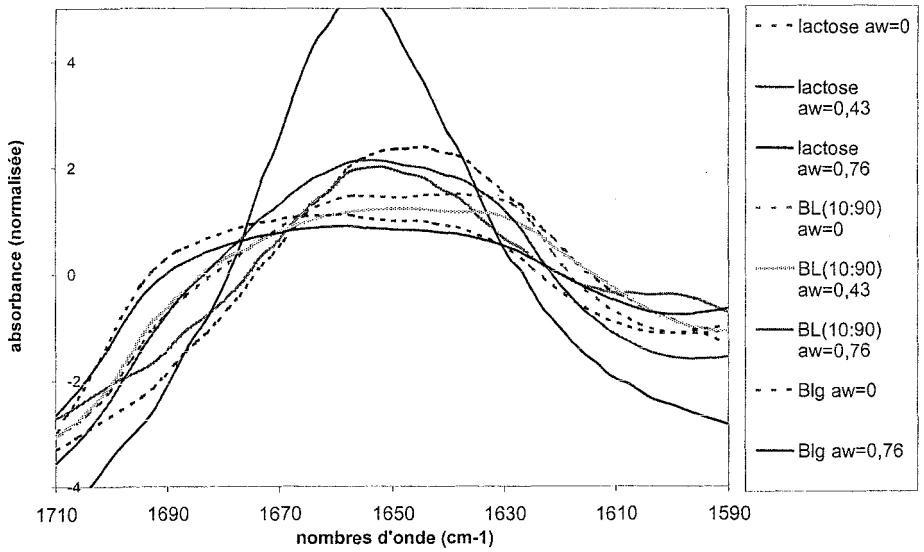


Figure III.44 : Position de la bande située dans la région 1710-1590 cm^{-1} des spectres infrarouges du lactose et de la poudre modèle BL(10:90) conservées sous des a_w de 0, 0,43 et 0,76 et de la β-lactoglobuline conservée sous des a_w de 0 et 0,76.

La comparaison de la **β-lactoglobuline** conservée aux activités de l'eau de **0 et de 0,76** (respectivement 0% environ et 18,4% d'eau) montre **l'influence de l'hydratation** sur l'allure des spectres. Après conservation sous une a_w de 0,76, la bande amide I a tendance à s'étaler vers le nombre d'onde 1620 cm^{-1}. Généralement, le décalage de la bande amide I vers les faibles nombres d'ondes correspond à un développement des liaisons hydrogène et/ou à un environnement plus hydrophile. Ceci est cohérent avec l'étalement de la bande observé lors

de l'hydratation de la β-lactoglobuline, car celle-ci établit des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau qu'elle adsorbe.

La différence entre les bandes de cisaillement des OH de l'eau de constitution de la poudre de **lactose**, aux a_w de **0,43 et 0,76** nous renseignent sur l'effet de **l'avancement de la cristallisation** sur les spectres. La figure III.44 montre que plus le lactose cristallise, lorsque l'a_w augmente, plus le maximum de la bande de cisaillement des OH est décalée vers des nombres d'onde élevés.

A l'a_w 0,43, le lactose est faiblement cristallisé et les molécules d'eau de constitution interagissent par liaisons hydrogène avec les molécules d'eau environnantes ; d'où un maximum de la bande qui apparaît à un faible nombre d'onde. Après conservation sous une a_w de 0,76, la cristallisation du lactose est presque complète. Les molécules d'eau de constitution établissent de fortes liaisons hydrogène avec les molécules de lactose dans le réseau cristallin et sont beaucoup moins liées à l'eau environnante, d'où un déplacement de la bande vers des nombres d'ondes plus élevés (Wolkers *et al.*, 2004).

Concernant la poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline, lorsqu'elle est conservée à a_w nulle ou sous une a_w de 0,43, la forme générale de sa bande à 1700-1600 cm^{-1} ressemble à celle de la β-lactoglobuline, bien qu'elle soit décalée vers de plus faibles nombres d'ondes, ce qui laisse supposer l'existence d'un plus grand nombre de liaisons hydrogène entre protéine et lactose, qu'au sein de la poudre de β-lactoglobuline seule. Lorsque la poudre BL(10:90) est conservée sous une a_w de 0,76, le maximum de la bande est au contraire décalé vers des nombres d'ondes élevés et l'allure du spectre est très proche de celle du lactose cristallisé. Ainsi, la présence de β-lactoglobuline influence fortement la bande à 1700-1600 cm^{-1} de la poudre modèle quand elle est conservée sous une a_w inférieure ou égale à l'a_w critique. Par contre, après cristallisation, c'est le lactose qui a une influence déterminante sur le spectre.

Dérivées secondes de la bande amide I

La dérivation d'ordre deux a été effectuée sur la bande de la zone spectrale 1700-1600 cm^{-1} pour préciser la structure secondaire de la β-lactoglobuline et l'influence de la cristallisation du lactose sur celle-ci. Le résultat de la dérivation de cette région des spectres infrarouges est présenté figure III.45.

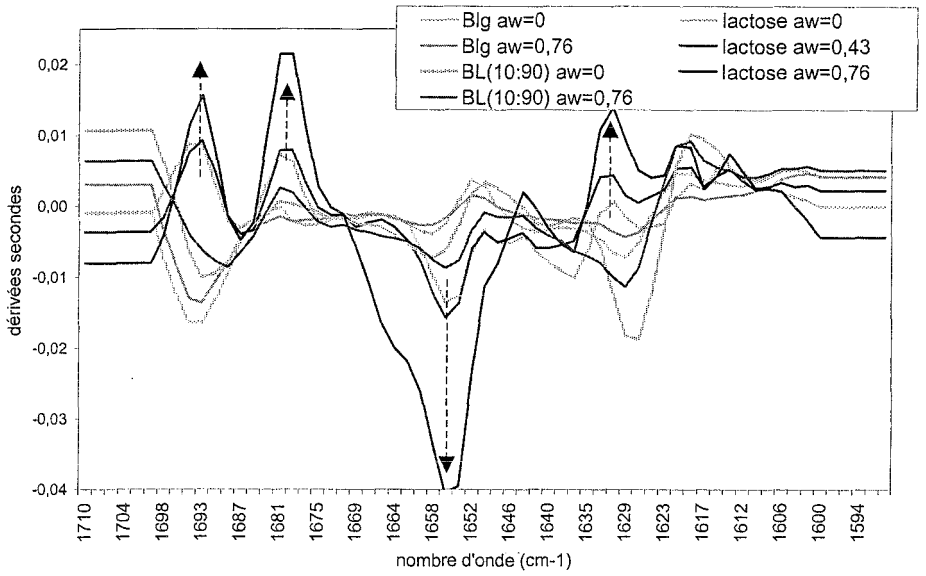


Figure III.45 : Dérivées secondes de la région 1700-1600 cm^{-1} des spectres des poudres BL(10:90) et de β-lactoglobuline aux a_w de 0 et 0,76 ; et du lactose conservé sous des a_w de 0, 0,43 et 0,76. Les flèches indiquent l'influence de la cristallisation du lactose sur l'allure du spectre.

La figure III.45 montre que la propagation des cristaux de lactose, caractérisée par les différences entre les courbes du lactose aux activités de l'eau de 0,43 et 0,76, influence très fortement les dérivées secondes de cette région du spectre infrarouge. Le **développement de la cristallisation** provoque une nette diminution des pics de dérivées secondes à 1692 cm^{-1} ,1681 cm^{-1} et 1631 cm^{-1}, ainsi qu'une très forte augmentation à 1656 cm^{-1}. La comparaison des dérivées secondes de la β-lactoglobuline conservée aux activités de l'eau nulle et de 0,76 indique que l'**hydratation** de la poudre a une tendance générale à diminuer l'intensité des pics de dérivées, surtout aux nombres d'ondes proches de 1630 cm^{-1}.

Les pics de dérivées secondes de BL(10:90) et surtout de la poudre de β-lactoglobuline peuvent être attribués, en référence à la littérature (voir tableau matériel et méthodes II.5, p.77) aux structures secondaires de la protéine. Le pic à 1629 cm^{-1} est dû aux feuillets β, qui sont majoritaires dans la β-lactoglobuline. Le pic à 1694 cm^{-1} est également lié à la présence de cette structure protéique. Le pic de dérivées à 1657-1656 cm^{-1} est dû à l'hélice α contenue dans la protéine. Le faible pic à 1642 cm^{-1} peut correspondre à des structures non ordonnées, et les variations de la région 1678-1663 cm^{-1} à des structures en coudes.

La surface délimitée par le pic à 1629 cm^{-1} correspond à la proportion des feuillets β de la β-lactoglobuline. On constate que celle-ci varie selon la composition et l'a_w de conservation de la poudre. En apparence, la quantité de feuillets β de la poudre BL(10:90) conservée à une a_w nulle est plus importante que dans toutes les autres poudres, ce qui laisse présumer d'un meilleur maintien de la structure protéique. Cependant, l'interprétation de ce pic est délicate car d'une part l'hydratation de la poudre et la cristallisation du lactose l'influencent très fortement, et d'autre part les interactions entre lactose et β-lactoglobuline peuvent modifier le spectre en provoquant des décalages de pics.

Pour être plus précis dans l'interprétation du pic de dérivées secondes dû aux feuillets β, le **spectre du lactose a été soustrait** à ceux des poudres modèles pour tenter d'éliminer l'influence de la bande de cisaillement des OH, causée par l'eau de constitution du lactose. Il faut cependant préciser que la soustraction de spectre n'élimine pas les variations dues aux interférences entre les vibrations des deux composants, et qu'il va aboutir à une courbe bruitée, qui présente peu de signal. La figure III.46 représente les courbes obtenues après soustraction des spectres du lactose aux poudres modèles et dérivation d'ordre deux de toutes les poudres.

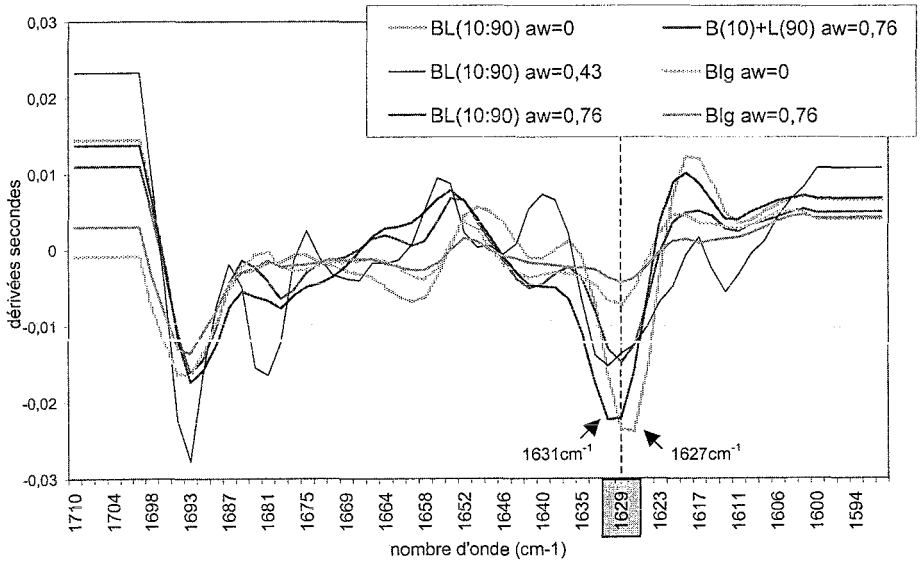


Figure III.46 : Dérivées secondes des spectres de la β-lactoglobuline (a_w de 0 et 0,76), de la poudre modèle BL(10:90) (a_w de 0, 0,43 et 0,76) et de celle produite par mélange B(10)+L(90) (a_w de 0,76) obtenues après soustraction des spectres du lactose aux a_w correspondantes.

Le maximum du pic de BL(10:90) à a_w nulle apparaît à 1627 cm^{-1} alors que celui de la β-lactoglobuline est de 1629 cm^{-1}. Il y a plus de liaisons hydrogène établies entre lactose et feuillets β dans BL(10:90) avant conservation, qu'entre feuillets β dans la poudre de β-lactoglobuline. Par contre, après conservation aux activités de l'eau 0,43 et 0,76, le pic de dérivées secondes est déplacé à 1631 cm^{-1}. Comme les spectres du lactose sont soustraits, ce décalage est plus lié à la modification des liaisons hydrogène qu'à la cristallisation du lactose. Il correspond à une diminution des liaisons hydrogène entre les feuillets β de la β-lactoglobuline et les molécules de lactose.

La poudre modèle avant conservation, puis conservée sous une a_w de 0,76 génère des pics de dérivées à 1630 cm^{-1} dont les surfaces sont équivalentes, ce qui montre que la structure secondaire de la β-lactoglobuline n'évolue pas pendant la conservation malgré la cristallisation.
Si l'on compare la surface des pics des poudres BL(10:90) et B(10)+L(90) conservées sous une a_w de 0,76, on constate que la proportion de feuillets β dans la poudre produite par mélange est beaucoup plus faible, ce qui signifie que la β-lactoglobuline a subi une perte de structure importante, alors que dans la poudre modèle les liaisons hydrogène établies entre lactose et β-lactoglobuline ont empêché que la protéine perde une partie de ses feuillets β pendant la cristallisation du lactose. La co-lyophilisation, qui implique la proximité des deux composants, permet un meilleur maintien de la structure en feuillets β de la protéine. Les conditions de l'expérimentation ne nous permettent cependant pas de préciser si la perte de conformation de la β-lactoglobuline dans la poudre mélangée est seulement due à la lyophilisation ou si elle est aussi due à la cristallisation.

La dérivation des spectres soustraits de la poudre modèle BL(10:90) conservée sous une a_w de 0,43 génère des pics très différents des autres poudres : la courbe présente par exemple des pics à 1680 et 1613 cm^{-1}. D'après la littérature, ces pics sont liés à l'agrégation des protéines, en tous cas en solution (Boye *et al.*, 1996 ; Lefèvre et Subirade, 2001a). Cet état agrégé est à relier au temps de conservation de 6 semaines et à la forte hydratation de la poudre BL(10:90) à cette a_w. L'eau favorise en effet la mobilité moléculaire et elle est médiatrice d'interactions par liaisons hydrogène. Cet état particulier du système co-lyophilisé conservé à l'a_w précédent la cristallisation correspond à un bouleversement de l'organisation des liaisons hydrogène

entre les deux composants et l'eau. L'effondrement de la structure des particules, qui débute à cette a_w, est certainement en partie responsable de ce phénomène.

En conclusion, dans toutes les poudres contenant du lactose, la bande de vibration νOH s'affine, sa forme générale change, la position du maximum se décale vers les faibles nombres d'ondes lorsque le lactose cristallise. Ces modifications sont dues au renforcement des liaisons hydrogène lors de l'organisation du réseau cristallin.
Dans les poudres modèles co-lyophilisées conservées à a_w nulle, la β-lactoglobuline établit d'importantes liaisons hydrogène avec le lactose car la bande amide I et le pic de dérivées dû aux feuillets β apparaissent à de faibles nombres d'ondes. Ces interactions maintiennent la structure en feuillets β de la β-lactoglobuline, contrairement aux poudres produites par mélange des deux composants.
La poudre modèle BL(10:90) conservée sous une a_w de 0,43 est dans un état particulier, dans lequel de nombreuses liaisons hydrogène, qui ne sont pas dues qu'à l'effet de l'hydratation, sont développées et/ou modifiées. Enfin, dans les poudres modèles conservées sous une a_w de 0,76, la cristallisation avancée du lactose correspond à la fois à une diminution du nombre des liaisons entre lactose et β-lactoglobuline et à une augmentation des liaisons hydrogène établies entre lactose et eau de constitution du cristal.

Il est important d'ajouter que des liaisons de type hydrophobe semblent intervenir à l'a_w 0,43 (agrégation de feuillets β intermoléculaires). Ces liaisons peuvent se développer entre β-lactoglobuline et lactose ; elles sont par exemple à l'origine d'un effet retardateur de la dénaturation thermique de la protéine (Cayot et Lorient, 1998; Dong *et al.*, 1995 ; Boye et Alli, 2000). Cependant, les énergies mises en jeu dans les interactions hydrophobes (1 à 3 kcal/mol) sont en général plus faibles que dans les liaisons hydrogène (2 à 10 kcal/mol) (Michot *et al.*, 2002). Il est donc plus difficile de les mettre en évidence par la technique de spectroscopie infrarouge, dans les conditions de notre étude.

IV. Modèle descriptif des interactions développées entre lactose et β-lactoglobuline dans les poudres modèles.

A partir des différents résultats de cette étude, il est possible de proposer un schéma explicatif du développement et de la modification des interactions entre lactose et β-lactoglobuline lors de la conservation des poudres laitières modèles. Les différentes étapes vont donc être décrites depuis la lyophilisation jusqu'à la conservation sous de fortes activités de l'eau, qui équivaut à un vieillissement accéléré. Ce schéma descriptif est complété par une discussion sur la stabilité des poudres modèles.

IV. 1. Les différentes étapes du développement des interactions.

IV.1.1. Lyophilisation et conservation sous de faibles activités de l'eau ($0 \leq a_w \leq 0,39$).

Lactosylation de la protéine dès la lyophilisation

Le brunissement non-enzymatique est causé par des produits de dégradation très avancés de la réaction de Maillard. Son développement dans les poudres modèles étudiées implique donc une étape préalable de lactosylation de la β-lactoglobuline. L'augmentation des concentrations locales des réactants qui se produit pendant la lyophilisation est connue pour favoriser la réaction de Maillard, car un environnement déshydraté augmente la vitesse de la réaction (Buera et Karel, 1995 ; Morgan *et al.*, 1998, 1999 ; Burin *et al.*, 2000 et 2004). La lactosylation s'est donc produite pendant la lyophilisation (bien que les analyses de spectroscopie infrarouge réalisées ne permettent pas de le vérifier), ce qui implique que plusieurs acides aminés réactifs de la β-lactoglobuline sont liés de manière covalente à des molécules de lactose dès le début de la conservation des poudres modèles.

Développement de liaisons hydrogène entre lactose et β-lactoglobuline.

Si l'on compare les positions des bandes amide I des poudres modèles et de β-lactoglobuline, on constate que la bande de BL(10:90) apparaît à un nombre d'onde plus faible que celle de la β-lactoglobuline ; ce qui correspond à un environnement plus hydrophile. Le lactose a donc établi des liaisons hydrogène avec les groupements polaires de la protéine. La dérivation de second degré des spectres, dont le lactose est soustrait, confirme ce résultat car le pic à environ 1630 cm^{-1} indique que les feuillets β de la protéine développent plus de liaisons hydrogène dans la poudre modèle que dans la poudre de β-lactoglobuline.

IV.1.2. Conservation à l'activité de l'eau précédant la cristallisation ($0,43 \leq a_w \leq 0,59$).

Etat du lactose

Les analyses infrarouges et de diffraction des rayons X ont permis d'étudier l'état du lactose à l'a_w critique de 0,43, qui précède la cristallisation du lactose dans la poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline. Le spectre infrarouge de BL(10:90) est aussi faiblement résolu à une a_w de 0,43 qu'à une a_w nulle, ce qui révèle l'état amorphe du lactose dans cette poudre après conservation sous une a_w de 0,43 (figure III.47 et cf §I).

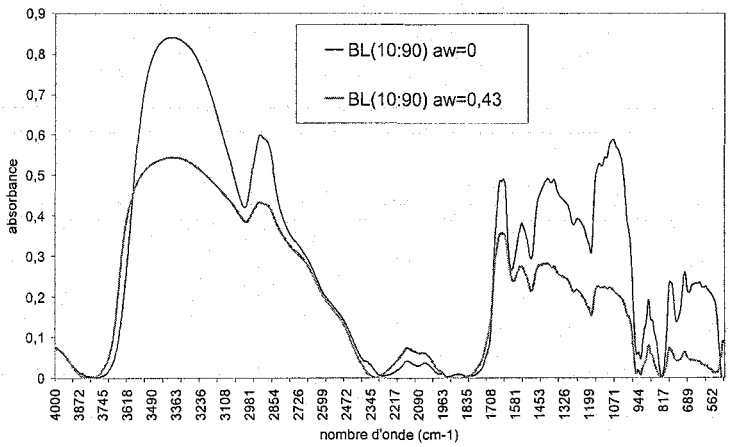


Figure III. 47 : Spectres infrarouges de la poudre modèle BL(10:90) à a_w nulle et conservée 3 mois à 20°C sous une a_w de 0,43.

Le diagramme de diffraction des rayons X par la poudre BL(10:90) conservée sous une a_w de 0,43 ne présente pas de pics de diffraction (figure III.48). L'échantillon est exempt de cristaux : le lactose est amorphe.

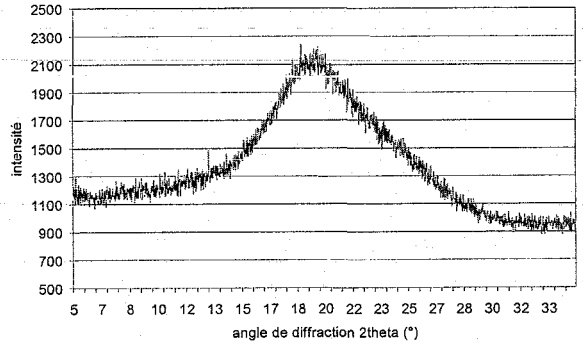


Figure III. 48. Spectre de diffraction des rayons X de la poudre modèle BL(10:90) conservée 3 mois à 20°C sous une activité de l'eau de 0,43.

Toutes les analyses concordent et montrent que le lactose présent dans la poudre modèle à 10% de β-lactoglobuline est encore amorphe après conservation de plusieurs mois à une a_w de 0,43.

Structure de la β-lactoglobuline

Dans la poudre modèle BL(10:90) conservée sous une a_w de 0,43, la β-lactoglobuline adopte une conformation un peu particulière : les pics de dérivées secondes qui apparaissent à 1613 cm^{-1} et 1680 cm^{-1} traduisent une agrégation de la β-lactoglobuline. Ce résultat est à approfondir car il est surprenant que le pic à 1680cm^{-1} ne soit plus visible après conservation sous une a_w de 0,76.

Modification des liaisons hydrogène

L'observation des spectres infrarouges de la poudre BL(10:90) a montré que la conservation sous une a_w de 0,43 correspond à une modification des interactions entre lactose et β-lactoglobuline. La largeur de la bande νOH est par exemple différente de celle des autres poudres, et ce phénomène n'est pas dû qu'à l'hydratation. Le pic de dérivées secondes des feuillets β pour une a_w de 0,43 se situe à un nombre d'onde plus élevé qu'à l'a_w nulle, ce qui indique que cette structure protéique interagit moins fortement, par liaisons hydrogène, avec les groupements OH du lactose. La conservation à l'a_w précédent la cristallisation du lactose dans les poudres modèles avec 10 à 30% de β-lactoglobuline s'accompagne d'une nouvelle répartition des liaisons hydrogène. Celles qui étaient présentes à activité de l'eau nulle entre lactose et β-lactoglobuline diminuent tandis que d'autres se développent.

Il faut noter que la forte présence d'eau à l'a_w de 0,43 est un paramètre qui va influencer les interactions entre lactose et β-lactoglobuline et favoriser la mobilité nécessaire au déclenchement de la cristallisation.

Sorption d'eau particulière à cette activité de l'eau

La comparaison des courbes isothermes de sorption d'eau des poudres modèles et des courbes d'additivité des sorptions d'eau, qui a mis en évidence les interactions lactose /β-lactoglobuline (figures III.12 et III.13), démontre aussi un comportement de sorption atypique des poudres modèles à l'activité de l'eau précédant la cristallisation. La figure III.49 compare les courbes isothermes expérimentales et celles obtenues par calcul des poudres modèles contenant de 10 à 40% de β-lactoglobuline.

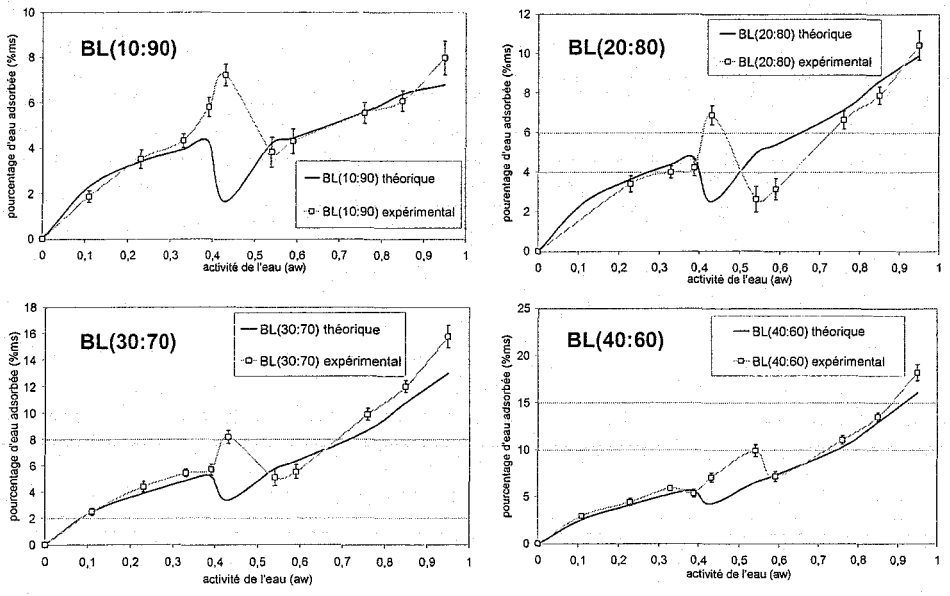


Figure III.49 : Comparaison des courbes isothermes de sorption d'eau des poudres modèles contenant 10 à 40% de β-lactoglobuline après 12 semaines de conservation à 20°C. Les courbes « théoriques » sont obtenues par le calcul à partir des courbes de sorption des poudres de lactose et de β-lactoglobuline lyophilisées.

Nous constatons que la teneur en eau des poudres modèles à l'a_w précédent la cristallisation est beaucoup plus élevée que la valeur prévue par le calcul. Les poudres contenant de 10 à 30% de β-lactoglobuline conservées sous une a_w de 0,43 et la poudre à 40% de cette protéine conservée sous une a_w de 0,54 adsorbent plus d'eau que s'il y avait additivité des comportements de sorption.

Un échantillon de 100 g de la poudre BL(10:90) anhydre sous une a_w nulle pèse environ 107 g après conservation sous une a_w de 0,43. La poudre est alors composée d'environ 10g de β-lactoglobuline, de 90 g de lactose et de 7 g d'eau, dont 3 g « excédentaires » par rapport à la courbe calculée. A partir de ces valeurs approximatives, on peut considérer que pour une mole de β-lactoglobuline, il y en a 480 de lactose et 700 d'eau adsorbée par la poudre. Parmi ces 700 moles d'eau, environ 400 seulement seraient adsorbées si l'on avait simple addition des capacités de sorption de la β-lactoglobuline et du lactose (dans le cas où le lactose serait encore amorphe). La poudre BL(10:90) adsorbe donc 300 moles d'eau « supplémentaires » du fait des interactions particulières entre les composants à cette activité de l'eau.

La figure III.50 montre que la β-lactoglobuline lyophilisée peut adsorber jusqu'à 2% d'eau de plus que la poudre commerciale qui ne l'est pas. La capacité d'adsorption d'eau par une protéine est liée à sa conformation car une dénaturation même partielle et réversible de la protéine génère une exposition plus importante de sa surface à l'eau environnante et entraîne souvent une augmentation de l'hydratation de la protéine (Schnepf,1992).

Dans notre étude, les contraintes apportées lors des étapes de congélation et de sublimation de l'eau pendant la lyophilisation, qui sont connues pour dénaturer les protéines sont certainement à l'origine de l'adsorption d'eau plus importante par la β-lactoglobuline lyophilisée par rapport à la poudre commerciale (Dong *et al.*, 1995 ; Carpenter *et al.*, 1998 ; Arakawa *et al.* 2001 ; Izutsu et Kojima, 2002).

Pour cette raison, l'adsorption d'eau particulièrement importante des poudres modèles (contenant de 10 à 30% de β-lactoglobuline) à une a_w de 0,43 semble liée à une perturbation de la structure de la protéine, visible sur les spectres de dérivées secondes de l'analyse infrarouge.

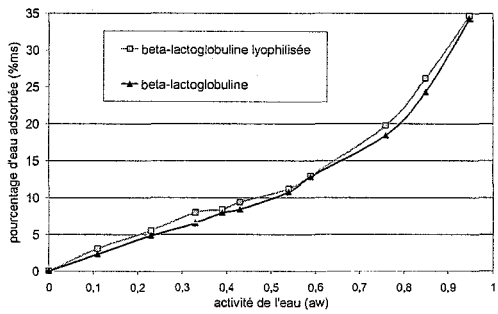


Figure III.50 : Courbes isothermes de sorption d'eau de poudres de β-lactoglobuline lyophilisée et non lyophilisée, obtenues après 3 semaines de conservation à 20°C.

Un état de transition particulier semble donc apparaître à une a_w de conservation de 0,43 dans les poudres modèles contenant 10 à 30% de β-lactoglobuline , et à une a_w de 0,54 dans celle à 40% de protéine. Les interactions par liaisons hydrogène entre lactose et β-lactoglobuline diminuent, alors que celles entre les groupements OH augmentent. Le lactose est encore amorphe et la structure de la protéine semble modifiée. La quantité d'eau adsorbée par les poudres modèles est particulièrement importante à cette activité de l'eau. Ces résultats semblent être en accord avec la théorie de l'hydratation préférentielle développée par Timasheff (2002).

Cet auteur présente l'aspect thermodynamique des interactions attractives ou répulsives qui apparaissent en solution entre une protéine, des molécules d'eau, et un co-solvant, comme un saccharide. Selon Timasheff (2002), la protéine dans l'eau pure présente une mosaïque de sites qui interagissent avec l'eau par le biais de mécanismes qui dépendent de la nature chimique et des énergies libres particulières des sites. Ceci mène à des forces d'attraction ou de répulsion qui définissent l'affinité de l'eau pour la protéine. Les molécules d'eau forment une sorte de « gangue » fluctuant autour de la protéine. Celle-ci va affecter thermodynamiquement la « gangue » de manière plus ou moins forte. Ce système protéine-eau peut être perturbé par l'ajout en forte quantité d'une troisième molécule, appelée co-solvant, qui peut occuper 40 à 50% du volume de la solution. Cette troisième molécule va entrer en interaction avec l'eau en mettant en jeu différentes énergies libres d'interaction, d'attraction ou de répulsion. Le potentiel chimique du co-solvant est perturbé par celui de la protéine, et inversement. La perturbation mutuelle des potentiels chimiques a pour conséquence la re-distribution des composants du solvant (eau et co-solvant) à proximité de la protéine. Les paramètres thermodynamiques de l'interaction peuvent être négatifs ; dans ce cas l'interaction est favorable et génère un excès de co-solvant à la surface de la protéine, par rapport à la quantité de co-solvant dans la solution. Cet excès de co-solvant correspond, logiquement, à une diminution du nombre de molécules d'eau à proximité de la protéine. Si les paramètres thermodynamiques sont positifs, l'interaction est défavorable et un défaut de co-solvant apparaît à proximité de la protéine. Dans ce cas, un excès de molécules d'eau est également constaté à la surface de la protéine ; et la concentration de co-solvant dans la solution est plus importante. L'auteur définit ces phénomènes par les termes « hydratation préférentielle » et « exclusion préférentielle » d'eau à proximité de la protéine. Selon le composant pris comme référence dans la solution, on peut également définir ce phénomène comme adsorption préférentielle ou exclusion préférentielle de co-solvant.

Lors de la lyophilisation de nos poudres modèles, la concentration des solutions de lactose utilisées (10% p/v) est de 0,25M. Elle est comprise dans la gamme de concentration définie par Timasheff comme permettant de considérer cette molécule comme un co-solvant (0,2-10M).

La présence de lactose permet un meilleur maintien de la structure native de la β-lactoglobuline. Cela suggère que l'état de la β-lactoglobuline en solution avec le co-solvant (lactose) est thermodynamiquement plus favorable que dans l'eau pure. Ainsi, il est possible qu'un phénomène de « salting in » se produise lors de la lyophilisation des solutions de β-

lactoglobuline/lactose. Ce « salting in » serait à l'origine d'une exclusion préférentielle de l'eau, qui correspond à une adsorption préférentielle du lactose, à proximité de la β-lactoglobuline.

Après lyophilisation, la poudre modèle est déshydratée et la β-lactoglobuline ne se trouve plus dans des conditions de solution avec un co-solvant. Par contre, lors de la conservation la poudre modèle ré-adsorbe des molécules d'eau. L'augmentation locale de la concentration en eau peut re-créer les conditions environnementales proches d'une solution contenant un co-solvant. Il serait alors justifié d'émettre l'hypothèse de l'apparition à une a_w de 0,43 d'un phénomène d'hydratation préférentielle de la β-lactoglobuline dans la poudre BL(10:90), accompagnée d'une exclusion préférentielle des molécules de lactose qui se trouvaient à proximité de la protéine. Cette hypothèse semble confortée par la forte teneur en eau de la poudre BL(10:90) à une a_w de 0,43, par rapport au comportement théorique de sorption d'eau. Les causes possibles de l'hydratation préférentielle sont diverses. Il peut s'agir d'une exclusion stérique, de l'apparition d'une répulsion par des sites chargés, d'une perturbation des tensions de surface (Timasheff, 2002). L'apparition d'un phénomène d'hydratation préférentielle dans nos poudres peut paraître surprenante car lors de l'étape de lyophilisation, c'est le phénomène inverse qui est observé (adsorption préférentielle de lactose). Cependant, les analyses en spectroscopie infrarouge ont montré que la β-lactoglobuline adopte une structure particulière à une a_w de 0,43. De plus, l'environnement de la protéine a été modifié lors de la conservation à cause du développement de la réaction de Maillard, notamment. L'énergie libre de surface de la protéine a donc été fortement perturbée. Tout cela a pu générer l'hydratation préférentielle à proximité de la β-lactoglobuline.

La modification des concentrations locales, due à l'exclusion préférentielle du lactose et à l'hydratation préférentielle à proximité de la protéine, pourrait également expliquer le maintien de l'état amorphe du lactose. La création préférentielle de liaisons hydrogène entre β-lactoglobuline et eau perturbe l'organisation des molécules de lactose entre elles. Un plus grand nombre de molécules d'eau, génératrices de liaisons hydrogène, serait nécessaire pour recréer des conditions favorables au développement de la cristallisation dans les poudres modèles. Celle-ci ne pourrait donc se produire qu'à une activité de l'eau plus importante par rapport au lactose pur.

Il est difficile de savoir si la modification de la structure de la β-lactoglobuline est antérieure au phénomène d'hydratation préférentielle ou s'il en est une conséquence. Une étude plus approfondie en spectroscopie infrarouge serait intéressante pour éclaircir ce point.

IV.1.3. Conservation avancée et conservation sous forte activité de l'eau ($a_w \geq 0,76$).

Forte cristallisation du lactose dans toutes les poudres

La forte présence d'eau lors de la conservation avancée, et à forte a_w, des poudres modèles est responsable de la cristallisation du lactose.

En effet, l'eau augmente la mobilité des molécules et leur diffusion. Ce phénomène est mis en évidence par le développement du brunissement non-enzymatique mesuré dans les poudres modèles. La figure III.37 qui représente l'évolution du paramètre b des poudres modèles en fonction de l'a_w de conservation le montre bien. Le paramètre b augmente fortement dans les poudres modèles lorsque l'a_w de conservation dépasse 0,43. Cette augmentation est directement liée à l'accélération des phénomènes de diffusion, d'une part à cause de l'a_w élevée, mais aussi parce que la réaction de Maillard et la cristallisation s'accompagnent d'une libération d'eau.

Lorsque le lactose est fortement cristallisé, la position de la bande amide I de toutes les poudres co-lyophilisées est décalée vers les nombres d'ondes élevés, comme pour la poudre de lactose. Ce décalage est gouverné par celui de la bande de cisaillement des OH de l'eau de constitution du lactose, lors de la cristallisation. Il correspond à un renforcement des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau de constitution et celles de lactose. Ce résultat est en accord avec le déplacement de la bande ν OH vers les faibles nombres d'ondes. Ainsi, la conservation à forte activité de l'eau s'accompagne d'une intensification des liaisons hydrogène entre lactose et eau, qui est caractéristique de l'organisation du réseau cristallin.

Les formes cristallines produites dans les poudres modèles sont similaires à l'a_w de début de cristallisation, puis évoluent, surtout selon l'a_w de conservation de la poudre (cf chapitre II, tableau III.2).

Structure de la β-lactoglobuline

Dans les poudres modèles, l'aire délimitée par le pic de dérivées secondes (1630 cm^{-1} environ) de la bande amide I correspond à la proportion de structure secondaire de la β-lactoglobuline organisée en feuillets β. L'aire étant similaire à a_w nulle et après conservation à une a_w de 0,76, la proportion de feuillets β est inchangée. Les liaisons hydrogène établies entre lactose et β-lactoglobuline dès la lyophilisation stabilisent la structure de la β-lactoglobuline, bien que la forte présence d'eau à partir d'une a_w de 0,43 modifie ces interactions.

Dans la poudre B(10)+L(90) produite par mélange, le lactose ne stabilise pas autant la structure de la protéine car cette poudre contient moins de feuillets β que la poudre co-lyophilisée conservée à une même activité de l'eau.

La dénaturation de la β-lactoglobuline dans la poudre mélangée peut se produire dès la lyophilisation (Arakawa, 2001 ; Izutsu et Kojima, 2002). Cependant, la cristallisation peut aussi être en partie responsable de cette perte de structure.

La figure III.51 suivante décrit les différentes étapes du développement des interactions entre lactose et β-lactoglobuline au cours de la conservation des poudres modèles sous les différentes activités de l'eau étudiées :

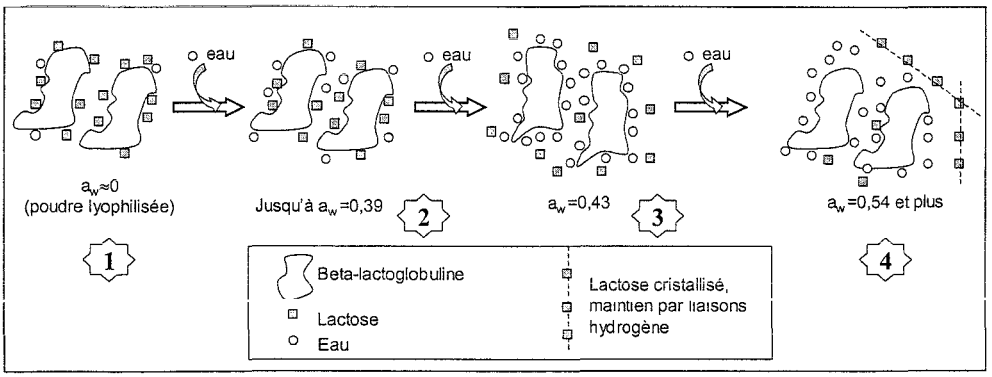


Figure III.51: Schéma des interactions développées entre lactose, β-lactoglobuline et eau lors de la conservation à 20°C d'une poudre modèle contenant 10 à 30% de β-lactoglobuline, sous une a_w nulle juste après lyophilisation, puis après conservation sous des a_w de 0,39, 0,43 et 0,54.

Au sein de la poudre modèle fraîchement lyophilisée(1) le lactose a établi des liaisons hydrogène avec les molécules de β-lactoglobuline. Il y a présence de très peu de molécules d'eau car la conservation sur P_2O_5 correspond à une a_w quasiment nulle.

Lors de la conservation sous des a_w inférieures ou égales à 0,39⟨2⟩ la poudre modèle adsorbe les molécules d'eau de l'atmosphère ambiante.

Les poudres de 10 à 30% de β-lactoglobuline subissent sous une a_w de 0,43⟨3⟩ un phénomène d'hydratation préférentielle (augmentation des liaisons hydrogène entre protéine et eau) et d'exclusion préférentielle des molécules de lactose (diminution des interactions lactose/β-lactoglobuline). La structure protéique serait perturbée pendant cet échange des liaisons hydrogène. Le lactose est encore amorphe, même si la structure de la poudre commence à s'effondrer.

Dans la poudre conservée sous des a_w supérieures ou égales à 0,54,⟨4⟩ le lactose cristallise, ce qui correspond à un développement du nombre et de la force des liaisons hydrogène entre lactose et eau de constitution du réseau cristallin. La modification des liaisons hydrogène et la cristallisation qui apparaissent pendant la conservation ne dénaturent pas la structure en feuillets β de la β-lactoglobuline (par rapport à l'état⟨1⟩).

IV. 2. Stabilité des poudres modèles par rapport à la cristallisation du lactose.

Dans le chapitre II de la partie résultats, l'étude des comportements de sorption d'eau des poudres modèle a permis la définition d'un temps de latence avant cristallisation. Celui-ci correspond au temps nécessaire, à une a_w donnée, avant d'observer nettement la libération d'eau (cassure), qui accompagne la cristallisation, sur la courbe isotherme . Ce temps de latence traduit la stabilité de la poudre laitière modèle puisqu'il correspond à la durée pendant laquelle le lactose reste amorphe.

La figure III.52 représente le temps de latence avant cristallisation, en fonction de la teneur en β-lactoglobuline de la poudre modèle et de l'a_w de conservation.

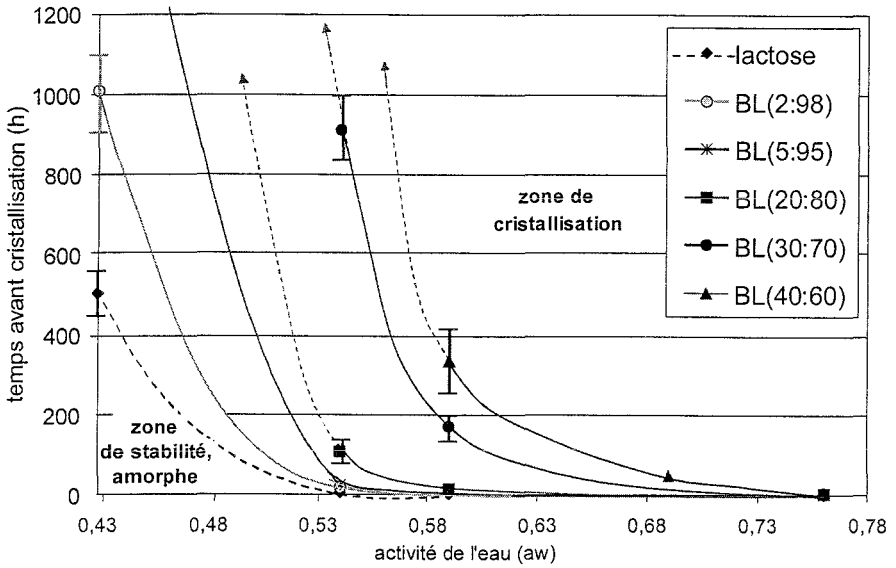


Figure III.52 : Délai avant cristallisation observé dans les poudres de lactose, de β-lactoglobuline et les poudres modèles BL(2:98), BL(5:95), BL(20:80), BL(30:70) et BL(40:60), en fonction de l'a_w de conservation. Les traits pointillés fins représentent les courbes extrapolées.

Chaque courbe de la figure III.52 correspond à une composition de poudre modèle et délimite deux régions sur la figure. A gauche de la courbe se trouve la zone de stabilité, dans laquelle le lactose contenu dans la poudre n'est pas cristallisé. La zone à droite de la courbe correspond à la zone d'instabilité, dans laquelle les conditions de l'environnement favorables à la cristallisation sont réunies.

Sur la figure III.52 plus l'a_w de conservation est élevée, plus le temps avant cristallisation diminue de manière exponentielle, quelle que soit la composition de la poudre modèle. Protéger la poudre de l'humidité relative ambiante est le meilleur moyen d'éviter sa cristallisation (Roos et Karel, 1991 ; Jouppila et Roos, 1994b ; Jouppila *et al.*, 1997).

La figure III.52 montre qu'il est l'important de considérer l'influence du temps dès lors que l'on aborde des questions de stabilité vis-à-vis de la cristallisation. La température, l'activité de l'eau et la composition ne sont pas les seuls facteurs influençant la cristallisation, une fois que l'a_w critique est dépassée. Une poudre placée sous une certaine activité de l'eau peut se trouver dans sa zone de stabilité en début de conservation, puis basculer au cours de la conservation dans la zone de cristallisation. La notion d'équilibre de sorption des courbes isothermes pourrait être remise en cause dans le cas d'un temps de latence très long ; la

courbe isotherme de sorption ne représentant alors que la stabilité apparente, à un instant « t ». On arrive également à la limite de la théorie de la transition vitreuse, qui ne prend pas suffisamment en compte ce paramètre temporel et ne semble donc pas complètement adaptée au phénomène de cristallisation.

La figure III.52 indique également que plus la poudre modèle contient de β-lactoglobuline, plus la courbe correspondante est déplacée vers des activités de l'eau élevées. La zone de stabilité est plus étendue lorsque la poudre contient 20% de β-lactoglobuline que lorsqu'elle en contient 5%, par exemple. Comme nous l'avons vu précédemment, la présence de β-lactoglobuline augmente la stabilité d'une poudre modèle vis-à-vis de la cristallisation. Cependant cette augmentation de stabilité n'est pas proportionnelle à la quantité de β-lactoglobuline dans la poudre. En effet, la zone de stabilité de la poudre modèle à 20% de β-lactoglobuline est à peine plus importante que celle de la poudre à 5% de protéine. Par contre, le doublement de la teneur en β-lactoglobuline de 20 à 40% augmente nettement la zone de stabilité.

Lorsque la figure est représentée avec un axe logarithmique (figure III 52bis), on constate que la teneur en β-lactoglobuline de 2% semble idéale pour stabiliser les poudres modèles vis-à-vis de la cristallisation : en effet, bien que cette quantité soit faible, elle augmente efficacement le temps de latence avant cristallisation, quelle que soit l'a_w de conservation considérée.

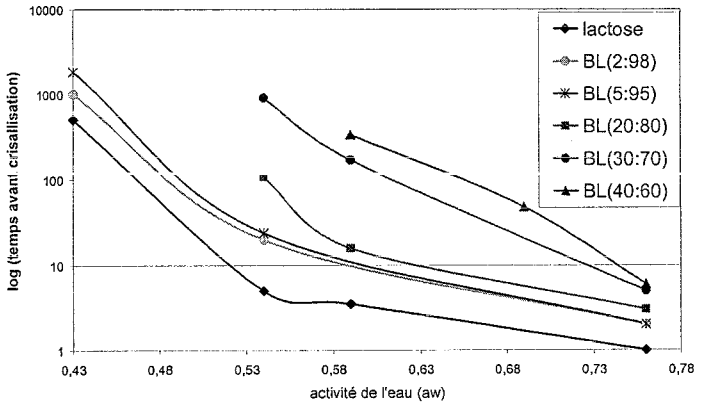


Figure III.52 bis : Figure identique à la III.52, mais avec un axe des ordonnées logarithmique.

Enfin, la figure III.52 permet de donner une estimation des conditions de l'environnement qui vont permettre la stabilité ou l'instabilité des poudres modèles. Il faut rappeler que cette estimation a été établie, et est valable, pour des échantillons de 0,5 à 1 g de poudre, conservés à 20°C. Cette estimation est effectuée dans des conditions particulières. Il est très probable que dans le cas de conservation de quantités plus importantes, les poudres soient stables plus longtemps. En effet, la durée d'humidification d'un lit de poudre dépend de sa taille (Stubberud *et al.*, 1996). La cristallisation du lactose dans un lot de poudre plus important apparaîtra probablement après un temps de conservation plus long.

La mesure, en fonction du temps, de la teneur en eau d'une poudre laitière contenant du lactose est donc une technique simple qui peut permettre d'établir une estimation des conditions et de la durée de stabilité d'une poudre laitière vis-à-vis de la cristallisation.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de l'étude était de contribuer à la compréhension des interactions qui peuvent se développer entre lactose et β-lactoglobuline pendant la conservation, sous différentes activités de l'eau, de poudres laitières modèles amorphes produites par lyophilisation. Ce travail visait aussi à étudier l'influence de la protéine - et des liaisons qu'elle établit - sur la cristallisation du lactose amorphe.

L'observation des modifications physico-chimiques (macro et microscopiques) a montré que les poudres modèles conservées sous des activités de l'eau (a_w) supérieures ou égales à 0,43 subissent un brunissement et que leurs particules s'agglomèrent, s'effondrent, avec apparition de cristaux à leur surface. L'a_w de conservation à partir de laquelle ces changements sont observés a été appelée a_w critique. Celle-ci varie selon la teneur en β-lactoglobuline de l'échantillon.

L'étude du comportement des poudres vis-à-vis de l'eau et de la cristallisation du lactose a montré que l'a_w critique précédemment observée correspond à une a_w de libération d'eau, révélée par une cassure sur les courbes isothermes de sorption. Les analyses thermiques différentielles et de diffraction des rayons X ont indiqué qu'elle correspond aussi à l'a_w de cristallisation du lactose dans les poudres.

La β-lactoglobuline diminue les vitesses de diffusion, ce qui ralentit la cristallisation. De plus, la présence de cette protéine reporte l'a_w de cristallisation du lactose dans les poudres modèles, alors que ceci n'est pas observé dans les poudres produites par mélange, dans lesquelles la proximité des deux composants est moins importante. Les comportements de sorption d'eau du lactose et de la β-lactoglobuline ne sont pas additifs dans les poudres modèles, ce qui traduit l'existence d'interactions entre ces deux molécules. Ces interactions stabilisent les poudres modèles vis-à-vis de la cristallisation, en reportant l'a_w critique de cristallisation à 0,54 dans les poudres à 10-30% de β-lactoglobuline et à 0,59 dans celles en contenant 40% ; alors que l'a_w critique du lactose lyophilisé est de 0,43.

La présence de β-lactoglobuline n'influence pas les formes cristallines produites dans les poudres à l'a_w de début de cristallisation, qui sont : les formes complexes α/β 5/3 et/ou α/β 3/2, le lactose α-monohydraté, et une faible part de lactose β anhydre. Après conservation

sous de fortes activités de l'eau, les formes complexes α/β disparaissent au profit des deux autres, dans des proportions qui varient selon la teneur en β-lactoglobuline de la poudre. Il est intéressant de constater que la diffraction des rayons X, l'analyse thermique différentielle et la spectroscopie infrarouge apportent des informations complémentaires sur la cristallisation du lactose ; cette dernière technique mériterait d'être développée dans ce but.

La mesure du changement de couleur en fonction de l'a_w de conservation traduit un brunissement non-enzymatique des poudres modèles, qui indique qu'une étape antérieure de lactosylation a eu lieu. En d'autres termes, des liaisons covalentes se sont développées, probablement dès la lyophilisation, entre les molécules de lactose et de β-lactoglobuline. Cette condensation n'est pas la seule responsable du report de l'a_w de cristallisation, car l'analyse par spectroscopie infrarouge montre que le lactose développe des liaisons hydrogène avec la protéine dès la lyophilisation. Celles-ci permettent un meilleur maintien de la structure en feuillets β de la β-lactoglobuline, même après le ré-arrangement des liaisons hydrogène qui accompagne la cristallisation à forte a_w.

La synthèse de tous les résultats obtenus a permis de proposer un schéma explicatif du développement des interactions entre lactose et β-lactoglobuline dans les poudres modèles conservées sous différentes activités de l'eau.
Lors de la conservation les poudres modèles ont un comportement de sorption d'eau atypique des poudres modèles à l'activité de l'eau précédent l'a_w de cristallisation. Celui-ci évoque la théorie de l'hydratation préférentielle : les analyses par spectroscopie infrarouge indiquent une modification des liaisons hydrogène, qui diminuent entre lactose et feuillets β de la β-lactoglobuline, alors que d'autres se développent préférentiellement entre la protéine et les molécules d'eau. Après conservation sous de fortes activités de l'eau, la cristallisation est étendue dans toutes les poudres, d'où un renforcement des liaisons hydrogène au sein du réseau cristallin de lactose.
La spectroscopie infrarouge semble également indiquer que dans les poudres modèles, la β-lactoglobuline adopte une structure secondaire particulière quand elle est conservée à l'a_w précédent la cristallisation, c'est-à-dire lorsque le phénomène de stabilisation apparaît. Il serait intéressant de préciser ce point en continuant l'analyse par spectroscopie infrarouge.

A l'issue de ce travail, il est possible d'envisager de représenter graphiquement l'influence des différents paramètres de l'étude. Le diagramme de phases « classique » qui représente la température en fonction de l'activité de l'eau (ou du pourcentage d'eau) pourrait être complété par une troisième dimension pour indiquer le temps de latence avant cristallisation. La figure III.57 montre que ce type de représentation est réalisable, à condition de compléter le nombre de points expérimentaux de cette étude. Il semble également important de tenir compte sur le diagramme de phase de la présence de protéines, ou de toute autre molécule pouvant agir comme fixateur ou rupteur de l'eau du système laitier étudié. Le présent travail montre notamment que la β-lactoglobuline a un rôle non négligeable car elle influence de manière significative la cristallisation du lactose, qui est un changement de phase important.

Concernant les techniques utilisées lors de l'étude, celle des enceintes climatiques ne permet pas de déceler finement les différences d'a_w de cristallisation, par exemple entre les poudres contenant de 10 à 30% de protéine. Une mesure plus fine des activités de l'eau et de la masse des échantillons permettrait une prédiction beaucoup plus exacte des phénomènes de diffusion et des variations de l'a_w de cristallisation. Pour cela, il faudrait utiliser une technique plus précise, comme un appareil de sorption dynamique de vapeur d'eau (DVS).
De plus, la résonance paramagnétique électronique, qui permet d'étudier la mobilité des molécules, notamment de l'eau, serait une technique à envisager pour la suite de l'étude des interactions à l'état faiblement hydraté.

Enfin, pour poursuivre ce travail dans un but plus appliqué, il serait intéressant de produire les mêmes poudres modèles par atomisation et de vérifier si les interactions lactose/β-lactoglobuline sont similaires et si les conséquences sont les mêmes sur la stabilisation vis-à-vis de la cristallisation. Les études portant sur la perturbation de la cristallisation du lactose par plusieurs molécules dans des poudres co-atomisées indiquent que ce pourrait être le cas (Berlin *et al.*, 1972 ; Forbes *et al.*, 1998 ; Corrigan *et al.*, 2002).
Il est enfin important de souligner que cette étude a été effectuée sur de petits échantillons et que les résultats sont sans doute différents si l'on considère un lit de poudre beaucoup plus important. Une atomisation sur un équipement pilote permettrait également de produire des lots de poudres beaucoup plus proches de la réalité industrielle et d'adapter la prévision de stabilité déjà effectuée sur des échantillons.

Aguilar, C. A. et Ziegler, R., Physical and microscopic characterization of dry whole milk with altered lactose content.1. Effect of lactose concentration, *Journal of Dairy Science*, 1994a; 77:1189-1197.

Aguilar, C. A. et Ziegler, R., Physical and microscopic characterization of dry whole milk with altered lactose content.2. Effect of lactose crystallization, *Journal of Dairy Science*, 1994b; 77:1198-1204.

Aguilera, J. M., Del Valle, J. M., Karel, M., Caking phenomena in amorphous food powders, *Trends in Food Science and Technology*, 1995; 6:149-155.

Allison, S. D., Chang, B., Randolph, T. W. et Carpenter, J. F., Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 365 (2), 289-298.

Anchordoquy, T. J., Izutsu, K. I., Randolph, T. W. et Carpenter, J. F., Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate deshydrogenase during freeze-drying, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 390(1):35-41.

Angberg, M., Lactose and thermal analysis with special emphasis on microcalorimetry, *Thermochimica Acta*, 1995, 248:161-176.

AOAC. Official methods of analysis. Association of Official Analysis Chemists, 1995, Washington, USA.

Arakawa, T., Prestrelski, S. J., Kenney, W. C. et Carpenter, J. F., Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins, *Advanced Drug and Delivery Reviews*, 2001, 46:307-326.

Baldwin, A. J. et Ackland, J. D., Effect of pre-heat treatment and storage on the properties of whole milk powder. Changes in physical and chemical properties, *Netherland Milk and Dairy Journal*, 1991; 45:169-181.

Belloque, J. et Smith, G. M., ^{1}H-Nuclear magnetic resonance studies on the conformational changes related to the foaming properties of β-lactoglobulin, *Journal of Dairy Science*, 1998, 81:2580-2587.

Berlin, E., Anderson, B. A., Pallansch, M. J., Water vapour sorption properties of various dried milks and wheys, *Journal of Dairy Science*, 1968, 51(9):1339-1344.

Berlin, E., Anderson, B. A., Pallansch, M. J., Water sorption by dried dairy products stabilized with carboxymethyl cellulose, *Journal of Dairy Science*, 1972, 56(6):685-689.

Berton, Benjamin, Hydratation par adsorption de vapeur d'eau ou par immersion des farines de blé et de leurs constituants, 215p., thèse INPL, Nancy, France, 2002.

Bertrand D. et Dufour E., La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. *Techniques et documentation*, 2000, Paris (566 p).

Bhandari, B. R. et Howes, T., Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods, *Journal of Food Engineering*, 1999; 40:71-79.

Boye, J. I., Ismail A. A., Alli I., Effects of physicochemical factors on the secondary structure of β-lactoglobulin, *Journal of Dairy Research*, 1996, 63:97-109.

Boye, J. I. et Alli, I., thermal denaturation of mixtures of α-lactalbumin and β-lactoglobulin : a differential scanning calorimetric study, *Food Research International*, 2000, 33(8):673-682.

Briggner, L. E., Buckton, G., Bystrom, K., Darcy P., The use of isothermal microcalorimetry in the study of changes in crystallinity induced during the processing of powders, *International Journal of Pharmaceutics*, 1994, 105:125-135.

Britten, M, et Lavoie, L., Foaming properties of proteins as affected by concentration, *Journal of Food Science*, 1992, 40: 873-879.

Brunauer, S., Emett, P. H. et Teller, E., Adsorption of gases in multi-molecular layers, *Journal of American chemical society*, 1938, 60:309-319.

Buckton, G. et Darcy, P., The use of gravimetric studies to assess the degree of crystallinity of predominantly crystalline powders, *International Journal of Pharmaceutics*, 1995, 123:265-271.

Buckton, G. et Darcy, P., Water mobility in amorphous lactose below and close to the glass transition temperature, *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 136:141-146.

Buckton, G., Yonemochi, E., Hammond J. et Moffat, A., The use of near infra-red spectroscopy to detect changes in the form of amorphous and crystalline lactose, *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, 168:231-241.

Buera, M. P. et Karel, M., Effect of physical changes on the rates of nonenzymatic browning and related reactions, *Food Chemistry*, 1995, 167-173.

Buma, T. J., Milk fat in spray-dried whole milk. 5. Cohesion; determination, influence of particle size, moisture content and free fat content, *Netherland Milk and Dairy Journal*, 1971, 25:107-122.

Burin, L., Jouppila, K., Roos, Y., Kansikas, J. et Buera, M. P., Color formation in dehydrated modified whey powder systems as affected by compression and Tg, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48:5263-5268.

Burin, L., Jouppila, K., Roos, Y., Kansikas, J. et Buera, M. P., Retention of β-galactosidase activity as related to Maillard reaction, lactose crystallization, collapse and glass transition in low moisture whey systems, *International Dairy Journal*, 2004, 14:517-525.

Burr, R., Moore, C. H. et Hill, J. P., Evidence of multiple glycosylation of bovine β-lactoglobulin by electrospray ionisation mass spectrometry, *Milchwissenschaft*, 1996, 51:488-492.

Bushill, J. H., Wright, W. B., Fuller, C. H. F., et Bell, A. V., The crystallisation of lactose with particular reference to its occurrence in milk powder, *Journal of Science Food and Agriculture*, 1965, 16:622-628.

Carpenter, J. F., Prestrelski S. J. et Dong, A., Application of infrared spectroscopy to development of stable lyophilised protein formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, 45, 231-238.

Carr, R. L., Evaluating flow properties of solids, *Chemical Engineering*, 1965, 18:163-168.

Cayot, P. et Lorient, D., Structure et techno-fonctionnalités des protéines de lait, Tech et Doc Lavoisier, 1998 Paris.

Celestino, E. L., Iyer, M. et Roginski, H., Reconstituted UHT-treated milk: effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour, *International Dairy Journal*, 1997a, 7:129-140.

Celestino, E. L., Iyer, M. et Roginski, H., The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods, *International Dairy Journal*, 1997b, 7:119-127.

Champion, D., Le Meste, M. et Simatos, D., Towards an improved understanding of glass transition and relaxations in foods: molecular mobility in the glass transition range, *Trends in Food Scence and Technology*, 2000, 11:41-55.

Chou, D. et Morr, C., Protein-water interactions and functional properties, *Journal of American Oil and Chemical Society*, 1979, 56:53A-62A.

Chevalier, F., Chobert, J. M., Dalgalarrondo, M., Choiset, Y. et Haertlé, T., Maillard glycation of β-lactoglobulin induces conformation changes, *Nahrung*, 2002, 46(2) :58-63.

Chidavenzi, O. C., Buckton, G., Koosha, F., Pathak, R., The use of thermal techniques to assess the impact of feed concentration on the amorphous content and polymorphic forms present in spray dried lactose, *International Journal of Pharm*aceutics, 1997, 159:67-74.

Chung, M. S., Ruan, R. R., Chen, P., Chung S. H., Ahn, T. H., et Lee, K. H., Study of caking in powdered foods using nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Journal of Food Science*, 2000, 65:134-138.

Chuy, L. E., and Labuza, T. P., Caking and stickiness of dairy-based food powders as related to glass transition, *Journal of Food Science*, 1994, 59:43-46.

Corrigan, D. O., Healy, A. M., Corrigan, O. I., The effect of spray-drying solutions of polyethylene glycol (PEG) and lactose/PEG on their physicochemical properties, *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 235:193-205.

Costantino H. R., Curley, J. G. et Hsu, C. C., Determining the water sorption monolayer of lyophilized pharmaceutical proteins, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997, 86(12):1390-1393.

Costantino, H. R., Curley, J. G., Wu, S. et Hsu, C. C., Water sorption behavior of lyophilized protein-sugar systems and implications for solid-state interactions, *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, 166:211-221.

Couchman, P. R. et Karasz, F. F., A classical thermodynamic discussion of the effect of composition on glass-transition temperatures, *Macromolecules*, 1978, 11:117-119.

Croguennec, T., Bouhallab, S., Mollé, D., O'Kennedy, T. et Mehra, R., Stable monomeric intermediate with exposed Cys-119 is formed during heat denaturation of β-lactoglobulin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 301:465-471.

Dana, G., Constantes des spectres infrarouges. *Techniques de l'ingénieur*, traité des constantes physico-chimiques, 1999, K 1010, p.9.

Darcy, P . et Buckton, G., The influence of heating/drying on the crystallisation of amorphous lactose after structural collapse, *International Journal of Pharmaceutics* , 1997, 158:157-164.

Dickinson, E. et Lopez, G., Comparison of the emulsifying properties of fish gelatin and commercial milk proteins, *Journal of Food Science*, 2001, 66:118-123.

Dong, A., Prestrelski, S. J., Allison, S. D. et Carpenter J. F., Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1995, 84 (4), 415-424.

Downton, G. E., Flores-Luna, J. L. et King, C. J., Mechanism of stickiness in hygroscopic, amorphous powders, *Industrial Engineering and Chemical Fundamentals*, 1982, 21:447-451.

Drapier-Bêche, Nathalie, Existence, caractérisation, analyses physico-chimiques et hypothèses de structure des composés moléculaires du lactose alpha/beta. Thèse. INPL, Nancy, France, 1997.

Dziuba, J. et Darewicz, M., Structural aspect of functional properties of milk proteins, *Natural Sciences*, 2000, 4:258-272.

El, S. N. et Kavas, A., Available lysine in dried milk after processing, *International Journal of Food Science and Nutrition*, 1997, 48:109-111.

Elisée, Philippe, Influence de l'état de crystallisation du lactose et de l'hydratation sur les propriétés rhéologiques des poudres de lait écrémé. Thèse. INPL, Nancy, France, 1992.

Euston, S. R. et Hirst, R. L., Comparison of the concentration-dependant emulsifying properties of protein products containing aggregated and non-aggregated milk proteins, *International Dairy Journal*, 1999, 9:693-701.

Fairise, J. F., Cayot, P. et Lorient, D., Characterisation of the protein composition of casein micelles after heating, *International Dairy Journal*, 1999, 9:249-254.

Fäldt, P., et Bergenstahl, B., Fat encapsulation in spray-dried food powders, *Journal of American Oil and Chemical Society*, 1995, 72:171-176.

Fäldt, P., et Bergenstahl, B., Spray-dried whey protein/lactose/soybean oil emulsions. 2. Redispersibility, wettability and particle structure, *Food Hydrocolloids*, 1996, 10: 431-439.

Fädt, P., et Sjohölm, I., Characterisation of spray-dried whole milk, *Milchwissenschaft*, 1996, 51:88-91.

Fenaille, F., Campos-Giménez E., Guy, P. A., Schmitt, C. et Morgan, F., Monitoring of β-lactoglobulin dry-state glycation using various analytical techniques, *Analytical Biochemistry*, 2003, 320:144-148.

Figura, L. O., The physical modification of lactose and its thermoanalytical identification, *Thermochimica Acta*, 1993, 222:187-194.

Forbes, R. T., Davis, K. G., Hindle, M., Clarke, J. G. et Maas, J., Water vapour sorption studies on the physical stability of a series of spray-dried protein/sugar powders for inhalation, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1998, 87(11):1316-1321.

Fox, P. F., Developments in dairy chemistry, 4ème edition. Elsevier science applied, 1989, New-York.

French, S. J., and W. J. Harper., Theoretical representation of surface properties on hypothetical Maillard modified β-lactoglobulin using GRASP/GRASS, *Milchwissenschaft*, 2001, 56(6):310-313.

French, S. J., Harper, W. J., Kleinholz, N. M., Jones, R. B. et Green-Church, K. B., Maillard reaction induced lactose attachment to bovine β-lactoglobulin: electrospray ionisation and matrix-assisted laser desorption/ionisation examination, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50:820-823.

Friedman, M., Food browning and its prevention: an overview, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 4:631-653.

Garnier, S., Petit, S. et Coquerel, G., Dehydration mechanism and crystallisation behaviour of lactose, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2002a, 68:489-502.

Garnier, S., Petit, S. et Coquerel, G., Influence of supersaturation and structurally related additives on the crystal growth of α–lactose monohydrate, *Journal of Crystal Growth*, 2002b, 234:207-219.

Gauthier, F., Bouhallab, S. et Renault, A., Modification of bovine β-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in aqueous solution: adsorption at the air-water interface, *Colloids and surfaces B:Biointerfaces*, 2001, 21:37-45.

Gezimati, J., Creamer, L. K., Singh, H., Heat-induced interactions and gelation of mixtures of β-lactoglobulin and α-lactalbumin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45:1130-1136.

Gombas A., Antal, I., Szabo-Revesz, P., Marton S. et Eros, I., Quantitative determination of crystallinity of alpha-lactose monohydrate by near infrared spectroscopy (NIRS). *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, 256, 25-32.

Gonzalez-Martinez, C., Becra, M., Chafer, M. Albors, A., Carot, J. M. et Chiralt, A., Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt, *Trends in Food Science and Technology*, 2002, 13:334-340.

Greenspan, S., Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions, *Journal of Research of the National Bureau Standards, section A physics and chemistry*, 1977, 81:89-93.

Groubet, R., Chobert, J. M. et Haertlé, T., Functional properties of milk proteins glycated in mild conditions, *Science des Aliments*, 1999, 19:423-438.

Guyomarc'h, F., Warin, F., Muir, D. D. et Leaver, J., Lactosylation of milk proteins during the manufacture and storage of skim milk powders, *International Dairy Journal*, 2000, 10:863-872.

Guyonnet, J. P., Les prodigieuses perspectives des protéines laitières, *Revue Laitière Française* n°609, 2001, 3 :16-19.

Hancock, B. C., Shamblin, S. L., Water vapour sorption by pharmaceutical sugars, *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 1998, 1(8):345-351.

Hardy, J., Interactions de l'eau avec les constituants et propriétés d'hydratation des aliments : une introduction, dans « les produits alimentaires et l'eau » 11èmes rencontres Agoral, Nantes, édition Tec & doc, 1999, Paris, 11-33.

Haylock, S. J., Dried dairy ingredients for confectionery, *The Manufacturing Confectioner*, 1995, 6:65-73.

Hennigs, C., Kockel, C. K. et Langrish, T. A. G., New measurements of the sticky behavior of skim milk powder, *Drying Technology*, 2001, 19:471-484.

Howell, N.K., Protein-protein interactions, dans: "Biochemistry of food proteins", ed. BJF Hudson, Elsevier science Applied, 1992.

Huffman, L. M., Processing of whey proteins for use as food ingredient, *Food technology*, 1996, 2:49-52.

Hunt, J. A. et Dalgleish, D. G., Effect of pH on the stability and surface composition of emulsions made with whey protein isolate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42:2131-2135.

Ibrahim, H. R., Kobayashi, K. et Kato, A., Improvement of the surface functional properties of β-lactoglobulin and α-lactalbumin by heating in a dry state, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1993, 57:1549-1552.

IDF Standard 87. 1979. Determination of the dispersibility and wettability of instant dried milk. International Dairy Federation.

Imamura, K., Ogawa, T., Sakiyama, T. et Nakanishi, K., Effects of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 92 (2), 266-274.

Itoh, T., Satoh, M. et Adachi, S., Differential thermal analysis of α-lactose hydrate, *Journal of Dairy Science,* 1977, 60:1230-1235.

Izutsu, K. I. et Kojima, S., Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2002, 54, 1033-1039.

Jameson, G. B., Adams, J. J. et Creamer, L. K., Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine β-lactoglobulin, *International Dairy Journal*, 2002, 12:319-329.

Jayaprakasha, H. M., Ratel, R. S. et Renner, E., Optimization of precrystallization process for nonhygroscopic whey powder by using reverse osmosis concentrate, *Japanese Journal of Dairy Food Science*, 1995, 44:113-121.

Jiang, S. et Nail, S. L., Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying, *European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics*, 1998, 45:249-257.

Jones, A. D., Tier, C. M. et Wilkins, J. P. G., Analysis of the Maillard reaction products of β-lactoglobulin and lactose in skim milk powder by capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography A,* 1998, 822:147-154.

Jouppila, K . et Roos, Y. H., Glass transition and crystallization in milk powders, *Journal of Dairy Science,* 1994a, 77:2907-2915.

Jouppila, K. et Roos, Y. H., Water sorption and time-dependant phenomena of milk powders, *Journal of Dairy Science*, 1994b, 77:1798-1808.

Jouppila, K., Kansikas, J. et Roos, Y. H., Glass transition, water plasticization, and lactose crystallization in skim milk powder, *Journal of Dairy Science*, 1997, 80:3157-3160.

Jouppila, K., Kansikas, J. et Roos, Y. H., Crystallization and X-ray diffraction of crystals formed in water-plsticized amorphous lactose, *Biotechnology Progress*, 1998, 14:347-350.

Karel, M. et Buera, M. P., Glass transition and its potential effects on kinetics of condensation reactions and in particular on non-enzymatic browning. dans: Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., O'Brien, J., *Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health*, special publication n°151. Cambridge: Royal society of chemistry, 1994, 164-169.

Karmas, R. et Karel, M., The effect of glass transition on Maillard browning in food models. In: Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., O'Brien, J., *Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health*, special publication n°151. Cambridge: Royal society of chemistry, 1994, 182-187.

Karmas, R., Buera, M. P. et Karel, M., Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40:873-879.

Kedward, C. J., Mc Naughtan, M. et Mitchell, J. R., Crystallization kinetics of lactose as a function of moisture content using isothermal differential scanning calorimetry, *Journal of Food Science*, 2000, 65:324-329.

Kedward, C. J., Mc Naughtan, M., Blanshard, J. M. V. et Mitchell, J. R., Crystallization kinetics of lactose and sucrose based on isothermal differential scanning calorimetry, *Journal of Food Science*, 1998, 63:192-197.

Kim, E. H.-J., Chen, X. D. et Pearce, D., Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting properties, *Colloids and Surfaces. B:Biointerfaces*, 2002, 26:197-212.

King, N., The physical structure of dried milk, *Dairy Science Abstracts*, 1965, 27(3):91-104.

Kinsella, J. E. et Fox, P. F., Water sorption by proteins : milk and whey proteins, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1986, 24(2):91-139.

Knudsen, J. C., Antanuse, H. S., Risbo, J. et Skibsted, L. H., Induction time and kinetics of crystallization of amorphous lactose, infant formula and whole milk powder as studied by isothermal differential scanning calorimetry, *Milchwissenschaft*, 2002, 57(9/10):543-546.

Kockel, T. K., Allen, S., Hennigs, C. et Langrish, T. A. G., An experimental study of the equilibrium for skim milk powder at elevated temperatures, *Journal of Food Engineering*, 2002, 51:291-297.

Kreilgaard, L., Frokjaer, S., Flink, J. M., Randolph, T. W. et Carpenter, J. F., Effects of additives on the stability of recombinant human factor XIII during freeze-drying and storage in the dried solid, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1998, 360:121-134.

Krimm S. Interpreting infrared spectra of peptides and proteins, dans "Infrared analysis of peptides and proteins. Principles and application" Singh, B. R., 2000, ACS Symposium series 750.

Labuza, T. P., Tannenbaum, S. R. et Karel, M., Water content and stability of low-moisture and intermediate-moisture foods, *Food Technology*, 1970, 24(543):35-42.

Lai, H.-M. et Schmidt, S. J., Lactose crystallization in skim milk powder observed by hydrodynamic equilibria, scanning electron microscopy and ^{2}H nuclear magnetic resonance, *Journal of Food Science*, 1990, 55(4):994-999.

Landrock, A. H. et Proctor, B. E., A new graphical interpolation method for obtaining humidity equilibrium data, with special reference to its role in food packaging studies, *Food Technology*, 1951, 5:332.

Lane R. Y. et Buckton G., The novel combination of dynamic vapour sorption gravimetric analysis and near infra-red spectroscopy as a hyphenated technique, *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 207, 49-56.

Le Meste, M. et Simatos, D., La transition vitreuse : incidences en technologie alimentaire, Cahier Scientifique et technique, *I.A.A.*, 1990; 1:5-12.

Lefèvre, T. et Subirade, M., Conformational rearrangement of β-lactoglobulin upon interaction with an anionic membrane, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001a, 1549, 37-50.

Lefèvre, T. et Subirade, M., Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by Fourier transform infrared spectroscopy: model studies on β-lactoglobulin, *Food Hydrocolloids*, 2001b, 15:365-376.

Levi, G. et Karel, M., Volumetric shrinkage (collapse) in freeze-dried carbohydrates above their glass transition temperature, *Food Research International*, 1995, 28:145-151.

Liang, J H., Kinetics of fluorescence formation in whole milk powders during oxidation, *Food Chemistry*, 2000, 71:459-453.

Lloyd, R. J., Chen X. D. et Hargreaves, J. B., Glass transition and caking of spray-dried lactose, *International Journal of Food Science and Technology*, 1996, 31:305-311.

Lockemann, C. A., A new laboratory method to characterize the sticking properties of free-flowing solids, *Chemical Engineering and Processing*, 1999, 38:301-306.

Lutz, E. T. G. et Van Der Maas, J. H., Hydrogen bonds in crystalline carbohydrates. A variable-temperature FT-IR study, *Journal of Molecular Structure*, 1994, 324, 123-132.

Mathlouti, M. et Rogé, B., Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders, *Food Chemistry*, 2003, 82:61-71.

Matveev, Y. I., Grinberg, V. Y., Sochava, I. V. et Tolstoguzov, V. B., Glass transition temperature of proteins. Calculation based on the additive contribution method and experimented data, *Food Hydrocolloids*, 1997, 11:125-133.

Matvev, Y. I., Grinberg, V. Y. et Tolstoguzov, V. B., The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds, *Food hydrocolloids*, 2000, 14:425-437.

Mauer, L. J., Smith, D. E. et Labuza, T. P., Effect of water content, temperature and storage on the glass transition, moisture sorption characteristics and stickiness of β-casein, *International Journal of Food Properties*, 2000, 3:233-248.

Mazzobre, M. F., Soto, G., Aguilera, J. M. et Buera, M. P., Crystallization kinetics of lactose in systems co-lyophilized with trehalose. Analysis by differential scanning calorimetry, *Food Research International*, 2001, 34:903-911.

Mc Cluskey, S., Connolly, J. F., Devery, R., O'Brien, B., Kelly, J., Harrington, D. et Stanton, C., Lipid and cholesterol oxidation in whole milk powder during processing and storage, *Journal of Food Science*, 1997, 62:331-337.

Mc Crae, C. H., Law, A. J., R., Leaver, J., Emulsification properties of whey proteins in their natural environment: effect of whey protein concentration at 4% and 18% milk fat, *Food Hydrocolloids*, 1999, 13:389-399.

Mc Kenna, A. B., Examination of whole milk powder by confocal laser scanning microscopy, *Journal of Dairy Research*, 1997, 64:423-432.

Mc Kenna, A. B., Lloyd, R. J., Munro, P. A. et Singh, H., Microstructure of whole milk powder, and of insolubles detected by powder functional testing, *Scanning*, 1999, 21:305-315.

Mc Kenna, A. B., Protein-protein interactions during the manufacture and storage of dried milk powder, *Scanning*, 2000, 2:66-67.

Michot L.J., Villiéras, F., François, M., Bihannic, I., Pelletier, M. et Cases, J. M., Water organisation at the solid-aqueous solution interface, *C. R. Geosciences*, 2002, 334:611-631.

Millqvist-Fureby, A., Elofsson, U., Bergenstahl, B., Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins, *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, 2001, 21:47-58.

Millqvist-Fureby, A., Malmsten, M. et Bergenstahl, B., Surface characterisation of freeze-dried protein/carbohydrate mixtures, *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 191:103-114.

Mistry, V. V. et Hassan, H. N., Delactosed, High milk protein powder. 2. Physical and functional properties, *Journal of Dairy Science*, 1991, 74:3716-3723.

Mistry, V. V. et Pulgar, J. B., Physical and storage properties of high milk protein powder, *International Dairy Journal*, 1996a, 6:195-203.

Mistry, V. V., Hassan, H. M. et Robinson, D. J., Effect of lactose and protein on the microstructure of dried milk, *Food Structure*, 1992, 11: 73-82.

Monahan, F. J., Mc Clements, D. J. et German, J. B., Disulfide mediated polymerization reactions and physical properties of heated WPI-stabilized emulsions, *Journal of Food Science*, 1996, 61:504-509.

Morales, F. J. et Van Boekel, M. A. J. S., A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation, *International Dairy Journal*, 1998, 8:907-915.

Morgan, F., Bouhallab, S., Mollé, D., Henry, G., Maubois, J. L. et Léonil, J., Lactolation of β-lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry, *International Dairy Journal*, 1998, 8:95-98.

Morgan, F., Léonil, J., Mollé, D. et Bouhallab, S., Modification of bovine β-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in aqueous solution: effect on association behavior and protein conformation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47:83-91.

Morr, C. V., German, B., Kinsella, J. E., Regenstein, J. M., Van Buren, J. P., Kilara, A., Lewis, B. A., Mangino, M. E., A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure, *Journal of Food Science*, 1985, 50:1715-1718.

Moughal, K. I., Munro, P. A. et Singh, H., Suspension stability and size distribution of particles in reconstituted, commercial calcium caseinates, *International Dairy Journal*, 2000, 10:683-690.

Nacka, F., Chobert, J. M., Burova, T., Léonil, J. et Haertlé, T., Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins, *Journal of Protein Chemistry*, 1998, 17:495-503.

Netto, F. M., Desobry, S. et Labuza, T. P., Effect of water content on the glass transition, caking and stickiness of protein hydrolysates, *International Journal of Food Properties*, 1998, 1:141-161.

Newell, H. E., Buckton, G., Butler, D. A., Thielmann, F. et Williams, D. R., The use of inverse phase gas chromatography to study the change of surface energy of amorphous lactose as a function of relative humidity and the processes of collapse and crystallisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 217:45-56.

Nielsen, B. R., Stapelfeldt, H. et Skibsted, L. H., Early prediction of the shelf-life of medium-heat whole milk powders using stepwise multiple regression analysis, *International Dairy Journal*, 1997, 7:341-348.

Otsuka, M., Ohtani, H., Kaneniwa, N. et Higuchi, S., Isomerization of lactose in solid-state by mechanical stress during grinding, *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*, 1991, 43:148-153.

Ottenhof, M. A., Macnaughtan, W. et Farhat, I. A., FTIR study of state and phase transitions of low moisture sucrose and lactose, *Carbohydrate Research*, 2003, 338, 2195-2202.

Özkan, N., Withy, B. et Chen, X. D., Effects of time, temperature, and pressure on the cake formation of milk powders, *Journal of Food Engineering*, 2003, 58(4):355-361.

Özkan, N., Walisinghe, N. et Chen, X. D., Characterization of stickiness and cake formation in whole and skim milk powders, *Journal of Food Engineering*, 2002, 55:293-303.

Ozmen, L. et Langrish, T. A. G., Comparison of glass transition temperature and sticky point temperature for skim milk powder, *Drying Technology*, 2002, 20(6):1177-1192.

Prentice, J. H., Lactose-based products. dans: *Dairy Rheology - A Concise Guide*. Food Sciences and Technology Series, 1992, New York, 143-149.

Rattray, W. et Jelen, P., Protein standardization of milk and dairy products, *Trends in Food Science and Technology*, 1996, 7:227-234.

Rennie, P. R., Chen, X. D., Hargreaves, C. et Mackereth, A. R., A study of the cohesion of dairy powders, *Journal of Food Engineering*, 1999, 39:277-284.

Rennie, P. R., Chen, X. D et Mackereth, A. R., Adhesion characteristics of whole milk powder to a stainless steel surface, *Powder Technology*, 1998, 97:191-199.

Richard, S., Des poudres issues de lait aux propriétés ciblées, *RIA*, 2000, 601:34-38.

Roetman, K. et Van Schaick, M. The β/α ratio of lactose in the amorphous state, *Netherland Milk and Dairy Journal*, 1975, 29:225-237.

Roos, Y. H. et Himberg, M. J., Nonenzymatic browning behavior, as related to glass transition of a food model at chilling temperature, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42:893-898.

Roos, Y. H., Glass transition-related physicochemical changes in foods, *Food Technology*, 1995, 10:97-102.

Roos, Y. H., Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders, *Le Lait*, 2002, 82:475-484.

Roos, Y., and Karel, M., Applying state diagrams to food processing and development, *Food Technology*, 1991, 12:66-71.

Schebor, C., Burin, L., Buera, M. P., Aguilera, J. M. et Chirife, J., Glassy state and thermal inactivation of invertase and lactase in dried amorphous matrices, *Biotechnoogy Progress*, 1997, 13:857-863.

Schebor, C., Buera, M. P., Karel, M. et Chirife, J., Color formation due to non-enzymatic browning in amorphous, glassy, anhydrous, model systems, *Food Chemistry*, 1999, 65:427-432.

Schentz, T. W., Glass transitions and product stability-an overview, *Food Hydrocolloids*, 1995, 9: 307-315.

Scher, J., Rhéologie, texture et texturation des produits alimentaires, *Techniques de l'ingénieur*, traité génie des procédés, 1998, 3 :1-12.

Schmitt, E. A., Law, D. et Zhang, G. G. Z., Nucleation and crystallization kinetics of hydrated amorphous lactose above the glass transition temperature, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999, 88(3):291-296.

Schnepf, M. I., chapitre 1: protein-water interactions dans: Biochemistry of food proteins, ed. BJF Hudson, Elsevier science applied, 1992.

Sebhatu, T., Elamin, A. A. et Ahlneck, C., Effect of moisture sorption on tabletting characteristics of spray dried (15% amorphous) lactose, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11(9):1233-1238.

Segall, K. I. et Goff, H. D., Influence of absorbed milk protein type and surface concentration on the quiescent and shear stability of butteroil emulsion, *International Dairy Journal*, 1999, 9:683-691.

Shamblin, S. L., Huang, E. Y. et Zografi, G., The effect of co-lyophilized polymeric additives on the glass transition temperature and crystallization of amorphous sucrose, *Journal of Thermal Analysis,* 1996, 47:1567-1579.

Singh, B. R., Determination of the secondary structure of proteins from amide I and amide III infrared bans using partial least-square method, dans "Infrared analysis of peptides and proteins. Principles and application" Singh B. R., 2000a, ACS Symposium series 750.

Singh, B. R., Determination of the technique and application of IR spectroscopy of peptides and proteins, dans "Infrared analysis of peptides and proteins. Principles and application" Sing B. R., 2000b, ACS Symposium series 750.

Smart, J. B., Effect of whey components on the rate of crystallization and solubility of α-lactose monohydrate, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 1988, 23:275-289.

Smithers, G. W. et Copeland, A. D., International whey conference, *Trends in Food Science and Technol*ogy, 1998, 9:119-123.

Souillac, P. O., Middaugh, C. R. et Rytting, J. H. Investigation of protein/carbohydrate interactions in the dried state. 2. Diffusive reflectance FTIR studies, *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, (235):207-218.

Srinivasan, M., Singh, H. et Munro, P. A., Creaming stability of oil-in-water emulsions formed with sodium and calcium caseinates, *Journal of Food Science*, 2001, 66:441-446.

Stapelfeldt, H., Nielsen, B. R. et Skibsted, L.H., Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder, *International Dairy Journal*, 1997, 7:331-339.

Stubberud, L. et Forbes, R. T., The use of gravimetry for the study of the effect of additives on the moisture-induced recrystallisation of amorphous lactose, *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, 163:145-156.

Stubberud, L., Arwidsson, H. G., Hjortsberg, V. et Graffner, C., Water-solid interactions. III. Effect of glass transition temperature, Tg, and processing on tensile strength of compacts of lactose and lactose/polyvinyl pyrrolidone, *Pharmaceutical Development and Technology*, 1996, 1(2):195-204.

Szpendowski, J., Smietana, Z. et Swigon, J., Selected physico-chemical and functional properties of caseinates, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 1997, 6/47:79-87.

Teunou, E., Fitzpatrick, J. J. et Synott, E. C., Characterization of food powder flowability, *Journal of Food Engineering*, 1999, 39:31-37.

Thomas, M. E. C., J. Scher et S. Desobry. Milk powders ageing : effect on physical and functional properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004, sept.

Thomas, M. E. C., Scher, J., et Desobry, S. Lactose/β-lactoglobulin interaction during storage of model whey powders, *Journal of Dairy Science*, 2004, 87:1158-1166.

Timasheff S. N., Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration, *Biochemistry*, 2002, 41 (46), 13473-13482.

Troyano, E., Olano, A. et Martinez-Castro, I., Changes in free monosaccharides during storage of dried milk, *Journal of Agricultural and Food Chem*istry, 1994, 42:1543-1545.

Van Mil, P. J. J. M. et Jans, J. A., Storage stability of whole milk powder: effects of process and storage conditions on product properties, *Netherland Milk and Dairy Journal*, 1991, 45:145-167.

Van Renterghem, R. et De Block, J., Furosine in consumption milk and milk powders, *International Dairy Journal*, 1996, 6:371-382.

Villamiel, M. et Corzo, N., Changes in furosine, free monosaccharides and β-lactoglobulin during storage of dried milk products, *Milchwissenschaft*, 2000, 55:90-92.

Voet, D., Voet, J. G., Gaudemer, Y. et Dulieu, chapitre 7: structures tridimensionnelles des protéines dans: Biochimie générale, édition De Boeck université, Paris, Bruxelles, 1998.

Vuataz, G., The phase diagram of milk : a new tool for optimising the drying process, *Le lait*, 2002, 82:485-500.

Vuataz, G., Prévention des transitions de phases dans les systèmes déshydratés pendant le traitement et le stockage. dans : « Rencontres Agoral 1999, Nantes. Les produits alimentaires et l'eau. Techniques et Documentation, 1999, Paris, 75-86.

Weis, W. I., Drickamer, K., Structural basis of lectin-carbohydrate recognition, *Annual Review of Biochemistry*, 1996, 65:441-473.

Williams, M. L., Landel, R. F. et Ferry, J. D., The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass-forming liquids, *Journal of American Chemical Society*, 1955, 77:3701.

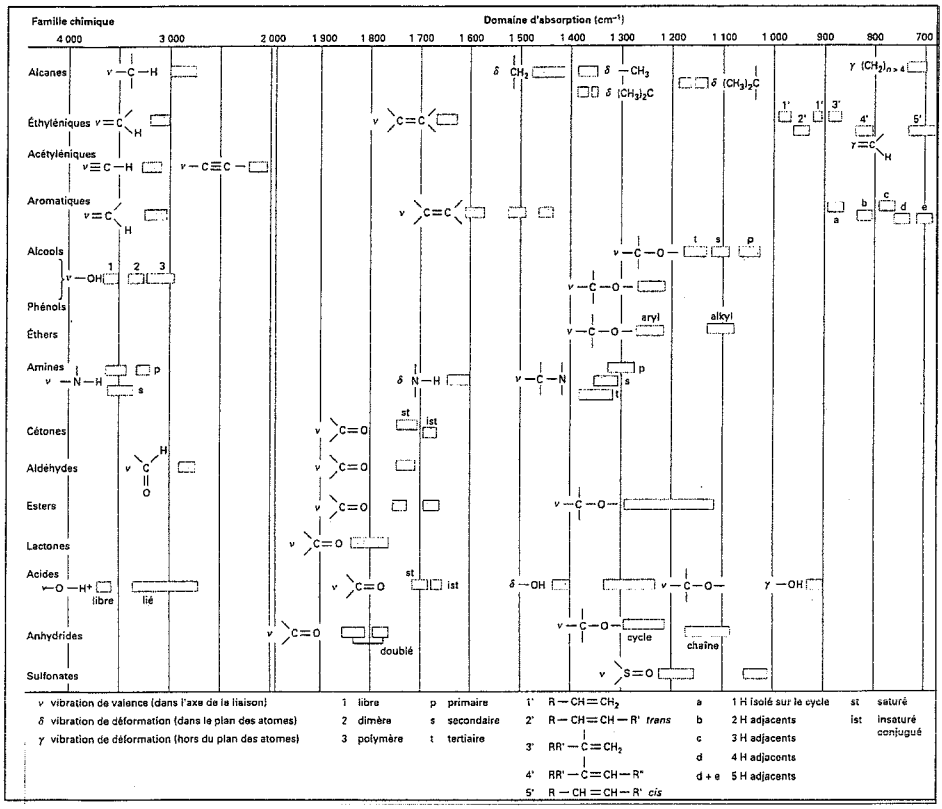
Wolkers, W. F., Oliver, A. E., Tablin, F. et Crowe, J. H., A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses, *Carbohydrate Research*, 2004, .

Yetismeyen, A., Deveci, O., Some quality characteristics of spray dried skim milk powders produced by two different atomizers, *Milchwissenschaft*, 2000, 55(4):210-212.

Zbikowska, A. et Szerszunowicz, I., Effect of whey addition to milk on functional properties of its powder, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 1999, 8/49:39-48.

Zbikowski, Z., Zbikowska, A. et Ziajka, S., Effect of technological parameters on the quality of agglomerated whole milk powder. 2. Physico-chemical properties, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 1993, 2:25-32.

ANNEXE 1



Corrélations entre fréquences et vibrations de groupements chimiques particuliers dans le moyen infrarouge, d'après Dana (1999).

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Madame Nathalie CAYOT, Maître de Conférences, UMRA-INRA-ENESAD, Dijon

Monsieur Saïd BOUHALLAB, Chargé de Recherche, UMR-INRA, Rennes

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame THOMAS Marie

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Influence de l'activité de l'eau sur les interactions lactose / ß-lactoglobuline de poudres laitières modèles lyophilisées"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 22 septembre 2004
Le Président de l'I.N.P.L.,
L. SCHUFFENECKER

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Résumé :

La conservation sous différentes activités de l'eau (a_w) de poudres laitières modèles produites par co-lyophilisation de lactose avec des quantités croissantes de β-lactoglobuline a permis de mieux comprendre les interactions pouvant se développer entre les deux composants à l'état déshydraté.

La β-lactoglobuline influence l'a_w critique d'apparition de dégradations physico-chimiques, telles que le brunissement non-enzymatique, l'agglomération des particules et surtout la cristallisation du lactose. Les courbes isothermes de sorption d'eau, les analyses thermiques différentielles et de diffraction des rayons X montrent que la présence de β-lactoglobuline tend à augmenter le temps de latence avant cristallisation, et surtout à augmenter l'a_w de cristallisation des poudres modèles ; à 0,54 pour les poudres avec 10 à 30% de protéine et à 0,59 pour les poudres en contenant 40% ; sachant que l'a_w de cristallisation du lactose pur est de 0,43.

Cette amélioration de la stabilité des poudres est liée à la proximité des composants, qui développent des interactions. Le brunissement non-enzymatique traduit une lactosylation de la β-lactoglobuline, la spectroscopie infrarouge indique aussi l'établissement de liaisons hydrogène entre les deux composants, probablement dès la lyophilisation. Lorsque la poudre modèle est conservée à une a_w immédiatement inférieure à son a_w critique, un phénomène d'hydratation préférentielle apparaît : les liaisons hydrogène lactose/β-lactoglobuline diminuent au profit d'autres entre β-lactoglobuline et eau. Cette modification des liaisons hydrogène serait à l'origine de la stabilisation des poudres laitières modèles vis-à-vis de la cristallisation du lactose.

Abstract :

Model milk powders were prepared by co-lyophilization of lactose and β-lactoglobulin and stored at various water activities (a_w) to better understand interactions between the two components in a dehydrated state.

The presence of β-lactoglobulin influenced the critical a_w where physico-chemical modifications like non-enzymatic browning, particles caking and particularly lactose crystallization, occurred. Moisture sorption isotherms, differential scanning calorimetry and X-ray diffraction demonstrated that β-lactoglobulin can both delay crystallization and increase crystallization a_w to 0.54 and even 0.59 in model powders containing 10 to 30%, and 40% β-lactoglobulin respectively, compared to 0.43 for pure lactose crystallization.

This stabilizing effect was due to the development of both covalent interactions and hydrogen bonding between lactose and β-lactoglobulin, as shown by non-enzymatic browning and spectroscopic studies. When model powders were stored at the a_w just below their critical a_w, preferential protein hydration occurred: hydrogen bonding between lactose and β-lactoglobulin decreased, whereas it increased between water and β-lactoglobulin. This change in hydrogen bonding seems to be responsible for the stabilizing effect against crystallization observed in model milk powders.