



HAL
open science

Modification de la structure des micelles de caséine lors de l'acidification par hydrolyse de Glucono-Delta-Lactone

Sylvie Desobry-Banon

► **To cite this version:**

Sylvie Desobry-Banon. Modification de la structure des micelles de caséine lors de l'acidification par hydrolyse de Glucono-Delta-Lactone. Biotechnologies. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1991. Français. NNT : 1991INPL077N . tel-01776196

HAL Id: tel-01776196

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776196>

Submitted on 24 Apr 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.



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>

100

à mes parents,
à ma soeur, Florence
à Stéphane,
avec tout mon amour



AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physicochimie et Génie Alimentaires de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires sous la direction de Monsieur Joël Hardy, Professeur de Physicochimie des Aliments à l'Institut National Polytechnique de Lorraine.

Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour son soutien, ses encouragements et surtout pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de cette étude.

Je remercie très sincèrement les membres de la Commission d'Examen qui ont accepté de lire et de juger mon travail malgré leurs nombreuses charges : Monsieur J. Boudrant, Directeur de Recherche C.N.R.S.; Monsieur J. Dodds, Directeur de Recherche C.N.R.S.; Monsieur B. Tarodo De La Fuente, Professeur à l'Université des Sciences de Montpellier ; Monsieur D. Paquet, Directeur de Recherche BSN.

Je remercie également le professeur D.G. Dagleish, professeur à l'Université de l'Utah (USA) , d'avoir accepté de juger une première partie de mon étude.

Enfin, je remercie l'ensemble de mes collègues et membres du Laboratoire de Physicochimie et Génie Alimentaires qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de cette étude, dans une ambiance toujours amicale et stimulante.



SOMMAIRE



SOMMAIRE

	page
ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION GENERALE	12
CHAPITRE I : UNE SUSPENSION COLLOIDALE, LE LAIT	16
1 - Le lait : généralités	17
2 - La structure des micelles, historique des micelles	19
2.1 - Modèles noyau-enveloppe.....	20
2.2 - Modèles à structure interne.....	21
2.3 - Modèles submicellaires.....	22
3 - La micelle : Interactions protéiques et minérales	26
3.1 - Interactions hydrophobes.....	27
3.2 - Interactions électrostatiques.....	28
3.3 - Liaisons hydrogène.....	29
3.4 - Liaisons disulfures.....	31
4 - Les micelles : Stabilisation colloïdale	31
4.1 - Interactions de Van der Waals.....	32
4.2 - La double couche électrique.....	32
4.3 - Répulsions stériques.....	35
5 - Modification des propriétés physicochimiques du lait au cours de l'acidification	40
5.1 - Composition minérale et protéique des micelles.....	41
5.1.1 - Minéraux colloïdaux.....	41
5.1.2 - Caséines micellaires.....	42

5.2 - Hydratation et voluminosité des micelles.....	44
5.3 - Mobilité électrophorétique et potentiel zéta.....	47
6 - Conclusion.....	52

**CHAPITRE II : ELABORATION DE DIAGRAMMES ACIDO-TURBIDIMETRIQUES
CARACTERISTIQUES 56**

1 - Introduction bibliographique : étude optique de la coagulation du lait.....	57
2 - Matériels et méthodes.....	60
2.1 - Préparation du lait.....	60
2.2 - Acidification du lait.....	61
2.2.1 - La Glucono-Delta-Lactone (GDL) - Généralités.....	61
2.2.2 - Caractéristiques biochimiques de la GDL.....	62
2.2.3 - Procédures d'acidification.....	63
2.2.3.1 - Acidification lente par hydrolyse de GDL et acidification instantanée par un acide fort.....	63
2.2.3.2 - Choix d'une concentration en GDL optimale.....	63
2.3 - Suivi de l'acidification du lait jusqu'à la formation du gel.....	67
2.3.1 - Mesure du pH.....	68
2.3.2 - Mesure turbidimétrique par réflexion de la lumière.....	68
2.3.2.1 - Principe de la méthode turbidimétrique.....	68
2.3.2.2 - Exemple de profil acido-turbidimétrique.....	69
2.3.2.3 - Validation des profils acido-turbidimétriques.....	70
2.3.3 - Mise en évidence du point de floculation du lait et suivi du raffermissement du gel.....	72
3 - Résultats et discussion.....	74

3.1 - Optimisation de la méthode turbidimétrique appliquée au suivi de l'acidification du lait.....	74
3.1.1 - Profils turbidimétriques, $\Delta\tau = f(\text{temps})$	74
3.1.2 - Profils acido-turbidimétriques $\Delta\tau = f(\text{pH})$	76
3.1.2.1 - Acidification à 15°C.....	76
3.1.2.2 - Acidification à 20°C et à 42°C.....	78
3.1.2.3 - Conclusion.....	78
3.1.3 - Stabilité de la turbidité du lait à un pH donné.....	79
3.2 - Elaboration de diagrammes acido-turbidimétriques caractéristiques d'une température d'acidification.....	80
3.2.1 - Cinétiques d'acidification et de gélification.....	80
3.2.2 - Profils $\Delta\tau = f(\text{temps})$	81
3.2.3 - Profils acido-turbidimétriques, $\Delta\tau = f(\text{pH})$	86
3.2.4 - Analyse d'un point remarquable : le point de gel.....	90
3.3 - Validation des profils acido-turbidimétriques par spectrophotométrie.....	92
3.3.1 - Influence de la longueur d'onde.....	94
3.3.2 - Influence de la température.....	94
3.3.3 - Comparaison des profils acido-turbidimétriques.....	94
3.3.4 - Conclusion.....	96
4 - Comparaison des profils optiques de la coagulation acide et présure du lait.....	97
5 - Conclusion.....	98
CHAPITRE III : APPROCHE PHENOMENOLOGIQUE DES MECANISMES PRECEDANT LA GELIFICATION DU LAIT.....	99
1 - Introduction.....	100
2 - Matériels et méthodes.....	101
2.1 - Viscosimétrie capillaire.....	101

2.1.1 - Protocole.....	101
2.1.2 - Différence de viscosité dynamique, $\Delta\eta$	101
2.2 - Analyse granulométrique.....	102
2.2.1 - Principe.....	102
2.2.2 - Protocole.....	102
2.3 - Mesure de la mobilité électrophorétique.....	106
2.3.1 - Théorie.....	106
2.3.2 - Principe et caractéristiques de l'appareil.....	107
2.3.3 - Protocole.....	109
2.4 - Mesures biochimiques.....	109
2.4.1 - Centrifugation et séparation des caséines solubles.....	109
2.4.2 - Analyse de la teneur en azote.....	110
3 - Observations phénoménologiques de l'acidification du lait.....	110
3.1 - Etude viscosimétrique.....	111
3.1.1 - Aspect théorique.....	111
3.1.2 - Résultats.....	112
3.2 - Etude granulométrique.....	114
3.3 - Evolution du potentiel zéta avec l'acidification.....	116
3.4 - Analyse de la solubilisation protéique.....	119
4 - Discussion générale.....	120
4.1 - Synthèse des résultats.....	121
4.2 - Approche phénoménologique de l'acidification du lait.....	122
4.2.1 - Phase I: latence de $\Delta\tau$ et diminution de $\Delta\mu$	122
4.2.2 - Phase I': diminutions de $\Delta\tau$ et de la taille des micelles, augmentation de $\Delta\mu$	118
4.2.3 - Phases II et III : augmentation de $\Delta\tau$, floculation et formation du gel.....	121
5 - Conclusion.....	132

**CHAPITRE IV : APPROCHE DE L'AGREGATION MICELLAIRE SELON LA
THEORIE DES OBJETS FRACTALS..... 136**

1 - Introduction..... 137

 1.1 - Les agrégats colloïdaux et la notion de dimension fractale..... 141

 1.2 - Aspect théorique..... 141

2 - Matériels et méthodes..... 137

3 - Résultats et discussion..... 144

 3.1 - Le système d'étude..... 144

 3.2 - Le coefficient de structure, β 144

 3.2.1 - $\log \tau^*$ vs $\log \lambda$ 144

 3.2.2 - Dépendance de β avec le temps et le pH..... 145

 3.3 - Dimension fractale, D, et température de l'acidification..... 150

4 - Conclusion..... 151

CONCLUSION GENERALE..... 153

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 158



ABREVIATIONS

b	constante tenant compte du degré de cohérence du système optique et de l'efficacité du corrélateur.
c	concentration
d	constante diélectrique
D	dimension fractale
D'	coefficient de diffusion des particules dispersantes (m^2s^{-1})
\overline{D}_{HS}	diamètre hydrodynamique moyen de sphères (m)
D_S	diamètre de sphères (m)
$g(t^*)$	fonction de corrélation
G	rigidité (G)
$G(t^*)$	fonction d'autocorrélation
H	facteur de dépendance de l'indice de réfraction d'une solution avec la concentration en soluté et la longueur d'onde de la mesure
I	intensité de la lumière dispersée (photons par s)
k_b	constante de Boltzman ($J.K^{-1}$)
k	constante
K	vecteur de dispersion (m^{-1})
l	constante
m	constante
M	masse (kg)
n	indice de réfraction du liquide de dilution des particules
N	nombre d'Avogadro (mol^{-1})
[N]	intensité moyenne (photons par s)
P	puissance de diffusion de la lumière par une particule (W)
q	indice de polydispersité
Q	vecteur d'onde (m)
r_0	taille d'un monomère (m)
r	taille d'un agrégat (m)
s	espace entre les franges d'interférences du laser (m)
t^*	temps d'échantillonnage du corrélateur (s)
t_c^*	temps caractéristique de la régression exponentielle (s)
T	température absolue ($^{\circ}K$)
v	volume (m^3)
V	voluminosité protéique ($m^3.kg^{-1}$)
W	poids moléculaire (Da)
Y	nombre de particules

α	angle de croisement des faisceaux laser (rad)
β	coefficient de structure fractal
ε	permittivité du solvant (Fa. m ⁻¹)
ε_0	permittivité du vide (Fa.m ⁻¹)
ϕ	fraction volumique
γ	facteur de dépendance de l'indice de réfraction avec la longueur d'onde
η	viscosité dynamique (Pa.s)
$\Delta\eta$	différence entre la viscosité dynamique au temps t, η , et la viscosité dynamique au temps t_0 , η_0 (Pa.s)
κ	longueur réciproque de Debye-Hückel (m ⁻¹)
λ	longueur d'onde (m)
μ	mobilité électrophorétique (m ² .s ⁻¹ .V ⁻¹)
v	vitesse (m.s ⁻¹)
$\Delta\nu$	décalage Doppler de la lumière diffusée (s ⁻¹)
θ	angle de dispersion (rad)
ρ	masse volumique (kg. m ⁻³)
τ	turbidité par réflexion de la lumière (NTU)
τ^*	turbidité par transmission de la lumière en spectrophotométrie
$\Delta\tau$	différence entre la turbidité au temps t, τ et la turbidité au temps t_0 , τ_0 (NTU)
ψ	potentiel électrique d'une particule (V)
ψ_s	potentiel de Stern (V)
ζ	potentiel zéta (V)

INTRODUCTION GENERALE



INTRODUCTION GENERALE

Le lait représente la base de l'alimentation humaine. Très riche en protéines, matières grasses, sucres et minéraux, il constitue l'aliment unique et suffisant pour le nourrisson. Mais, autant l'effet attractif du lait sur le jeune enfant n'est plus à démontrer, autant, les industriels se doivent de rivaliser d'ingéniosité pour créer le produit laitier que l'adulte appréciera.

Ainsi, le marché recèle une infinité de variétés laitières, du camembert au yaourt glacé allégé dépourvu de cholestérol et enrichi en protéines de soja... répondant, pour sa part, à une hygiène alimentaire en vogue.

A l'origine, la transformation accidentelle du lait en un caillé acide permit à l'homme de conserver le lait et c'est ainsi que se perpétua, à travers les âges, le procédé de fermentation lactique. Le lait se prête ainsi facilement à la coagulation par acidification, emprésurage ou chauffage ... mais, présente également un caractère de remarquable stabilité face à de nombreux traitements technologiques dits sévères tels que la stérilisation thermique ou la déshydratation.

Malgré la maîtrise des procédés, il arrive régulièrement que des incidents de fabrication inexplicables surviennent puis disparaissent sans que la cause en soit élucidée.

Ainsi, étudier le comportement des micelles de caséine - composant protéique de première importance dans le lait - au cours de différents procédés industriels revêt toute son importance.

La coagulation présure du lait a été le sujet de nombreux travaux scientifiques et les mécanismes en sont maintenant quasiment connus. Ils se divisent en trois phases, au moins, avec:

- une phase enzymatique, dite "primaire", correspondant à l'hydrolyse de la caséine κ dans l'enveloppe protéique micellaire

- une phase d'agrégation des particules caséiques
- une phase de gélification et de raffermissement du gel

Les mécanismes de la coagulation acide du lait demeurent, par contre, encore flous et inexplicables : ils seront le sujet de ce travail. L'accent sera mis sur le comportement des micelles de caséine durant la période précédant la gélification - la gélification elle-même ayant récemment été traitée dans les thèses de Roefs (1986) et de Bringe (1988). En effet, comme la phase primaire de la coagulation présure du lait, il doit exister une (ou plusieurs) phase de la coagulation acide du lait qui induit l'agrégation des micelles de caséine et dont le processus reste à définir.

Le lait est considéré comme une suspension colloïdale de micelles de caséine, et, dans une première partie de la revue bibliographique (chapitre I), les principaux travaux concernant la structure des micelles de caséine seront présentés sur les différents points suivants :

- modèles de structure micellaire
- interactions protéiques et minérales
- stabilisation colloïdale des micelles avec, en particulier, l'existence de répulsions stériques.

L'évolution des propriétés physico-chimiques des micelles de caséine au cours de l'acidification du lait est le second thème de la revue bibliographique.

Le chapitre II met en évidence l'intérêt de l'utilisation d'une méthode turbidimétrique pour le suivi de l'acidification du lait. L'objectif préliminaire est de valider cette méthode par une technique spectrophotométrique traditionnelle. Dans un second temps, des profils acido-turbidimétriques, représentatifs de l'acidification du lait à une température donnée, sont proposés.

Une étude phénoménologique des mécanismes micellaires survenant avant la

gélification du lait est l'objet du troisième chapitre. De nombreuses techniques appliquées à l'étude de suspensions colloïdales, sont ainsi utilisées (vélocimétrie laser, granulométrie laser...). Les profils acido-turbidimétriques, précédemment obtenus, servent de base pour lier les différents évènements physico-chimiques observés au cours de l'acidification du lait. Une représentation schématique des phénomènes micellaires pouvant se dérouler au cours de l'acidification du lait est finalement proposée.

Alors que différents modèles, tendant à décrire l'agrégation des micelles de caséine, existent déjà, le dernier chapitre de ce travail présente une nouvelle approche de l'agrégation micellaire basée sur la théorie des objets fractals.

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

BANON, S. et HARDY, J. 1991. Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection. *J. Dairy Res.*, 58 : 75-84

BANON, S. et HARDY, J. 1991. Etude de l'acidification du lait par une méthode optique.

Colloque INRA, Rennes, 6 Mars 1991

BANON, S. et HARDY, J. 1991. Approach of the fractal dimension during acid milk coagulation by hydrolysis of glucono-delta-lactone.

7th International Conference on " Surface and Colloid Science ".

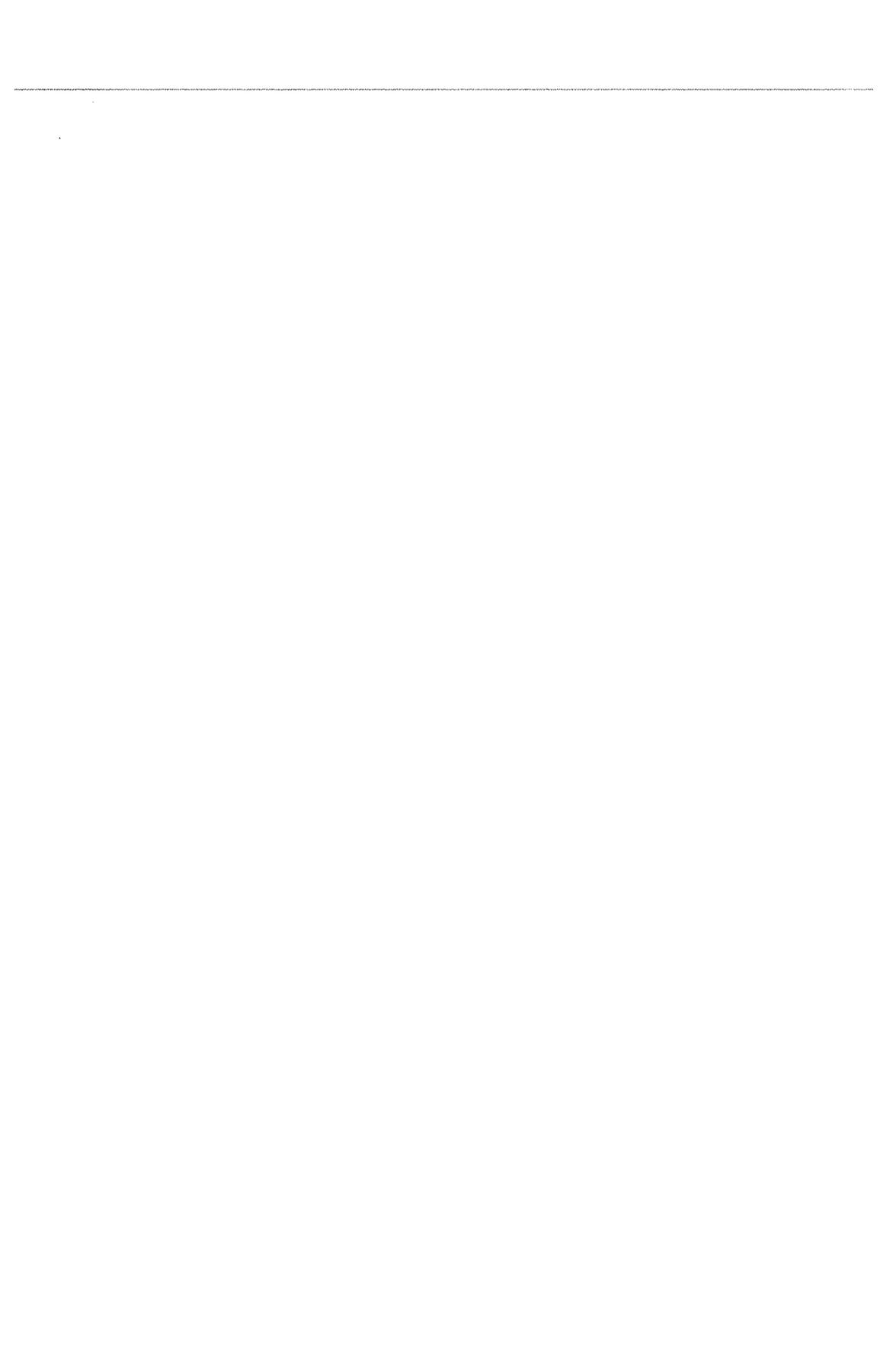
Compiègne, France, Juillet 7-13, 1991

BANON, S. et HARDY, J. 1991. A colloidal approach of milk acidification by glucono-delta-lactone. *J. Dairy Sci.* Accepté.



CHAPITRE I :

UNE SUSPENSION COLLOIDALE,
LE LAIT



CHAPITRE I : UNE SUSPENSION COLLOIDALE, LE LAIT

1 - Le lait : généralités

Le lait est un système biologique complexe constitué principalement de protéines, de sels minéraux, de lactose, de matière grasse et d'eau. Son aspect blanc opaque est dû à la lumière dispersée par deux types de particules en suspension dans le sérum : les globules gras et les micelles de caséine.

La majeure partie des protéines du lait, ou caséines, forme des particules colloïdales, les micelles, le reste est solubilisé dans le sérum ; la composition protéique moyenne d'un lait de vache est donnée dans le tableau I.1.

tableau I.1 : Composition protéique moyenne du lait de vache
d'après Walstra et Jenness (1984).

Protéines	Concentration (g/l)
caseine α_1	10.0
caséine α_2	2.6
caséine β	9.3
caséine κ	3.7
caséine γ	0.8
protéose-peptones	0.8
lactalbumine α	1.2
lactoglobuline β	3.2
albumine du sérum	0.4
immunoglobuline	0.8
lactoferrine	0.1
transferrine	0.1
membranes globules gras	0.4
total	33.0

De par leur concentration élevée, les caséines détermineraient en grande partie le comportement du lait durant un traitement technologique (Schmidt, 1980).

Les micelles de caséine sont des particules quasi-sphériques, d'un poids moléculaire de l'ordre de 10^7 à 10^9 Daltons et de dimension variable (25-680nm) selon l'espèce animale, l'état physiologique, le degré de maturation du lait (Wheelock, 1980)... Elles sont constituées d'eau (4g/g de caseines), de protéines et de minéraux (60mg/g de caséines). Les caséines α_{s1} , β , α_{s2} et κ , dont la composition en acides aminés est donnée dans le tableau I.2, entrent dans la composition des micelles selon un rapport moyen 3/3/1/1 (Davies et Law, 1980).

tableau I.2 : Composition en acides aminés des caséines en nombre de résidus par mole. D'après Mercier et al. (1972) et Brignon et al. (1977)

acides aminés	Caséines			
	α_{s1} -B	α_{s2}	β -A2	κ -B
Asp	7	4	4	4
Asn	8	14	5	7
Glu	25	25	17	13
Gln	14	15	22	14
Gly	9	2	5	2
Ala	9	8	5	15
Val	11	14	19	11
Leu	17	13	22	8
Ile	11	11	10	13
Ser	16	17	16	13
Thr	5	15	9	14
Cys-SH	-	2	-	2
Met	5	4	6	2
Lys	14	24	11	9
His	5	3	5	3
Arg	6	6	4	5
Trp	2	2	1	1
Tyr	10	12	4	9
Phe	8	6	9	4
Pro	17	10	35	20

Davies et Law (1983) observent des variations dans la composition protéique de micelles de taille décroissante (200,150,120 et 90nm); la proportion relative de caséine κ augmente alors que celles de caséine β et, de façon moins remarquable, de caséine α_{s2} diminuent. Les proportions relatives de caséines α_{s1} et γ sont quasi-constantes dans les micelles quelle que soit leur taille.

Le calcium (3%), le phosphate (4.3%) et, en moindre quantité, le magnésium (0.2%) et le citrate (0.5%) constituent les minéraux colloïdaux; leur rôle serait d'assurer la cohésion micellaire (Schmidt, 1982 ; Holt , 1989 ; Van Dijk, 1990 a-b-c).

2 - La structure des micelles, historique des modèles

Si la composition biochimique et les principales caractéristiques physicochimiques du lait sont bien définies, une énigme de taille concernant la structure intime des micelles subsiste encore.

Cependant quelques éléments sont connus:

- existence d'une enveloppe protéique comprenant des monomères de caséine κ
- rôle du phosphate de calcium colloïdal dans le maintien de l'intégrité micellaire

On ignore cependant l'agencement des divers constituants protéiques et minéraux au sein de la micelle.

Un rappel des différents modèles micellaires, fruits des travaux et des réflexions de différents auteurs depuis vingt ans, s'efforcera d'éclaircir ce point. Les modèles proposés gravitent autour de trois types de structure: noyau-enveloppe, à structure interne et à submicelles.

2.1 - Modèles noyau-enveloppe

Le modèle type noyau-enveloppe est basé sur l'agrégation de caséines autour d'un noyau, constitué de caséines κ selon Parry et Carroll (1969) ou d'un complexe de caséines α_{s1} et β selon Waugh et al. (1970). Contrairement au rapport 3/3/1/1 connu, il apparaît qu'aucune stoechiométrie particulière n'entre en jeu entre les différentes caséines; par ailleurs, le modèle de Waugh ne comprend pas de phosphate de calcium colloïdal dont le rôle prépondérant dans la stabilité micellaire a été démontré.

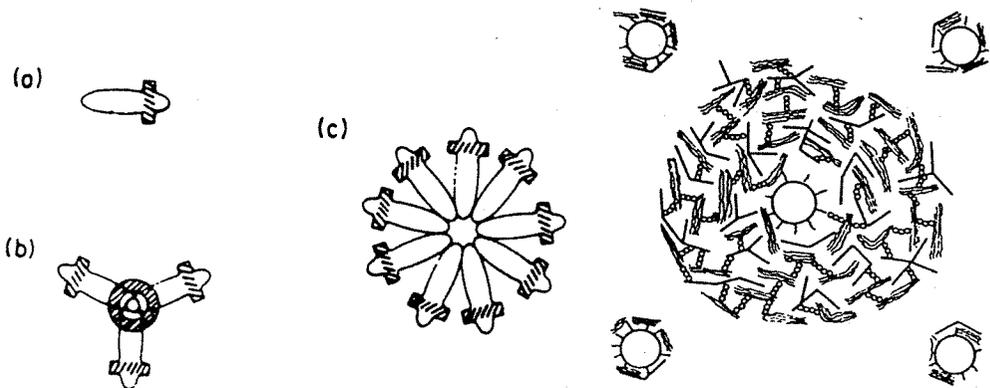


fig. I.1.a: D'après Waugh et al. (1970) :
a. modèle d'un monomère de caséine α_{s1} ou β avec une extrémité chargée; b. tétramère de monomères de caséines α_{s1} ; c. modèle d'un noyau polymère de caséines α_{s1} et β .

fig. I.1.b: D'après Parry et Carroll (1969):
○ caséine κ
▣ caséine α_{s1}
— caséine β
∞∞∞ calcium phosphate

figures I.1: modèles type noyau-enveloppe de la micelle de caséine

2.2 - Modèles à structure interne

Garnier et Ribadeau Dumas (1970) proposent un modèle descriptif de la structure micellaire interne constitué d'une unité répétitive tridimensionnelle (figure I.2). Un trimère de caséine α_{s1} lié à trois chaînes de caséines κ et β formerait un ensemble dont l'agrégation édifierait un réseau régulier et poreux. La polymérisation endothermique de la caséine β formerait des chaînes sur lesquelles viendraient se greffer des caséines α_{s1} et κ . Le calcium-phosphate colloïdal stabiliserait l'ensemble. Ici, le choix de la caséine β comme base de la formation micellaire a été remis en question.

Lin et al.(1972) envisage l'existence d'un réseau, formé de caséine α_{s1} et de phosphate de calcium colloïdal, qui déterminerait la taille de la particule; les monomères de caséines β et κ seraient liées au réseau et en rempliraient les interstices par le biais de liaisons calciques.

Visser et al.(1986), dans la même optique, proposent que la micelle de caséine soit constituée d'un squelette de caséines α_{s1} sur lequel viendraient se greffer des monomères de caséine β et du phosphate amorphe; une enveloppe de caséine κ stabiliserait l'ensemble. Ce modèle sous-entend une certaine "liberté" ou mobilité des constituants liés au réseau de base; en effet, la solubilisation de calcium, de phosphate et de caséines β n'altérerait pas l'intégrité de la structure micellaire.

L'ensemble des modèles à structure interne décrivent la micelle comme étant un réseau protéique lâche et très hydraté. Ce type de structure, perméable à de petites molécules, satisfait aux travaux qui mettent en évidence le clivage de toutes les caséines dans la micelle par la carboxypeptidase A (30.000); la dansylation (réaction spécifique au niveau de la terminaison N d'un peptide) permet également d'obtenir les résidus dansylés des trois types de caséines.

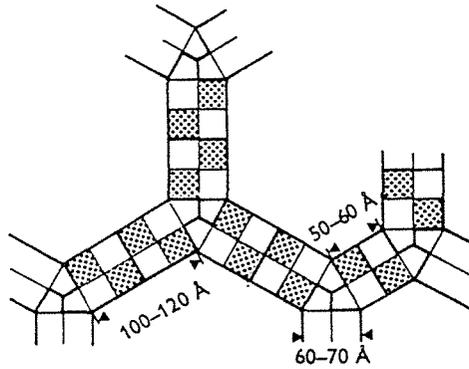
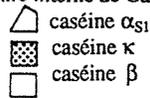


figure I.2 : modèle à structure interne de Garnier et Ribadeau-Dumas (1970)



Si le modèle à structure interne satisfait de nombreux travaux, il n'explique pas comment est limitée la taille des micelles ni certaines observations microscopiques de cellules épithéliales des glandes mammaires montrant, semble-t-il, la synthèse des micelles de caséine. En effet, au niveau de l'appareil de Golgi des cellules épithéliales, Bulcheim et Welsch (1973) mettent en évidence la sécrétion primaire de particules de 15 à 20nm de diamètre désignées sous le nom de submicelles car elles semblent donner naissance, par leur agrégation dans les vésicules de Golgi, à des particules beaucoup plus grandes, les micelles de caséine.

Ainsi, ces observations donnent naissance à de nombreux modèles basés sur l'agrégation de submicelles ou modèles submicellaires.

2.3 - Modèles submicellaires

Les modèles submicellaires supposent que les micelles sont constituées de sous-unités (submicelles) sphériques d'un diamètre variant de 10nm (Shimmim et Hill, 1964) à 30nm (Morr, 1967) (figure I.3.a).

Les submicelles seraient composées de caséines α_{s1} , β et κ stabilisées par des liaisons hydrophobes et des ponts de caséinate de calcium . Ces particules s'agrègeraient en une structure micellaire grâce à un "ciment", le phosphate de calcium colloïdal (Morr, 1967).

Le modèle de Slattery (1976) est basé sur une répartition non homogène à la surface des submicelles, de chaînes peptidiques hydrophiles et hydrophobes (figure I.3.b). Les liaisons hydrophobes supposées prédominantes dans les associations entre ces sous-unités, la croissance micellaire s'arrêterait lorsque l'étendue de la partie hydrophobe en surface serait insuffisante pour permettre ce type de liaison. Selon le schéma de Slattery, la structure micellaire serait poreuse et permettrait à de petites molécules enzymatiques de pénétrer en son sein.

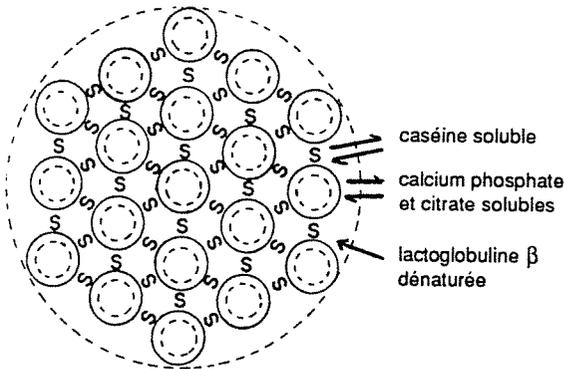


fig.I.3.a: modèle de Morr (1967). Les "S" représentent les liaisons Ca-P entre des complexes sphériques de caséines, α_s , β et κ .

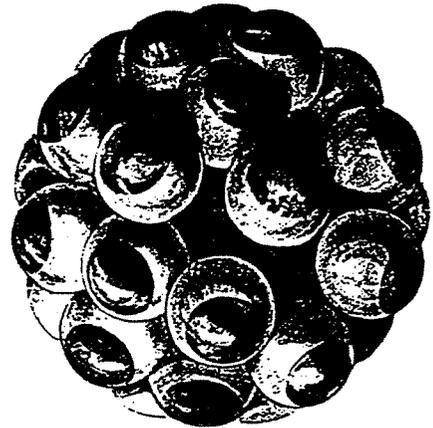


fig. I.3.b: modèle de Slattery (1976)

figures I.3 : modèles de micelles de caséine à submicelles

Schmidt (1982) propose que les submicelles soient constituées d'un noyau hydrophobe formé par les parties apolaires des caséines. Les résidus chargés, riches en groupements phosphoriques, des caséines α_{s1} , α_{s2} et β créeraient une enveloppe hydrophile dans laquelle des plages de la partie -COOH terminale de la caséine κ occuperaient une place plus ou moins privilégiée (figure I.4.a). Les liaisons entre submicelles résulteraient d'interactions électrostatiques entre les groupements esters phosphoriques négativement chargés des caséines α_{s1} , α_{s2} et β et le phosphate de calcium colloïdal positivement chargé constitué par des amas de phosphate de Ca amorphe, $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ (figure I.4.b). La croissance micellaire serait conditionnée par les zones riches en caséine κ et s'arrêterait lorsque toute la surface de la micelle en serait constituée.

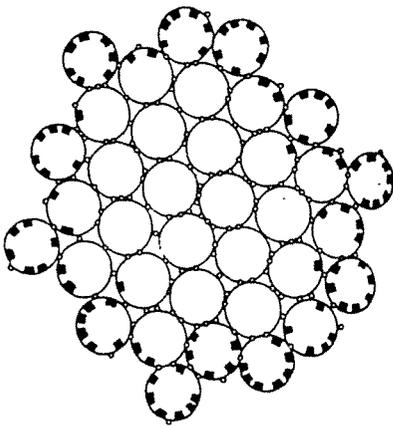


fig. I.4.a: modèle de Schmidt (1982)

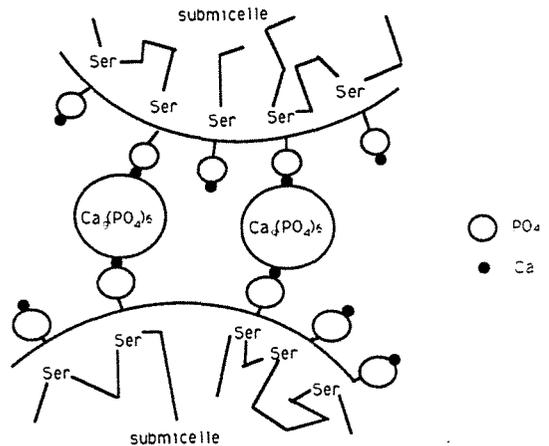


fig. I.4.b: représentation schématique des modalités d'assemblage de deux submicelles. D'après Schmidt (1982)

figures I.4: modèle submicellaire de Schmidt (1982)

Le plus récent modèle submicellaire, inspiré de celui de Schmidt (1982), est proposé par Ono et Obata (1989).

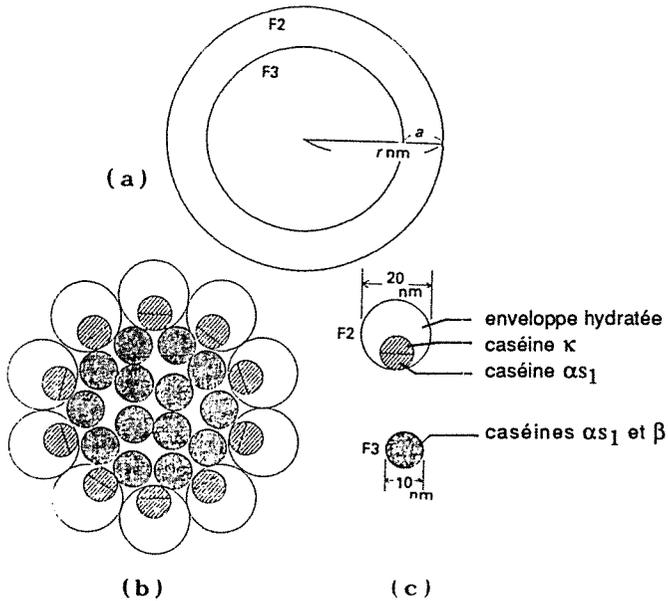


figure I.5 : représentation schématique de la micelle de caséine (a et b) et de ses sous-unités (c). (a) est un diagramme schématisé de la micelle de caséine pour le calcul de r (rayon de la micelle) et de a (épaisseur de la couche F2). (b) est le modèle micellaire proposé. Les sous-unités F2 (c) sont à la périphérie de la micelle tandis que les sous-unités F3 (c) forment le noyau micellaire. D'après le modèle de Ono & Obata (1989).

L'élément nouveau est que la micelle serait composée de deux types de sous-unités, séparés dans l'espace en deux zones (figure I.5) :

- la zone micellaire interne, F3, constituée de submicelles de caséines α_{s1} et β d'un diamètre de 10 nm ; les sous-unités seraient liées par du phosphate de calcium colloïdal comme l'envisage Schmidt (1982)

- la zone micellaire externe, F2, formée de submicelles de 20 nm constituées de caséines κ et α_{s1} ; la partie hydrophile de la caséine κ serait orientée vers le milieu tandis que la caséine α_{s1} , à la limite des deux zones, permettrait de lier les deux types de submicelles.

La croissance micellaire s'arrêterait lorsque ne subsisterait en surface aucun point de contact hydrophobe.

La limitation de la taille des micelles est, ici, le point fort du modèle submicellaire. Les arguments en son encontre concernent , d'une part, la distribution inégale de la caséine κ qui pourrait être totalement absente de certaines submicelles et, d'autre part, la fragilité apparente de l'édifice micellaire.

3 - La micelle : interactions protéiques et minérales

Un aperçu des modèles de structure micellaire met en évidence l'intérêt de rappeler les différents types d'interactions possibles dans un environnement aqueux au sein d'un polypeptide et entre différentes chaînes polypeptidiques.

Chaque protéine montre à l'état natif une structure tertiaire unique qui détermine ses propriétés biologiques et fonctionnelles. La conformation adoptée dans un milieu donné correspond à un minimum d'énergie libre du système en sachant que le facteur thermodynamique déterminant la structure protéique est la somme de forces attractives et répulsives agissant sur chaque zone polypeptidique. Les principales forces gouvernant l'adoption d'une telle structure sont d'origine hydrophobes. Les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes et les liaisons disulfures peuvent stabiliser la structure finale (Kinsella, 1982).

3.1- Interactions hydrophobes

Kauzman (1959) définit les interactions hydrophobes comme étant à l'origine d'une augmentation de l'entropie d'un système protéines-solvant aqueux. La stabilité d'un tel système est en effet accrue lorsque deux chaînes protéiques hydrophobes s'associent et excluent les molécules d'eau de leur proche environnement dans le milieu. L'origine des liaisons hydrophobes proviendrait davantage de répulsions entre les molécules non polaires et l'eau plutôt que d'une attraction entre les groupes apolaires eux-mêmes (Freeman, 1984).

Le transfert des molécules d'eau, de la proximité des groupes hydrophobes vers le milieu aqueux, semble thermodynamiquement d'autant plus facile que ce milieu est "désordonné" et peu structuré; c'est le cas à haute température où les interactions hydrophobes sont maximales (Damodaran et Kinsella 1981). A basse température, par contre, les interactions hydrophobes sont fragilisées. Les hydrophobicités moyennes (somme de l'hydrophobicité du peptide divisé par le nombre d'acides aminés) des caséines α_{s1} , β , κ sont respectivement égales à 4,9, 5,7, et 5,1 kJ/ mole de résidus (Payens et Vreeman 1982). Par leur hydrophobicité importante, les caséines peuvent s'agréger spontanément en polymères (Hill et Wake, 1969).

L'importance des interactions hydrophobes sur le comportement des micelles est mise en évidence par les effets d'agents chaotropiques (ou "destructurants" de l'eau) comme l'urée, ou par les basses températures (Kinsella, 1982). De nombreux travaux ont ainsi montré, à basse température et au pH naturel du lait, la solubilisation de monomères caséiques, principalement constitués de caséine β (Creamer et al., 1977). Davies et Law (1983) mettent en évidence que la dissociation micellaire observée à basse température est totalement réversible lorsque le lait est "réchauffé" à sa température initiale, suggérant ainsi le rééquilibrage spontané du système dans l'état

énergétiquement le plus stable à cette température. D'autre part, le fait que les monomères caséiques solubilisés soient réincorporés par la micelle indique une certaine "souplesse" de la structure micellaire et rappelle ainsi le modèle à structure interne de Lin et al.(1972) repris par Visser et al.(1986).

Lors de l'acidification du lait, Dalglish et Law (1989) mettent en évidence qu'il est possible d'éliminer tout le phosphate de calcium colloïdal sans dissociation caséique à 30°C alors qu'à basse température (de 4°C à 20°C), une large solubilisation des protéines micellaires survient dans les mêmes conditions. Selon ces auteurs, les interactions hydrophobes seraient largement responsables du maintien de l'intégrité micellaire à 30°C. A cette température, alors que les liaisons intramicellaires engageant du phosphate de calcium ont disparu, d'autres liaisons permettraient de conserver une pseudo-structure micellaire ne ressemblant, peut être, aucunement à la structure initiale.

3.2-Interactions électrostatiques

Les protéines en solution aqueuse à pH 7 sont chargées électriquement par l'ionisation des groupes carboxyles et aminés. Ces groupes chargés donnent naissance à des forces d'interactions électrostatiques. Celles-ci sont attractives entre les acides aminés négativement chargés (acides aspartique et glutamique) et les acides aminés positivement chargés (arginine, lysine et histidine) ou répulsives lorsque les groupements sont d'un même signe. Des forces électrostatiques apparaissent également avec des molécules non chargées mais polaires.

Les fonctions protéiques chargées ont un pKa dans la gamme de pH utilisée couramment pour les études de systèmes biologiques; ainsi leur ionisation est fortement dépendante du pH du milieu.

L'ionisation des groupements protéiques est également dépendante de la présence d'autres groupements chargés à proximité et dans leur environnement, de l'accessibilité à l'eau et de la polarité du solvant (Freeman, 1984). Ainsi en solution, seule une stabilisation marginale de la structure protéique par des interactions électrostatiques peut être attendue même dans un environnement de faible force ionique dont la concentration en contre-ions peut s'avérer suffisante pour minimiser les interactions charges-charges (Kinsella, 1982).

Le rôle des liaisons ioniques intra- et intermoléculaires des caséines α_{s1} , α_{s2} , β , γ et κ dans la stabilisation de la structure micellaire est difficile à définir. Des travaux ponctuels sur certains monomères caséiques permettent néanmoins d'éclaircir le rôle probable des liaisons ioniques interprotéiques dans la formation de l'édifice micellaire. Ainsi, il a été démontré que la carbamylation des résidus lysine 5 et 9 de la caséine κ annihile son aptitude à stabiliser la caséine α_s .

D'autre part, de nombreux travaux ont mis en évidence que la solubilisation partielle ou totale du phosphate de calcium colloïdal, par acidification ou addition d'un agent chélatant du calcium, s'accompagne d'une dissociation extensive des caséines micellaires. Ce dernier phénomène tend à démontrer le rôle prépondérant des interactions électrostatiques dans la stabilisation micellaire. Elles se formeraient entre les caséines phosphorylées via des ponts calciques.

L'addition de NaCl à un lait pré-traité par la présure provoque une nette augmentation de la voluminosité micellaire quelle que soit le pH du système. Le sel interférerait avec les forces cohésives maintenant l'intégrité micellaire ou, plus vraisemblablement, déplacerait le calcium et le phosphate de calcium de la matrice caséique. Il s'ensuivrait l'augmentation concomitante du nombre de groupements ioniques et du volume micellaire de par l'apparition de répulsions électrostatiques (Creamer, 1985).

De même, Bingham et al. (1972) montrent que des micelles formées à partir de caséines

α_s déphosphorylées ont une structure très lâche, fortement hydratée et relativement instable. Par contre, le mélange de monomères caséiques α_s et β déphosphorylés peuvent former des particules type micelle. Ce phénomène d'association spontanée serait inhérent à la formation primaire des micelles.

3.3 - Liaisons hydrogène

Les interactions hydrogène résultent de l'interaction entre un atome d'hydrogène très électropositif lié à un atome électronégatif et un autre atome possédant un doublet électronique libre. La formation de telles liaisons apparaît essentiellement entre les atomes d'O, d'N et d'H. Les liaisons hydrogènes sont responsables des structures secondaires en α -hélice ou en feuillet des chaînes peptidiques. Elles participent également à la stabilisation des structures tertiaires et quaternaires des protéines. Elles existent aussi, bien sûr, dans l'eau liquide et sont modifiées au voisinage des protéines.

Herskovits (1966) a montré, par dispersion optique rotatoire dans des solutions aqueuses, que les caséines α_{s1} , β et κ ont une structure désordonnée avec très peu de structure en α -hélice ou en β -feuillet. Elles auraient une conformation intermédiaire entre désordonnée et globulaire (Herskovits, 1966; Noelken et Reibstein, 1968; Creamer et al. 1981). En solution aqueuse et dans une solution de guanidine-HCl (6M), la caséine β se présente sous une conformation enroulée non ordonnée (Noelken et Reibstein, 1968). En accord avec les observations précédentes, les séquences aminées des caséines α_s et β montrent une assez forte proportion de proline dont la particularité est l'empêchement stérique des structures en α hélice ou en feuillet. En conclusion, il apparaît que les structures secondaires (α et β) ne contribuent que

faiblement à la stabilisation micellaire, les liaisons hydrogènes doivent intervenir toutefois dans la stabilisation micellaire au niveau de liaisons spécifiques entre groupements protéiques et avec le solvant.

3.4 - Liaisons disulfures

Les liaisons disulfures (50kcal/mole), survenant entre deux résidus cystéines, stabilisent les structures tertiaires des protéines. Elles se mettent en place généralement après l'adoption par la molécule de la forme thermodynamiquement la plus stable (Anfinsen et Scheraga, 1975).

Seules les caséines κ et α_{s2} contiennent des résidus cystéine (2 résidus / mole); la polymérisation de molécules de caséines κ passerait ainsi par la formation primaire de liaisons disulfures (Swaisgood et al. 1964) .

De la même façon, Pepper et Farrell (1982) mettent en évidence lors de la solubilisation de caséine entière en absence de Ca^{2+} , la formation d'agrégats protéiques de caséine κ de poids moléculaire croissant avec la taille de la micelle (Slattery, 1978).

Il est difficile de déterminer le nombre et l'importance réelle des liaisons disulfures au sein de la micelle mais il semblerait qu'elles ne régissent pas la formation primaire des micelles.

4 - Les micelles : stabilisation colloïdale

Les micelles de caséine sont des particules colloïdales. Leurs deux principales

caractéristiques sont d'une part, un grand rapport surface/volume et, d'autre part une diffusion importante par mouvement Brownien.

Au pH naturel du lait, les micelles de caséine sont en dispersion stable dans le lactosérum. Afin d'en cerner les raisons, la théorie des interactions colloïdales basée sur les forces de Van Der Waals et de la double couche électrique sera abordée ainsi que l'existence d'interactions stériques entre particules possédant une enveloppe polymérique.

4.1- Interactions de Van Der Waals

L'existence des forces attractives entre molécules neutres fut postulée au siècle dernier par Van Der Waals (1873) . Il est maintenant établi que ces forces sont de trois sortes dont deux (entre dipole-dipole (Keesom) et dipole-dipole induit (Debye)) n'existent qu'entre des molécules polaires. Plus généralement, le troisième type, dit de London-Van Der Waals, concerne des dipôles instantanés. La création de ces dipôles est due aux fluctuations de densité électronique des atomes et est dépendante du temps. Une différence de phase dans la fluctuation des charges entraîne une attraction mutuelle des atomes. L'attraction de Van Der Waals est inversement proportionnelle à la distance de séparation entre deux molécules et peut devenir très importante à courte distance (<1 nm). Par ailleurs, elle est liée à la taille des particules mais est indépendante de la force ionique du milieu.

4.2 - La double couche électrique

Dans un environnement aqueux, indépendamment de la charge des particules, la

charge de surface est compensée par la charge des contre-ions dans la double couche électrique. Le modèle de Gouy-Chapman de cette double couche électrique suppose que les ions en solution sont des points de charge soumis à la fois à l'attraction de la surface chargée du solide et à la randomisation par mouvement Brownien. La résultante de ces deux effets opposés crée une couche diffuse à la surface. La concentration en ions de signe opposé décroît avec un profil exponentiel au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface de la particule. Ces effets, exprimés en potentiel, sont donnés dans l'expression suivante :

$$\psi = \psi_0 \exp(-\kappa x) \quad (1.1)$$

avec ψ_0 , le potentiel de surface du solide et κ , un paramètre appelé la longueur réciproque de Debye-Hückel (m^{-1}), fonction de la force ionique de la solution. $1/\kappa$ peut être considéré comme l'épaisseur de la double couche électrique.

En réalité, les contre-ions ont une taille finie et encombrant le volume près de la surface pour former une couche rigide appelée couche de Stern à laquelle correspond le potentiel de Stern ψ_s . Le potentiel zéta, mesuré par des techniques électrophorétiques, correspondrait au potentiel de Stern.

Enfin, enveloppant le tout, se trouve la couche diffuse de Gouy Chapman (figure I.6). Par électroneutralité, la charge superficielle de la particule est égale à la somme des charges superficielles du plan de Stern et de la couche diffuse.

Les répulsions électrostatiques apparaissent entre deux particules lorsque leurs doubles couches électriques s'interpénètrent. La répulsion résulte en fait de la combinaison des effets électrostatique et osmotique.

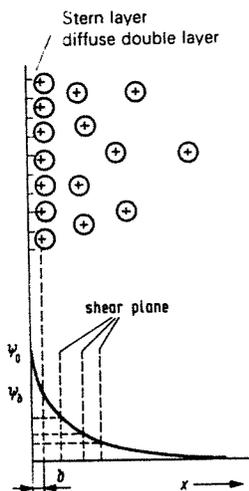


figure I.6 : profil de potentiel d'une particule colloïdale (Sontag et Streng, 1987)

La superposition des effets de répulsion, due à la double couche électrique, et d'attraction de Van Der Waals a donné lieu à la théorie DLVO, développée par Deryaguin et Landau (1941) puis Verwey et Overbeek (1948) (auteurs cités par Payens, 1979).

La stabilité et l'instabilité des colloïdes sont ainsi expliquées par l'addition d'un terme de répulsion, V_R , des doubles couches électriques et d'un terme d'attraction, V_A représentant les interactions à longue distance de London-Van Der Waals. Ainsi, le potentiel d'énergie entre deux particules V_T devient simplement:

$$V_T = V_R + V_A$$

Un certain nombre d'auteurs (Payens, 1966; Green et Crutchfield, 1971) ont proposé l'hypothèse selon laquelle la théorie DLVO expliquerait la stabilisation des micelles de caséine.

Payens (1979) montre, cependant, les limites de cette théorie, insuffisante pour expliquer le comportement des micelles de caséine native. Comme Holt (1975) et Walstra (1979), il suppose l'existence d'un facteur de stabilisation stérique, dû à une enveloppe micellaire de caséine κ . Cependant, après action de la présure et élimination de cet éventuel facteur de stabilisation, le comportement des micelles et leur agrégation ne correspondrait toujours pas à la théorie DLVO (Dalglish, 1983).

4.3 - Répulsions stériques

Selon Walstra (1979), la voluminosité élevée des micelles de caséine ne peut s'expliquer que par la présence d'une enveloppe protéique très solvatée autour de la micelle; il propose qu'elle soit constituée de l'extrémité C terminale de la caséine κ .

L'existence d'une telle enveloppe a, en effet, été démontrée. D'une épaisseur de 12nm environ, elle serait constituée de 10% de la caséine κ totale. La densité des segments (protéines polymériques en surface) et le rayon hydrodynamique moyen d'un segment seraient respectivement de l'ordre de $1,1 \cdot 10^{25} \text{ m}^{-3}$ et 0,116nm (Holt et Dalglish, 1986).

Cette enveloppe protéique aurait un rôle déterminant dans la stabilisation colloïdale des micelles grâce à la mise en jeu de forces de répulsion stérique couramment observées dans le cas de particules polymériques (A-B) plus simples. Elles sont formées d'un noyau (A) et d'une enveloppe diffuse (B) constituée de chaînes polymériques "solubles" dans le milieu.

L'interpénétration des enveloppes de deux particules en contact entraîne une augmentation de la densité locale des chaînes polymériques. Il s'ensuit, d'une part, un "effet osmotique" qui tend à diminuer la concentration en polymères par la diffusion

"forcée" de solvant et, d'autre part, une gêne stérique réduisant le nombre de configurations polymériques (figure I. 7). Ceci implique une réduction, ΔS , de l'entropie du système et donc un accroissement, $T\Delta S$, de l'énergie libre (Overbeek, 1982).

De nombreux travaux tendent à confirmer le rôle stabilisateur de l'enveloppe caséique. Ainsi Roefs (1986) propose qu'à 4°C, la coagulation du lait par emprésurage soit totalement contrôlée par les répulsions stériques. En effet les interactions électrostatiques étant supposées inexistantes à cette température (potentiel zéta nul), seules les forces de répulsion stérique éliminées par hydrolyse de la caséine κ pourraient entraîner la déstabilisation des micelles.

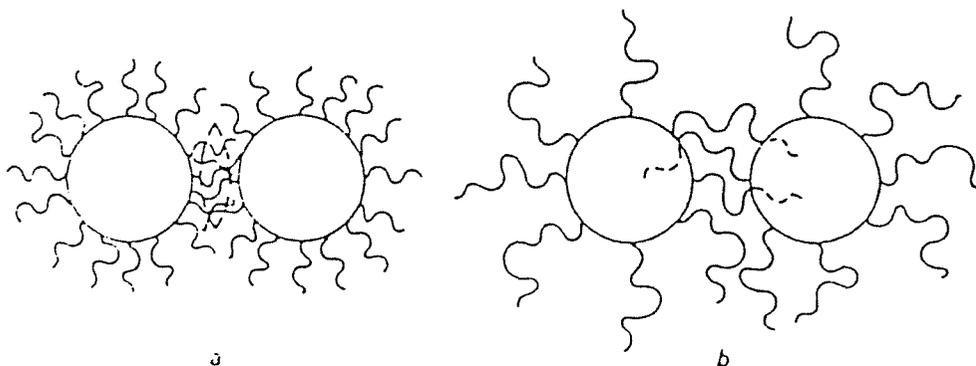


figure I.7 : illustration de deux aspects des répulsions stériques entre particules colloïdales :

a, effet osmotique dû à une concentration élevée en chaînes polymériques dans la région de l'interpénétration

b, volume de restriction dû à la perte possible de conformations des chaînes polymériques de l'enveloppe. D'après Overbeek (1982).

Par analyse de la distribution des tailles hydrodynamiques, Walstra et al.(1981) mettent en évidence une diminution de l'ordre de 5 nm de la taille micellaire après

l'addition de chymosine au lait et avant l'agrégation finale. Il s'agirait de l'hydrolyse enzymatique de la caséine κ périphérique constituant l'enveloppe protéique qui serait responsable de la diminution de taille observée et de la déstabilisation des micelles (figure I.8).

Horne (1984) montre également une réduction progressive du diamètre micellaire lorsque les micelles sont diluées dans des solutions d'éthanol de concentration croissante (mais inférieure à celles entraînant une coagulation). Cette diminution de taille serait due à l'effondrement de l'enveloppe protéique micellaire. En effet, un environnement défavorable comme une solution d'éthanol provoque la transition conformationnelle des protéines et autres polymères d'une forme déroulée à une forme "compactée", accompagnée d'une diminution du volume effectif de la molécule (Post et Zimm, 1982).

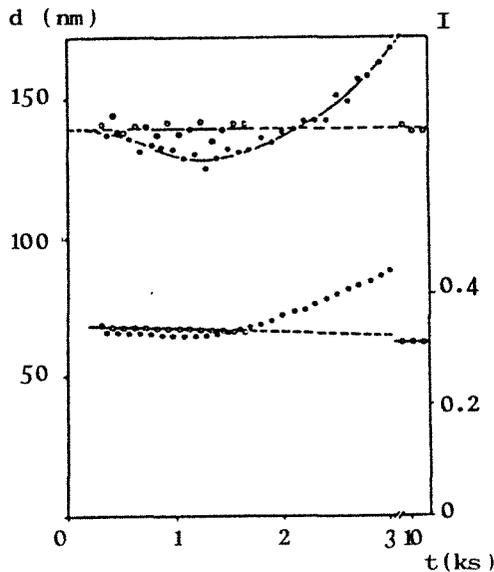


figure I.8 : diamètre hydrodynamique moyen d (courbes supérieures) et intensité totale de dispersion lumineuse I (courbes inférieures) des micelles de (para) caséine, en fonction du temps t après l'addition de chymosine ; o, référence (sans chymosine) ; •, 2.4 μg de chymosine pour 1g de lait écrémé. D'après Walstra et al. (1981)

Horne et Davidson (1986) définissent l'épaisseur de l'enveloppe protéique comme étant la différence entre le rayon micellaire dans un tampon sans éthanol et le rayon minimum mesuré en présence d'éthanol dans le tampon correspondant. Ils mettent en évidence que la stabilité de la dispersion est directement proportionnelle à l'épaisseur de cette barrière. En effet, une relation linéaire est observée entre l'épaisseur de l'enveloppe et la quantité critique d'éthanol à ajouter pour provoquer l'agrégation des micelles. Les variations de l'épaisseur de l'enveloppe sont obtenues au préalable par modification du pH (7,0-6,0), de la force ionique (0-200mM NaCl) ou de la quantité de calcium dans le tampon (0-30 mM) (figure I.9). L'enveloppe est fragilisée lorsque la concentration en calcium soluble est accrue, elle est au contraire renforcée lorsque le pH varie de pH 6,0 à pH 7,0 et pour une force ionique croissante.

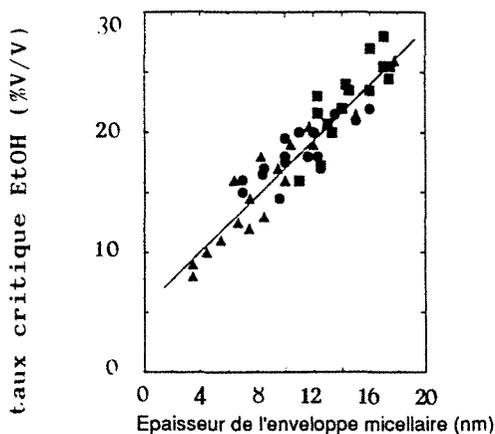


figure I.9 : taux critique d'éthanol en fonction de l'épaisseur hydrodynamique de l'enveloppe micellaire. L'épaisseur de l'enveloppe protéique est définie comme la différence entre le rayon micellaire dans un tampon sans éthanol et le rayon minimum mesuré en présence d'éthanol dans le tampon correspondant. Les effets observés sont obtenus par la variation du pH (•), du taux de calcium ionique (Δ) et de la teneur en NaCl (◻) des systèmes tampons. D'après Horne et Davidson (1986)

En résumé, la figure I.10 proposée par Griffin (1987) schématise la déstabilisation stérique des micelles de caséine vis à vis de l'emprésurage (Walstra et al.,1981) et de l'addition d'éthanol (Horne, 1984).

Selon Walstra (1990), la forte dépendance du temps de coagulation thermique du lait avec le pH pourrait également être expliquée par la présence d'une enveloppe micellaire. En effet, la zone de pH 6,5 à 6,9, correspondant à une stabilité moindre des micelles est également la zone de dissociation des caséines κ , supposées constituer, en partie, leur enveloppe protéique. Il en résulterait une déstabilisation stérique des micelles qui, dans des conditions défavorables comme les hautes températures conduirait à leur agrégation (figure I.11).

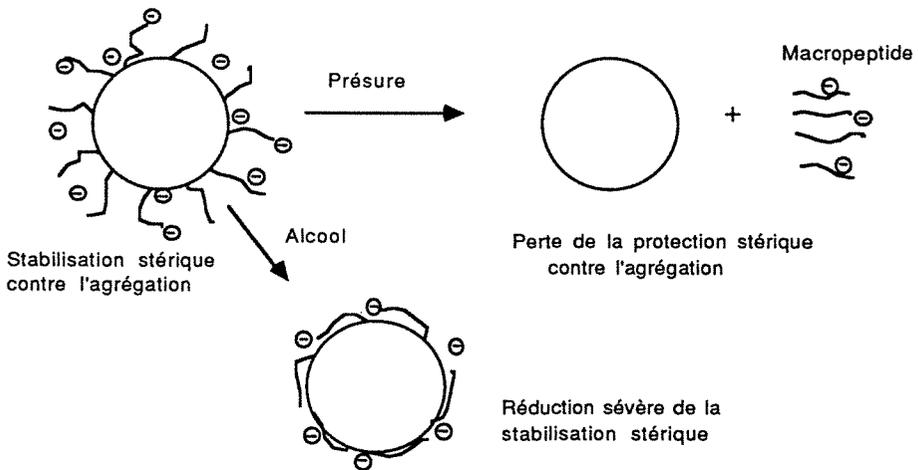


figure I.10: diagramme schématique de la stabilisation stérique des micelles de caséine. D'après Griffin (1987)

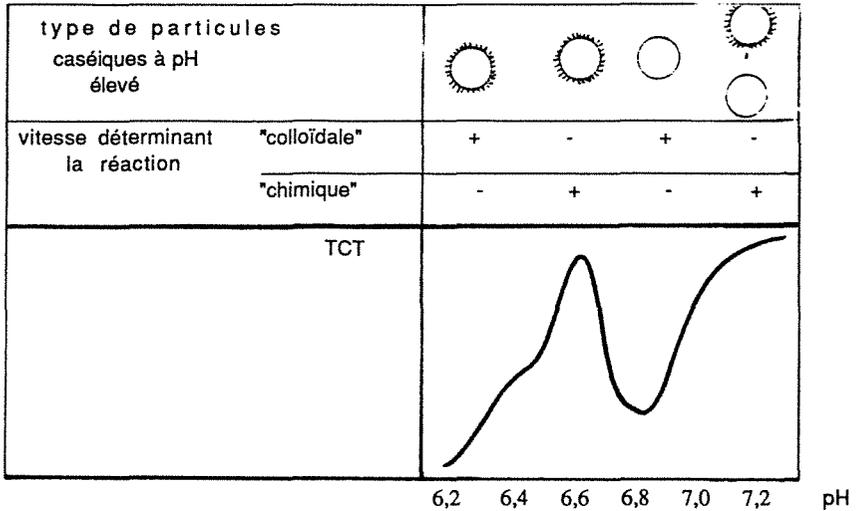


figure I.11 : effet du pH du lait sur le temps de coagulation thermique (TCT). Corrélation avec le type de micelle correspondant et nature de la réaction "colloïdale" ou "chimique" déterminant la vitesse de la réaction. D'après Walstra (1990).

5 - Modification des propriétés physicochimiques du lait au cours de l'acidification

L'acidification du lait peut conduire à l'obtention d'un coagulum résistant à de nombreuses contaminations bactériennes de par son bas pH. Cette propriété illustre l'un des intérêts de son utilisation par l'homme depuis des millénaires pour conserver le lait. La diversification de l'alimentation par la variété des saveurs, textures et valeurs nutritives des nombreux dérivés acides du lait sont certainement d'autres motivations de son usage.

Toutefois, avant la formation d'un gel, la réduction du pH du lait provoque également des bouleversements au niveau de la composition micellaire et, certainement, au niveau

de la structure micellaire. Il en résulte des modifications de diverses propriétés physico-chimiques du lait telles la solvatation protéique ou le potentiel zéta (potentiel de surface) .

5.1 - Composition minérale et protéique des micelles

5.1.1 - Minéraux colloïdaux

Au pH naturel du lait, 70% du calcium et 42% du phosphate inorganique (P_i) du lait sont liés aux micelles (Van Hooydonk et al.,1986) en partie sous la forme d'un complexe de phosphate de calcium amorphe (Visser et al., 1986; Holt, 1989). La forme cristalline la plus appropriée de ce complexe serait $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ (Holt, 1989).

L'acidification du lait conduit à la solubilisation partielle ou totale de ces minéraux colloïdaux. La figure I.12 met en évidence la dissociation de calcium et de P_i , des micelles dans le sérum; des résultats identiques sont obtenues à 4°C, à 20°C et à 30°C. Il apparait, en effet, que la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal avec le pH est indépendant du facteur température. Celui-ci n'affecte pas non plus la composition du phosphate de calcium colloïdal (Dalglish et Law,1989). Pour des valeurs de pH inférieures à pH 5,5, Dalglish et Law donnent un rapport, moles de calcium par moles de P_i , égal à 1,75-1,85. Des résultats similaires ont été obtenus avec 1,61 pour Chaplin (1984) et 1,66 pour Van Hooydonk et al. (1986).

La petite quantité de magnésium colloïdal se comporte comme le calcium durant l'acidification du lait. Dans un lait à pH4,9, du calcium et du magnésium micellaires subsistent alors que tout le P_i est solubilisé. L'ion Mg^{2+} , comme l'ion Ca^{2+} , doit être

lié aux sites non phosphorylés des caséines par le même type de liaison sensible aux variations de pH (Dalglish et Law, 1989).

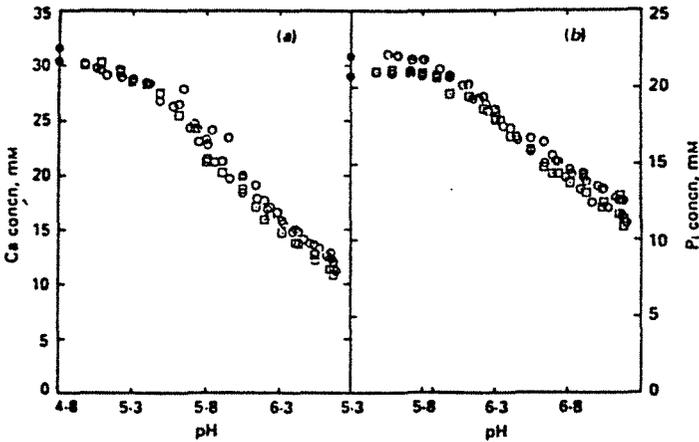


figure 1.12 : Solubilisation de calcium (Ca) et de phosphate inorganique (P_i) au cours de l'acidification à 20°C, avec les concentrations dans le sérum du lait obtenus par ultrafiltration (○) et par ultracentrifugation (⊖). Les points sur les axes représentent le Ca et le P_i total mesuré après précipitation de la caséine à pH 4.6. D'après Dalglish et Law (1989).

Comme le précisent Dalglish et Law (1989) de nombreuses questions se posent quant à la relation entre minéraux et protéines, en particulier lorsque sont introduits les effets de la température et de l'acidification. Au cours de l'acidification du lait, notamment, il serait nécessaire de prendre en compte, d'une part, les effets de neutralisation de la charge protéique et, d'autre part, la création d'interactions ioniques spécifiques entre protéines lorsque d'autres sources de liaisons ont été détruites.

5.1.2 - Caséines micellaires

Durant l'acidification du lait, outre la solubilisation minérale, Rose (1968) met en

évidence une large solubilisation des caséines α_s , β et κ avec un maximum de solubilité à pH 5,3. Rose (1968) montre également l'amplification de la dissociation caséique à basse température.

De nombreux auteurs ont observé, depuis, ces mêmes phénomènes (Downey et Murphy, 1970; Lin et al, 1972; Creamer et al., 1977; Davies et Law, 1983; Roefs et al., 1985).

Dagleish et Law (1988) montrent que les quantités et les proportions des monomères caséiques dissociés durant l'acidification sont dépendantes de la température et du pH, en particulier pour la caséine β . Le point de solubilisation est maximal à 4°C pour un pH 5,1, à 20°C un pH 5,4 et à 30°C un pH 5,5. A ces valeurs respectives, la quantité de caséines solubilisées par rapport à la caséine colloïdale chute de ~40% à 4°C, à ~20% à 20°C pour s'annuler à 30°C (figure I.13).

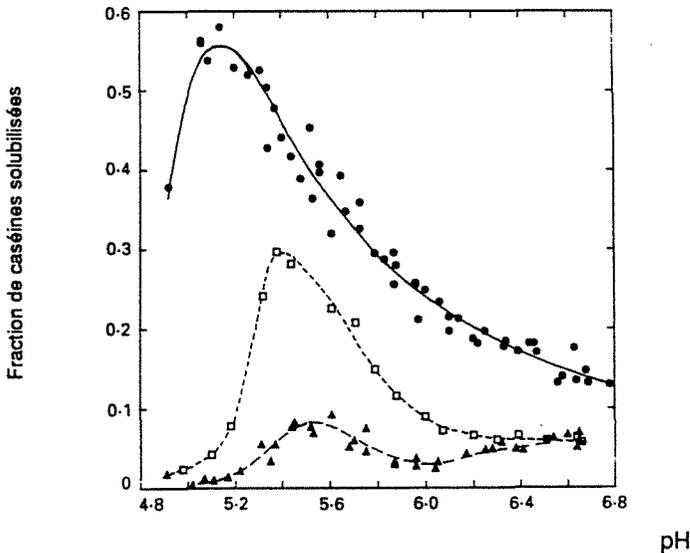


figure I.13 : concentrations dans le sérum des protéines micellaires solubilisées , en fonction du pH et de la température; 4°C, ● ; 20°C, □ ; 30°C, ▲. D'après Dagleish et Law (1988)

Rollema et Brinkhuis (1989) ont étudié la mobilité des protéines du lait par résonance magnétique nucléaire sous diverses conditions de pH, de température et de concentration en calcium soluble.

L'acidification du lait, étudiée jusqu'à pH 5,8, ne provoque pas de variation dans la mobilité des caséines micellaires alors qu'à ces pH une grande partie du phosphate de calcium colloïdal est solubilisée.

La complexation du calcium par EDTA entraîne, par contre, la dissociation de caséines micellaires mettant ainsi en évidence deux types de calcium colloïdal libéré d'une part, au cours de l'acidification et d'autre part, après addition d'un agent chélatant au lait.

En résumé, la dissociation des caséines micellaires durant l'acidification du lait serait due à trois facteurs principaux:

- un effet hydrophobe, dépendant de la température mais non du pH
- la dissolution du calcium et du phosphate des micelles avec la réduction du pH
- la précipitation isoélectrique des caséines, dépendante de la température et du pH.

Malgré les nombreux travaux déjà réalisés dans ce domaine, les mécanismes gouvernant la solubilisation protéique des micelles demeurent toujours obscurs.

5.2 - Hydratation et voluminosité des micelles

L'hydratation des particules caséiques (g eau par g caséine) peut être calculée à partir des fractions d'eau et de caséines contenues dans les culots de centrifugation (forcé de centrifugation > 70000 g pendant plusieurs heures) de laits écrémés acidifiés à différents pH et à des températures variées (Tarodo de la Fuente et Alais, 1975; Snoeren et al., 1984 ; Creamer, 1985 ; Van Hooydonk et al., 1986). L'eau est associée avec les protéines sous différentes formes mais la capacité de rétention d'eau d'une protéine peut être assimilée à la quantité d'eau retenue dans la matrice protéique sous

certaines conditions. Cela comprend l'eau d'hydratation et l'eau restant faiblement associée avec la protéine après centrifugation. L'eau hydrodynamique, constituant les couches d'hydratation des protéines, peut être assimilée ou non à l'eau solvante selon les techniques utilisées. Tous les auteurs précédemment cités mettent en évidence une chute de la voluminosité avec l'acidification jusqu'aux pH 5,8-6,0 suivie d'une augmentation de celle-ci jusqu'à un maximum à pH 5,4 ensuite, pour des pH plus acides, la voluminosité diminue régulièrement (figure I.14). Les mêmes profils de voluminosité et les mêmes ordres de grandeur sont trouvés à 20°C, à 30°C et à 37°C indiquant que la température a peu d'influence sur la variation de voluminosité des micelles avec l'acidification.

Voluminosité (ml H₂O / g protéine)

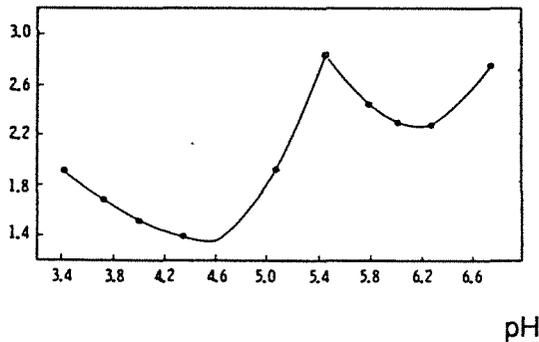


figure I. 14 : effet du pH sur la solvation de la caséine dans le lait à 20°C. D'après Snoeren et al. (1984)

Darling (1982), cependant, n'observe pas le maximum de voluminosité, qu'il met en évidence à pH 5,4 et à 10°C, pour des températures plus élevées à 30°C et 55°C (figure I.15).

La neutralisation des charges protéiques expliquerait, dans un premier temps, la chute de la voluminosité des micelles. En effet, les interactions protéines-protéines

favorisées par la diminution des répulsions électrostatiques provoqueraient un rapprochement des chaînes protéiques excluant ainsi le solvant.

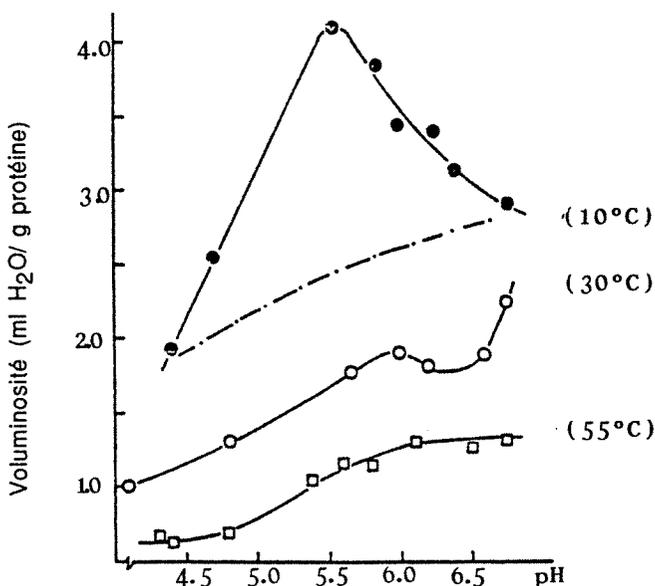


figure 1.15: voluminosité des micelles de caséine en fonction du pH et de la température. D'après Darling (1982)

Selon Snoeren et al.(1984), le pic de voluminosité observé à pH 5,4 correspondrait au maximum de solubilisation des caséines β qui seraient remplacées par de l'eau dans le réseau micellaire.

Van Hooydonk et al. (1986) ne trouvent pas une exacte correspondance entre les maxima de voluminosité et de solubilisation caséiques ; une "sur-hydratation" des submicelles externes serait alors, selon ces auteurs, à l'origine de l'augmentation de la voluminosité jusqu'à pH 5,4. En deçà de ce pH, la précipitation progressive des caséines à l'approche du pH_i (pH 4,6) entraînerait une diminution régulière de la voluminosité observée.

L'effet du pré-traitement du lait par la présure montre une nette réduction de la

voluminosité initiale des micelles due certainement au clivage de la caséine κ . Par contre, le profil voluminosité-pH est comparable à ceux obtenus pour des laits non traités. Seuls, les maxima, obtenus à pH 5,4 pour des laits non traités, sont déplacés à pH 5,0 pour Creamer (1985) et à pH 5,6 pour Van Hooydonk et al. (1986).

Dans le schéma précédent, l'effet de la présure serait de modifier les charges électriques périphériques des micelles par le clivage de la caséine κ ; il s'en suivrait un simple déplacement dans l'échelle de pH du profil de voluminosité.

5.3 - Mobilité électrophorétique et potentiel zéta

Si les raisons de la stabilité des micelles de caséines ne sont pas clairement définies, il apparait qu'elles seraient inhérentes à la nature et aux propriétés de la surface micellaire. L'étude de la mobilité électrophorétique des micelles apporte ainsi de précieuses informations sur la charge de surface des micelles dans diverses conditions de température, de pH, de force ionique...

Le potentiel zéta, calculé à partir de la mobilité électrophorétique par la formule générale de Henry, permet simplement de faciliter les comparaisons des valeurs d'une expérience à une autre lorsque la viscosité ou la constante diélectrique du solvant sont modifiées (Darling et Dickson, 1979a). La viscosité du milieu influence les propriétés hydrodynamiques et donc la vitesse des particules. La constante diélectrique du solvant reflète la polarisabilité des molécules de solvant qui, lorsque elle est élevée, diminue les interactions électrostatiques entre les ions en solution.

Comme le précise Dalglish (1984), la charge des micelles étant négative, les valeurs de mobilité électrophorétique et de potentiel zéta, qui en découlent sont également négatives. Ainsi, les termes d'"augmentation" et de "diminution" de ces valeurs

négatives se référeront aux valeurs absolues et non aux valeurs algébriques.

La mobilité électrophorétique a été mesurée par différentes techniques : l'électrophorèse en veine liquide (Green et Crutchfield, 1971; Pearce, 1976; Darling et Dikson, 1979 a-b), l'électrophorèse libre, l'électro-osmose (Payens, 1966; Schmidt et Poll, 1986) et l'électrophorèse laser Doppler (Dalglish, 1984; Holt et Dalglish, 1986).

Dans un sérum de lait, un potentiel zéta de l'ordre de 8mV est donné par Payens (1966) ainsi que par Schmidt et Poll (1986); une valeur égale à 18mV est obtenue par Pearce (1976), Darling et Dikson (1979 b) et Dalglish (1984).

Après action de la présure, un potentiel zéta initialement à 18mV est réduit à 11mV environ (Pearce, 1976; Dalglish, 1984).

L'influence de différents paramètres sur le potentiel zéta a été étudiée et donne lieu dans certains cas à des contradictions:

- le potentiel zéta augmente avec la température (Pearce, 1976; Darling et Dikson, 1979b; Dalglish, 1984).

- les variations de la force ionique du milieu (Dalglish, 1984) ou de la taille micellaire (Darling et Dikson, 1979b; Dalglish, 1984) sont deux paramètres sans influence sur le potentiel zéta. Holt et al. (1982) montrent, par contre, la dépendance du potentiel zéta avec le rayon micellaire.

- une augmentation de la concentration en calcium soluble du milieu conduit à une diminution du potentiel zéta de micelles natives ou pré-traitées par la présure. La neutralisation de la charge micellaire serait expliquée par la fixation spécifique d'ions calcium à la surface micellaire sur des groupements protéiques chargés, constitués principalement de groupes carboxyles (Dalglish, 1984; Holt et Dalglish, 1986).

L'influence du pH sur le potentiel zéta s'avère complexe. Une première solution serait d'envisager la neutralisation progressive des charges micellaires négatives avec une concentration croissante en protons. Ceci est effectivement mis en évidence par Pearce (1976) ainsi que par Darling et Dickson (1979) dans les figures I.16.

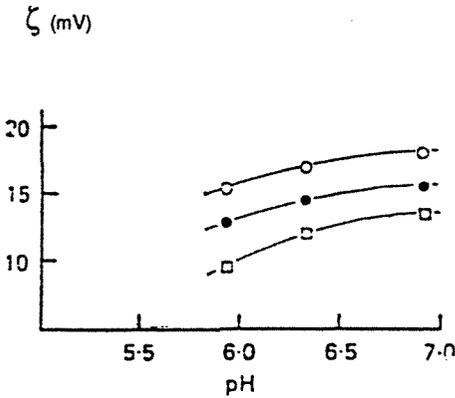


figure I.16.a

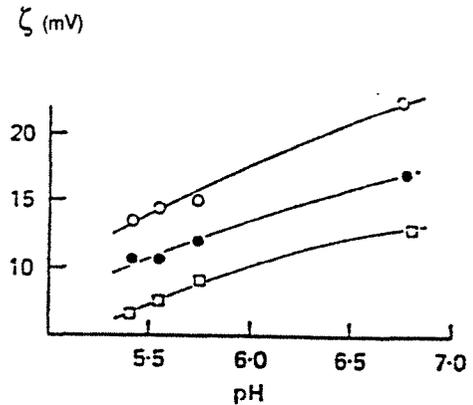


figure I.16.b

figures I.16 : les effets du pH et de la température sur le potentiel zéta avec deux échantillons de lait différents. Fig I.12.a : o, 30°C; ●, 20°C; □, 10°C. Fig. I.12.b: o, 45°C; ●, 30°C; □, 20°C. D'après Darling et Dickson (1979).

Walstra (1984) ainsi que Schmidt et Poll (1986) révèlent par contre un profil bien plus complexe de la dépendance du potentiel zéta avec le pH du milieu.

Walstra (1984) montrent une diminution du potentiel zéta, égal à 10mV initialement, jusqu'à une valeur quasi-nulle à pH 5,2, le potentiel zéta augmente alors jusqu'à 5 mV environ à pH 5,0 pour à nouveau s'annuler à pH 4.6 (figure I.17).

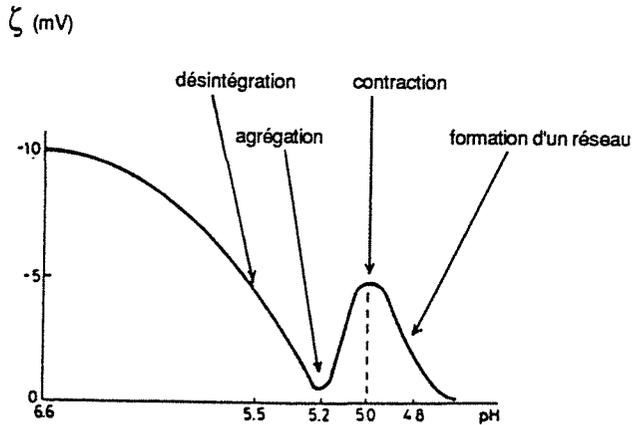


figure I.17 : variation du potentiel zéta des micelles de caséine durant l'acidification du lait. D'après Walstra, 1984.

Visser et al. (1986), à l'appui de ses travaux en microscopie électronique notamment, reprend les travaux de Walstra (1984) pour proposer les étapes successives se déroulant durant l'acidification du lait. Le phénomène de coagulation serait ainsi préparé par une désintégration micellaire dès pH 5,5 suivie d'une agrégation à pH 5,2 et d'une contraction des amas formés précédemment à pH 5,0; la finalité de ces phénomènes étant la formation d'un réseau. La caséine β , dont le point isoélectrique est à pH 4,8-5,1, jouerait le rôle de "déclencheur" de l'agrégation des autres protéines. Selon Schmidt et Poll (1986), le potentiel zéta, initialement à 8mV à pH 6,7, diminue avec l'acidification jusqu'à une valeur nulle à pH 5,4, il augmente ensuite jusqu'à 6,5mV à pH 5,1 pour s'annuler à nouveau au pH isoélectrique de la caséine (figure I.18).

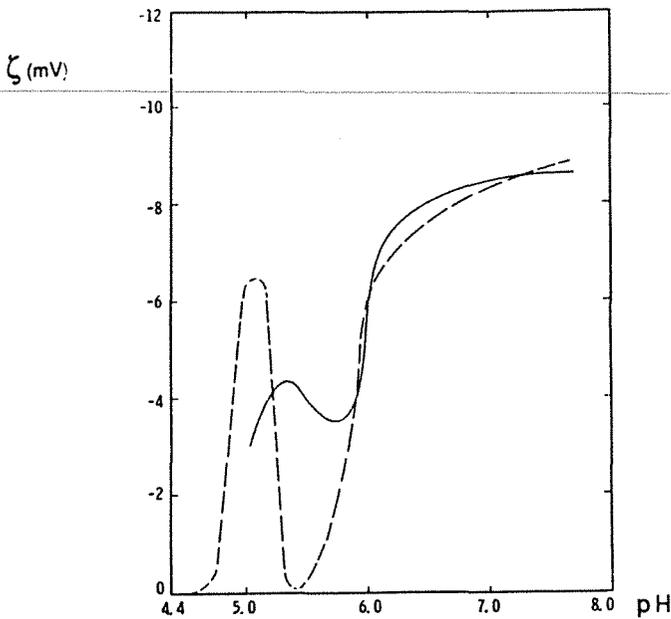


figure I.18 : comparaison des courbes de potentiel zéta des micelles de caséine de lait traité (—) ou non (- - -) thermiquement.

L'amplitude des variations du potentiel zéta avec le pH est modifiée par le traitement thermique du lait en présence ou non d'un excès de protéines sériques. Si, globalement, le potentiel zéta diminue avec l'acidification et la neutralisation des charges caséiques; cette explication est insuffisante pour expliquer l'ensemble des phénomènes observés. Ainsi, le minimum de potentiel zéta observé à pH 5,4 serait dû à l'adsorption spécifique d'ions calcium sur les caséines, adsorption mise en évidence précédemment par Ottenhof (cité par Schmidt et Poll, 1986) à pH 5,3-5,4. Cet auteur montre une adsorption de phosphate inorganique croissante pour des pH supérieurs à pH 5,4 et pas d'adsorption pour des pH inférieurs à pH 5,3. La fixation de phosphate inorganique aux dépend du calcium durant le chauffage du lait expliquerait d'une part, l'amplitude moindre du minimum de potentiel zéta observé à pH 5,4 et le déplacement de ce minimum vers des valeurs de pH plus élevées pour des laits thermisés.

6 - Conclusion et objectifs de l'étude

Les connaissances actuelles montrent que le comportement du lait est à rapprocher de celui d'une suspension colloïdale de particules complexes, les micelles de caséine.

Cependant la structure des micelles pose de nombreuses interrogations. Deux tendances peuvent toutefois être distinguées; l'une décrit la micelle comme un assemblage de sous-unités, les submicelles, tandis que la seconde considère la micelle comme un réseau protéique continu dans lequel s'imbriqueraient des monomères caséiques.

Toutes deux s'accordent sur l'importance des minéraux colloïdaux et des forces d'interaction hydrophobes et électrostatiques dans le maintien de l'édifice micellaire.

L'existence d'une couche polymérique diffuse enveloppant la micelle est également admise depuis une dizaine d'années. Elle serait à l'origine de répulsions stériques entre les micelles et se révélerait ainsi, d'une importance prépondérante dans leur stabilisation.

Il est bien connu que le clivage par la présure des caséines κ induit la floculation des micelles ; ceci serait dû à l'élimination de ces forces de répulsion. Dans un milieu défavorable comme l'éthanol, le passage d'une forme diffuse à une forme compactée de cette enveloppe polymérique aurait les mêmes conséquences. La stabilité au traitement thermique des micelles de caséine, variable en fonction du pH, serait liée à la dissociation des caséines κ de l'enveloppe micellaire (Walstra, 1990).

En résumé, l'influence de l'enveloppe protéique des micelles sur leur stabilité dans ces différents cas est illustrée dans la figure I.19.

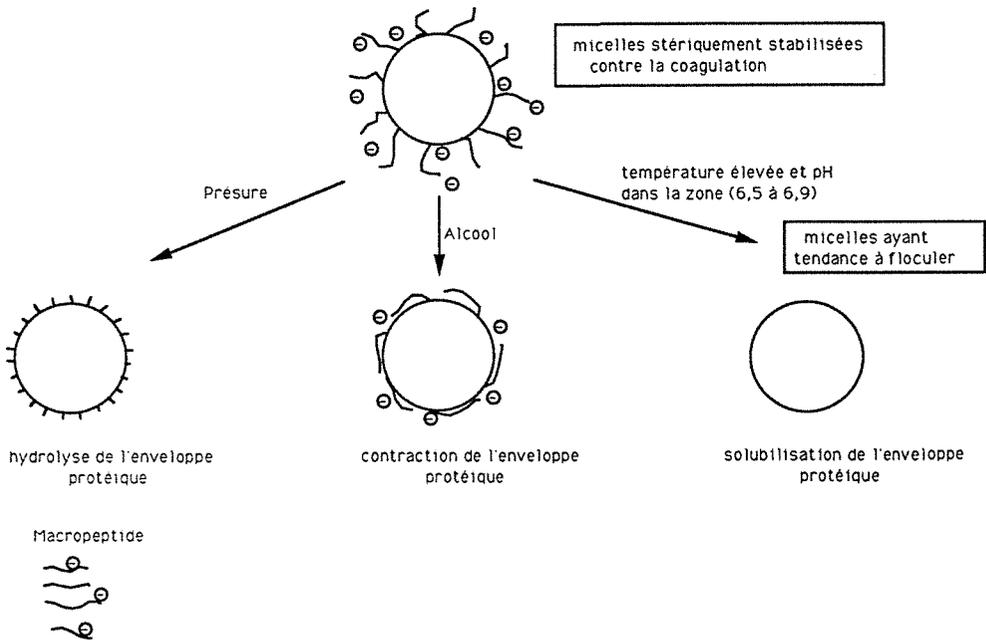


figure I.19 : représentation schématique de l'influence de l'enveloppe micellaire sur la stabilité colloïdale des micelles dans différentes conditions. D'après Griffin (1987) et Walstra (1990).

Les nombreux travaux réalisés dans le domaine de l'acidification du lait mettent en évidence divers phénomènes se déroulant avant la gélification comme la solubilisation de matière colloïdale (protéines et minéraux) ou les variations de voluminosité et de potentiel zéta des micelles de caséine. Mais on peut constater qu'il n'existe pas de

synthèse de l'ensemble de ces résultats permettant de lier de façon cohérente tous les évènements observés.

Compte tenu de la nécessité d'éclaircir le déroulement logique des phénomènes observés ponctuellement par différents auteurs et d'approfondir la connaissance "colloïdale" de l'acidification du lait, deux types d'étude sont entrepris dans ce travail. L'une conduit à la validation d'une méthode optique pour le suivi de l'acidification du lait et la seconde constitue une approche phénoménologique des mécanismes colloïdaux de l'acidification.

Les sondes de mesure optique se révèlent particulièrement intéressantes pour le suivi d'une transformation sol-gel comme dans le cas de l'acidification du lait. Emettrices et réceptrices d'un signal lumineux, elles permettent d'observer les phénomènes sans perturber le milieu, contrairement aux méthodes rhéologiques.

L'utilisation de la spectrophotométrie ou de la diffusion laser, techniques les plus utilisées, impose une dilution importante du lait pour toute mesure. L'intérêt d'une sonde optique adaptée à un milieu non dilué est ainsi apparu très rapidement. Déjà employée dans le cadre du suivi de la coagulation présure (Scher, 1988), la méthode turbidimétrique développée par Scher et Hardy (1987), à la suite de travaux expérimentaux sur la réflexion de la lumière par le lait (Hardy et Fanni, 1981) est appliquée, dans le présent travail, au suivi de l'acidification du lait.

Ainsi dans le chapitre II, la validité de cette méthode est mise en évidence dans différentes conditions de température (15°C, 20°C, 30°C et 42°C) et de vitesse d'acidification. Les résultats turbidimétriques obtenus sur le lait sont confrontés à des résultats spectrophotométriques sur dilutions de lait. La spectrophotométrie est en effet choisie comme référence pour la méthode turbidimétrique, encore peu connue. Basée

sur le principe de diffusion de la lumière par les particules colloïdales, elle mesure l'intensité de la lumière transmise alors que la seconde mesure l'intensité de la lumière réfléchie. L'aboutissement de ce chapitre est la création de profils acido-turbidimétriques caractéristiques d'une température d'acidification qui montrent l'influence directe du pH du lait sur ses propriétés optiques. Les phénomènes mis en évidence grâce aux profils acido-turbidimétriques sont exploités dans le chapitre III. Différentes méthodes, adaptées à l'étude des particules colloïdales, sont alors utilisées pour l'étude des variations, au niveau micellaire, de la voluminosité, du diamètre, du potentiel zéta et de la teneur en caséines.

Le dernier chapitre traite de l'application d'une théorie récente, celle des fractals, à la modélisation de l'agrégation colloïdale des micelles au cours de l'acidification du lait. Cette théorie récemment développée par Mandelbrot (1977) met en évidence qu'une structure, apparemment désordonnée, peut correspondre à une géométrie rigoureuse caractérisée par une dimension fractale, D . Les valeurs obtenues peuvent être comparées aux nombreuses données de la littérature et confrontées aux modèles divers d'agrégation simulée.

CHAPITRE II :

ELABORATION DE DIAGRAMMES
ACIDO-TURBIDIMETRIQUES
CARACTERISTIQUES



CHAPITRE II : ELABORATION DE DIAGRAMMES ACIDO-TURBIDIMETRIQUES CARACTERISTIQUES

1 - Introduction bibliographique: étude optique de la coagulation du lait

Si l'étude optique de la coagulation acide du lait est peu développée, de nombreux travaux traitent, par contre, de la coagulation présure du lait. Ils se divisent selon trois méthodologies basées sur la transmission, la réfraction ou la réflexion de la lumière dans un milieu complexe.

Jusqu'à présent, la plupart des travaux ont été réalisés par transmission turbidimétrique sur des solutions diluées de lait (Payens, 1978; Horne et Dalgleish, 1981; Dalgleish, 1983; Surkov et al., 1982; Mc Mahon et al., 1984; Carlson et al., 1987).

Pour une étude directe sur le lait, Korolczuk et al. (1986) utilisent la variation de l'indice de réfraction, mesure globale tenant compte des effets sur la réfraction de la lumière des composants protéiques (micelles caséiques et protéines solubles) et des solutés de la phase aqueuse (lactose et sels minéraux).

Toujours dans le cadre de la coagulation enzymatique du lait, ont été réalisés des travaux par photométrie de réflexion diffuse (Hardy et Fanni, 1981; Hardy et al., 1981). De même, Scher et Hardy (1987) ont adapté au suivi de la coagulation présure du lait un turbidimètre fonctionnant sur le principe de la réflexion d'une lumière monochromatique dans le proche infra-rouge.

En première approximation, les cinétiques de coagulation présure du lait présentent un profil sigmoïdal divisé en trois phases : une phase de latence puis l'ascension rapide du signal correspondant au grossissement, à l'agrégation des particules et à la coagulation et, enfin, l'atteinte d'un palier lorsque le gel est formé (figure II.1).

Des profils plus complexes sont parfois obtenus. Ainsi, une diminution significative

de la turbidité du lait durant la phase initiale de la coagulation présure est observée par Payens (1978) et Walstra (1979). L'état des connaissances actuelles permet de préciser que ce phénomène est dû à la diminution de la taille des micelles de caséine à la suite du clivage, par la présure, de la caséine κ périphérique.

Par ailleurs, un épaulement du signal optique, coïncidant avec la floculation du lait, est également mis en évidence dans le cas de la coagulation présure (Hardy et Fanni, 1981) ; il reflèterait la prise en gel.

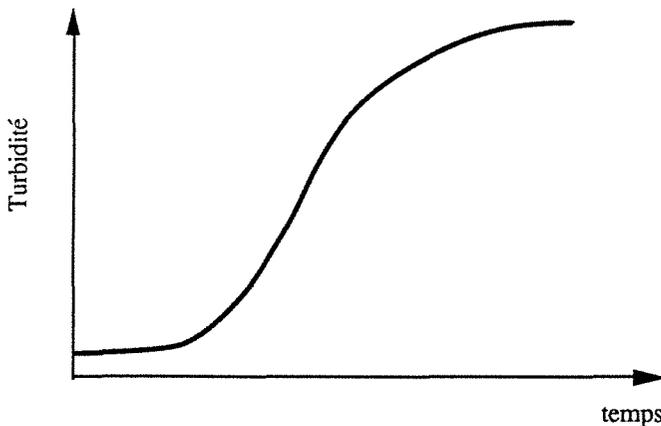


figure II.1: profil turbidimétrique caractéristique de la coagulation présure du lait

Le suivi de l'acidification du lait par des méthodes optiques est encore peu développé et concerne surtout la coagulation rapide du lait par des acides forts. Ainsi, Jablonka et al. (1988) étudient l'applicabilité d'un capteur optique au suivi de la coagulation acide du lait dans des conditions industrielles (injection d'acide dans le lait à chaud).

Bringe (1988) et Bringe & Kinsella (1990) réalise l'étude cinétique, par une méthode spectrophotométrique, de la coagulation acide des micelles de caséine en solution. La coagulation "lente" par hydrolyse de GDL est également abordée par ces auteurs.

Des différences fondamentales sont ainsi mises en évidence entre les deux types de coagulation, rapide et lent (figures II.2).

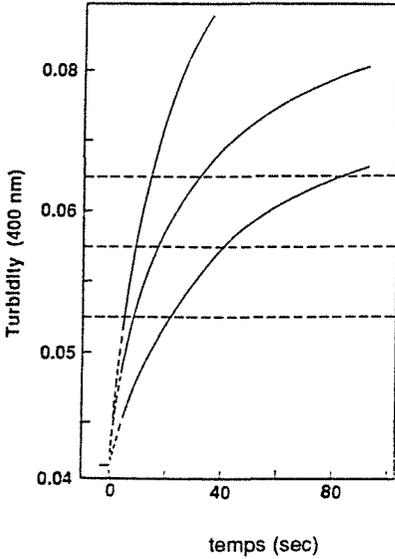


fig.II.2.a

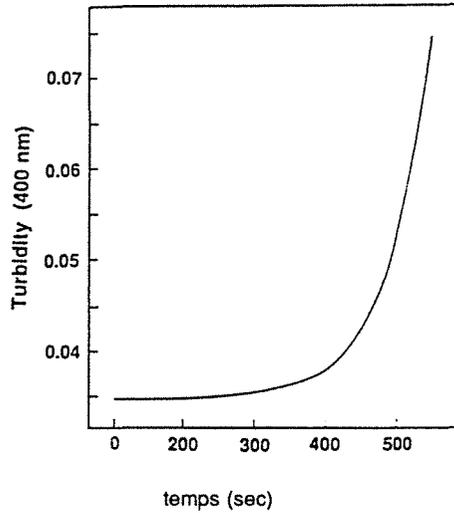


fig.II.2.b

figures II.2: coagulation acide par HCl (a) et par hydrolyse de GDL (b) de dilutions de micelles de caséine dans des solutions de CaCl_2 . D'après Bringe (1988), Bringe et Kinsella (1990).

Dans le cas de la coagulation acide "quasi-instantanée" (< 2 min) du lait, il est mis en évidence que pour chaque condition expérimentale (pH, température, $[\text{CaCl}_2]$) l'agrégation des particules serait régie par les mêmes mécanismes; seule la vitesse de la coagulation varierait au cours du temps (processus limité par la diffusion). Ainsi, selon Bringe (1988), la vitesse de la coagulation acide des micelles de caséine, dans ces conditions, reflèterait l'intensité des forces intercolloïdales existantes à un pH et à une température donnés.

Une acidification graduelle par hydrolyse de GDL ne correspond plus au schéma simplifié de la coagulation par HCl. La vitesse de variation du signal optique reflète, en chaque point, la tendance à la coagulation des micelles de caséine; ainsi, plus le pH diminue et plus la vitesse de la coagulation augmente (Bringe, 1988).

L'acidification quasi-instantanée du lait "simplifié" les processus de coagulation de par sa rapidité. Elle est particulièrement adaptée à une étude ciblée sur la coagulation du lait (Bringe, 1988) ou sur la fabrication de caséines acides.

L'acidification lente du lait par hydrolyse de GDL parait, par contre, plus intéressante pour une étude des étapes précédant la coagulation et pour la simulation de fermentations lactiques, deux objectifs de notre étude.

2 - Matériels et méthodes

2.1 - Préparation du lait

Le point de départ de cette étude concernait le contrôle de la fabrication de laits fermentés de type yaourt. La matière première "lait" a donc été standardisée selon des conditions proches de celles utilisées en milieu industriel et ce mode de préparation a, par la suite, été conservé pour l'étude des différents types d'acidification.

Ainsi, le lait est reconstitué à 12 % (p/p) de matière sèche avec de l'eau distillée, à température ambiante. La poudre de lait écrémé "low heat", utilisée tout au long de ce travail, provient d'un même lot ; elle a été conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité. Ses caractéristiques chimiques sont indiquées dans le tableau II.1 .

tableau II.1: composition chimique moyenne (en g/100g) de la poudre de lait écrémé "low-heat" utilisée dans cette étude. NNC : azote non caséique et NNP : azote non protéique

caractéristiques chimiques de la poudre de lait écrémé	en g/100g de poudre
eau	4,9
Cendres	9
N total	5,51
NNC	1,08
NNP	0,34
Matière grasse	0,97

Après un repos d'une heure, le lait est filtré puis soumis à un traitement thermique intense (90°C-15min) simulant les conditions habituellement employées en technologie des laits fermentés et permettant une bonne destruction des microorganismes.

Après refroidissement, 0.25% (p/v) d'ampicilline est ajouté au lait afin de prévenir un développement microbien. Le lait est alors thermostaté dans un bain d'eau (+/- 0.1°C) au moins 2h avant toute manipulation afin d'atteindre la température souhaitée et de laisser les équilibres salins et protéiques s'accomplir.

2.2 - Acidification du lait

2.2.1- La Glucono-Delta-Lactone (GDL) - Généralités

Traditionnellement, l'acidification du lait est obtenue par fermentation lactique. Dans le cadre de ce travail, la fermentation du lait n'a pu être utilisée car elle aurait posé divers problèmes:

- difficulté de contrôler totalement l'activité bactérienne
- adaptabilité des ferments lactiques à la variation de divers paramètres (température, durée de l'acidification...)
- complexité physico-chimique du système d'étude, inhérente à la présence d'une flore vivante et "envahissante" (>10⁸ cellules /ml de produit).

Outre l'utilisation des ferments lactiques, l'acidification du lait peut également être assurée par l'emploi de divers acides alimentaires (acides acétique, citrique, phosphorique...) (Scott, 1986). La baisse instantanée du pH qu'ils engendrent implique une très bonne homogénéisation dans le lait lors de leur addition. Dans ce cas, la coagulation instantanée du lait est rendue impossible en raison des perturbations mécaniques dès le début de la gélification. Il est également apparu que le produit fini, obtenu par une telle acidification, est souvent de texture hétérogène.

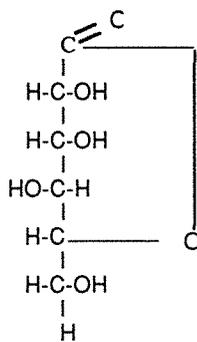
La considération de tous ces critères et la nécessité néanmoins de simuler une

fermentation lactique, a conduit à l'utilisation de la Glucono-Delta-Lactone (GDL) dont la principale caractéristique est une acidification lente du milieu, similaire à celle obtenue par fermentation lactique (Little, 1968; Harwalkar et al., 1977; Trop, 1984). La GDL permet de maîtriser totalement l'acidification du lait dans diverses conditions et d'obtenir ainsi un produit parfaitement régulier et de texture homogène (Mabbit et al., 1956; Deane et Hammond, 1960; Patel et Chakraborty, 1985; Serpelloni et al., 1990).

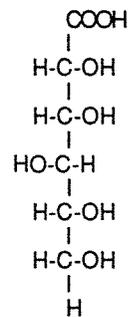
Par ailleurs, la GDL, déjà utilisée dans le domaine alimentaire (correcteurs d'acidité en charcuterie, poudres à lever en pâtisserie, maturation du lait en fromagerie) pourrait connaître, comme aux Etats Unis, un développement très important dans l'industrie laitière pour la fabrication de nouveaux produits (fromages à pâtes molle, persillée, pressée cuite, pressée non cuite ou semi cuite). Il s'avère donc intéressant d'acquérir une meilleure connaissance de son mode d'acidification dans le lait.

2.2.2 - Caractéristiques biochimiques de la GDL

La glucono-delta-lactone (1) est un ester interne de l'acide gluconique (2) obtenue à partir du D-glucose par fermentation oxydative (*Acetobacter suboxydans*).



Glucono-Delta-Lactone (1)



Acide Gluconique (2)

Après dissolution dans un milieu aqueux, la GDL s'hydrolyse lentement jusqu'à l'obtention d'un équilibre entre l'acide gluconique et la glucono-delta-lactone . L'acide gluconique libère des protons et du gluconate dans le milieu selon la réaction résumée comme suit:



Cette libération de protons conduit à une acidification du milieu.

2.2.3 - Procédures d'acidification

2.2.3.1 - Acidification lente par hydrolyse de GDL et acidification instantanée par un acide fort

L'acidification du lait jusqu'à une valeur de pH donnée est obtenue par l'hydrolyse d'une certaine concentration en GDL (tableau II. 2) ou par l'addition de quelques gouttes d'acide lactique concentré. Les valeurs finales de pH, mesurées au bout de 24 heures, sont très reproductibles ($\pm 0,05$ u.pH, $n \geq 3$).

L'influence de la cinétique de l'acidification, utilisée pour atteindre un certain pH, sur la valeur de la turbidité du lait, à ce pH, est ainsi étudiée.

2.2.3.2 - Choix d'une concentration en GDL optimale

L'hydrolyse de la GDL est fortement dépendante de la température. Ainsi, des températures croissantes entraînent une hydrolyse de la GDL plus rapide et le déplacement de l'équilibre lactone-acide gluconique vers la formation d'acide gluconique.

Dans l'échelle de température de 15°C à 42°C, employée au cours de cette étude, l'obtention d'une cinétique d'acidification identique impliquerait l'utilisation aux plus

basses températures de fortes concentrations en GDL et, aux plus hautes, de faibles concentrations en GDL avec, éventuellement, des additions et mélanges successifs de GDL au cours du temps (Visser et al., 1986).

tableau II.2: pH final des laits acidifiés à 15°C, 20°C, 30°C et 42°C après addition d'un certain pourcentage (p/v) de GDL .

% (p/v) GDL	pH final des laits acidifiés aux températures:			
	15°C	20°C	30°C	42°C
0	6.65	6.60	6.60	6.55
0.2	6.33	6.20	6.10	6.00
0.3	6.10	6.00	5.85	5.75
0.4	6.00	5.80	5.70	5.60
0.5	5.80	5.70	5.65	-
0.55	5.70	5.65	5.60	-
0.6	5.60	5.55	5.50	-
0.65	5.55	5.50	5.45	-
0.7	5.50	5.40	5.30	-
0.75	5.45	5.35	5.25	-
0.8	5.40	5.30	-	-
0.9	5.30	5.20	-	-
0.95	5.20	5.15	-	-
1	5.15	5.10	-	-
1.5	4.75	4.70	4.55	4.50

Les essais réalisés ont montré la difficulté de parvenir à un même profil d'hydrolyse avec des températures d'acidification différentes (figures II.3); les vitesses initiales d'hydrolyse de la GDL demeurent différentes , par ailleurs, la concentration en GDL devient trop variable d'une expérience à l'autre.

Aux hautes températures, la coagulation survenant plus rapidement qu'aux basses températures, les additions-mélanges successifs deviennent irréalisables à partir d'une certaine acidité sans perturbation du début de la gélification du lait.

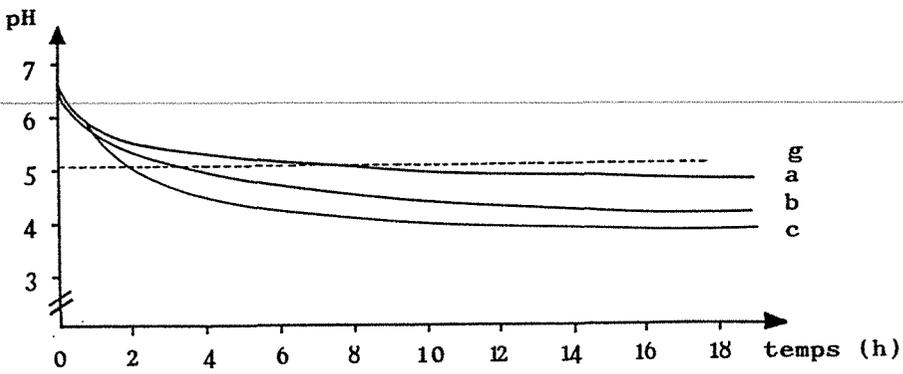


figure A

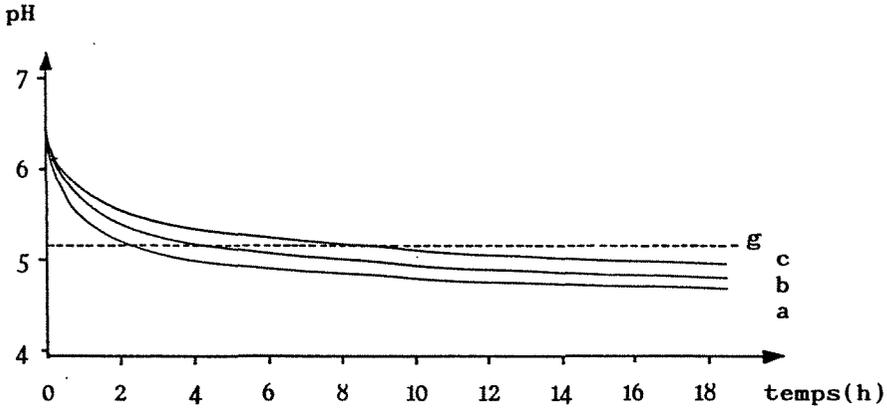


figure B

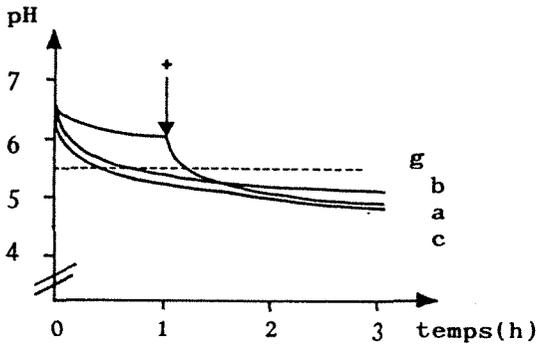


figure C

figures II.3 : cinétiques d'acidification du lait obtenues par différentes concentrations en GDL (% p/v):

A : à 15°C, 1.5 (a), 1.5 + 0.75 (b), 1.5 + 1.5 (c)

B : à 20°C, 1.5 (a), 1.2 (b), 1.0 (c)

C : à 42°C, 0.25 + 1.25 (a), 1.5 (b), 1.75 (c)

Si l'addition de GDL est réalisée en deux fois (signe +), le second ajout de GDL se fait à $t_0 + 1$ heure.

"g" indique le point de gel.

Ainsi, c'est un système d'étude, fondé sur une concentration globale en GDL identique quelle que soit la température, qui a été envisagé. Des essais préliminaires, tenant compte de la réponse turbidimétrique, ont montré qu'une concentration en GDL égale à 1.5% (p/v) répondait à cet ensemble de nécessités. En conséquence, l'étude de l'acidification jusqu'à obtention du coagulum est réalisée en ajoutant initialement 1,5% (p/v) de GDL au lait thermostaté.

A 42°C, une cinétique d'acidification particulière est adoptée : 0.25 % de GDL est initialement additionné au lait puis le complément, soit 1.25% , est rajouté au bout d'une heure.

Cette cinétique rappelle la fermentation symbiotique de *Lactobacillus delbrukii subsp. bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus* dans la fabrication du yaourt (figure II.4).

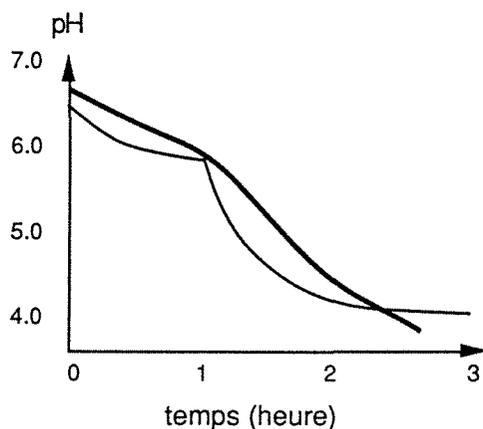


figure II.4 : représentation de deux types d'acidification ; l'un par hydrolyse de GDL - additions au temps t_0 de 0,25% GDL et au temps $t_0 + 1$ heure de 1,25%GDL- (—) et l'autre par fermentation lactique (—). D'après Visser et al. (1986)

Déjà utilisée par Visser et al.(1986), une telle cinétique d'acidification permet d'acquérir des informations sur les transformations physico-chimiques du lait provoquées par l'acidification lors de la fabrication du yaourt.

2.3 - Suivi de l'acidification du lait jusqu'à la formation du gel

Au cours de l'acidification du lait par hydrolyse de GDL, trois mesures physico-chimiques sont effectuées en parallèle et enregistrées graphiquement au cours du temps par un enregistreur quatre voies (Linseis) : le pH, la turbidité et la rigidité (figure II.5).

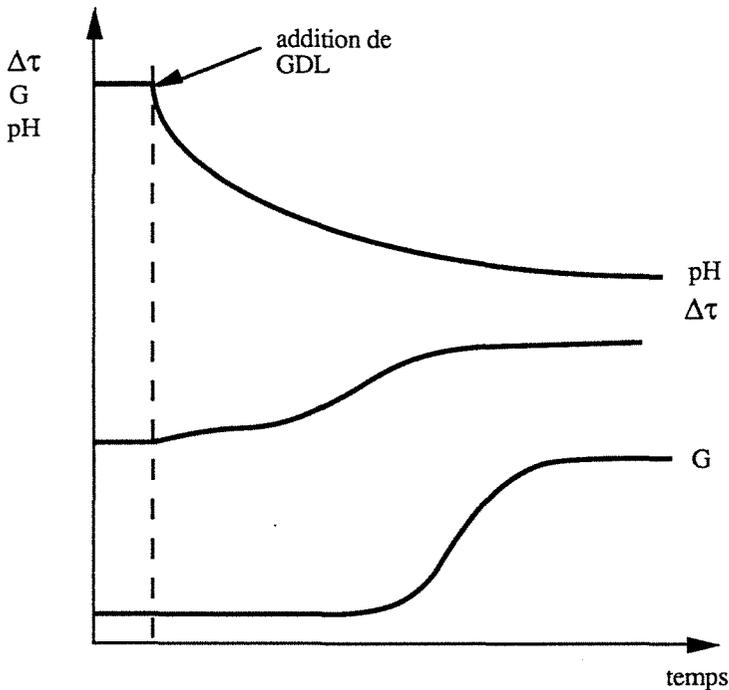


figure II.5 : graphe caractéristique superposant les enregistrements du pH, de la turbidité ($\Delta\tau$) et de la rigidité (G) du lait en cours d'acidification

2.3.1 - Mesure du pH

Le pH du lait est mesuré à une précision de 0.02 unité de pH avec un pHmètre Tacussel.

2.3.2 - Mesure turbidimétrique par réflexion de la lumière

L'évolution des propriétés optiques du lait avec l'acidification a été suivie grâce à un turbidimètre (ANALITE) portable modèle NTM Novasina (Zürich, Suisse) muni d'une sonde immergeable.

L'adaptation de cette méthode pour l'étude de la coagulation présure du lait a été effectuée par Hardy et Scher (1986). Le même dispositif expérimental est utilisé pour l'étude de l'acidification par hydrolyse de GDL.

2.3.2.1- Principe de la méthode turbidimétrique

principe

La méthode turbidimétrique est basée sur la réflexion d'un rayonnement monochromatique dans le proche IR: le rayon incident (860nm) transmis dans le lait par l'intermédiaire de fibres optiques est réfléchi par les particules en suspension dans le fluide porteur. Le rayonnement réfléchi à 180° est capté par un second réseau de fibres optiques jusqu'à un récepteur électronique amplifiant et transformant le signal reçu en unité néphélométrique de turbidité (NTU).

Le terme "turbidité" implique que la lumière traverse l'échantillon; il représente alors la différence entre le rayon incident et le rayon émis après passage de la solution.

La méthode utilisée correspondrait donc plutôt à une mesure optique par réflexion de la lumière. Cependant par souci de clarté, les termes de turbidité et de méthode turbidimétrique seront conservés tels qu'ils ont été employés par Hardy et Scher (1986).

protocole

La sonde turbidimétrique est immergée horizontalement dans une cuve thermostatée à $\pm 0.1^\circ\text{C}$ contenant le lait, elle-même posée sur un agitateur magnétique assurant une répartition homogène de la GDL au moment de son addition. La cuve a un volume de 600 ml, le volume de lait ajouté est fixé à 400 ml; la sonde est placée à environ 10 cm en dessous de la surface du liquide.

2.3.2.2 - Exemple de profil acido-turbidimétrique

Afin d'éliminer l'erreur induite par une différence de turbidité initiale du lait, la variation de la turbidité, $\Delta\tau$, au cours du temps a été calculée selon ;

$$\Delta\tau = \tau - \tau_0 \quad (2.1)$$

$\Delta\tau$ représente la différence entre la turbidité, τ , au temps t , et la turbidité initiale, τ_0 , du lait avant addition de GDL.

Pour une meilleure compréhension des profils turbidimétriques, il est apparu plus judicieux de les représenter en fonction du pH du milieu plutôt qu'en fonction du temps. Ces diagrammes, $\Delta\tau = f(\text{pH})$, ont ainsi été dénommés "acido-turbidimétriques". Les points de variation de la turbidité, $\Delta\tau$, et du pH correspondant ont été prélevés sur les enregistrements à un pas variable selon la température et le moment de l'acidification. L'allure d'un profil acido-turbidimétrique caractéristique est donné dans la figure II.6.

Chaque profil acido-turbidimétrique représente la moyenne d'au moins 10 expériences (coefficient de variation $\leq 6\%$).

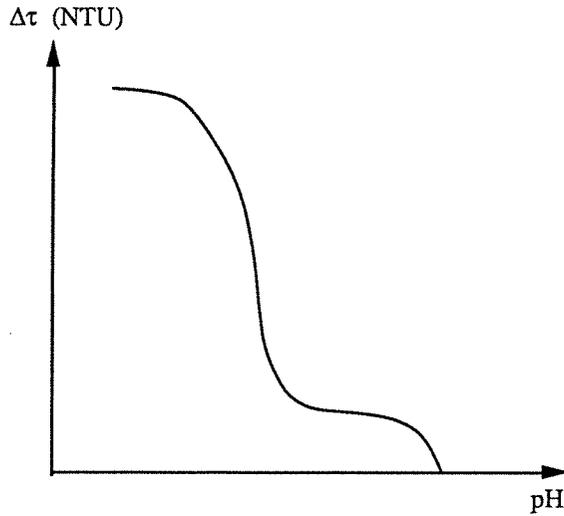


figure II.6: allure d'un profil acido-turbidimétrique

2.3.2.3 - Validation des profils acido-turbidimétriques

La méthode turbidimétrique étant encore très peu utilisée, il a semblé intéressant de la comparer avec une méthode de référence, fonctionnant selon un même principe, la spectrophotométrie.

Dans les deux cas, seule une fraction de la lumière diffusée par les particules est captée; la lumière transmise en spectrophotométrie et la lumière réfléchie en turbidimétrie.

La première technique implique une concentration faible en particules diffusantes alors que la seconde nécessite une concentration élevée.

a - Dilution du lait et acidification

L'utilisation d'une technique spectrophotométrique implique que les solutions à

analyser soient translucides. Le tampon de Jenness et Koops (1962), enrichi en lactose, est ainsi choisi comme milieu de dilution du lait grâce à sa composition ionique et sa pression osmotique proches de celle du lactosérum (tableau II. 3). Le pH de ce milieu est ajusté à pH 6,60 par KOH 1N.

tableau II.3 : composition du milieu de Jenness et Koops (1962) enrichi en lactose

composants	quantité en g/l
KH_2PO_4	1,58
K_3 citrate, H_2O	0,51
Na_3 citrate, 5 H_2O	2,12
K_2SO_4	0,18
CaCl_2 , 2 H_2O	1,32
Mg_3 citrate, H_2O	0,5
K_2CO_3	0,3
KCl	1,08
lactose anhydre	50

Pour se rapprocher des conditions opératoires de Horne (1987) dans le but d'une confrontation ultérieure des résultats dans le chapitre IV, une dilution du lait au 1/250ème est choisie. De même, l'agrégation micellaire est réalisée en vingt minutes environ par hydrolyse de 2,5% (p/v) de glucono-delta-lactone à 20°C, à 30°C et à 42°C.

b - Mesure de turbidité par spectrophotométrie

Les mesures de turbidité par transmission de la lumière sont réalisées par un spectrophotomètre Beckman DU-170, dans la région spectrale 400 à 860 nm.

Le zéro spectrophotométrique est réalisé sur le tampon de Jenness et Koops

thermostaté à la température de l'acidification. Compte tenu du délai nécessaire à l'homogénéisation de la GDL et à la mise en place de la cuve dans le spectrophotomètre, la première lecture de turbidité est réalisée à $t_0 + 1$ min (l'addition de GDL étant réalisée à t_0).

Etant donné que l'acidification est responsable des transformations physicochimiques du milieu, les graphiques turbidimétriques en fonction du temps sont rapportés au pH selon le même principe de construction des profils acido-turbidimétriques que précédemment.

2.3.3 - Mise en évidence du point de floculation du lait et suivi du raffermissment du gel

Un gélographe est utilisé pour mettre en évidence le point de floculation du lait et assurer un contrôle continu de la cinétique de raffermissment du gel.

principe

La sonde du gélographe, constituée d'une lame métallique rectangulaire ($L = 15$ mm, $l = 6$ mm), est immergée dans le liquide. Elle est animée d'un mouvement pendulaire de très faible amplitude (< 2 mm) donnant naissance à une tension induite. Cette amplitude et donc, la tension induite, est fonction de la résistance qu'offre le milieu. Le signal obtenu est amplifié puis envoyé sur un millivoltmètre.

La figure II.7 représente la courbe "enveloppe" de l'enregistrement de la variation du signal en fonction du temps, après addition de GDL.

Pour des produits newtoniens, le fabricant donne une correspondance entre les mesures obtenues en milli-G (mG) et la viscosité du produit en mPa.s, 1 mG étant égal à 1 mPa.s à 25°C.

Cependant au voisinage de la gélification et au-delà, lors du raffermissment du gel, les propriétés initialement newtoniennes du lait deviennent viscoélastiques et rendent

ainsi impossible toute équivalence entre la mesure effectuée et la viscosité réelle du produit. Le terme de "rigidité" a donc été choisi pour représenter les mesures réalisées au cours de l'acidification du lait . Les unités "mG" utilisées sont donc arbitraires.

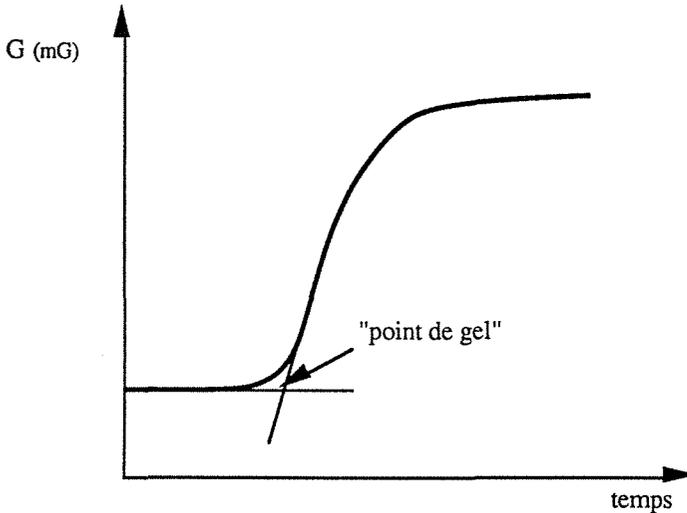


figure II.7 : Profil de prise en gel et de raffermissement du coagulum en fonction du temps et détermination graphique du "point de gel"

point de gel

Le point de gel est déterminé sur un enregistrement de la rigidité en fonction du temps (figure II.7) à l'intersection des deux tangentes tracées dans la zone de transition sol-gel du lait.

Il peut être remarqué que la notion de point de gel est assez floue et qu'elle varie selon la sensibilité de la méthode employée. Dans notre cas, ce point remarquable correspondrait au début de formation d'un réseau caséique emplissant tout le volume de la cuve. Il se distinguerait ainsi du point de floculation, déterminé par la méthode visuelle de Berridge, qui met en évidence la formation d'agrégats caséiques de l'ordre de 0,2 mm de diamètre.

3 - Résultats et discussion

3.1 - Optimisation de la méthode turbidimétrique appliquée au suivi de l'acidification du lait

L'hydrolyse de la GDL étant dépendante de la température, les vitesses d'acidification du lait ne peuvent être identiques dans toute la gamme de température étudiée.

L'influence de la vitesse de l'acidification sur les profils turbidimétriques est donc abordée dans un premier temps. Le but est de définir s'il est possible d'obtenir un profil turbidimétrique caractéristique de l'acidification du lait à une température donnée, quelle que soit la vitesse de l'acidification utilisée.

La stabilité dans le temps de la turbidité du lait, à un pH défini, est ensuite abordée.

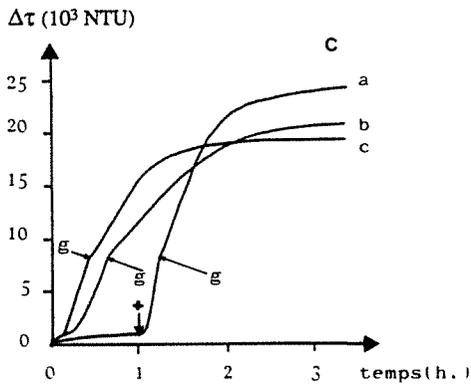
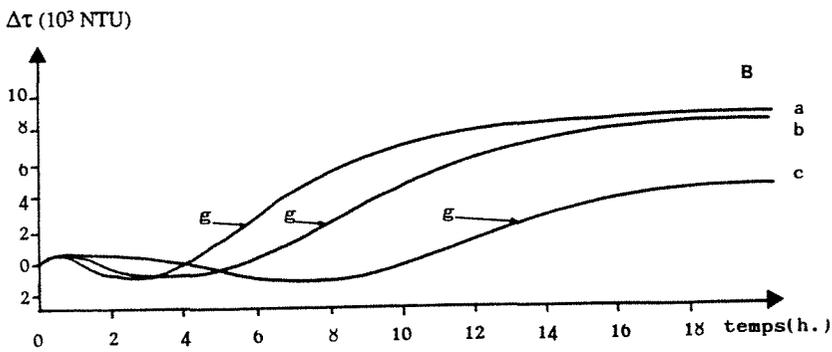
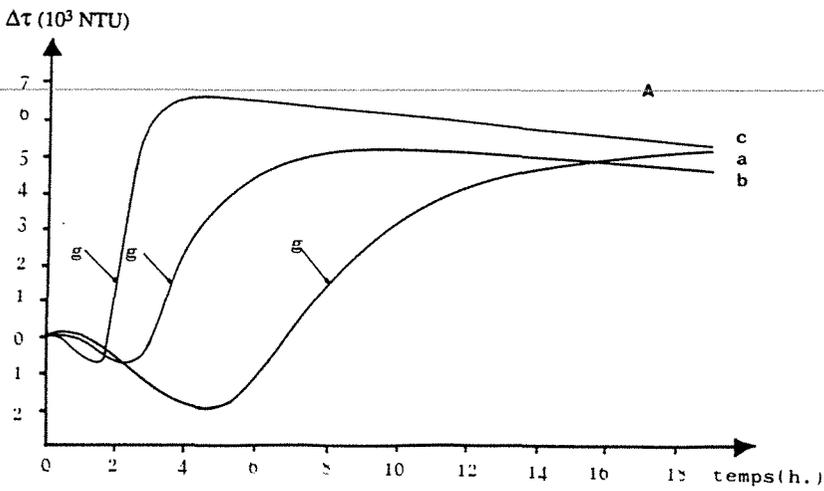
3.1.1 - Profils turbidimétriques, $\Delta\tau = f(\text{temps})$

Les figures II.8 montrent l'évolution de $\Delta\tau$ en fonction du temps de l'acidification. Globalement, ces profils turbidimétriques rappellent ceux de la coagulation présure du lait avec une phase initiale, une phase d'ascension du signal (correspondant à l'agrégation des micelles, à la prise en gel) et enfin, l'atteinte d'un palier (fig. II.2).

Pour une température donnée, le profil turbidimétrique varie selon la concentration en GDL utilisée:

- les amplitudes du signal turbidimétrique sont modifiées
- le signal est déplacé vers des temps plus longs pour une cinétique d'acidification plus lente

Il est habituel de représenter des profils d'agrégation de monomères caséiques ou des profils de coagulation (présure ou thermique...) du lait en fonction du temps.



figures II.8 : profils types de la variation de $\Delta\tau$ avec le temps de l'acidification ;

A : à 15°C, 1.5 (a), 1.5 + 0.75 (b), 1.5 + 1.5 (c)

B : à 20°C, 1.5 (a), 1.2 (b), 1.0 (c)

C : à 42°C, 0.25 + 1.25 (a), 1.5 (b), 1.75 (c)

Si l'addition de GDL est réalisée en deux fois (signe +), le second ajout de GDL se fait à $t_0 + 1$ heure.

"g" indique le point de "gel".

Dans le cas de l'acidification du lait, il paraît plus judicieux de tenir compte du paramètre "pH" qui est à l'origine des modifications physicochimiques du lait et donc de la variation du signal turbidimétrique.

3.1.2 - Profils acido-turbidimétriques, $\Delta\tau = f(\text{pH})$

Afin d'éliminer la variable "temps" et de permettre une analyse comparative des profils turbidimétriques obtenus dans différentes conditions d'acidification, les diagrammes représentant la variation de la turbidité, $\Delta\tau$, en fonction du pH sont élaborés (figures II.9).

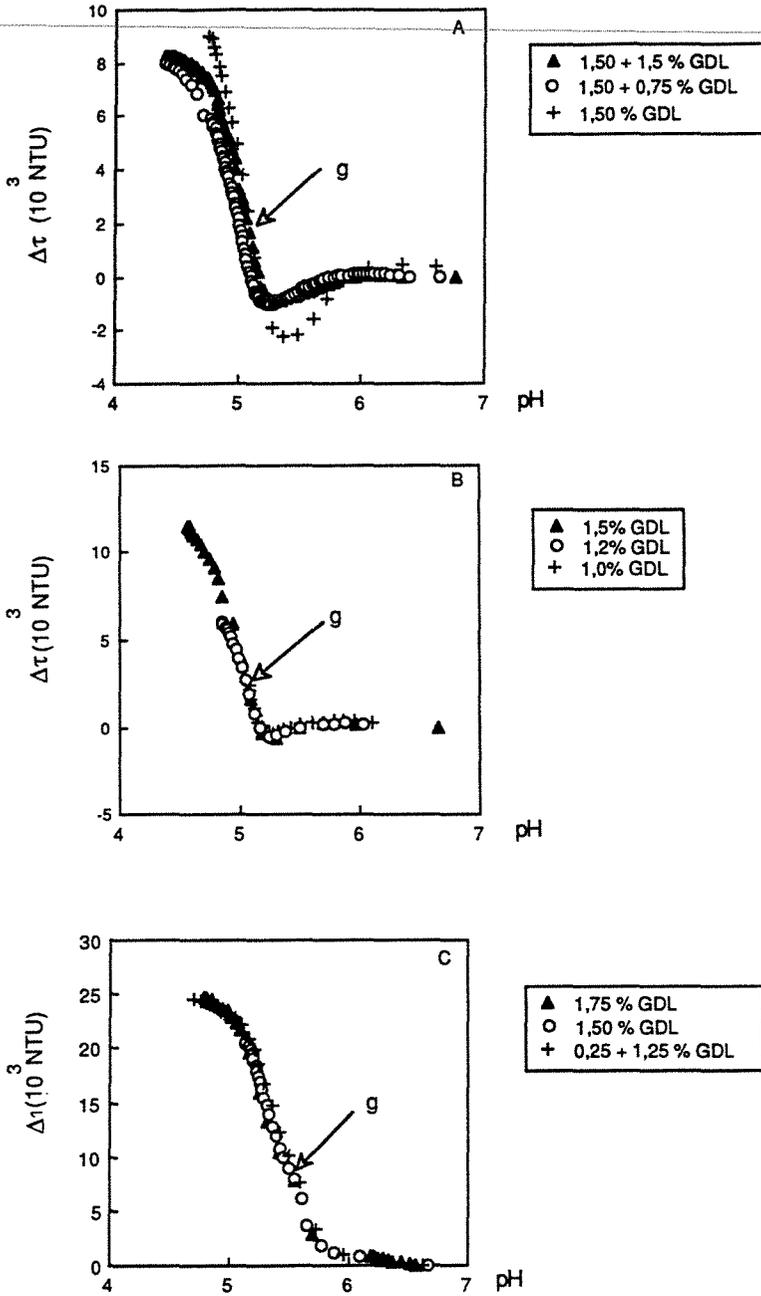
3.1.2.1 - Acidification à 15°C

A 15°C, la vitesse de l'acidification influence fortement l'allure du profil turbidimétrique (fig. II. 9. A).

La diminution significative de $\Delta\tau$ dans la zone entre pH 6 et pH 5, observée nettement pour une acidification à une concentration inférieure ou égale à 1.5% (p/v) en GDL, tend à disparaître pour des teneurs en GDL supérieures.

La concentration en GDL conditionnant la cinétique de l'acidification, il semble que la chute de la turbidité - conséquence d'une modification des propriétés optiques du milieu - requiert, pour être maximale, des temps d'acidification suffisamment longs. Un tel phénomène nécessiterait donc un certain temps pour se réaliser. L'hypothèse d'un processus physicochimique lent peut être envisagée et sera développée ultérieurement dans le chapitre III.

Le choix d'une concentration en GDL inférieure ou égale à 1.5% (p/v) paraît indispensable pour ne pas perdre d'informations sur l'acidification du lait à 15°C.



figures II.9 : profil $\Delta\tau = f(\text{pH})$ construits à partir des profils $\Delta\tau = f(\text{temps})$ et $\text{pH} = f(\text{temps})$:
à 15°C (A), à 20°C (B) et à 42°C (C).

Les quantités de GDL utilisées (en %) sont indiquées à côté de chaque graphe.

3.1.2.2 - Acidification à 20°C et à 42°C :

L'observation globale des profils $\Delta\tau = f(\text{pH})$ à 20°C et à 42°C montre que, dans les limites étudiées, la vitesse de l'acidification (fig.II.3) n'a pas d'influence sur une grande partie du profil turbidimétrique avant la gélification (phase colloïdale) (fig. II.9.B et C).

Autrement dit, dans cette zone, une valeur définie de la turbidité du lait à 20°C ou à 42°C est caractéristique du pH correspondant et peut être considérée comme représentative d'un état physicochimique particulier du lait.

A 20°C, une diminution de $\Delta\tau$ est mise en évidence, comme à 15°C, entre pH 6 et pH 5 mais l'amplitude est moindre (fig.II.9.B). Pour des cinétiques d'acidification identiques, à 15°C (1.5% GDL) et à 20°C (1% GDL), la différence d'amplitude de $\Delta\tau$ implique que le facteur température est prépondérant.

Au-delà du point de gélification, les profils turbidimétriques deviennent parfois dissemblables et l'on peut supposer que la structure fragile du coagulum formé est alors plus ou moins altérée. Ainsi, l'atteinte d'un $\Delta\tau$ maximum correspondrait à la formation d'un gel occupant tout le volume de la cuve puis, avec le temps, l'apparition d'un phénomène de synérèse résulterait en une évolution de la turbidité plus ou moins irrégulière.

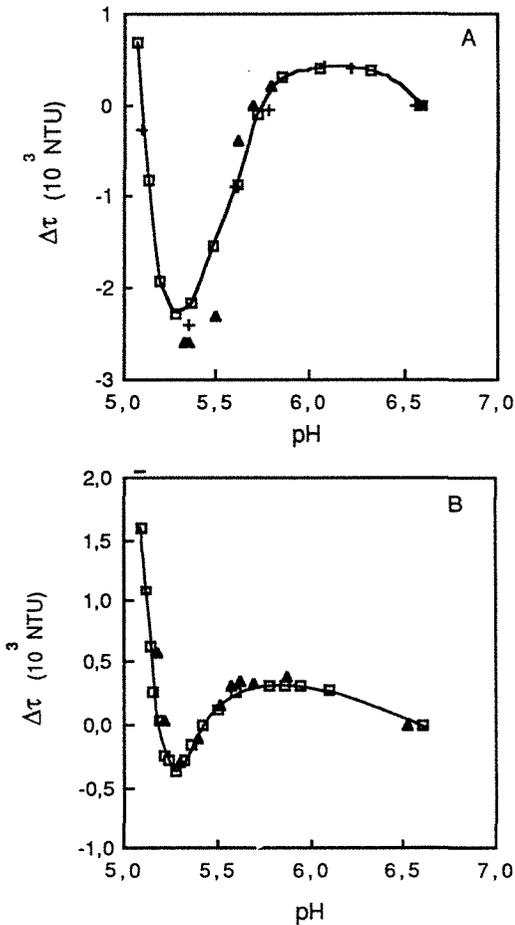
3.1.2.3 - Conclusion

Les résultats turbidimétriques obtenus mettent en évidence que cette méthode est tout à fait adaptée à l'étude de l'acidification du lait.

Jusqu'à la gélification, la vitesse de l'acidification n'influe pas les profils acido-turbidimétriques obtenus à 20°C et à 42°C mais, par contre, engendre la variation de ceux élaborés à 15°C. Comme il a été remarqué précédemment, le choix d'une concentration en GDL égale à 1,5% (p/v) permet de ne pas perdre d'informations sur l'acidification du lait à 15°C. Cette concentration est donc conservée pour toutes les températures d'acidification afin d'avoir un système d'étude identique.

3.1.3 - Stabilité de la turbidité du lait à un pH donné

On cherche à tester l'hypothèse selon laquelle une valeur ponctuelle de la turbidité, dans la phase colloïdale de l'acidification, illustre un état physicochimique caractéristique du lait à une acidité pH donnée.



figures II.10 : comparaison du profil acido-turbidimétrique correspondant à l'acidification du lait par hydrolyse de 1.5% GDL (□), avec les valeurs de turbidité, $\Delta\tau$, d'un lait acidifié en 24h à un pH défini par hydrolyse de GDL (+) ou par l'acide lactique (▲); à 15°C (A) et à 20°C (B).

La comparaison des valeurs de $\Delta\tau$ atteintes au bout de 24 heures par une acidification très lente (GDL) ou instantanée (addition d'acide lactique) et de celles relevées au cours de l'acidification du lait par hydrolyse de 1.5% (p/v) de GDL est portée en fonction du pH du lait dans les figures II.10.

La similitude des profils des figures II.10 montre qu'une valeur de $\Delta\tau$ instantanée, mesurée au cours de l'acidification du lait par hydrolyse de 1.5% (p/v) de GDL, correspond, dans d'autres conditions d'acidification, à une valeur de $\Delta\tau$ constante dans le temps et caractéristique d'une valeur de pH.

Ceci ouvre la voie à une étude ponctuelle des profils $\Delta\tau = f(\text{pH})$, sur des substrats stables avec le temps et démontre encore la validité de la méthode turbidimétrique telle qu'elle est employée pour 1.5% (p/v) en GDL.

A 15°C, un léger déplacement des courbes d'acidification en 24 heures vers des valeurs de $\Delta\tau$ moindres peut être noté. Le facteur temps est probablement à l'origine de ce phénomène qui sera détaillé dans le chapitre III.

3.2 - Elaboration de diagrammes acido-turbidimétriques caractéristiques d'une température d'acidification

L'intérêt de la création des diagrammes $\Delta\tau = f(\text{pH})$ a déjà été démontré. Ils permettent, en effet, d'éliminer la variable "temps" et de mettre en évidence l'influence directe du pH sur la turbidité du milieu.

Dans ce paragraphe, les différents profils aboutissant à l'élaboration de ces diagrammes seront analysés dans le cas d'une acidification par hydrolyse de GDL à 1.5% (p/v) - un système d'étude désormais utilisé - aux températures de 15°C, 20°C, 30°C et 42°C.

3.2.1 - Cinétiques d'acidification et de gélification

Les cinétiques d'acidification et de gélification du lait par hydrolyse de 1.5% (p/v) de GDL sont présentées dans les figures II.11.

Les courbes de gélification permettent de déterminer le pH de gélification du lait et de suivre l'évolution du raffermissement du gel .

On peut noter que la prise en gel survient à un pH d'autant plus élevé que la température est élevée : pH 5,05 à 15°C, pH 5,15 à 20°C, pH 5,25 à 25°C, pH 5,35 à 30°C et pH 5,50 à 42°C.

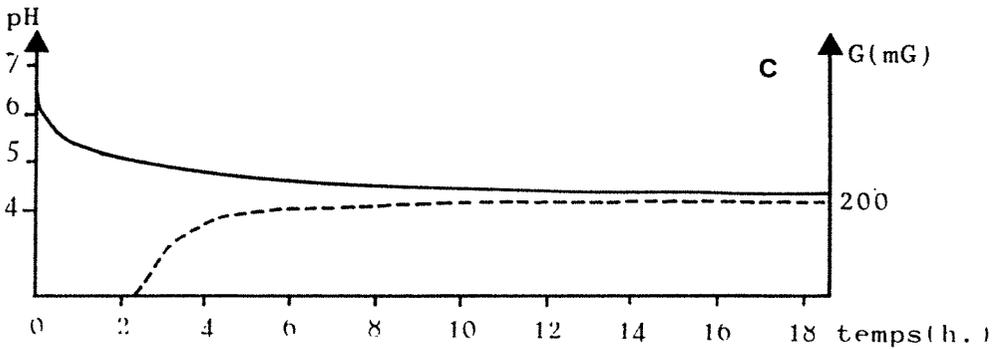
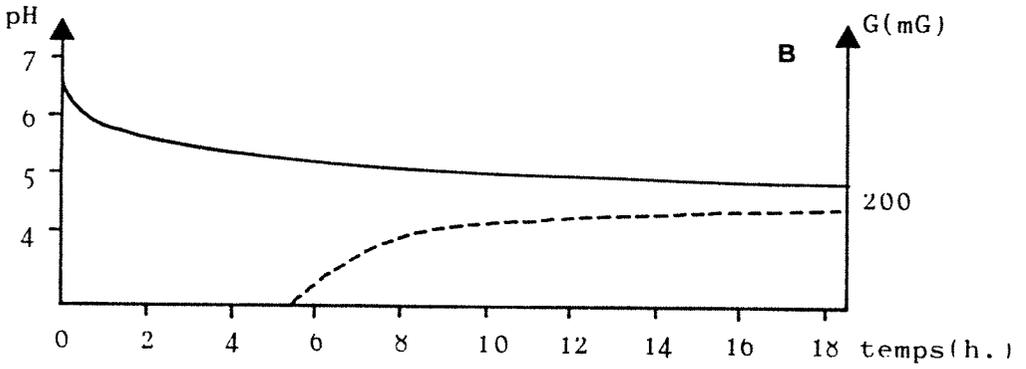
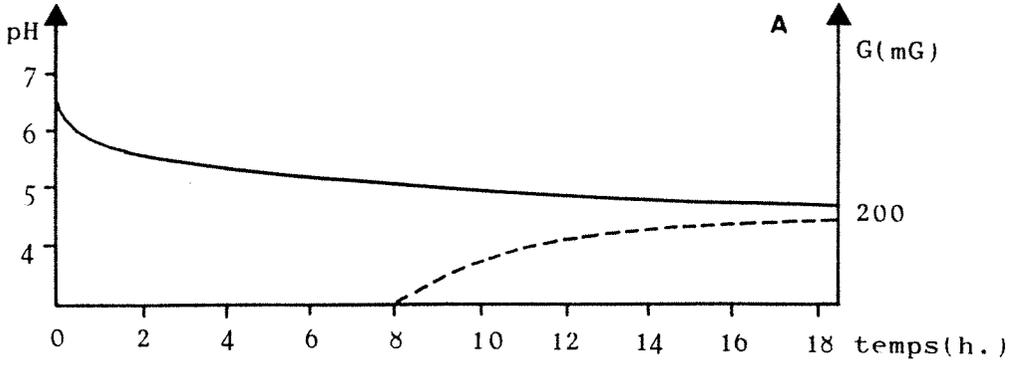
Le développement des propriétés viscoélastiques du gel en formation est ensuite mis en évidence par l'augmentation progressive de la rigidité, G. D'après les travaux de Roefs (1986), l'atteinte d'un palier dans la courbe de rigidité correspondrait plutôt à une "pseudo- stabilisation" macroscopique du gel. En effet, les mesures rhéologiques dynamiques qu'il a effectuées de coagulum en formation à des températures de 10°C à 50°C, montrent une évolution microscopique de la structure du gel durant plus de 27 heures après la prise en gel. Au bout de 27 heures, l'état métastable du coagulum est atteint, excepté à 50°C, température à laquelle le coagulum continue d'évoluer durant plus de 7 jours. Même si les valeurs maximales de rigidité obtenues sont difficilement comparables , on peut observer qu'elles se situent dans une même zone de grandeur, autour de 200 mG.

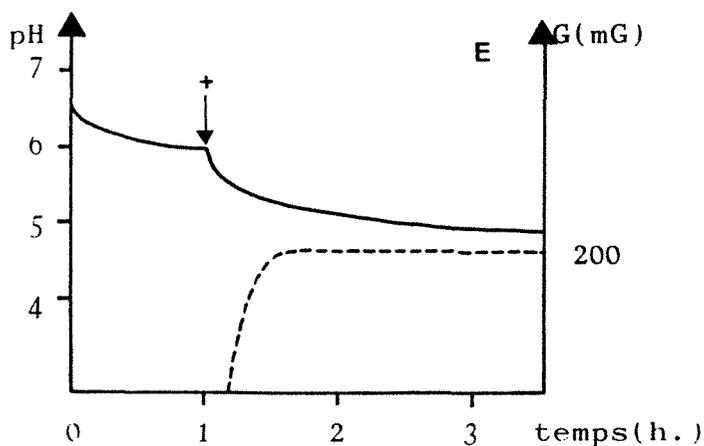
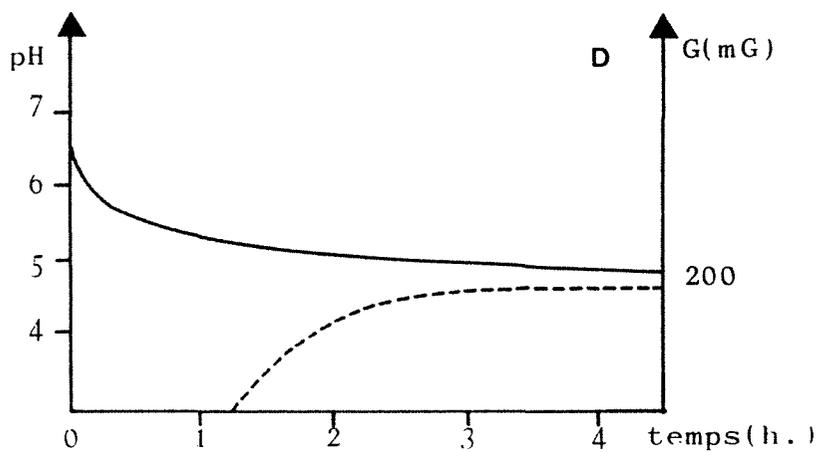
3.2.2 - Profils $\Delta\tau = f(\text{temps})$

L'évolution de $\Delta\tau$ au cours du temps de l'acidification est mise en évidence dans les figures II.12 aux différentes températures étudiées. Le début de gélification du lait est indiqué sur chacun des graphes.

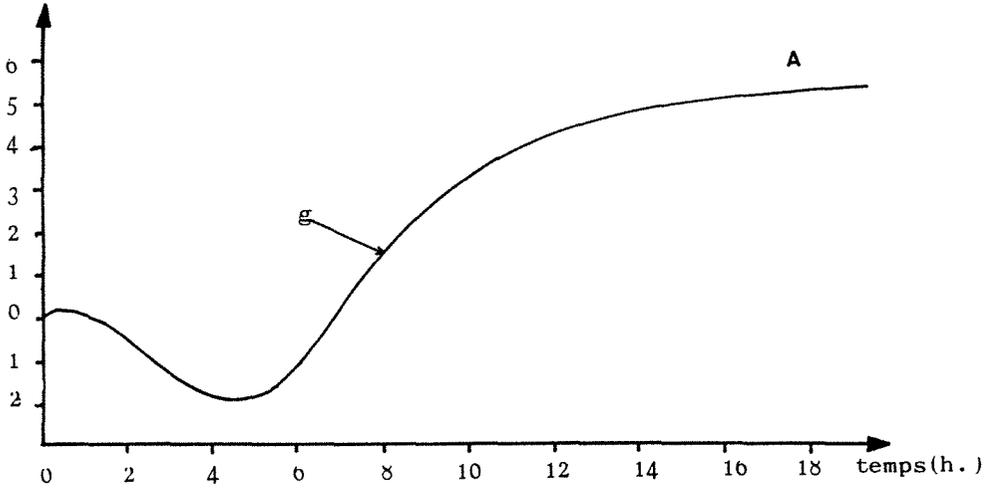
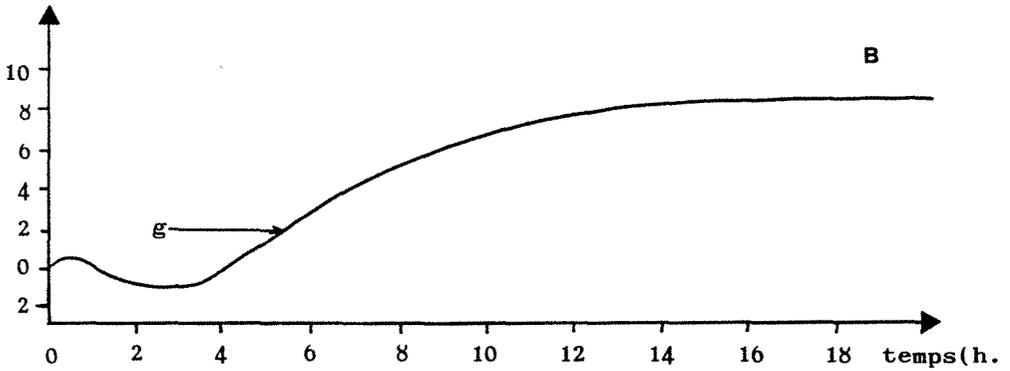
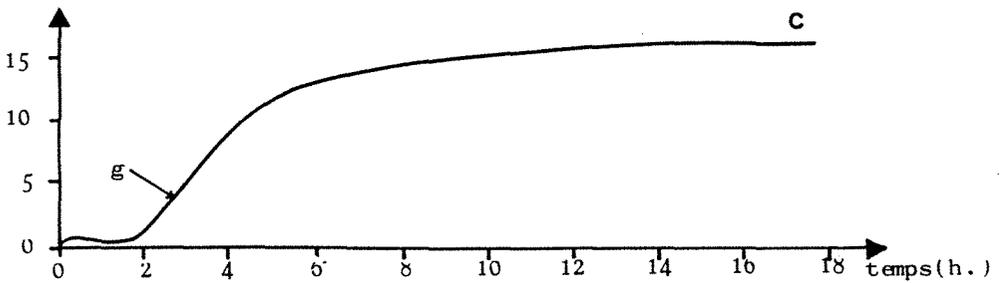
Quatre phases principales peuvent être distinguées de l'observation globale des profils turbidimétriques:

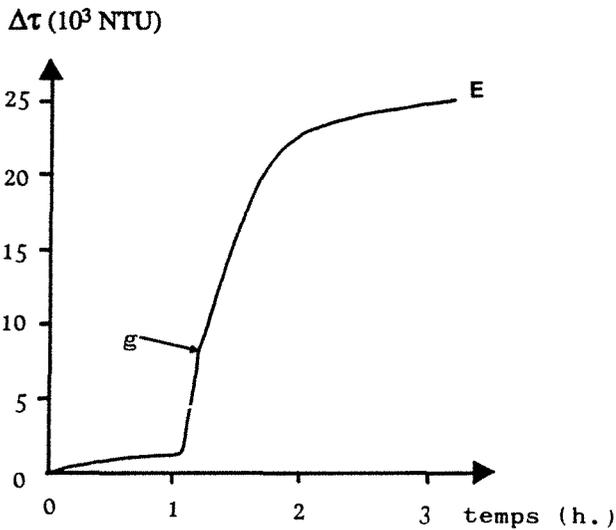
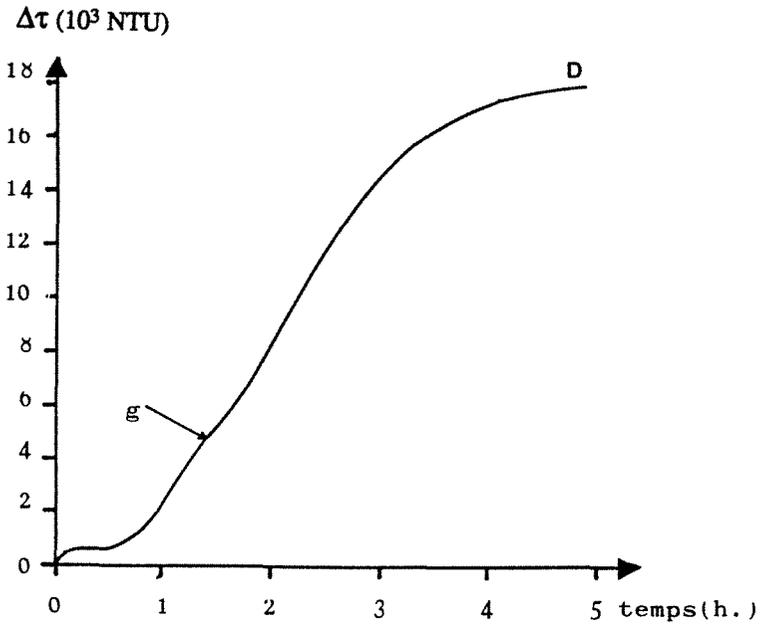
- phase I: phase initiale durant laquelle $\Delta\tau$ s'accroît de 10% environ par rapport à $\Delta\tau_{\max}$
- phase I': diminution de $\Delta\tau$, observée à 15°C, 20°C et 25°C et amplifiée avec les basses températures ($\sim 30\%$ par rapport à $\Delta\tau_{\max}$ à 15°C)





figures II.11 : cinétiques d'acidification (—) et de gélification (-----) du lait par l'addition initiale de 1.5% de GDL; à 15°C (A), à 20°C (B), à 25°C (C) et à 30°C (D). A 42°C (E), la GDL est ajoutée au lait en deux fois: 0.25% à t_0 et 1.25% à $t_0 + 1h$.

$\Delta\tau$ (10^3 NTU) $\Delta\tau$ (10^3 NTU) $\Delta\tau$ (10^3 NTU)



figures II.12 : variation de $\Delta\tau$ en fonction du temps de l'acidification; à 15°C (A), à 20°C (B), à 25°C (C), à 30°C (D) et à 42°C (E). Le point, g, indique le point de gel

- phase II: augmentation du signal turbidimétrique avant la gélification
- phase III: évolution de la turbidité avec la gélification du lait

Une analyse détaillée des profils met en évidence les différences de comportement turbidimétrique du lait acidifié avec la température.

A 15°C et à 20°C (fig. II.12. A et B), on observe une diminution significative de la turbidité suivie d'une augmentation sigmoïdale régulière du signal jusqu'à l'atteinte d'un palier.

L'amplitude de la chute de la turbidité est d'autant plus importante que la température de l'acidification est basse.

Le signal turbidimétrique à 30°C et à 42°C (fig. II.12 D et E), ne diminue pas comme c'était le cas à 15°C et à 20°C et se distingue par un épaulement coïncidant avec le point de gélification.

L'acidification à 25°C (fig. II.12 C) montre une légère diminution de la turbidité et un léger épaulement du signal au point de gélification. Elle semble être à l'interface entre les deux types de courbes analysées précédemment et met en évidence une évolution logique des événements turbidimétriques avec la température .

3.2.3 - Profils acido-turbidimétriques, $\Delta\tau = f(\text{pH})$

La turbidité dépendant des transformations physicochimiques du lait engendrées par l'acidification, les profils turbidimétriques précédents sont portés en fonction du pH du milieu (figures II.13).

Le tableau II.4 (p.84) met en évidence les valeurs remarquables de pH correspondant à une variation caractéristique du signal turbidimétrique.

Ainsi pH_0 , pH_h et pH_g représentent respectivement le pH initial du lait, le pH

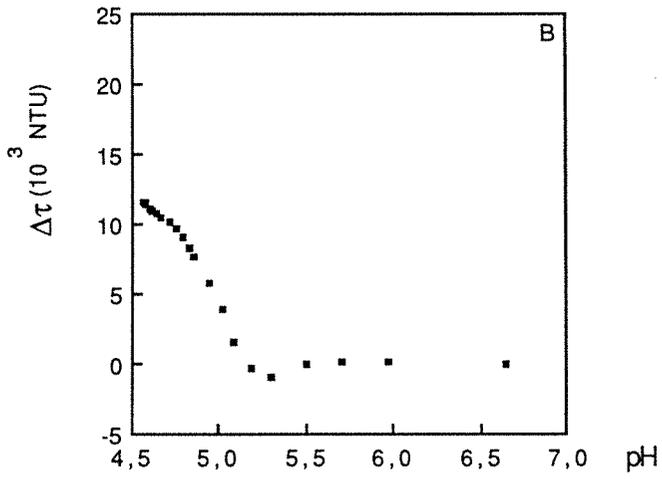
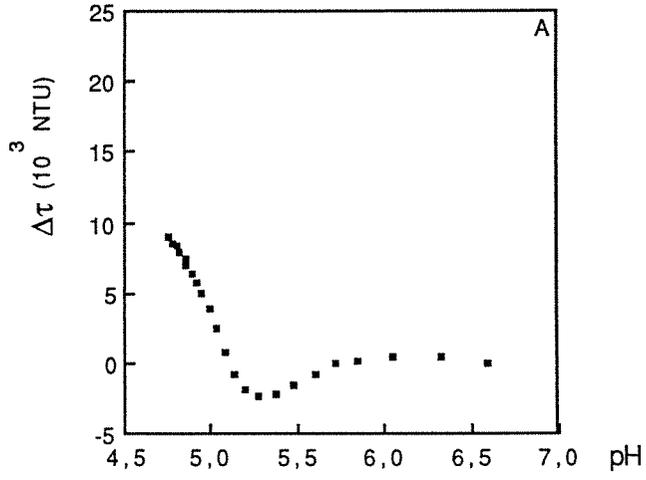
minimum avant la hausse finale du signal turbidimétrique et le pH au point de gel.

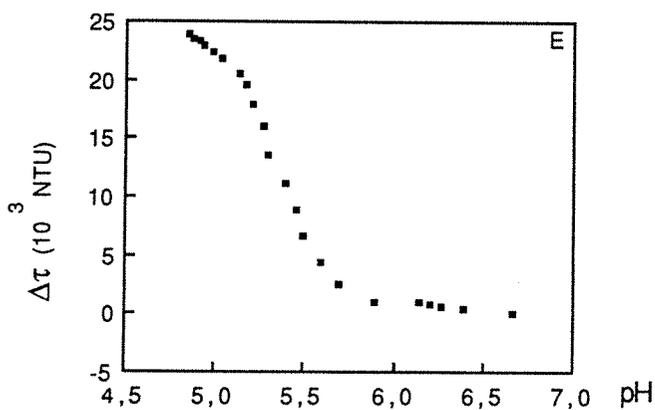
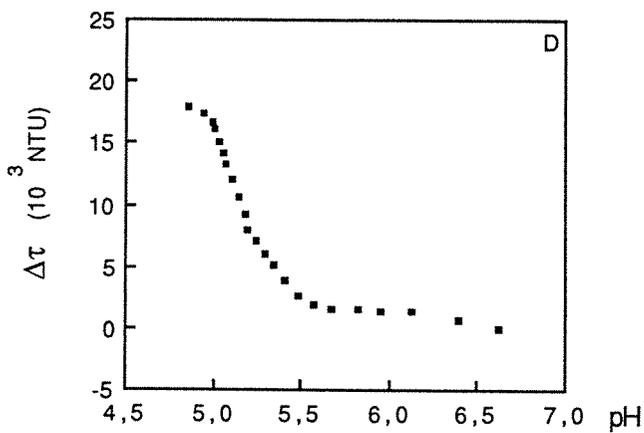
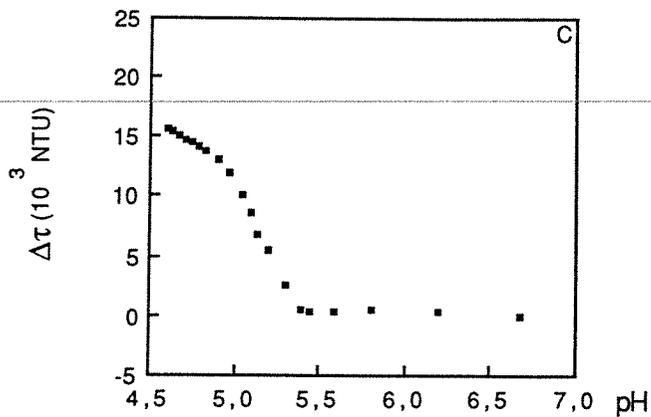
La diminution de $\Delta\tau$ observée à 15°C, à 20°C et de façon fugace à 25°C est initiée à pH_d . A pH_{τ_0} , la valeur de $\Delta\tau$ redevient égale à la turbidité initiale du lait.

tableau II.4 : valeurs de pH correspondant aux variations caractéristiques de $\Delta\tau$ avec l'acidification du lait à 15°C, 20°C, 25°C, 30°C et 42°C.

pH_0 , pH_h et pH_g représentent respectivement le pH initial du lait, le pH annonçant la hausse finale de turbidité et le pH au point de gélification du lait. La diminution de turbidité observée à 15°C, 20°C et 25°C est définie par deux valeurs de pH supplémentaires: pH_d et pH_{τ_0} .

Température(°C)	pH_0	pH_d	pH_{τ_0}	pH_h	pH_g
15	6,65	5,90	5,75	5,30	5,05
20	6,60	5,75	5,55	5,30	5,15
25	6,60	5,85	-	5,50	5,25
30	6,60	-	-	5,55	5,35
42	6,55	-	-	5,70	5,50





figures II.13: variation de $\Delta\tau$ en fonction du pH du milieu : à 15°C (A), à 20°C (B), à 25°C (C), à 30°C (D) et à 42°C (E).

3.2.4 - Analyse d'un point remarquable : le point de gel

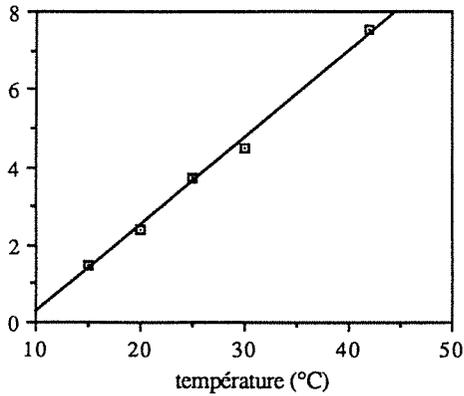
Les valeurs de la turbidité et du pH du lait au point de gel sont indiquées dans le tableau II.5 en fonction de la température de l'acidification.

Comme de nombreux travaux l'ont déjà montré, le pH du début de la gélification du lait est d'autant moins acide que la température de l'acidification est élevée. En effet, la conjugaison des deux facteurs, réduction du pH du lait (neutralisation des charges micellaires) et températures élevées (interactions hydrophobes et agitation thermique accrues) entraîne une déstabilisation des micelles de caséine, d'autant plus facile et plus rapide.

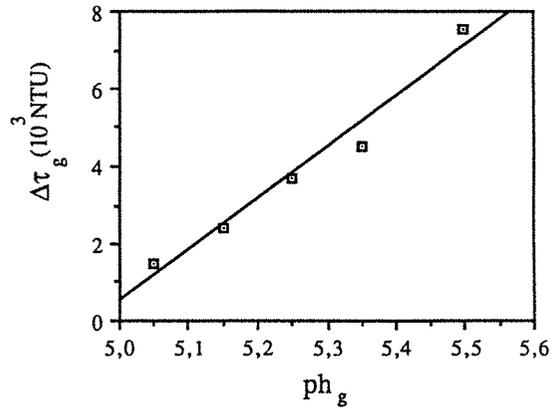
tableau II.5 : turbidité initiale du lait (τ_0) et valeurs du pH et de $\Delta\tau$ du lait au point de gel (g) en fonction de la température de l'acidification.

t (°C)	$\tau_0(10^3 \text{ NTU})$	pH _g	$\Delta\tau_g (10^3 \text{ NTU})$
42	10,80	5,50	7,55
30	10,55	5,35	4,50
25	10,35	5,25	3,70
20	10,03	5,15	2,40
15	9,55	5,05	1,50
coefficient de variation	≤6%	≤1%	≤6%

Une relation linéaire est mise en évidence entre la température de l'acidification et la turbidité ($\Delta\tau$) du lait au point de gel ainsi qu'entre le pH au point de gel et la turbidité correspondante (figures II.14) . Plus la température de l'acidification est basse, plus la turbidité du lait au point de gélification est faible.



(A)



(B)

figures II.14 : mise en évidence des relations linéaires existant entre $\Delta\tau_g$ au point de gélification du lait avec la température (A) et le pH (B) correspondants.

La turbidité par réflexion de la lumière dépend de la taille, du nombre ou des propriétés optiques des particules colloïdales en suspension. Dans un milieu plus organisé (type réseau), la turbidité reflète les propriétés optiques de celui-ci; ainsi plus le réseau sera dense, plus la turbidité par réflexion sera élevée.

Entre 15°C et 42°C, la turbidité (τ) initiale du lait varie peu: de $9,55 \cdot 10^3$ à $10,8 \cdot 10^3$ NTU. Au point de gel; par contre, les différences sont bien plus marquées: de $11 \cdot 10^3$ à $18 \cdot 10^3$ NTU.

On peut envisager avec l'augmentation de la température et donc de l'énergie disponible dans le milieu, un état d'organisation du gel formé plus important et donc des propriétés de réflexion de la lumière plus grandes. Certains auteurs remettent en question la formation d'un gel acide à basse température par hydrolyse de GDL: la structure formée serait en effet plus proche de celle d'un fluide épais que de celle d'un gel (Bringe et Kinsella, 1990; Roefs, 1986).

3.3 - Validation des profils acido-turbidimétriques par spectrophotométrie

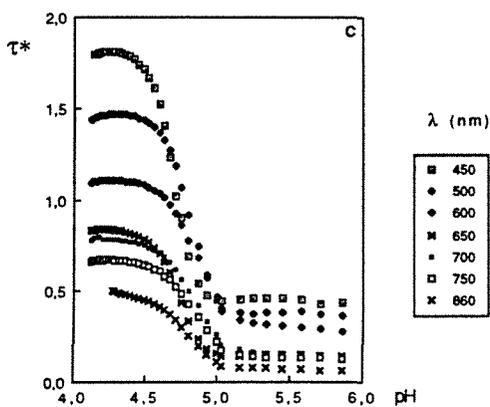
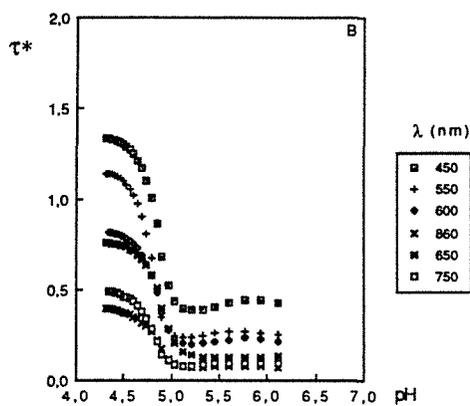
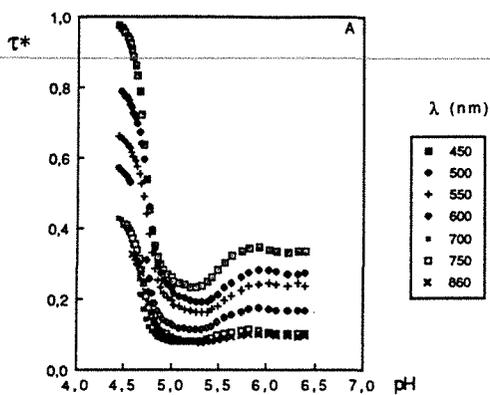
Les profils acido-turbidimétriques précédents expriment la variation d'une grandeur optique globale liée à la réflexion d'un faisceau monochromatique de 860nm par le milieu. Provenant d'une méthode encore peu connue, il semble intéressant de confronter ces profils à des profils spectrophotométriques plus conventionnels réalisés à différentes longueur d'onde dont celle du turbidimètre (860 nm). Cette seconde méthode mesure une turbidité par transmission ou réduction de l'intensité de lumière transmise par la dispersion des particules colloïdales.

Le suivi spectrophotométrique de l'acidification ainsi que la variation du pH sont enregistrés au cours du temps . Les profils représentant l'évolution de la turbidité du milieu en fonction du pH sont construits à partir des graphes précédents et présentés dans les figures II.15.

L'allure des profils acido-turbidimétriques obtenus par spectrophotométrie peut être représentée par trois phases :

- une phase initiale plus ou moins complexe selon la température et la longueur d'onde de mesure
- une phase d'ascension du signal turbidimétrique entre pH 5,0 et pH 4,5
- l'atteinte d'un maximum turbidimétrique à pH 4,5 environ

Une quatrième phase correspondant à une diminution du signal est observée avec la sédimentation des agrégats formés.



figures II.15 : Profils acido-turbidimétriques (spectrophotométrie) de l'acidification d'une dilution de lait au 1/250ème par hydrolyse de 2.5% de GDL à 20°C (A) , à 30°C (B) et à 42°C(C). La longueur d'onde de mesure varie de 450nm à 860nm.

3.3.1 - Influence de la longueur d'onde

D'après l'observation de l'ensemble des profils, la sensibilité des mesures apparaît d'autant plus grande que la longueur d'onde est faible.

En effet, pour des particules de petite dimension par rapport à λ - longueur d'onde incidente - l'intensité de la lumière diffusée est inversement proportionnelle à λ^4 . Lorsque la taille des particules grossit et devient comparable à λ , les profils d'intensité deviennent de plus en plus complexes avec une succession de maxima et de minima (théorie de Mie) ; l'intensité de la lumière diffusée est alors plus faible que dans la région de Rayleigh (Kastler, 1952).

Ainsi, la turbidité finale à 450nm est trois fois plus importante que celle obtenue à 860nm. De la même façon, la diminution de turbidité (environ 20% de la turbidité maximale), observée à 20°C aux faibles longueurs d'onde, disparaît à 860nm. L'ébauche d'une telle diminution est mise en évidence jusqu'à 600nm à 30°C et n'apparaît qu'à 450nm à 42°C.

3.3.2 - Influence de la température

A 20°C, la phase de diminution du signal spectrophotométrique survient en deçà du pH 5,75 et atteint son minimum au pH 5,3. Ces deux valeurs de pH remarquables ont déjà été mises en évidence à cette température sur les profils acido-turbidimétriques précédents (tableau II.4).

Il semble ainsi que le phénomène entraînant une modification des propriétés optiques micellaires durant l'acidification à basse température survienne de façon similaire dans un lait dilué ou non.

Ce phénomène apparaît légèrement, à 30°C et à 42°C, sur les profils spectrophotométriques obtenus aux plus faibles longueurs d'onde alors qu'il n'a pas été mis en évidence par turbidimétrie. Ceci peut s'avérer intéressant dans la suite du

travail lorsque des techniques d'analyse plus sensibles seront utilisées.

Par ailleurs, pour une même longueur d'onde, les valeurs de turbidité initiales à pH 6,0 sont similaires quelle que soit la température (20°C, 30°C ou 42°C). Les valeurs finales, atteintes à pH 4,5, sont par contre croissantes avec la température. Des observations similaires sont obtenues par la méthode turbidimétrique (860 nm) sur le lait. Ainsi de 15°C à 42°C, les valeurs de la turbidité du lait à pH 6.60 environ sont semblables puis augmentent fortement avec la température lorsque surviennent l'agrégation des particules caséiques et la formation du gel.

3.3.3 - Comparaison des profils acido-turbidimétriques

Les profils acido-turbidimétriques, de par les techniques employées, ont été réalisés sur des milieux différents :

- lait pour la turbidimétrie
- dilution de lait au 1/250ème pour la spectrophotométrie

L'allure globale des profils est similaire avec trois à quatre phases selon la longueur d'onde et la température de l'acidification: une phase initiale de latence suivie d'une diminution du signal, dans certaines conditions, puis de son ascension et enfin de l'atteinte d'un palier.

Les conditions de pH et de température pour l'apparition d'une diminution significative du signal turbidimétrique dans la phase de latence sont également identiques. Ainsi, la diminution du signal, significative à 20°C, tend à disparaître à 30°C et à 42°C. Le pH 5,75 indique le début de diminution de la turbidité et le pH 5,30, le minimum de turbidité.

Pour un pH donné et des températures croissantes, la similitude des valeurs initiales de la turbidité puis l'augmentation des valeurs finales de la turbidité sont communes aux deux types de profils.

Par contre, la dépendance de la hausse du signal turbidimétrique (indiquant l'agrégation micellaire, la prise en gel...) avec la température, observée dans le lait, n'apparaît pas pour une dilution de lait. En effet, dans ce cas, la hausse du signal spectrophotométrique survient à pH 5,0 quelle que soit la température de l'acidification.

De même, l'épaulement du signal optique en coïncidence avec le point de gel du lait n'apparaît pas sur les profils spectrophotométriques. L'hypothèse selon laquelle cet épaulement serait dû à la modification soudaine des propriétés optiques du milieu lors de la prise en gel s'avère ici justifiée (Hardy et al. 1981).

Du fait de la dilution importante du lait, la comparaison des résultats spectrophotométriques et turbidimétriques reste limitée. En effet, la promiscuité des micelles de caséine dans le lait accélère le processus d'agrégation ne serait-ce que par l'absence d'un facteur de diffusion limitant.

Dans la phase pré-agrégation, les similitudes observées entre les deux types de mesure sur des substrats de dilution différente indiqueraient que la méthode turbidimétrique est aussi sensible que la méthode spectrophotométrique à de petites variations de propriétés optiques colloïdales.

3.3.4 - Conclusion

La longueur d'onde de 860nm, parmi toutes celles étudiées, est la moins sensible aux modifications physico-chimiques des micelles de caséine dans la dilution de lait au 1/250ème. Mais, l'intensité de la turbidité étant intimement liée à la concentration en particules d'une part et les deux types de profil acido-turbidimétrique présentant de nombreux points de similitude, d'autre part, on peut considérer que la longueur d'onde de 860nm est particulièrement adaptée au suivi de l'acidification dans le lait non dilué. En effet, les plus fines modifications d'intensité de lumière diffusée au niveau micellaire seraient décelées à 860nm grâce à la multiplication de cette quantité infime par le très grand nombre de micelles dans le lait. Dans ces conditions, une mesure avec

une longueur d'onde inférieure (et donc plus sensible) risquerait d'être rapidement saturée et de ne plus révéler la totalité de la transformation du lait en gel.

L'intérêt de la méthode turbidimétrique sera particulièrement mis en évidence dans le chapitre III où l'ensemble des observations effectuées sur les profils acido-turbidimétriques sera repris.

4 - Comparaison des profils optiques des coagulations acide et présure du lait

Il n'existe pas, à notre connaissance, de travaux utilisant des méthodes optiques sur le suivi de l'acidification du lait comparables avec les résultats turbidimétriques présentés dans cette étude.

Par contre, de nombreux points de similitude sont mis en évidence avec les profils optiques de la coagulation présure du lait.

Même si ces deux types de coagulation sont fondamentalement différents, on peut admettre que les phénomènes optiques observés se rapportent à une séquence d'évènements similaires: "mise en condition" des micelles de caséine par action enzymatique ou par acidification du lait, formation d'agrégats caséiques et, finalement, gélification.

Ainsi, l'évolution globale du signal turbidimétrique au cours de l'acidification du lait correspond bien au profil typique de la coagulation présure du lait (fig. II.1).

Les particularités des profils turbidimétriques distinguant l'acidification à 15°C et à 20°C de l'acidification à 30°C et à 42°C soit, respectivement, une diminution de la turbidité dans une phase initiale et un épaulement au point de gel, sont également observées dans certains profils optiques décrivant la coagulation présure du lait (figures II.16 et II.17) (Payens, 1978; Walstra, 1979 ; Hardy et al., 1981).

La citation de ces travaux a ici une simple valeur d'information mais peut également apporter des éléments de réflexion sur l'aspect optique "universel" de la coagulation du lait.

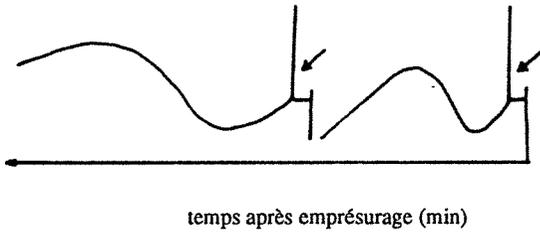


figure II.16 : emprésurage du lait par la trypsine
D'après Payens (1978)

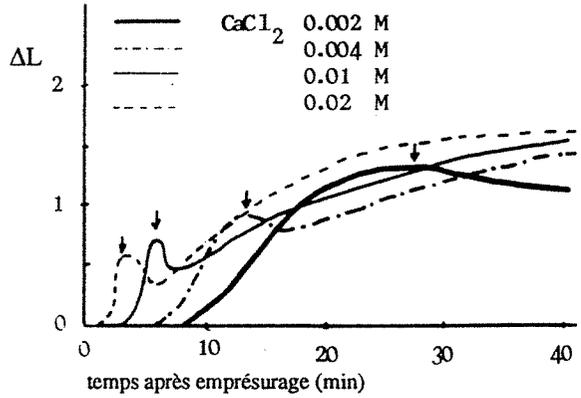


figure II.17 : effet du CaCl_2 sur le signal optique, ΔL , d'un lait emprésuré. D'après Hardy et Fanni (1981)

5 - Conclusion

La méthode turbidimétrique employée au cours de cette étude se révèle un indicateur très fiable de l'état du lait au cours de sa coagulation avec, en outre, une bonne reproductibilité des mesures (coefficient de variation $\leq 6\%$).

Le suivi de l'acidification du lait par la méthode turbidimétrique se révèle donc particulièrement intéressant au niveau fondamental comme au niveau industriel. La sonde turbidimétrique permet en effet de suivre l'acidification du lait avant et après la coagulation sans perturbation physique du système contrairement aux méthodes rhéologiques.

Après la coagulation du lait, le profil optique du raffermissement du gel est très similaire à la courbe obtenue rhéologiquement.

Avant la coagulation, les phénomènes turbidimétriques observés soulèvent de nombreuses questions quant à leur signification.

Une étude phénoménologique de l'acidification du lait avant la gélification est ainsi entreprise dans le but d'y répondre.





CHAPITRE III :

APPROCHE PHENOMENOLOGIQUE
DES MECANISMES PRECEDANT LA
GELIFICATION DU LAIT



CHAPITRE III: APPROCHE PHENOMENOLOGIQUE DES MECANISMES PRECEDANT LA GELIFICATION PAR ACIDIFICATION DU LAIT



1- Introduction

D'après la bibliographie (chapitre I.5), quatre principaux phénomènes sont observés, au niveau micellaire, durant la phase de l'acidification précédant la gélification du lait :

- la solubilisation des minéraux colloïdaux (Ca, P, Mg), indépendante du facteur température selon Dalglish et Law (1989)
- la solubilisation des caséines micellaires à basse température
- la variation de la voluminosité des micelles
- la variation du potentiel zéta des micelles : décroissante avec le pH selon Darling et Dickson (1979 a-b) ou plus complexe selon Schmidt et Poll (1986).

L'étude de Roefs et al. (1985) sur la variation de la taille micellaire au cours de l'acidification demeure l'unique référence en ce domaine à notre connaissance ; une légère diminution de la taille des particules est observée avant la formation d'agrégats.

Les profils acido-turbidimétriques, $\Delta\tau = f(\text{pH})$, obtenus précédemment (chapitre II) permettent de suivre la transition sol-gel du lait durant son acidification. Il s'avère donc particulièrement intéressant de situer l'ensemble des phénomènes cités ci-avant dans un contexte plus général afin de parvenir à une meilleure compréhension du déroulement logique de l'acidification du lait. Ce sera l'un des objectifs de ce chapitre.

Pour cela, l'approche phénoménologique des mécanismes précédant la gélification du lait est complétée à l'aide de diverses techniques adaptées à l'étude des suspensions colloïdales : la viscosimétrie capillaire, la granulométrie et la mobilité électrophorétique.

2 - Matériels et méthodes

2.1 - Viscosimétrie capillaire

Le viscosimètre d'Ostwald (Viscomatic MS) permet de déterminer la viscosité dynamique des fluides newtoniens.

Le lait acidifié présente un comportement newtonien dans une première phase de l'acidification avant de développer des propriétés viscoélastiques. La viscosité dynamique de laits acidifiés et de sérums de lait a pu ainsi être mesurée.

2.1.1- Protocole

Le volume de liquide (η_1, ρ_1, t_1) introduit dans le viscosimètre est fixé à 40 ml. L'étalonnage de l'appareil avec de l'eau distillée (η_e, ρ_e, t_e) donne la relation suivante:

$$\frac{\eta_1}{\eta_e} = \frac{t_1 * \rho_e}{t_e * \rho_1} \quad (3.1)$$

avec η , la viscosité dynamique et ρ , la masse volumique du fluide.

La viscosité étant fonction de la température, le module viscosimétrique à jaquette est thermostaté par circulation d'eau à +/- 0.1°C.

2.1.2 - Différence de viscosité dynamique, $\Delta\eta$:

Afin d'éliminer l'erreur due à la variabilité de la viscosité dynamique initiale du lait ; la différence de viscosité dynamique est calculée entre chaque valeur, η , à un pH défini et la valeur initiale, η_0 :

$$\Delta\eta = \eta - \eta_0 \quad (3.2)$$

Chaque profil viscosimétrique correspond à la moyenne de 5 expériences; la correction de viscosité $\Delta\eta$ a permis de réduire les coefficients de variation à 5 %. Aux approches de la gélification, une augmentation de l'erreur est observée correspondant à l'atteinte des limites de l'appareil.

2.2 - Analyse granulométrique

La détermination de la taille des micelles a été réalisée à l'aide de techniques de mesure par diffusion quasi-élastique de la lumière avec le Malvern Zetasizer.

2.2.1 - Principe

La détermination de la taille micellaire par diffusion quasi-élastique de la lumière repose sur l'analyse des fluctuations infimes de la lumière diffusée par les particules en solution.

Dans le cas d'une suspension colloïdale, ces fluctuations sont dominées par le mouvement Brownien, lui-même représentatif de la taille des particules. Ainsi des relations mathématiques complexes permettent de calculer la taille d'une particule à partir de la mesure d'une intensité lumineuse diffusée.

Au niveau de l'appareil, l'intensité captée par le photomultiplicateur est intrinsèquement observée comme un ensemble de paquets d'énergie, les photons, donnant chacun naissance à une impulsion électrique de 50 nanosec.

Le corrélateur additionne les impulsions photoniques durant un "temps d'échantillonnage" et les stocke pour pouvoir calculer un coefficient de corrélation à différents temps d'observation.

Une fonction d'autocorrélation (mesure du degré de ressemblance du signal avec lui-même au cours du temps) est déterminée par la multiplication de l'intensité au temps $t +$

t^* avec celle qui est stockée au temps t . Le résultat de cette multiplication est ajouté au coefficient de corrélation à chaque intervalle de mesure, la nouvelle valeur remplaçant la précédente.

Dans le cas d'un phénomène de diffusion simple, la multiplication des intensités sur une échelle de temps t^* donne une fonction d'autocorrélation exponentielle de la forme:

$$G(t^*) = [N]^2 \{ 1 + b \exp (-t^*/t_c^*) \} \quad (3.3)$$

$[N]$, intensité moyenne mesurée en photons par unité de temps

b , constante, <1 , tenant compte du degré de cohérence du système optique et de l'efficacité du corrélateur.

t_c^* , temps caractéristique de la régression exponentielle

L'analyse de $G(t^*)$ donne des informations sur les objets dispersant la lumière.

Lorsqu'ils sont de tailles différentes, il y aura plusieurs valeurs de t_c^* donnant lieu à la superposition de régressions exponentielles. Extraire une distribution de taille à partir de $G(t^*)$ est un problème mathématique complexe.

Dans le cas le plus simple de sphères monodispersées non interagissantes, t_c^* , dans la relation (3.5), permet de calculer le coefficient de diffusion des particules dispersantes:

$$t_c^* = (D'K^2)^{-1} \quad (3.4)$$

D' , coefficient de diffusion des particules dispersantes

$K = 4\pi n \lambda^{-1} \sin (\theta/2)$, vecteur de dispersion (m^{-1}) avec:

n , indice de réfraction du liquide de dilution des particules

λ , longueur d'onde de la lumière dans le vide

θ , angle de dispersion

Le coefficient de diffusion peut être converti en un diamètre hydrodynamique en utilisant la relation de Stokes- Einstein, ceci dans le cas de particules sphériques de même taille ($0,01\mu\text{m}$ à $1\mu\text{m}$) n'interagissant pas:

$$D_s = \frac{k_b T}{3\pi D' \eta} \quad (3.5)$$

D_s , diamètre des sphères (nm)
 k_b , constante de Boltzman
 T , température absolue
 D' , coefficient de diffusion
 η , viscosité du fluide de dilution

Dans le cas de particules polydispersées, la technique des cumulants permet de déterminer une taille moyenne z et une polydispersité. L'équation (3.3) est généralisée comme suit:

$$G(t^*) = [N]^2 \{ 1 + b g(t^*)^2 \} \quad (3.6)$$

La fonction de corrélation $g(t^*)$ est analysée par un polynôme du second ordre appliqué au logarithme de la fonction mesurée :

$$\log\{(G(t^*) / [N]^2) - 1\} = 1 + mt^* + kt^{*2} \quad (3.7)$$

k , l et m sont des constantes déterminées par l'analyse des cumulants.

On peut remarquer que :

- dans le cas de sphères monodispersées pour laquelle l'équation (3.3) s'applique: $k = 0$ et la fonction $g(t^*)$ est linéaire.

Le coefficient m définit la pente initiale du graphe. m peut être lié au coefficient de diffusion moyen et à la taille hydrodynamique moyenne en utilisant les équations (3.4) et (3.5).

- dans le cas de sphères polydispersées, on obtient une distribution de fonctions exponentielles et $N \neq 0$. Un indice de polydispersité est alors défini, $q = N / (2M^2)$. Pour des distributions étroites, q est proche de la variance de la distribution de taille.

La distribution de taille S est constituée de I populations discrètes de taille S_i . La

puissance de diffusion par particule de taille S_i est P_i . Il y a Y_i particules de taille S_i dans l'échantillon.

Ainsi, la moyenne z , mesurée comme la pente de la partie du premier ordre de l'équation (3.3) est équivalente à :

$$z = \frac{\sum_i \{ S_i P_i Y_i \}}{\sum_i \{ P_i Y_i \}} \quad (3.8)$$

Les valeurs de P_i sont calculées par la théorie de Mie.

2.2.2 - Protocole

Afin de replacer les micelles dans leur environnement ionique naturel, le perméat du lait analysé a été recueilli par ultrafiltration sur membrane (YM 100, Amicon) pour servir de milieu de suspension. L'ultrafiltration est réalisée à la même température que celle de l'acidification. Le lait est dilué au 1/25 ième dans le sérum d'UF, clarifié au préalable sur membrane millipore (0,2 μ m). L'échantillon est parfaitement stable dans ces conditions. La filtration sur membrane Millipore permet l'élimination de particules parasites à la mesure (poussières, ...).

10 mesures ont été réalisées sur chaque échantillon, la durée d'une mesure a été optimisée (précision de la méthode et contrainte de temps) à 120 secondes.

Le diamètre hydrodynamique moyen, \overline{D}_{HS} , a été calculé pour représenter l'ensemble des distributions de taille d'un échantillon (coefficient de variation $\leq 1\%$). Les constantes introduites dans le logiciel pour le calcul de la distribution de taille hydrodynamique des micelles sont l'indice de réfraction (1.33) et la viscosité dynamique du milieu de dilution mesurée par viscosimétrie capillaire (en mPa.s): 1,2 à 15°C, 1,15 à 20°C, 1,11 à 30°C et à 1,05 à 42°C.

2.3 - Mesure de la mobilité électrophorétique

Les mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées à l'aide du Malvern Zetasizer qui utilise deux techniques: l'électrophorèse et la vélocimétrie Doppler laser.

2.3.1 - Théorie

Le principe de mesure des mobilités électrophorétiques est celui de l'électrophorèse. Il est basé sur le fait qu'une particule chargée, placée dans un champ électrique est soumise à une force et se déplace à une vitesse déterminée par l'équilibre entre cette force et la résistance de Stokes. Cet effet électrocinétique est appelé électrophorèse et est caractérisé par la mobilité μ :

$$\mu = \frac{\text{vitesse de la particule } (\mu\text{m/sec})}{\text{intensité du champ électrique (volt/cm)}} \quad (3.9)$$

En se déplaçant, la couche externe de la particule est arrachée jusqu'à un certain plan de cisaillement. Bien que l'on ne connaisse pas exactement la localisation de ce plan de rupture, on suppose qu'il est assez proche du plan de Stern; ainsi, on détermine le potentiel zéta qui serait supérieur ou égal au potentiel de Stern ψ_s (figure I.4).

Le calcul du potentiel zéta à partir de la mobilité électrophorétique a été traité théoriquement par Von Smoluchowski (1918), Hückel (1924) et Henry (1931). Ce dernier propose une expression du potentiel zéta à partir des travaux de Von Smoluchowski et Hückel:

$$\zeta = \frac{6\pi\eta\mu}{\varepsilon f(\kappa r)} \quad (3.10)$$

η (poise), la viscosité dynamique du solvant

μ ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$), la mobilité électrophorétique

$\epsilon = \epsilon_0 d$ avec :

$\epsilon_0 = 8.854.10^{-12}$ Fa. m⁻¹, la permittivité du vide
 d , la constante diélectrique du solvant

Le terme $f(\kappa r)$, sans dimension, relie le rayon (r) de la particule à l'épaisseur de la double couche (exprimée par $1/\kappa$); pour des particules sphériques, un produit $\kappa r \ll 1$ correspond à de très petites particules et une double couche large, tandis que $\kappa r \gg 1$ correspond à des particules larges et une double couche mince.

2.3.2 - Principe et caractéristiques de l'appareil (figure III.1)

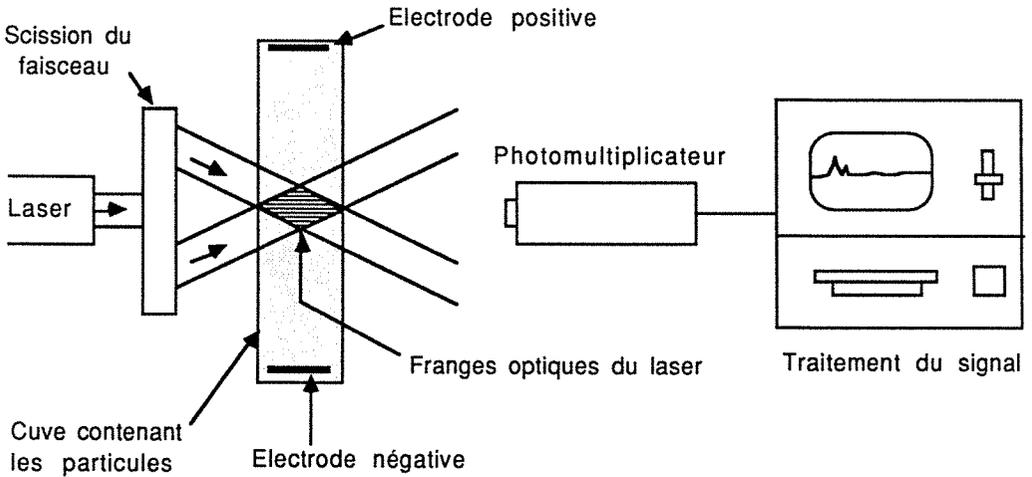


figure III.1 : principe de mesure de la mobilité électrophorétique de particules colloïdales

Afin d'éviter les mouvements parasites des particules le long des faces en verre négativement chargées de la cellule (électro-osmose), les expérimentations sont réalisées au niveau du plan stationnaire. En cet endroit, le mouvement des particules est seulement dû à leur charge.

Le rayon laser est divisé en deux faisceaux qui se croisent dans le plan stationnaire en délimitant un certain volume de mesure (figure III. 1).

Le croisement de ces deux faisceaux produit des franges d'interférence avec lesquelles les particules interagissent. La lumière dispersée ainsi produite varie avec le temps selon leur vitesse.

Il y a cinq étapes qui permettent de transformer la fonction de corrélation mesurée en un spectre de mobilités électrophorétiques:

- 1- élimination des effets de diffusion
- 2- application d'une transformée de Fourier pour convertir le signal des intensités lumineuses en un spectre de décalages Doppler
- 3- transformation du spectre de décalages Doppler en un spectre de vitesses.

La vélocimétrie Doppler laser permet de déterminer la vitesse des particules par l'analyse des décalages Doppler (Δv) de la lumière diffusée:

$$v = \Delta v \cdot s \quad (3.11)$$

v , vitesse des particules ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

Δv , décalage Doppler de la lumière diffusée

s , espace entre les franges d'interférences dans la région où les rayons lasers se croisent. s est donnée par la relation: $s = \lambda / (2\sin(\alpha/2))$ avec λ , la longueur d'onde du faisceau et α , l'angle de croisement des faisceaux.

4- calcul des mobilités électrophorétiques à partir de la vitesse des particules en divisant celle-ci par l'intensité du champ électrique.

5- calcul du potentiel zéta à partir des mobilités électrophorétiques par la formule simplifiée suivante:

$$\mu = \zeta \cdot \frac{\epsilon}{\eta} \quad (3.12)$$

2.3.3 - Protocole

L'échantillonnage est identique à celui utilisé pour les mesures granulométriques. Les deux méthodes peuvent être employées successivement sur un même échantillon et, dans ce cas, la mesure de taille est effectuée la première.

15 mesures sont réalisées sur un même échantillon; le temps d'application du champ électrique est optimisé à 20 secondes par mesure.

Les constantes introduites pour le calcul du potentiel zéta à partir de la mobilité électrophorétique (équation 3.12) sont la constante diélectrique de l'eau, d , donnée par Owen, Miller, Milner et Cogan (cités dans Handbook of Chemistry and Physics, 51^{ième} édition) et la viscosité dynamique du sérum de dilution des micelles de caséine que nous avons mesurée (tableau III.1).

tableau III.1: constantes utilisées pour la conversion de la mobilité électrophorétique en potentiel zéta (équation 3.15) avec les valeurs de la viscosité dynamique du sérum de dilution des micelles de caséine mesurées par viscosimétrie capillaire (η en mPa.s) et celles de la constante diélectrique de l'eau adimensionnelle (d) d'après Owen, Miller, Milner et Cogan (cités dans Handbook of Chemistry and Physics, 51^{ième} édition).

	15°C	20°C	30°C	42°C
$d = \epsilon/\epsilon_0$ (adimensionnel)	82,04	80,18	76,58	72,30
η (mPa.s)	1,20	1,15	1,11	1,05

2.4 - Mesures biochimiques

2.4.1 - Centrifugation et séparation des caséines solubles

Les caséines solubles sont définies comme des caséines ne sédimentant pas durant une ultracentrifugation à 70 000g aux durées spécifiées ci-dessous. Une ultracentrifugeuse

Beckman a été utilisée avec un rotor Swing contenant 6 tubes de 13,2 ml à une vitesse de 24000 révolutions par minute. La sédimentation est réalisée à la température à laquelle le lait acidifié a été obtenu; les durées de centrifugation sont modulées pour tenir compte de la plus grande viscosité du lait à basses températures (Davies & Law, 1983). Ainsi, les temps de centrifugation sont de 180 min à 15°C, 120 min à 20°C, 115 min à 25°C et 105 min à 30°C . En principe , des corrections supplémentaires devraient être apportées pour prendre en considération les variations de voluminosité et de densité des micelles avec la diminution du pH (Van Hooydonk et al. 1986). Dalglish et Law (1989) estiment cependant que les effets sont faibles dans la gamme de pH 5,0-6,6. Après centrifugation, le liquide surnageant est recueilli et laissé à température ambiante.

2.4.2 - Analyse de la teneur en azote

Les teneurs en azote total, caséinique et non caséinique du lait avant l'acidification ont été déterminées par la méthode micro-Kjeldhal (Davies et Law,1983). Ceci a permis de calculer la concentration en azote sérique, constante durant l'acidification. Chacun des échantillons de surnageant, recueilli après ultracentrifugation, est analysé selon la même méthode pour l'azote total. La valeur initiale de l'azote non caséinique est soustraite pour donner la concentration en azote caséinique dans le sérum et enfin le rapport entre azote caséinique micellaire et azote caséinique soluble (Dalglish et Law,1988).

3 - Observations phénoménologiques de l'acidification du lait

Les différents résultats concernant l'approche phénoménologique de l'acidification du lait sont décrits dans ce paragraphe.

Il sera mis en évidence dans la discussion qui suivra que ces mesures, réalisées à l'aide de techniques variées (viscosimétrique, granulométrique, électrophorétique et

biochimique), présentent tout leur intérêt lorsqu'elles sont confrontées les unes aux autres. Elles permettent ainsi d'élucider en partie, la phase précédant la gélification du lait dans les profils acido-turbidimétriques.

3. 1 - Etude viscosimétrique

3.1.1 - Aspect théorique

L'évolution de la viscosité est d'un intérêt particulier car elle met en évidence des transformations microscopiques de la suspension colloïdale. Ainsi, la relation d'Eilers citée par Hallstrom et Dejmek (1988b) permet d'évaluer la fraction volumique totale, ϕ_t , de la phase dispersée à partir de mesures de la viscosité dynamique, η .

$$\eta = \eta_{\text{réf}} * \frac{1 + 1.25 \phi_t}{1 - \frac{\phi_t}{\phi_{\text{max}}}} \quad (3.13)$$

Dans le cas du lait écrémé, Snoeren et al. (1982) donnent à ϕ_t la valeur 0,79 et assimilent la viscosité du solvant, $\eta_{\text{réf}}$ à la viscosité du perméat d'ultrafiltration.

Par ailleurs, on sait que la fraction volumique totale est la somme des fractions volumiques des caséines ϕ_c , des protéines du sérum natives ϕ_{sn} et des protéines du sérum dénaturées ϕ_{sd} :

$$\phi_t = \phi_c + \phi_{\text{sn}} + \phi_{\text{sd}} = c_c V_c + c_{\text{sn}} V_{\text{sn}} + c_{\text{sd}} V_{\text{sd}} \quad (3.14)$$

c est la concentration massique de la protéine et V est la voluminosité protéique .

3.1.2- Résultats

La figure III.2 montre la variation de $\Delta\eta$ au cours de l'acidification à différentes températures.

Trois phases peuvent être distinguées :

- une diminution de $\Delta\eta$ jusqu'à pH 5,90 à 15°C, à pH 5,80 à 20°C, à pH 5,70 à 30°C et à 42°C.
- un palier durant lequel $\Delta\eta$ n'évolue quasiment pas (ponctuel à 42°C)
- une augmentation de $\Delta\eta$ dès le pH 5,75 à 15°C, le pH 5,60 à 20°C et à 30°C et le pH 5,70 à 42°C.

Il peut être remarqué que l'amplitude de la chute de $\Delta\eta$ avec la température est cohérente, celle-ci étant d'autant plus importante que la température est basse. Par contre, il n'en est pas de même des valeurs de pH initiatrices de la hausse subséquente de $\Delta\eta$, sans ordre de croissance ou de décroissance apparent.

En effet, il sera en effet mis en évidence qu'un même phénomène provoque la chute de $\Delta\eta$ avec l'acidification alors que deux événements distincts, selon la température, sont à l'origine de sa hausse.

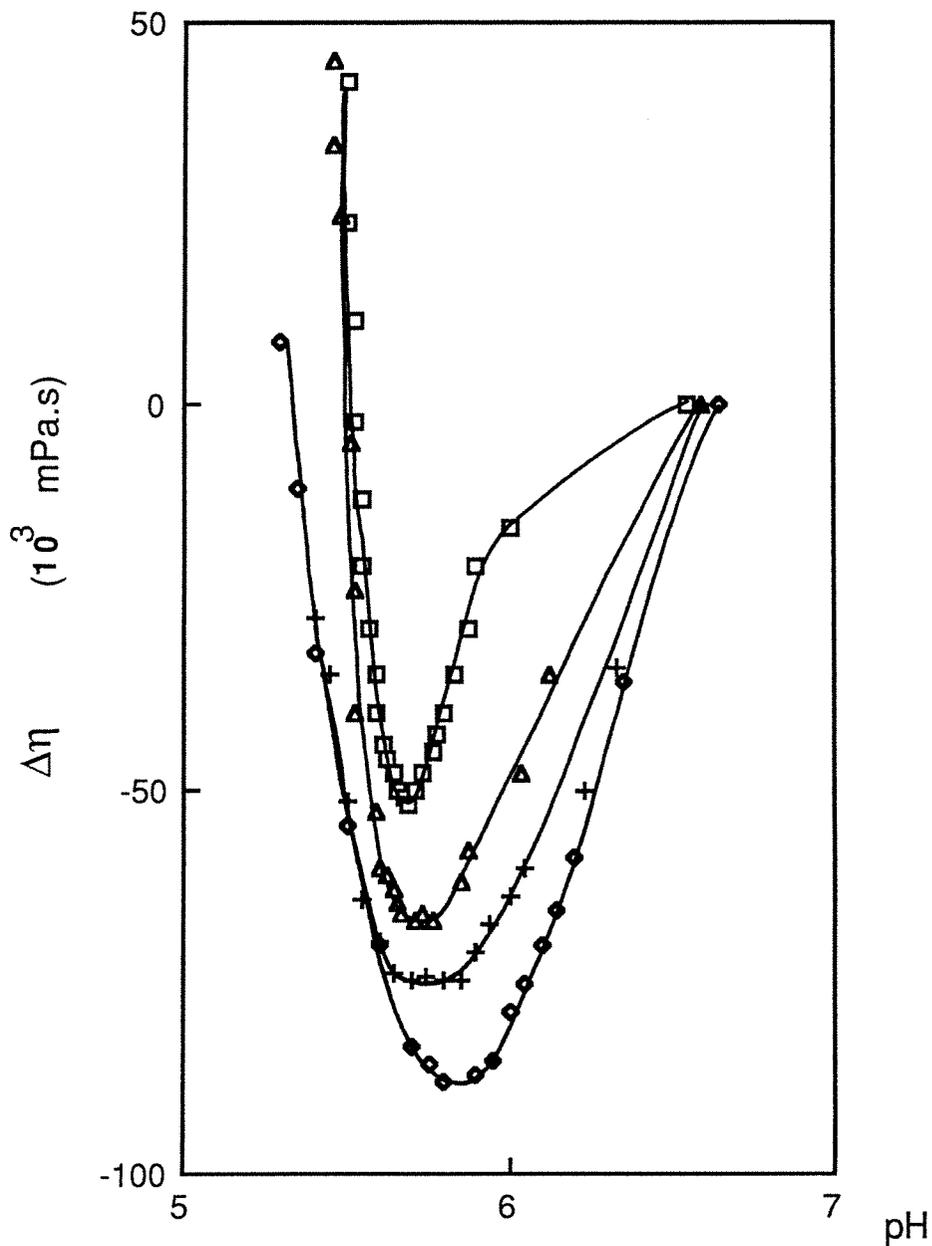


figure III.2 : évolution de $\Delta\eta$ en fonction du pH à 15°C (○), à 20°C (+), à 30°C (Δ) et à 42°C (■).

3.2 - Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique globale (figure III.3) met en évidence au moins deux phases dans l'évolution du diamètre hydrodynamique moyen, \bar{D}_{HS} , des micelles de caséine au cours de l'acidification avec:

- dans un premier temps, une taille des micelles constante
- puis à 15°C et à 20°C uniquement, une diminution significative de la taille des micelles dès le pH 5,75 et le pH 5,55 (ou pH_{τ_0})
- enfin, une augmentation de la taille des micelles aux environs du pH 5,40 à 15°C et à 20°C, du pH 5,50 à 30°C et du pH 5,70 à 42°C. Ces valeurs de pH sont à rapprocher respectivement du pH_d et du pH_h des profils acido-turbidimétriques.

L'analyse granulométrique a permis de suivre l'évolution de la taille hydrodynamique moyenne des micelles mais également d'observer des tendances en ce qui concerne le nombre de particules en suspension. Ce nombre semble rester constant jusqu'à l'approche du point de gélification puis diminue avec l'apparition de particules caséiques de plus grande taille.

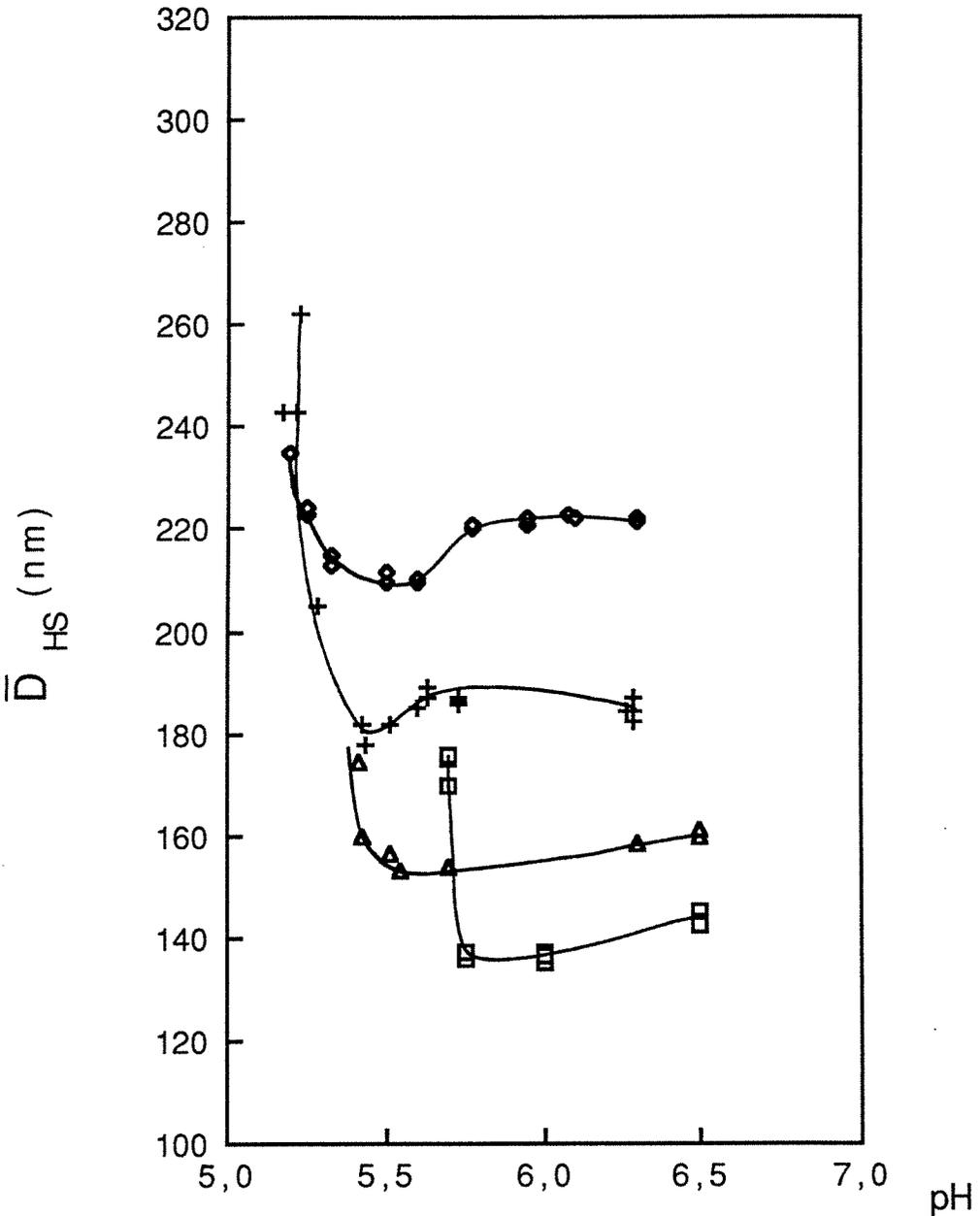


figure III.3 : variation du diamètre hydrodynamique moyen, \bar{D}_{HS} , des micelles en fonction de l'acidification à 15°C (○), à 20°C (+), à 30°C(Δ) et à 42°C (◻).

3.3 - Evolution du potentiel zéta avec l'acidification

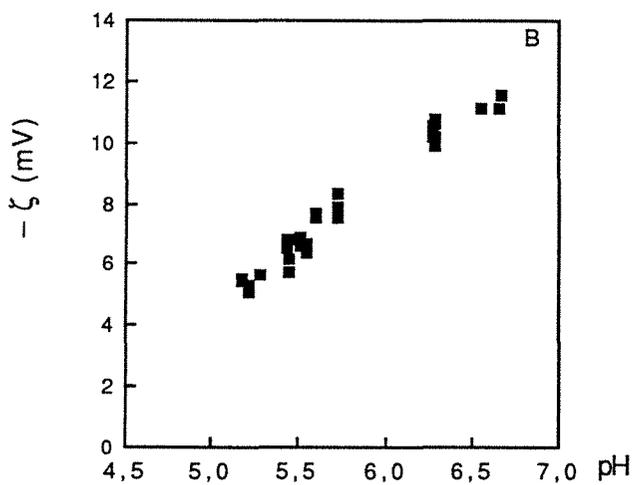
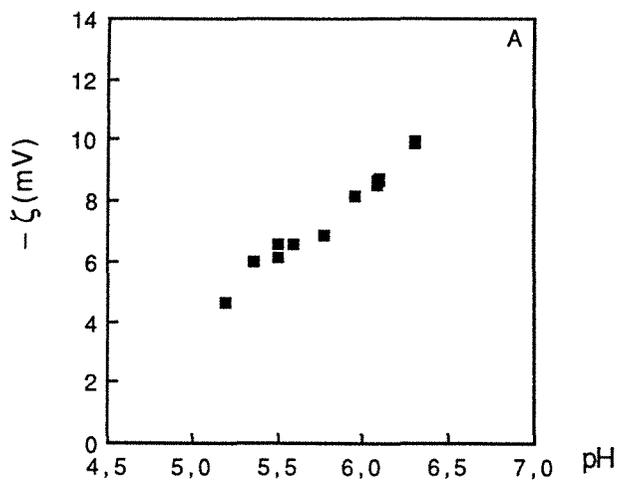
L'évolution du potentiel zéta avec l'acidification est présentée dans la figure III.4 . Les valeurs de potentiel zéta sont négatives mais exprimées par $-\zeta$ comme il est admis dans la littérature.

L'analyse des profils montre que le potentiel zéta évolue de façon curvilinéaire avec l'acidification et ceci se rapproche donc des résultats des travaux de Darling et Dickson (1979 a-b) et de Pearce (1976).

Comme l'ont observé Dalgleish (1984), Darling et Dickson (1979 b) et Pearce(1976), on note également que les profils de potentiel zéta sont déplacés vers de plus grandes valeurs lorsque la température de l'acidification s'élève.

Walstra (1984) ainsi que Schmidt et Poll (1986) trouvent des résultats assez différents. En effet, si dans l'ensemble, le potentiel zéta montre une nette diminution avec l'acidification , un épaulement de la courbe est mis en évidence aux pH 5,2-5,0 pour Walstra (1984) aux pH 5,3-5,4 pour Schmidt et Poll (figures I.17 et I.18).

De tels profils ont également été obtenus au cours de cette étude mais les épaulements correspondaient à une agrégation précoce des micelles de caséine due à une mauvaise régulation de la température des échantillons durant toute la manipulation avant la mesure. En effet, à 15°C et à 20°C, une élévation même faible de la température de l'échantillon au cours des filtrations, dilutions ou temps d'attente provoque dans la zone de pH 5,3 cet épaulement qui doit être interprété comme un simple artefact.



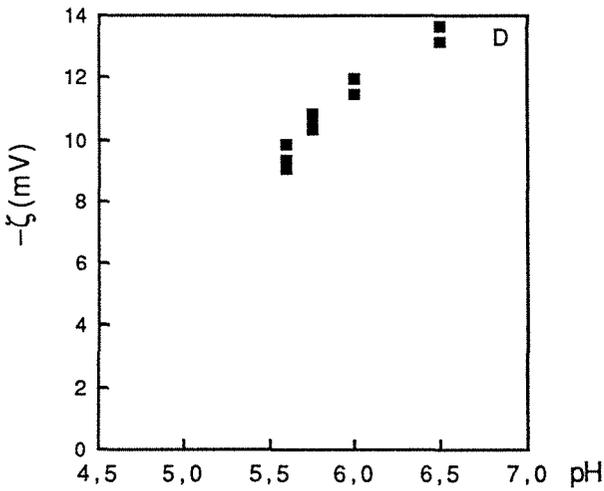
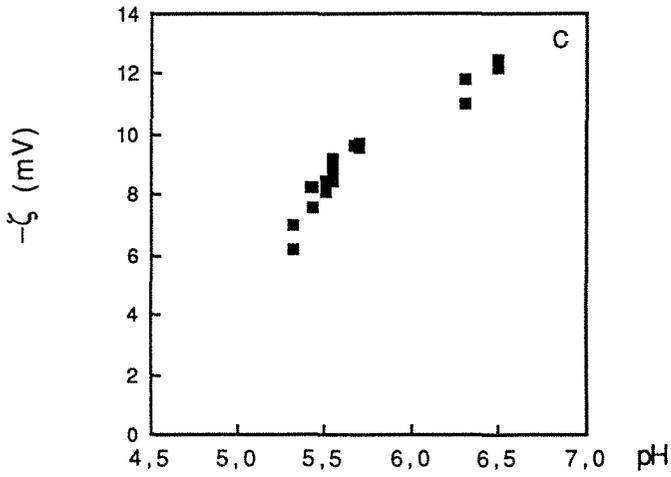


figure III.4 : variation du potentiel zéta des particules caséiques en fonction de l'acidification à 15°C(A), à 20°C(B), à 30°C (C) et à 42°C (D).

3.4 - Analyse de la solubilisation protéique

Un des événements de l'acidification, particulièrement dépendant de la température, est la solubilisation protéique des micelles. Afin de déterminer l'importance de ce phénomène au cours des acidifications réalisées de 15°C à 42°C, une analyse quantitative des protéines solubilisées a été réalisée sur les surnageants d'ultracentrifugation de laits acidifiés (figure III.5).

Le début de la solubilisation des caséines colloïdales survient à des pH d'autant plus acides que la température est élevée. A 15°C, la solubilisation apparaît dès le pH initial et à 20°C, dès pH 6,0.

Le maximum de solubilisation est mis en évidence dans la zone de pH 5,4-5,6 en accord avec les travaux de Dalgleish et Law(1988).

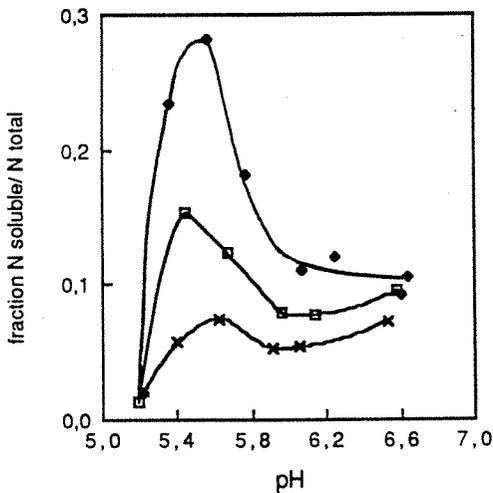


figure III.5: solubilisation des protéines colloïdales avec l'acidification à 15°C (●), à 20°C (■) et à 25°C (X).

L'influence de la température apparaît prépondérante. Le rapport maximal "caséines solubilisées/ caséines colloïdales" passe de 0,3 à 15°C à 0,15 à 20°C et enfin à une valeur quasi négligeable à 25°C ($< 0,1$).

On peut supposer qu'aux effets de l'acidification, comme la solubilisation des minéraux colloïdaux, vient s'ajouter un affaiblissement des interactions hydrophobes inter-protéiques avec les basses températures. Ce phénomène serait à l'origine de la forte dépendance de la solubilisation caséique vis à vis de la température (Dalglish et Law, 1988; Dalglish et Law, 1989).

4 - Discussion générale

Une approche phénoménologique de l'acidification s'efforcera de cerner et de comprendre les événements responsables des modifications physico-chimiques du lait observées.

Au préalable, une synthèse de l'ensemble des résultats est réalisée en fonction des différentes phases observées sur les profils acido-turbidimétriques " $\Delta\tau = f(\text{pH})$ " du paragraphe II.3.2.

4.1 - Synthèse des résultats

Les profils obtenus à 15°C, à 20°C, à 30°C et à 42°C sont reportés dans le tableau synoptique III.2 en fonction des différentes phases turbidimétriques signalées par les pH correspondants (figure III.6):

- Dans la phase I dite initiale, une légère augmentation du signal turbidimétrique, de 10% par rapport à la variation maximale de $\Delta\tau$, est mise en évidence. La diminution de la viscosité dynamique est l'évènement majeur de cette phase.

- la phase I' correspond à une diminution du signal turbidimétrique qui s'amplifie avec les basses températures; simplement "ébauchée" à 25°C, la diminution

atteint 30% environ de $\Delta\tau_{\max}$ à 15°C.

La solubilisation des protéines colloïdales est le fait marquant de cette phase.

- l'augmentation de la turbidité jusqu'au point de gel caractérise la phase II et correspond, principalement, à la floculation des protéines colloïdales et solubles du lait

- la phase III se traduit par une augmentation de la turbidité du milieu après la gélification

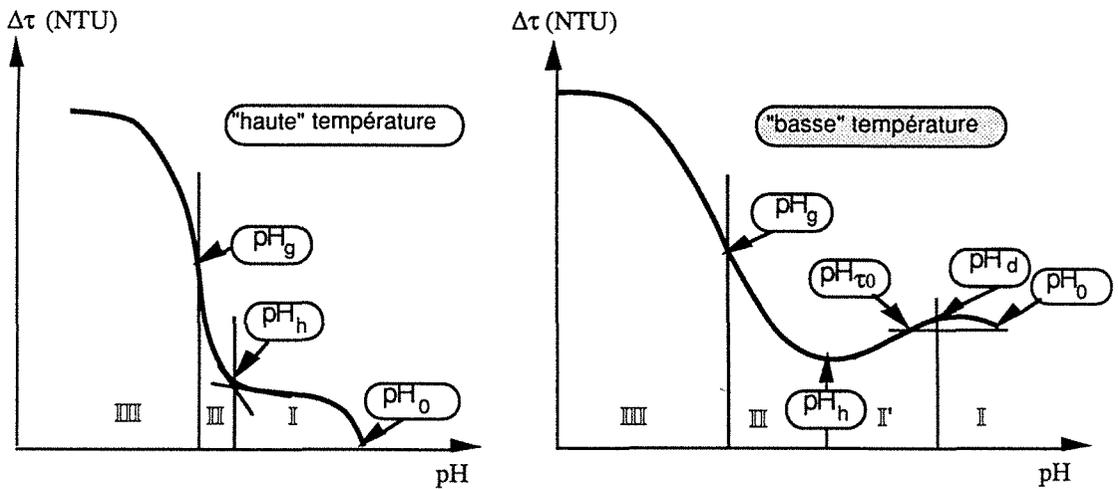


figure III.6 : profils acido-turbidimétriques caractéristiques de l'acidification à haute température et à basse température.

pH_0 , pH_h et pH_g représentent respectivement le pH initial du lait, le pH annonçant la hausse finale de turbidité et le pH au point de gélification du lait. La diminution de turbidité observée à 15 et à 20°C est définie par deux valeurs de pH supplémentaires: pH_d et $pH_{\tau 0}$.

tableau III.2 : variations turbidimétrique ($\Delta\tau$), viscosimétrique ($\Delta\eta$), granulométrique (\overline{D}_{HS}) et du potentiel zéta (ζ) avec l'acidification du lait à 15°C, 20°C, 30°C et 42°C. La phase I' en grisé n'est mise en évidence qu'à 15°C et 20°C.

	Phase I	Phase I'		Phase II	Phase III
	pH_0	pH_d	pH_{to}	pH_h	pH_g
$\Delta\tau$	→	↘	↘	↗	↗
$\Delta\eta$	↘	→	↗	↗	—
\overline{D}_{HS}	→	→	↘	↗	—
ζ	↘	↘	↘	↘	—
rotéines solubles	→	↗	↗	↘	—

4.2 - Approche phénoménologique de l'acidification du lait

4.2.1 - Phase initiale, I: latence de $\Delta\tau$ et diminution de $\Delta\eta$

La zone de pH_0 à pH_d ou pH_h correspond à la phase initiale de la turbidité du lait.

L'évènement le plus marquant de cette période est une diminution significative de la viscosité dynamique du lait acidifié.

Selon Holt et Dalgleish (1986), les propriétés hydrodynamiques et électrocinétiques des micelles de caséines peuvent être expliquées par l'existence d'une enveloppe protéique diffuse (Holt, 1975) .

La contraction de cette enveloppe protéique a été expérimentalement mise en évidence par Horne (1984) ainsi que par Horne et Davidson (1986) lorsque les micelles de caséine sont diluées dans des solutions d'éthanol. Elle correspond, selon les travaux de Griffin et al.(1989), aux diminutions de la viscosité dynamique et de la voluminosité micellaire. L'hydrolyse de l'enveloppe micellaire par la présure provoque également une diminution significative de la viscosité dynamique du lait emprésuré (Guthy et Novak, 1977).

Par similitude, on peut envisager le même phénomène dans le cas de l'acidification du lait. Ainsi, la diminution régulière de la charge des micelles provoquée par l'acidification pourrait expliquer un rapprochement des chaînes protéiques et un drainage réduit du solvant à travers cette enveloppe. Il s'ensuivrait une diminution progressive de la voluminosité micellaire et de la viscosité dynamique qui lui est liée. Ceci est en accord avec la chute de la solvatation des micelles observée durant l'acidification jusqu'à pH 6,0-5,8 à 20°C (Tarodo de la Fuente et Alais, 1975; Creamer, 1985; Snoeren et al. 1984; Hallstrom et Dejmek, 1988 a-b).

La quasi-constance de la taille des micelles à 15°C et à 20°C indique que l'effondrement de l'enveloppe serait partiel à ces températures et n'atteindrait donc pas les 10nm correspondant à l'épaisseur de celle-ci selon Horne et Davidson (1986). A 30°C et à 42°C, par contre, la diminution de l'ordre de 10nm observée pourrait illustrer la contraction totale de cette barrière stérique.

La non-linéarité du profil de potentiel zéta avec le pH serait également inhérente à la présence de l'enveloppe micellaire diffuse selon Holt et Dalgleish (1986).

En effet, la mobilité électrophorétique d'une particule "lisse" dépendrait linéairement de la charge électrique de celle-ci et l'observation d'une non-linéarité impliquerait l'intervention d'un autre paramètre en l'occurrence celui d'une interface particulière structurée.

Une équation tenant compte de la force de friction hydrodynamique, engendrée par

l'enveloppe polymérique diffuse d'une particule, décrit parfaitement l'allure du profil expérimental des mobilités électrophorétiques en fonction du degré d'élimination de l'interface micellaire (constituée de caséines κ) par la présure. Ce profil (figure III.7) rappelle l'allure de l'évolution du potentiel zéta avec le pH dans la phase I de l'acidification du lait (figure III.3) et illustrerait ainsi, non l'élimination, mais la contraction de l'enveloppe micellaire.

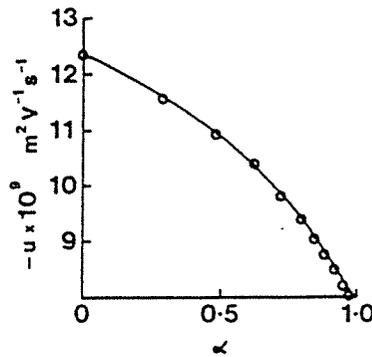


figure III.7 : évolution de la mobilité électrophorétique (u) des micelles de caséine avec le degré d'hydrolyse de l'enveloppe protéique par la présure, α . D'après Holt et Dalgleish (1986)

Le passage d'une forme diffuse à une forme plus compacte de l'enveloppe micellaire avec l'acidification peut également expliquer la légère hausse du signal turbidimétrique. En effet, les propriétés optiques des particules étant l'un des trois paramètres - avec la taille et la concentration - influençant la turbidité du lait, la hausse de la turbidité pourrait provenir d'une modification des propriétés optiques des micelles dans le sens d'une meilleure réflexion de la lumière lorsque l'enveloppe protéique est plus dense.

On voit donc que la contraction de l'enveloppe micellaire, responsable des forces de répulsion stérique, paraît être l'élément clé de la première phase de l'acidification du lait quelle que soit la température.

4.2.2 - Phase I' (observée à 15°C et à 20°C) : diminutions de la turbidité et de la taille des micelles, augmentation de la viscosité

Dans cette phase, les observations suivantes sont faites:

- pour des valeurs de pH inférieures à pH_D , le signal turbidimétrique tend à diminuer
- dès l'atteinte du pH_{τ_0} , la diminution s'accroît jusqu'à un palier à pH_H
- la viscosité dynamique qui diminuait dans la phase I se stabilise à pH_D puis augmente dès que le pH_{τ_0} est atteint
- le diamètre hydrodynamique moyen des micelles diminue, précisément, à pH_{τ_0}
- alors que le pH diminue, la neutralisation des charges micellaires se poursuit régulièrement comme l'indique les mesures du potentiel zéta.

Ces observations conduisent à un certain nombre d'interrogations.

Peut-on se référer à la coagulation présure ?

Payens (1978) et Walstra (1979), étudiant la coagulation présure, montrent une diminution similaire de la turbidité du lait mais accompagnée par contre d'une diminution simultanée de la viscosité. La chute de la turbidité proviendrait, dans le cas de ces travaux, d'une réduction de la taille des micelles dont l'origine serait l'élimination du macropeptide de la caséine κ par la présure.

Y- aurait - il poursuite de la contraction de l'enveloppe protéique des micelles ?

Un effondrement total de l'enveloppe protéique peut être envisagé et il pourrait en effet correspondre au maximum de diminution de taille mesuré à 15°C. Toutefois, cela

n'explique pas l'augmentation de la viscosité dynamique du lait acidifié. On peut donc supposer l'apparition d'un évènement antagoniste, en ce qui concerne l'effet sur la viscosité dynamique, qui succéderait ou qui masquerait le premier évènement mis en évidence, c'est à dire, la contraction de l'enveloppe micellaire.

Quelles seraient les conséquences de la solubilisation des protéines colloïdales?

Roefs et al.(1985) trouvent une relation entre la diminution de la taille des micelles et celle de l'intensité du signal spectrophotométrique du lait durant l'acidification à 8°C et émettent l'hypothèse qu'elles seraient les conséquences d'une solubilisation protéique importante à cette température.

La diminution de la turbidité observée à 15°C et à 20°C est amplifiée avec une température plus basse et avec l'acidification jusqu'à un pH défini. Ces deux facteurs sont intimement liés à la solubilisation des caséines colloïdales et plus particulièrement de la caséine β (Davies et White, 1960; Rose, 1968; Downey et Murphy, 1970; Dalgleish et Law, 1988). La figure III. 5 met en évidence ce phénomène pour les trois températures 15°C, 20°C et 25°C; à cette dernière température la solubilisation caséique est quasi-inexistante.

La solubilisation des minéraux colloïdaux (Ca, P, Mg) est une conséquence de la diminution du pH du lait et contribuerait à la déstabilisation des protéines colloïdales (Dalgleish et Law,1989).

Les effets combinés de la température et de l'acidification favorisent le relargage des monomères caséiques dans la phase sérique de façon plus importante que si chacun des facteurs était pris séparément (Rose, 1968; Dalgleish et Law,1988).Selon ces auteurs, les premiers signes de solubilisation durant l'acidification à 4°C et à 20°C apparaissent dès pH 6 ; le maximum de solubilisation est trouvé à pH 5,3 par Rose (1968) et à pH 5,4 par Dalgleish et Law (1988). En dessous de ces valeurs, la concentration en caséines solubles diminue fortement.

Les valeurs de pH, caractéristiques de la solubilisation protéique selon Rose (1968) et Dalgleish et Law (1988), sont semblables à celles obtenues dans la phase de diminution de $\Delta\tau$, soient pH_d et pH_h .

Pourquoi la fraction volumique totale du lait augmente-t-elle?

L'augmentation de la viscosité dynamique peut être liée à une augmentation de la fraction volumique totale, ϕ_t , selon la relation d'Eilers précédemment citée. Si l'on considère que les protéines sériques, en faible concentration, peuvent être négligées et, que la concentration en caséines reste identique à sa valeur initiale, alors seule la voluminosité caséique, V_c , pourrait expliquer l'augmentation de ϕ_t .

La solubilisation significative de monomères caséiques des micelles dans la phase sérique entraînerait la diminution de la taille micellaire - observée en effet - et pourrait également générer une structure micellaire poreuse et hydratée. Ceci aboutirait à un accroissement de la voluminosité caséique par la solubilisation des monomères et par la porosité des micelles. Une augmentation de l'eau de solvatation micellaire est en effet mise en évidence dans ces mêmes conditions de pH et de température (20°C) (Tarodo de la Fuente et Alais, 1975; Creamer, 1985; Snoeren et al., 1984).

Lin et al. (1972) ainsi que Munya et Larsson-Raznikiewicz (1980) mettent également en évidence que la perte de matériel micellaire après l'addition d'EDTA au lait conduit à une diminution des propriétés de dispersion de la lumière de ce même lait.

La comparaison reste toutefois limitée par le fait que l'élimination de calcium par l'EDTA dans le lait est différente de celle provoquée par l'acidification (Rollema et Brinkhuis, 1989).

En résumé, la solubilisation des caséines micellaires peut expliquer l'augmentation de la viscosité dynamique par celle de la voluminosité caséique.

L'ensemble de ces résultats tend à montrer que la diminution de la turbidité (inhérente à celle de la taille des micelles) ainsi que la hausse de la viscosité dynamique seraient les

conséquences de la solubilisation de composants micellaires et plus particulièrement de caséines colloïdales, en accord avec l'hypothèse de Roefs et al.(1985).

4.2.3 - Phases II et III: augmentation de $\Delta\tau$, floculation et formation du gel

Le potentiel zéta des micelles diminue régulièrement vers la valeur zéro à laquelle correspondent la neutralité de la charge des particules et théoriquement, s'il ne subsiste aucune autre force de stabilisation, leur agrégation.

Avant le point de gel

A 15°C et à 20°C, l'augmentation de la taille des micelles est mise en évidence à pH 5,4 environ donc, légèrement en deçà du pH 5,3 ($pH_{1/2}$) correspondant à la remontée du signal turbidimétrique.

L'accroissement de la taille des particules pourrait être expliqué, dans un premier temps, par la réincorporation dans le réseau protéique des monomères caséiques solubilisés (Rose, 1968; Lin et al.1972; Visser et al.1986).

Par la suite, comme aux températures de 30°C et de 42°C, l'augmentation de la taille des particules correspond à une diminution importante du nombre de particules en suspension illustrant la floculation de particules "primaires" en particules "secondaires" puis "tertiaires" ...

On peut remarquer que la floculation des particules caséiques survient à un pH d'autant plus acide que la température de l'acidification est basse. En effet, le point de floculation des micelles de caséines peut être considéré comme la combinaison de différentes déstabilisations provoquées, entre autre, par la température et par l'acidification. On peut donc imaginer que l'importance croissante de l'une des déstabilisations, en l'occurrence celle de la température (agitation Brownienne

accélérée, augmentation du nombre de chocs entre particules...), peut entraîner la diminution d'une autre, dans notre exemple celle de l'acidification, pour aboutir aux mêmes fins: la floculation des particules caséiques.

En accord avec ces observations, la concentration en caséines solubles diminue fortement dès que le pH 5,3 - 5,4 à 20°C et le pH 5,6 à 30°C sont dépassés (Rose, 1968; Van Hooydonk et al., 1986; Dalgleish et Law, 1988).

Par ailleurs, Tarodo de la Fuente et Alais (1975), Creamer (1985) et Snoeren et al. (1984) montrent, à 20°C, une diminution considérable de la solvation micellaire entre le pH 5,45 et le point isoélectrique de la caséine à pH 4,6. Ces valeurs sont à rapprocher du pH_{I} à 20°C et à 30°C (limites de l'agrégation caséique).

Changement d'état sol-gel

Les premiers signes de gélification, correspondant à la formation d'un réseau caséique, sont mis en évidence par une mesure rhéologique. Comme précédemment, on peut remarquer que le pH de gélification est d'autant plus acide que la température de l'acidification est basse. L'apport d'énergie thermique accélérerait le processus de gélification, tout comme celui de l'agrégation des particules caséiques, par une augmentation du nombre de liaisons hydrophobes possibles, par exemple.

Au point de gel, les courbes turbidimétriques à 30°C et à 42°C montrent un changement de pente significatif ; ce phénomène n'est observé ni à 15°C ni à 20°C (fig. II. 12-13). L'explication d'un épaulement provoqué par le changement d'état sol-gel et, donc, la modification des propriétés optiques du milieu réfléchissant la lumière a déjà été proposé dans le cadre de la coagulation présure par Hardy et Fanni (1981). Elle impliquerait une modification de la structure du milieu, brutale et marquée, à des températures relativement élevées (30°C et 42°C) mais très progressive et atténuée à des températures plus basses (15°C et 20°C).

Bringe et Kinsella (1990) indiquent que les gels de lait formés par action de la GDL à

basses températures ressemblent plus à un fluide épais qu'à un gel ; nos propres observations mènent à des remarques similaires. Ainsi, l'épaulement du signal turbidimétrique serait lié au mode de gélification du système.

Diffusion de la lumière en relation avec l'accroissement de taille des particules

Généralement, la diffusion de la lumière par des particules en suspension dans un liquide suit la loi de Rayleigh si le diamètre, D , des particules est inférieure à $1/4$ de la longueur d'onde incidente, λ . Pour ces particules, l'intensité de la lumière diffusée est proportionnelle à D^6 et varie comme $1/\lambda^4$ (Kastler, 1952).

Lorsque le diamètre des particules grandit et devient comparable à λ , la diffusion de la lumière devient beaucoup plus complexe et répond à la théorie de Mie. Des interférences lumineuses destructives inter- et intra- particules se traduisent par des maxima et minima d'intensité dans le spectre de diffusion. Celui-ci se présente comme la résultante d'un nombre théoriquement infini de vibrations partielles dont l'amplitude et la phase de chacune sont des fonctions compliquées du diamètre de la particule et de son indice de réfraction, par rapport au milieu environnant (Kastler, 1952).

Pour des particules très grandes par rapport à la longueur d'onde, l'intensité de la lumière diffusée prend en compte la diffraction, la réfraction et la réflexion de la lumière par ces particules et devient proportionnelle à D^4 (Kastler, 1952).

Dans le cas de l'acidification du lait suivie par la méthode turbidimétrique ($\lambda = 860\text{nm}$), la loi de Rayleigh s'appliquerait durant la phase précédant le début de l'agrégation des particules caséiques - le diamètre des micelles de caséine étant environ de 200nm - . Puis s'y substituerait de façon transitoire la théorie de Mie. Enfin, pour des agrégats visibles à l'oeil, au point de floculation, la diffusion de la lumière par les particules répondrait au trois principes de l'optique classique (réflexion, réfraction et diffusion).

L'acidification du lait à des températures différentes peut engendrer la formation d'agrégats caséiques de taille distincte de par l'"histoire" des particules primaires

(solubilisation protéique variable ...) et l'énergie thermique fournie au système pour l'agrégation . Les propriétés de diffusion de la lumière par les particules, dont dépend la turbidité du milieu, peuvent ainsi s'en trouver modifiées - surtout dans la zone de l'agrégation - et expliquer en partie l'épaulement obtenu au point de gélification du lait.

Y - aurait - t' il superposition de plusieurs phénomènes ?

Une méthode optique voisine de la méthode turbidimétrique mais utilisant une longueur d'onde différente à 630 nm donnerait un pic au point de gélification qui pourrait correspondre à l'épaulement obtenu avec λ à 860 nm (Dalglish, 1989). Il est possible, en effet, que nous ayons une vue grossière des évènements se déroulant à la gélification et que l'épaulement corresponde en fait à la superposition de deux ou plusieurs phénomènes dont l'évolution de la taille des agrégats, le processus de gélification....

En résumé, il est difficile de trouver une réponse définitive en ce qui concerne l'épaulement observé au point de gélification à 30°C et à 42°C. Un tel phénomène est observé dans le cas de la coagulation présure à des températures supérieures ou égales à 30°C - zone d'activation enzymatique - . Au delà d'un évènement propre à l'activité enzymatique, l'influence de la température pourrait être prépondérante.

Hardy et Fanni (1981) ont mis en évidence, au cours de la coagulation présure, un épaulement de plus en plus marqué avec une concentration en CaCl_2 croissante. Ils proposent également une explication basée d'une part, sur les lois de diffusion de la lumière par des particules de taille diverses et d'autre part, sur le processus de coagulation, plus rapide avec des concentrations en CaCl_2 croissantes.

5 - Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus sur la période de l'acidification précédant la gélification du lait, a permis d'élaborer le schéma III.1.

En rappelant que la neutralisation des charges protéiques et la solubilisation des minéraux colloïdaux sont sous-jacentes au déroulement de l'acidification, le schéma III.1 illustre nos hypothèses concernant la succession d'évènements se déroulant au sein de la micelle dans un premier temps, puis entre particules caséiques dans un second temps :

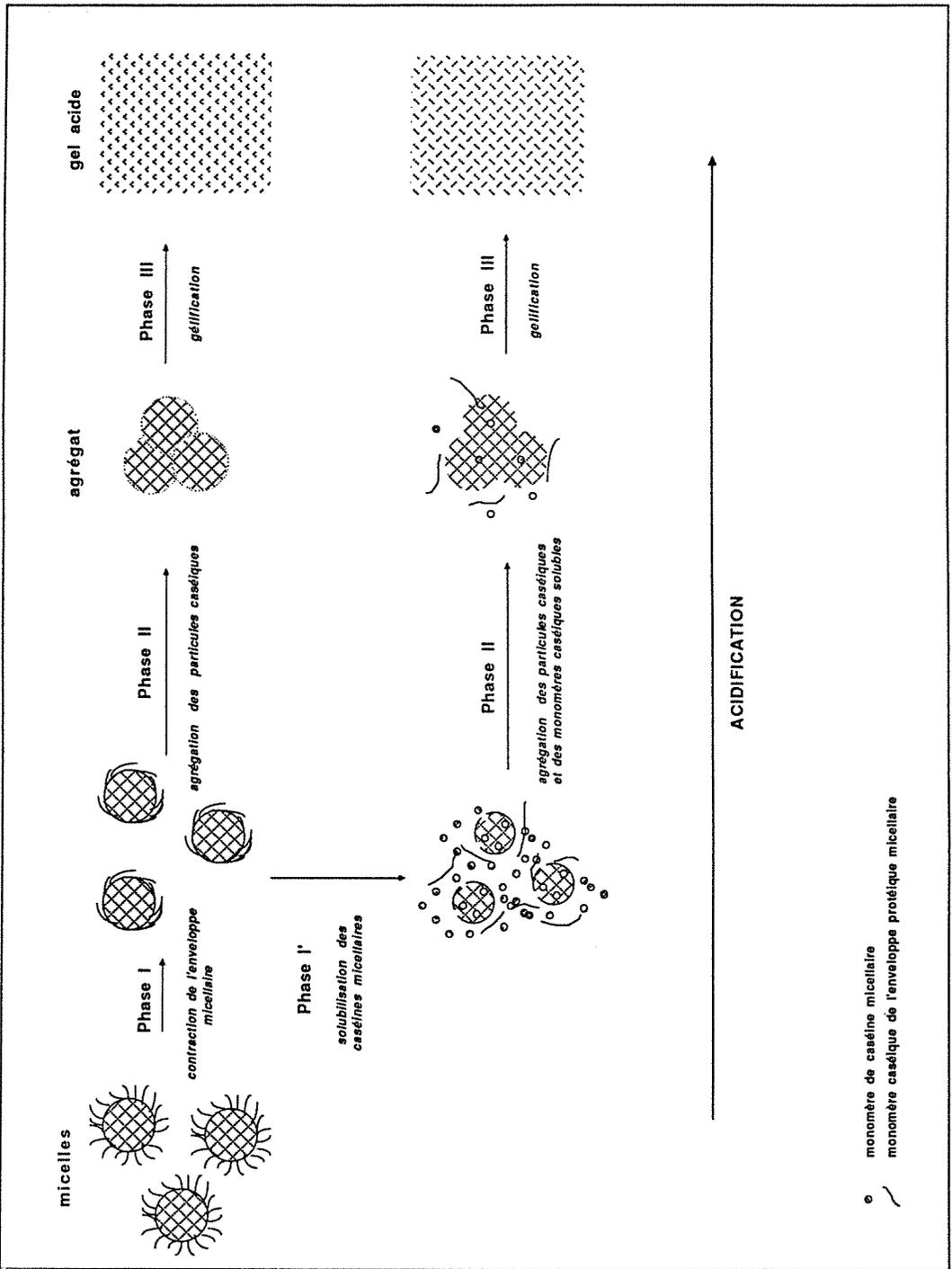
- contraction de l'enveloppe protéique micellaire et diminution des forces de répulsion stérique
- induction de la floculation des particules caséiques
- formation d'un réseau protéique tridimensionnel ou gélification

Le phénomène de solubilisation micellaire, qui apparait avant la floculation, est la conséquence des effets déstabilisants conjugués de l'acidification et de la température.

La déminéralisation micellaire, la neutralisation des charges protéiques et la diminution des interactions hydrophobes entraînent la libération de monomères caséiques colloïdaux.

La contraction de l'enveloppe protéique, provoquée par la réduction du pH, serait l'un des principaux facteurs qui induirait la floculation des particules caséiques. De par la nature des éléments caséiques amenés à flocculer, il peut être attendu un processus de floculation différent avec la température.

A basse température, la participation des monomères solubilisés à l'agrégation caséique correspondrait à un processus dit "floc-particule". A haute température, la floculation entre agrégats caséiques seuls serait de type "floc-floc". Différents types de liaisons sont probablement responsables de l'agrégation irréversible de deux particules : liaisons ioniques, ponts salins par l'intermédiaire de Ca^{2+} , liaisons covalentes entre peptides ... (Walstra, 1990).



Après cette première liaison, d'autres liaisons doivent intervenir pour parachever la fusion des deux particules.

Les hypothèses formulées dans ce travail reposent sur l'observation de différents événements physicochimiques marquants, se recoupant les uns avec les autres, et dont la suite logique a pu être retrouvée dans les profils acido-turbidimétriques. Ces profils correspondraient ainsi à une vision globale de la structure des particules caséiques dans le lait durant l'acidification.

Si l'on se réfère à la revue bibliographique du chapitre I, on peut remarquer que les effets de l'acidification rapportés au niveau micellaire, rappellent fortement les effets de l'emprésurage ou de l'éthanol sur le lait. Même si des événements intimement liés à la structure micellaire sont propres à un type de déstabilisation donné, comme la solubilisation du calcium colloïdal pour l'acidification ou l'hydrolyse de la caséine κ dans l'enveloppe protéique micellaire pour l'emprésurage, il serait intéressant d'aboutir à un schéma global de la déstabilisation des micelles de caséine, de leur agrégation et enfin de la gélification du lait.

Les techniques de microscopie électronique et d'analyse d'image semblent particulièrement adaptées à ce type d'étude, basé sur l'évolution de la structure des micelles de caséine au cours d'un processus dénaturant .

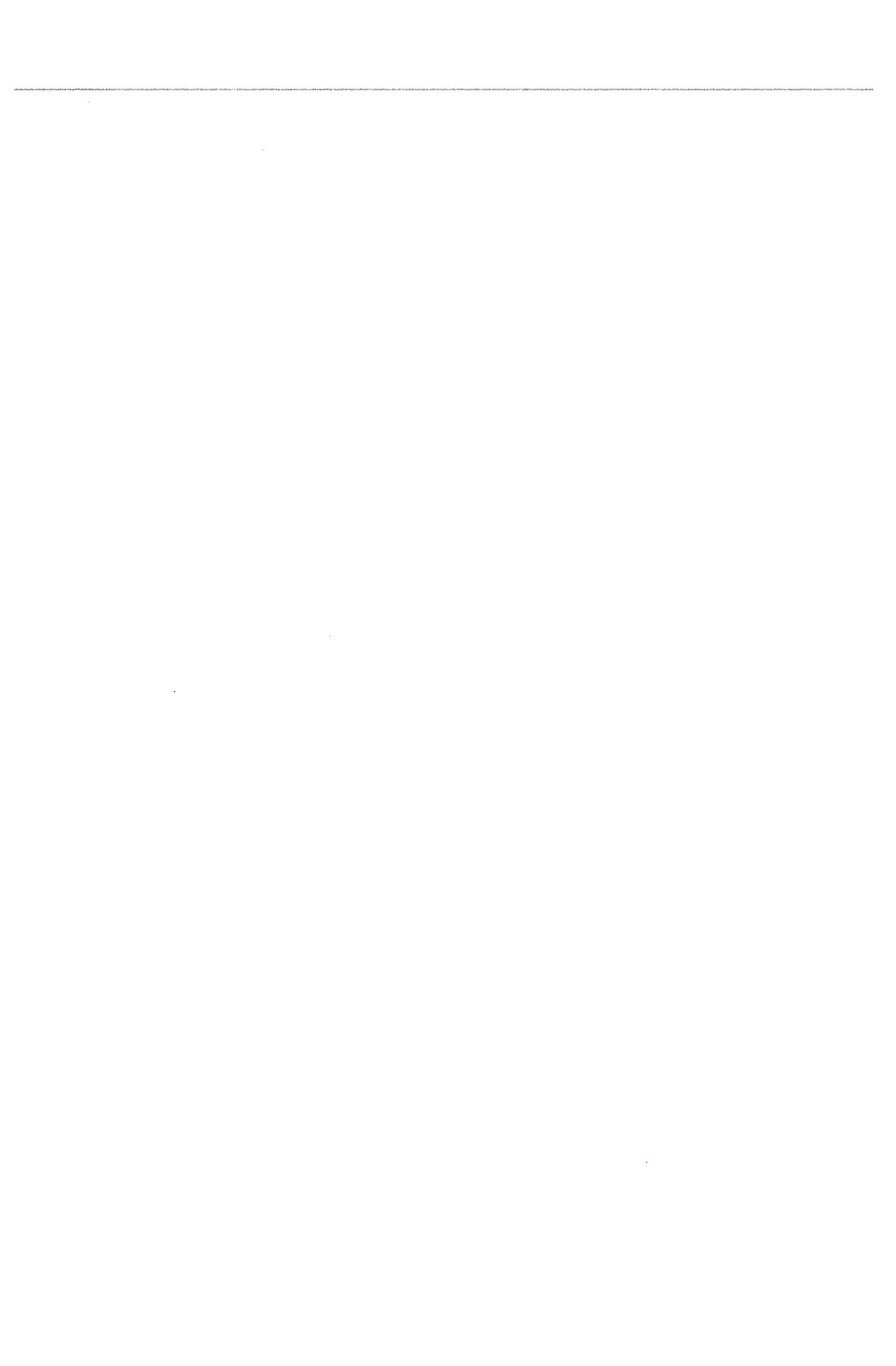
Cependant, le problème d'un échantillonnage sans perturbation du système se pose et mériterait des travaux approfondis.

Une approche de la structure des agrégats colloïdaux peut être réalisée en appliquant la théorie récente des fractals.

Un objet est ainsi dit "fractal" si sa structure, apparemment désordonnée, présente une autosimilarité. On peut ainsi obtenir des informations sur le type de floculation qui survient dans le système et le rapprocher d'un processus type "floc-particules" ou "floc-floc" par exemple. Les hypothèses d'une agrégation initiale entre particules

caséiques et monomères caséiques (floc-particule) à basse température et d'une agrégation entre particules caséiques (floc-floc) à haute température peuvent ainsi être discutées.

Peu de travaux ont été effectués sur l'agrégation micellaire et ainsi, l'approche par la théorie des fractals de la coagulation acide des micelles de caséine sera le sujet du prochain chapitre.









CHAPITRE IV :

APPROCHE DE L'AGREGATION
MICELLAIRE SELON LA THEORIE
DES OBJETS FRACTALS



CHAPITRE IV : APPROCHE DE L'AGREGATION MICELLAIRE SELON LA THEORIE DES OBJETS FRACTALS

1- Introduction

1.1 - Les agrégats colloïdaux et la notion de dimension fractale

Les micelles de caséine sont des particules colloïdales particulièrement résistantes à différents traitements technologiques tels la centrifugation, la stérilisation ou le séchage. Néanmoins, cette stabilité a des limites et il a été montré que l'acidification est l'un des moyens de l'annihiler. De façon similaire à l'action de l'éthanol ou de la présure, l'acidification provoquerait dans une première phase l'élimination des forces de répulsion stérique intermicellaires conduisant finalement à l'agrégation des particules colloïdales. Cette dernière étape est particulièrement délicate à étudier puisqu'elle se situe à l'interface des phases liquide-gel et donc aux limites d'utilisation de nombreuses techniques physico-chimiques.

Depuis une dizaine d'années, le concept des objets fractals développé par Mandelbrot en 1977, a été adapté à l'étude de tels phénomènes. Selon cette théorie, une structure apparemment désordonnée, comme celle d'un réseau caséique, peut recéler une certaine régularité, invariante dans l'espace et symbolisée par la notion de "chaos ordonné". Cette structure dite fractale est caractérisée par une dimension fractale, D , inférieure à la dimension euclidienne, d ($d = 1,2,3$), et non entière.

De façon générale, la dimension fractale, D , est définie par :

$$N(r) = (r/r_0)^D \quad (4.1)$$

avec $N(r)$, le nombre de particules de rayon, r_0 , contenues dans une sphère de rayon, r , au sein d'un agrégat arbitraire.

Pour un processus de croissance, r , représente une taille caractéristique de l'agrégat (ex. rayon de gyration) et l'équation 4.1 devient, alors, une loi reliant la masse et la taille de l'agrégat à différents stades de sa croissance comme l'illustre la figure IV.1:

$$M(r) = (r/r_0)^D \quad (4.2)$$

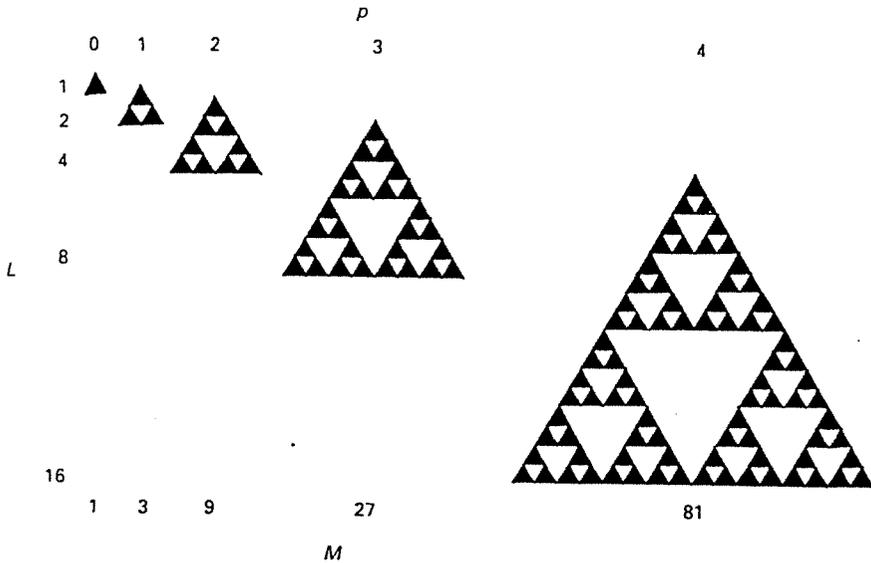


figure IV.1 : Illustration de la croissance d'un polymère de façon strictement définie. A chaque étape de la croissance, p , la masse de l'objet, M , et la longueur d'un côté, L , sont notées (Horne, 1989).

Le tableau IV.1 présente une liste non exhaustive de travaux réalisés sur l'agrégation de particules colloïdales. La dimension fractale d'une structure résultant d'un tel processus d'agrégation est, ainsi, de l'ordre de 1,5 à 2,5 qu'elle soit obtenue par simulation, à l'aide de différents modèles, ou expérimentalement, pour une grande variété de réactions.

Les modèles "flocs-flocs" et "flocs-particules" sont les modèles théoriques fractals de base. Ils correspondent, respectivement, à une agrégation entre flocs et à une agrégation entre flocs et particules. Pour se rapprocher de la réalité, des facteurs limitants de l'agrégation comme la diffusion, la réaction chimique, la déstructuration ou la restructuration (...) peuvent être introduits dans ces modèles de simulation.

Horne (1987,1989) est le premier à avoir utilisé la théorie des objets fractals dans le cas de l'agrégation des micelles natives du lait par action de l'éthanol ou de la présure. Puis Bremer (1989) réalise une étude comparative de la dimension fractale de gels acides de caséinate de sodium et de gels emprésurés de lait par des mesures rhéologique, spectrophotométrique et de perméabilité.

Aucun travail ne semble avoir été réalisé dans le cas de l'agrégation par acidification des micelles natives de caséine. Ainsi, afin de compléter notre étude de l'acidification du lait, la détermination de la dimension fractale de ce type d'agrégation à 20°C, à 30°C et à 42°C sera effectuée en interprétant la dépendance de la turbidité d'une solution avec la longueur d'onde (Horne,1987; Bremer, 1989).

tableau IV.1: valeurs de dimension fractale correspondant à l'agrégation de particules colloïdales et obtenues par différents moyens d'investigation

OBJET FRACTAL ETUDIE	DIMENSION FRACTALE	AUTEURS
Modélisation		
limité par la diffusion :		
* floc-floc	1,45 à 1,5	Meakin, 1983
	1,38 ± 0,06	Kolb et al.1983
*floc-particules	2,5	Meakin, 1983
limité par réaction :		
*floc-floc	2,0	Kolb et al. 1983
	1,53 ± 0,04 (d=2)	Julien et Kolb,1984
	1,98 ± 0,04 (d=3)	"
	2,32 ± 0,04 (d=4)	"
limité par diffusion + désagrégation	1,54 ± 0,08	Botet et Julien, 1985
Expérimental		
fumées : Fe, Zn, SiO ₂	1,7 à 1,9	Forest et Witten,1979
	1,55 à 1,69	"
particules d'or :		
* diffusion	1,7 ± 0,1	Weitz et al. 1984
* réaction	2,0 ± 0,05	"
particules de silice :		
* agrégation lente	2,08 ± 0,05	Aubert et Cannel,1986
* agrégation rapide	1,78 ± 0,05	"
	2,08 ± 0,05	"
Immunoglobulines	2,56 ± 0,3	cité par Horne, 1987
Agrégation de caséines natives		
* présure	2,23	Bremer, 1989
	2,17	"
	2,4	"
	2,4	Horne, 1987
	2,56 ± 0,04	Horne, 1989
* éthanol		
limité par réaction :	2,2 à 2,3	Horne,1987
limité par diffusion :	2,33 ± 0,03	"
	2,29 ± 0,07	"
	2,2 ± 0,2	"
* thermique	2,3 ± 0,1	Nieuwenhuijse et al. (Walstra, 1990)
Caséinate de Na		
* acidification :		
agrégation	2,27 ± 0,05	Bremer,1989
	2,39	"
	2,23	"
gelification	2,19 à 2,36	Bremer et al.,1990

1.2 - Aspect théorique :

Le cheminement théorique conduisant à la détermination de la dimension fractale d'un agrégat par diffusion de la lumière est détaillé par Teixeira (1986). Dans ce paragraphe, seuls quelques éléments mathématiques, indispensables pour la compréhension de notre travail, seront développés.

Les objets fractals montrent une loi de dépendance en puissance de l'intensité de la lumière dispersée I avec le vecteur d'onde, Q :

$$I \sim Q^{-x} \quad (4.3)$$

avec,

$$1/r \ll Q \ll 1/r_0 \quad (4.4)$$

r , taille de l'agrégat
 r_0 , rayon du monomère

$$Q = (4 \pi n / \lambda) \sin \Theta/2 \quad (4.5)$$

n , indice de réfraction
 λ , longueur d'onde de la lumière
 Θ , angle de dispersion

Le facteur x est équivalent à la dimension fractale, D , qui dans ces conditions permet de corréler la taille, r , de l'objet à sa masse, M (équation 4.2).

Oster (1947) a étudié les cinétiques d'agrégation de divers systèmes colloïdaux et a montré, dans le domaine d'application de la loi de Rayleigh, la relation linéaire de la densité optique (ou turbidité) avec le temps ; la pente étant proportionnelle au carré de la concentration en particules colloïdales.

Lorsque $R \geq \lambda/10$, la théorie de Rayleigh-Gans-Debye se substitue à celle de Rayleigh. Son application permet la détermination de la taille et du poids moléculaire de particules par mesure de la lumière dispersée à différents angles d'observation. La technique

complémentaire de turbidimétrie par transmission développée par Doty et Steiner (1950) parvient aux mêmes résultats par mesure de la variation de la turbidité d'une solution avec la longueur d'onde. Ces derniers travaux sont repris par Horne (1987) qui l'adapte à la mesure de la dimension fractale d'agrégats colloïdaux.

La turbidité, τ^* , d'une suspension de particules est la mesure de la réduction de l'intensité du rayon lumineux incident par rapport au rayon transmis. La turbidité, τ^* , est définie comme suit :

$$\tau^* = l \ln (I_0/I) \quad (4.6)$$

avec l , la longueur du trajet optique et I_0/ I , le rapport des intensités des rayons lumineux incident et transmis.

Dans le cas de particules monodisperses de poids moléculaire, W , de concentration, c et d'indice de réfraction, n , proche de celui du solvant, la turbidité est donnée par Doty et Steiner (1950) :

$$\tau^* = HcWQ \quad (4.7)$$

avec

$$H = \frac{32 \pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2}{3 N \lambda^4} \quad (4.8)$$

N est le nombre d'Avogadro, dn/dc , l'incrément de l'indice de réfraction spécifique de la solution et n_0 est l'indice de réfraction du solvant.

La fonction Q résulte des interférences de la lumière dispersée par la particule à tous les angles Θ de dispersion (Teixera, 1986).

D'après l'équation 4.7, la dérivée suivante est obtenue :

$$\frac{d \log \tau^*}{d \log \lambda} = 4 - \frac{d \log Q}{d \log \lambda} - 2 \frac{d \log \left(n \frac{dn}{dc} \right)}{d \log \lambda} = 4 - \beta - \gamma \quad (4.9)$$

Le coefficient de structure β , directement accessible par mesure de la pente de la droite $\log \tau^*$ vs $\log \lambda$, est liée à la structure des agrégats en formation :

$$\beta = \frac{d \log Q}{d \log \lambda} = 4 - \gamma + \frac{d \log \tau^*}{d \log \lambda} \quad (4.10)$$

avec $\gamma = -0,2$ (Horne,1987).

Lorsque β devient invariant avec le grossissement des agrégats, la structuration de l'objet est supposée autosimilaire ; β est alors assimilé à la dimension fractale, D , caractéristique de l'objet dit fractal.

2 - Matériels et méthodes

L'utilisation d'une technique spectrophotométrique implique que le milieu analysé soit translucide. Le lait est donc dilué au 1/250ème afin de se rapprocher des conditions expérimentales choisies par Horne (1987). De même, l'agrégation des micelles de caséine est réalisée en 20 minutes environ par hydrolyse de 2,5% de GDL à 20°C, 30°C et 42°C.

Les profils spectrophotométriques de turbidité en fonction du temps (figures II. 15), présentés dans le chapitre II, sont utilisés pour élaborer les profils $\log \tau^*$ vs $\log \lambda$ à partir desquels seront calculés les coefficients de structure, β .

L'évolution de β avec le temps ou le pH permettra de déterminer la dimension fractale, D , caractéristique de la structure du système étudié.

3 - Résultats et discussion

3.1 - Le système d'étude

Le système d'étude choisi peut être assimilé à une suspension de Y_0 particules identiques dans un volume v_0 de liquide. La concentration $c_0 = Y_0/v_0$ est telle que la distance moyenne entre deux particules est beaucoup plus grande que leur rayon ($c_0 \ll 1$). Le mouvement des particules est supposé indépendant et aléatoire (agitation Brownienne) (Kolb et al. 1986).

Durant l'acidification, lorsque deux particules entrent en contact : soit les forces de répulsion sont suffisantes pour prévenir une agrégation, soit elles ne le sont plus et les deux particules s'aggrègent de façon irréversible. Ce processus "collisionnel" continue entre floccs (agrégation floc-floc) ou entre floccs et particules, en suspension dans le fluide.

A un certain stade de l'agrégation, l'arrangement des monomères dans la structure en formation deviendrait répétitif et pourrait être ainsi décrit par une dimension fractale, D . Tenter de mesurer D dans le cas de lait dilué est l'objet du présent chapitre.

Lorsque la taille des amas formés est telle qu'il y a sédimentation, on peut supposer la formation macroscopique d'un seul agrégat, à un temps infini, par interactions entre l'ensemble des floccs. Ce serait, peut être, alors le point de gel ou la transition sol-gel dans le cas du lait non dilué.

3.2 - le coefficient de structure, β

3.2.1 - $\log \tau^*$ vs $\log \lambda$

Les pentes des droites $\log \tau^*$ vs $\log \lambda$ permettent de calculer le coefficient de structure β selon la relation 4.10. L'ensemble des droites obtenues pour l'acidification à 30°C est donné en exemple (figures IV.2) et met en évidence les bons coefficients de

régression linéaire obtenus avec ce type d'exploitation. Les plus faibles coefficients de régression linéaire correspondent à la région du début de l'agrégation micellaire (entre 460sec. et 580 sec. après l'addition de GDL à 30°C).

3.2.2 - dépendance de β avec le temps et le pH

L'évolution du coefficient de structure β avec le processus de l'agrégation permet de définir la dimension fractale, D , du système.

L'évolution de β avec le temps de l'acidification est représentée dans la figure IV.3.

L'allure des profils est sigmoïdal à 30°C et à 20°C. A 42°C, par contre, la hausse initiale de β avec le temps provient probablement d'une agrégation accélérée des micelles de caséine avec la température. Dans le cadre de l'étude de l'agrégation de particules caséiques, des profils similaires sont obtenus par Horne (1987) et par Bremer (1989).

Le tableau IV.2 détaille les valeurs de β obtenues au cours du temps de l'acidification à 20°C, 30°C et 42°C. On peut remarquer que les valeurs initiales de β sont proches à 30°C et à 42°C avec 1,3 et 1,26 respectivement. A 20°C, par contre β est plus élevé avec une valeur de 2,0.

Lorsque le coefficient de structure, β , tend vers un maximum, constant dans le temps, il peut être assimilé à la dimension fractale, D .

A 20°C, la valeur de la dimension fractale est égale à 2,5. A 30°C et à 42°C, elle est identique et égale à 2,2. La valeur de dimension fractale mesurée par Bremer (1989) à l'aide de la même méthode, dans le cas de l'agrégation de caséinate de sodium par hydrolyse de GDL à 30°C, est du même ordre de grandeur que cette dernière, soit 2,27 \pm 0,05.

D'après le tableau IV.1, il apparaît que les valeurs de dimension fractale correspondant à l'agrégation de particules caséiques (micelles natives ou caséinate de Na) par action de l'éthanol, de la présure, de la chaleur ou de l'acidification sont comprises entre 2,2 et 2,5.

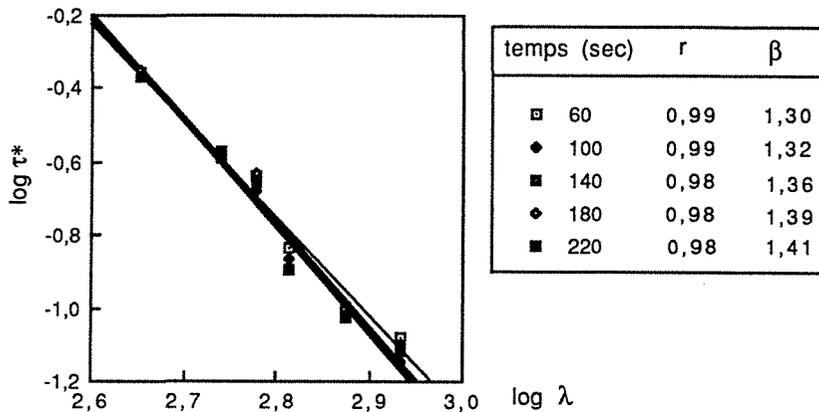


figure IV.2 - A

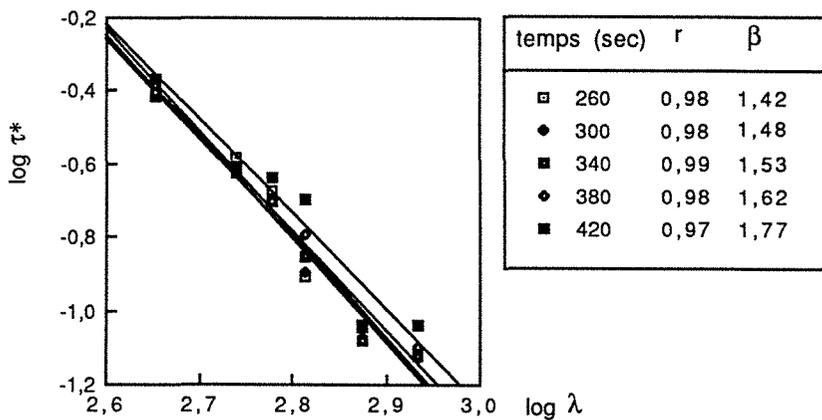


figure IV.2 - B

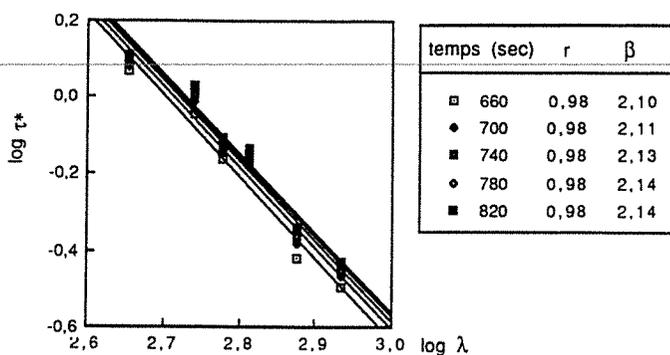


figure IV.2 - C

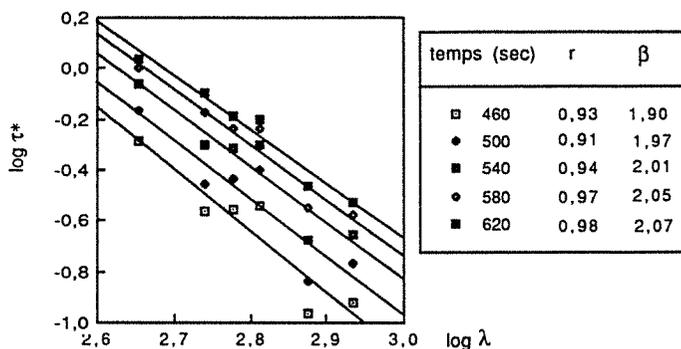


figure IV.2 - D

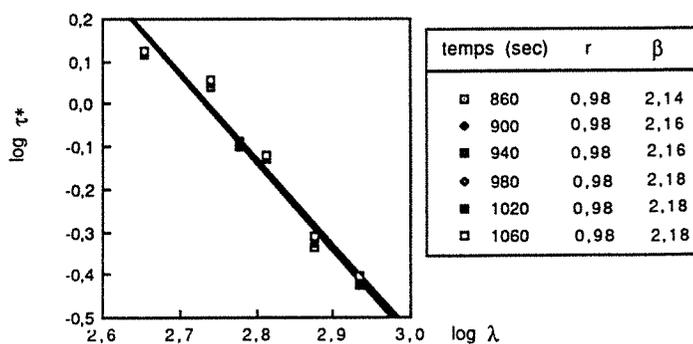


figure IV.2 - E

figures IV.2 : Evolution du $\log \tau^*$ en fonction du $\log \lambda$ à différents temps de l'acidification à 30°C après addition de GDL. A : de 60 à 220 sec ; B : de 260 à 420 sec ; C : de 460 à 620; D : de 660 à 820 sec ; E : de 860 à 1060 sec. Pour chacune des droites obtenues, le coefficient de régression linéaire et le coefficient de structure, β , sont mentionnés.

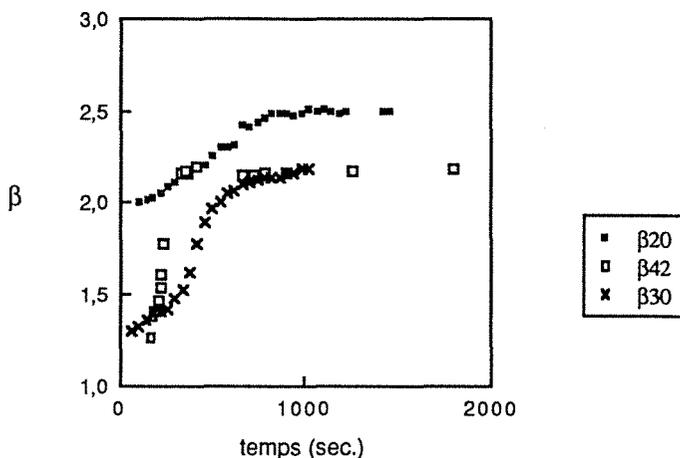


figure IV.3: coefficient de structure β en fonction du temps de l'acidification

La dépendance de β avec le pH est tracée pour rendre compte de l'influence directe et prépondérante de ce paramètre sur l'agrégation colloïdale des micelles (figure IV.4).

Par rapport au profil précédent représentant l'évolution de β avec le temps, il est ainsi mis en évidence une superposition quasi-parfaite des courbes obtenues à 30°C et à 42°C et une nette séparation de la courbe obtenue à 20°C.

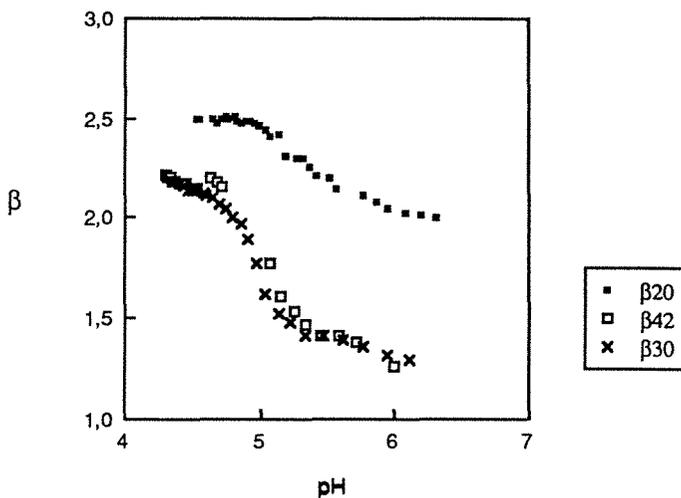


figure IV.4 : coefficient de structure β en fonction du pH

tableau IV.2 : valeurs des coefficients de structure β obtenues au cours de l'acidification à 20°C, 30°C et 42°C.

temps (sec)	20°C	30°C	42°C
60	-	1,30	1,26
80	-	-	1,38
100	2,00	1,32	1,41
120	-	-	1,41
140	2,02	1,36	1,47
160	-	-	1,54
180	2,03	1,39	1,61
200	-	-	1,77
220	2,05	1,41	-
240	-	-	-
260	2,08	1,42	-
280	-	-	-
300	2,11	1,48	-
320	-	-	2,16
340	-	1,53	2,17
360	-	-	2,20
380	2,15	1,62	-
400	-	-	-
420	2,20	1,77	2,15
440	-	-	2,15
420	-	-	2,16
480	-	-	2,16
500	2,26	1,97	2,17
520	-	-	2,18
540	2,30	2,01	2,20
560	-	-	2,20
580	2,30	2,05	2,20
600	-	-	2,21
620	2,31	2,07	-
660	2,42	2,10	-
700	2,41	2,11	-
740	2,44	2,13	-
780	2,46	2,14	-
820	2,48	2,14	-
860	2,48	2,14	-
900	2,49	2,16	-
940	2,47	2,16	-
980	2,49	2,18	-
1020	2,51	2,18	-
1060	2,50	2,18	-
1100	2,51	2,20	-
1140	2,50	2,18	-
1180	2,48	2,21	-
1220	2,50	2,20	-

3.3 - dimension fractale, D, et température de l'acidification

D diminue avec la température de l'acidification de 20°C à 30°C mais apparaît constante à 30°C et à 42°C (tableau IV.3).

La dépendance de la dimension fractale vis à vis de la température peut être rapprochée de celle du processus d'agrégation des micelles de caséine au cours de l'acidification proposé dans le schéma III.1.

température (°C)	dimension fractale, D
20	2,50±0,05
30	2,20±0,01
42	2,20±0,02

tableau IV.3: variation de la dimension fractale, D, avec la température de l'acidification d'une dilution de lait au 1/250ème

Ainsi, la structure des particules caséiques amenées à flocculer est supposée semblable à 30°C et à 42°C mais, par contre, plus poreuse et hydratée à 20°C par suite d'une solubilisation caséique importante.

D'autre part, l'agrégation à 30°C et à 42°C correspondrait à un processus de tendance floc-floc alors qu'à 20°C elle serait plutôt de type floc-particule avec une fixation des monomères caséiques (particules), précédemment solubilisés, sur les agrégats caséiques (flocs). La littérature donne en effet des valeurs de D inférieures pour un modèle d'agrégation floc-floc par rapport à un modèle d'agrégation floc-particule (tableau IV.1).

Dans cette optique, on peut remarquer que les dimensions fractales des agrégats caséiques obtenus par action de la présure sont de l'ordre de 2,4 alors que celles d'agrégats obtenus par action de l'éthanol sont de l'ordre de 2,3. Or, l'action de la

présure sur les micelles de caséine libre des monomères de caséine κ dans le milieu qui, par la suite, pourraient participer au processus d'agrégation, alors de tendance "floc-particule". Par contre, l'effet de l'éthanol sur les micelles provoque une contraction de l'enveloppe micellaire qui induirait l'agrégation des particules selon le type "floc-floc".

Enfin, si l'on considère que l'augmentation de la température entraîne une accélération de la vitesse d'agrégation des particules par une agitation brownienne accrue, la diminution de D , avec l'accroissement de la température d'acidification, peut être rapprochée de celle des travaux de Aubert et Cannel (1986). Ces auteurs observent, en effet, dans le cas de l'agrégation de particules de silice, une dimension fractale moindre (de 2,08 à 1,78) avec une vitesse de réaction accrue (tableau IV.1).

Le système étudié étant très complexe, de par la nature des particules colloïdales et les nombreuses interactions existant entre celles-ci et l'environnement (température, force ionique du milieu, pH...), toutes les combinaisons possibles entre processus "floc-floc", "floc-particule", limité par diffusion ou par réaction ... sont envisageables. Il apparaît ainsi indispensable de multiplier les travaux en ce domaine pour parvenir à une connaissance perfectible des mécanismes d'agrégation micellaire.

4 - Conclusion

La théorie récente des objets fractals est de plus en plus utilisée pour l'étude des mécanismes d'agrégation colloïdale et des structures de gels. L'interprétation des données obtenues demeure néanmoins délicate et l'ensemble des auteurs s'accorde à réaliser soit des comparaisons entre les valeurs de dimension fractale de différents systèmes soit des corrélations avec d'autres techniques de mesure.

Ainsi, le schéma III.1, synthèse de l'ensemble des résultats des chapitres précédents, représente l'évolution structurale possible des particules caséiques au cours de l'acidification et pourrait expliquer en partie les profils de coefficient de structure et les valeurs de dimension fractale obtenues.

Dans un cadre plus général, on peut remarquer que les valeurs de dimension fractale des agrégats caséiques (Horne, 1987-1989) et des gels de caséine (Bremer, 1989; Bremer et al. 1990) sont voisines que le traitement dénaturant utilisé soit l'empresurage, l'acidification, le chauffage ou l'addition d'éthanol (tableau IV.1).

La possible distinction d'un processus d'agrégation de tendance "floc-particule", dans le cas de l'empresurage et de l'acidification à basse température, et d'un processus de tendance "floc-floc", dans celui de l'addition d'éthanol et de l'acidification à haute température, est également permise grâce aux valeurs de dimensions fractales expérimentales.

La similitude des modifications structurales des micelles de caséine au cours de ces traitements a déjà été discutée dans les chapitres II et III. Il serait particulièrement intéressant de pouvoir réaliser l'étude systématique de ces différents systèmes pour aboutir, peut être, à un schéma global de l'agrégation des micelles de caséine et de la gélification du lait.





CONCLUSION GENERALE



CONCLUSION GENERALE

Une première partie expérimentale de ce travail a permis de valider une méthode turbidimétrique au suivi de la coagulation acide du lait. Dans une seconde partie, un schéma de l'évolution de la structure des micelles de caséine au cours de l'acidification a pu être proposé. Enfin, l'approche fractale de l'agrégation micellaire a conduit à certaines hypothèses concernant le type de floculation survenant au cours de différents procédés de transformation du lait.

La méthode turbidimétrique, validée au cours de cette étude, se révèle particulièrement intéressante pour le suivi de l'acidification du lait au niveau fondamental comme au niveau industriel.

L'un de ses principaux avantages est de permettre le suivi intégral de la transformation sol-gel du lait alors que la plupart des méthodes physiques ne sont valides que dans l'une des phases: sol ou gel. De plus, les méthodes optiques traditionnelles nécessitent un milieu très dilué contrairement à celle-ci .

Une analyse comparative des profils turbidimétriques et des résultats obtenus par des outils très performants et spécifiques comme la granulométrie laser ou la vélocimétrie Doppler laser a montré que le signal turbidimétrique rend compte des modifications ultrastructurales des micelles de caséine avec précision et, en temps réel.

La méthode turbidimétrique représente donc un capteur très fiable de la gélification du lait et de plus non destructif, la mesure étant optique. Au niveau industriel, une fabrication de yaourt défectueuse, par exemple, pourrait être décelée très tôt; ce qui permettrait un gain de temps conséquent. Les possibilités d'adaptation de cette sonde à différents procédés de transformation du lait sont également envisageables.

L'approche phénoménologique de l'acidification du lait, réalisée dans ce travail, a abouti à un schéma de synthèse représentant l'évolution de la structure micellaire selon

la température de l'acidification.

Dans une première phase de l'acidification, la contraction de l'enveloppe micellaire, responsable des forces de stabilisation stérique, a été mise en évidence. Un phénomène similaire a également été démontré dans le cas de la coagulation du lait par la présure ou l'éthanol et suggéré dans le cas de la coagulation thermique.

Par ailleurs, la solubilisation des protéines micellaires, provoquées par la combinaison des effets déstabilisants de la réduction du pH et des faibles températures, a pu être replacée dans un contexte phénoménologique plus large.

Le facteur température est ainsi apparu déterminant dans le comportement général des micelles de caséines durant l'acidification.

L'agrégation des particules caséiques serait le résultat des effets cumulés de différents facteurs de déstabilisation dont l'élimination des forces de répulsion stérique, la neutralisation des forces de répulsion électrostatiques et l'agitation thermique.

Selon la température, il y aurait un processus de floculation différent avec, à basse température, la présence de monomères solubilisés qui participeraient à l'agrégation des particules caséiques et, à haute température, seulement des particules caséiques. Le gel formé ainsi présenterait également, une structure différente selon la température.

La constatation d'une solubilisation colloïdale importante sans destruction de l'entité micellaire nous conduit à valider plutôt le modèle micellaire à structure interne. Le modèle submicellaire, constitué de submicelles liées par du phosphate de calcium colloïdal (Schmidt, 1982 ; Ono et Obata, 1989) ou par des interactions hydrophobes (Slattery, 1976), est un édifice fragile lorsqu'il est confronté à une déminéralisation et une solubilisation protéique extensives.

Un modèle basé sur un réseau continu de caséines dans lequel s'"imbriqueraient" d'autres monomères caséiques est plus concevable. En surface de la micelle, l'enveloppe protéique serait en grande partie, constituée de caséines κ .

Les liaisons protéiques dans la micelle résulteraient de la combinaison de liaisons

calciques, électrostatiques et hydrophobes. En effet, la résistance de la structure micellaire à la solubilisation de minéraux colloïdaux, à la neutralisation des charges ou à la diminution de la température montre d'une part une certaine "souplesse" de l'édifice micellaire et d'autre part, une action solidaire de ces différentes liaisons qui permettrait, lorsqu'un type de liaison est affaibli, de maintenir intègre le système.

Pour achever cette étude, la théorie des objets fractals a été choisie afin de décrire, de façon nouvelle, la structuration des agrégats caséiques au cours de l'acidification du lait.

La confrontation des résultats obtenus sur l'acidification du lait avec, d'une part, les données existantes sur l'agrégation caséique et, d'autre part, les deux modèles fractals de base de l'agrégation colloïdale ont permis de proposer une classification des différents procédés de coagulation du lait.

Ainsi, la coagulation présure et la coagulation acide à basse température résulteraient d'une agrégation à tendance "floc-particule" de par la présence, dans le milieu, de monomères protéiques solubles. Le processus d'agrégation par l'éthanol ou par l'acidification à haute température serait plutôt de type "floc-floc". La signification des dimensions fractales correspondantes indiquerait dans le premier cas, un réseau protéique plus dense que dans le second cas.

Les perspectives de poursuite de ce travail sont nombreuses dans le cadre de l'acidification du lait comme dans celui de différents procédés technologiques de transformation du lait.

Ainsi, le rôle des minéraux dans l'acidification du lait demeurent flou et requiert une étude physicochimique approfondie. L'influence de divers paramètres sur la coagulabilité acide des laits peut également être abordée avec, par exemple, les effets du traitement thermique du lait.

Dans un cadre plus général, une étude similaire à celle-ci sur différents procédés d'agrégation micellaire permettrait d'aboutir à une meilleure connaissance des

"réactions" de la micelle face à diverses modifications physicochimiques de son environnement.

Des outils techniques et mathématiques de plus en plus performants tels l'analyse d'images et la théorie des objets fractals ouvrent de nouvelles voies d'investigations permettant, d'une part, l'observation in situ des phénomènes survenant au cours de l'acidification et , d'autre part, leur exploitation.





REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



BIBLIOGRAPHIE

ANFENSEN, C.B. et SHERAGA, H.A. 1975. Experimental and theoretical aspects of protein folding . *Adv. Protein Chem.* 29 : 205

AUBERT, C. et CANNEL, D.S. 1986. Restructuring of colloidal silica aggregates. *Phys. Rev. Lett.* 56 : 738

BINGHAN, E., FARRELL, H. et CARROL, R. 1972. Properties of dephosphorylated α s1-casein . Precipitation by calcium ions and micelle formation. *Biochemistry.* 11 : 2450

BOTET, M. et JULLIEN, R. 1985. Diffusion-limited aggregation with disaggregation. *Phys. Rev. Lett.* 55 : 1943

BREMER, L.G.B. 1989. Theoretical and experimental study of the fractal nature of the structure of casein gels. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1.* 85 : 3359

BREMER, L.G.B., BIJSTERBOSCH, B.H., SCHRIJVERS, R., VAN VLIET, T. et WALSTRA, P. 1990. On the fractal nature of the structure of acid casein gels. *Colloids and Surfaces.* 51 : 159

BRIGNON, G.P., RIBADEAU-DUMAS, B., MERCIER, J.C. et PELISSIER, J. 1977. Complete aminoacid sequence of bovine α ₂-casein. *Febs lett.* 76 : 274

BRINGE, N.A. 1988. "The mechanisms of the acidic coagulation of casein micelles". Thèse. Cornell University, U.S.A.

BRINGE, N.A. et KINSELLA, J.E. 1990. Acidic coagulation of casein micelles - Mechanisms inferred from spectrophotometric studies. *J. Dairy Res.* 57 : 365

BULCHEIM, W. et WELSCH, U. 1973. Evidence for the submicellar composition of casein micelles on the basis of electron microscopical studies. *Neth. Milk Dairy J.* 27:163

CARLSON, A., HILL, C.G. et OLSON, N.F. 1987. Kinetics of milk coagulation. II. Kinetics of the secondary phase : micelle flocculation. *Biotechnol. Bioeng.* 29 : 568.

CHAPLIN, L.C. 1984. Studies on micellar Calcium phosphate : composition and apparent solubility product in milk over a wide pH range. *J. Dairy Res.* 51 : 251

CREAMER, L.K., BERRY, G.P. et MILLS, O.E. 1977. A study of the dissociation of β casein from the bovine casein micelle at low temperature. *New Zeal. J. Dairy Sci. Technol.* 12 : 58

CREAMER, L.K., RICHARDSON, T. et PARRY, D.A.D. 1981. Secondary structure of bovine α_{s1} and β caseins in solution. *Arch. Biochem. Biophys.* 211 : 689

CREAMER, L.K. 1985. Water absorption by renneted casein micelles. *Milchwissenschaft* 40 : 589

DALGLEISH, D.G. 1983. Coagulation of renneted bovine casein micelles; dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *J. Dairy Res.* 50 : 331

DALGLEISH, D.G. 1984. Measurement of electrophoretic mobility and zeta potential from milk using laser doppler electrophoresis. *J. Dairy Res.* 51 : 425

DALGLEISH, D.G. et LAW, A.J.R. 1988. pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *J. Dairy Res.* 55 : 529

DALGLEISH, D.G. et LAW, A.J.R. 1989. pH-induced dissociation of bovine casein micelles. II Mineral solubilization and its relation to casein release. *J. Dairy Res.* 56:72

DALGLEISH, D.G. 1989. Communication personnelle

DAMODARAN, S. et KINSELLA, J.E. 1981. The effects of neutral salts on the stability of macromolecules. *J. Biological Chem.* 256 : 3394

DARLING, D.F. et DICKSON, J. 1979a. The determination of the zeta potential of casein micelles. *J. Dairy Res.* 46 : 329

DARLING, D.F. et DICKSON, J. 1979b. Electrophoretic mobility of casein micelles. *J. Dairy Res.* 46 : 441

DARLING, D.F. 1982. The effect of environmental conditions on the steric stabilization of casein micelles in milk. In *The effect of polymers on dispersion properties*, (Ed.) TADROS, Th.F. Academic Press, New York.

DAVIES, D.T. et WHITE, J.C.D. 1960. The use of ultrafiltration and dialysis in isolating the aqueous phase of milk and determining the partition of milk constituents between the aqueous and disperse phases. *J. Dairy Res.* 27 : 171

DAVIES, D.T. et LAW, A.J.R. 1980. Content and composition of protein in creamery milks in South-West Scotland. *J. Dairy Res.* 47 : 83

DAVIES, D.T. et LAW, A.J.R. 1983. Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. *J. Dairy Res.* 50 : 67

DEANE, D.D. et HAMMOND, E.G. 1960. Coagulation of milk for cheese making by ester hydrolysis. *J. Dairy Sci.* 43 : 1421

DOTY, P. et STEINER, R.F. 1950. Light scattering and spectrophotometry of colloidal solutions. *J. Chem.Phys.* 18 : 1211

DOWNEY, W.K. et MURPHY, R.F. 1970. The temperature dependent dissociation of β casein from bovine casein micelles and complexes. *J. Dairy Res.* 37 : 361

FOREST, S.R. et WITTEN, T.A.Jr. 1979. Long-range correlations in smoke-particle aggregates. *J. Phys. Lett. A* . 12 : L109

FREEMAN, W.H. 1984. Physical forces that determine the properties of proteins. In *Proteins structures and molecular properties* , (Ed.) CREIGHTON, T. E., p. 133.

GARNIER, J. et RIBADEAU DUMAS, B.1970. Structure of the casein micelles : A proposed model . *J. Dairy Res.* 37 : 493

GREEN, M.L. et CRUTCHFIELD, G.1971. Density-gradient electrophoresis of native and of rennet-treated casein micelles. *J. Dairy Res.* 38 : 151

GRIFFIN, M.C.A. 1987. Steric stabilization and flow properties of concentrated casein micellar suspensions. In *Food Colloids* , p. 110. Royal Society Chemistry, London.

GRIFFIN, M.C.A., PRICE, J.C. et GRIFFIN, W.G. 1989. Variation of the viscosity of a concentrated, sterically stabilized, colloid : Effect of ethanol on casein micelles of bovine milk. *J. Colloid Interface Sci.* 128 : 223

GUTHY, K. et NOVAK, G. 1977. Observations on the primary phase of milk coagulation by rennet under standardized conditions . *J. Dairy Res.* 44 : 363

HALLSTROM, M. et DEJMEK, P. 1988a. Rheological properties of ultrafiltered skim milk . I. Effects of pH, temperature and heat pretreatment. *Milchwissenschaft.* 43: 31

HALLSTROM, M. et DEJMEK, P. 1988b. Rheological properties of ultrafiltered skim milk . II. Protein voluminosity. *Milchwissenschaft* 43 : 95

HARDY, J. et FANNI, J. 1981. Application of reflection photometry to the measurement of milk coagulation. *J. Food Sci.* 46 : 1956

HARDY, J., FANNI, J. et WEBER, F. 1981. Etude de la coagulation du lait par photométrie de réflexion diffuse. *Sci. des Aliments* 3 : 351

HARDY, J. et SCHER, J. 1986. Mesure en continu de la coagulation du lait par une méthode optique. In *Automatic Control and Optimisation of Food Process Symp. ACOFOP, Paris.* , p. 357. Elsevier, Londres

HARWALKAR, V.R., KALAB, M. et EMMONS, D.B. 1977. Gels prepared by adding D-glucono- δ -lactone to milk at high temperature. *Milchwissenschaft*. 32 : 400

HERSKOVITS, T.T. 1966. On the conformation of caseins. Optical rotatory properties. *Biochemistry*. 5 : 1018

HILL, R.J. et WAKE, R.G. 1969. Amphiphile nature of κ -casein as the basis for its micelle stabilizing property. *Nature*. 221: 635

HOLT, C. 1975. In *Proceedings of the International Conference on Colloid and Surface Sci.* , (Ed.) WOLFRAM, E., p. 641 . Akademiai Kiado, Budapest.

HOLT, C. et DALGLEISH, D.G. 1986. electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particle with an outer hairy layer. *J. Colloid Interface Sci.* 114 : 513

HOLT, C. 1989. Composition and structure of micellar Calcium Phosphate. *J. Dairy Sci.* 56 : 411

HORNE, D.S. et DALGLEISH, D.G. 1981. Electrostatic interactions and the kinetics of protein aggregation : α s1-casein. *International J. Biol. Macromol.* 2 : 154

HORNE, D.S. 1984. Steric effects in the coagulation of casein micelles by ethanol. *Biopolymers* 23 : 989

HORNE, D.S. et DAVIDSON, C.M. 1986. The effects of environmental conditions on the steric stabilization of casein micelles. *Colloid Polymer Sci.* 264: 727

HORNE, D.S. 1987. Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. *Far. Disc.Chem. Soc.* 83 : 259

HORNE, D.S. 1989. Application of fractal concepts to the study of caseinate aggregation phenomena . *J. Dairy Res.* 56 : 535

JABLONKA, M.S., MUNRO, P.A.et DUFFY, G.G. 1988. Use of light scattering techniques to study the kinetics of precipitation of mineral acid casein from skim milk. *J. Dairy Res.* 55 : 179

JENNESS, R. et KOOPS, J., 1962. Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.* 16 : 153

JULLIEN, R. et KOLB, M.1984. Hierarchical model for chemically limited cluster-cluster aggregation. *J. Phys. A.* 17 : L639

KASTLER, A. 1952. La diffusion de la lumière par les milieux troubles : influence de la grosseur des particules. *Actualités Scientifiques et Industrielles.* (Ed.) HERMANN & Cie, Paris

KAUZMAN, W.1959. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* 14 : 1

KINSELLA, J.E. 1982. Relationship between Structure and Functional Properties of Food Proteins. In *Food Proteins.*, (Ed.) FOX, P.F. and CONDON, J.J, p. 51. Applied Science Publishers, London

KOLB, M., BOTET, R. et JULLIEN, R. 1983. Scaling of kinetically growing clusters. *Phys. Rev. Lett.* 51 : 1123

KOLB M., JULLIEN R. et BOTET R. 1986. Scaling properties of cluster and particle aggregation. In *Scaling Phenomena in Disordered Systems.*, (Ed.) PYNN, R. et SKJELTOP, A., p. 71. Plenum, New York

KOROLCZUK, J., MAUBOIS, J.L. et LOHEAC, J. 1986. Suivi de la coagulation présure à l'aide d'un nouveau capteur réfractométrique. *Le Lait* . 66 : 327

LIN, S.H.C., LEONG, S.L., DEWAN, R.K., BLOOMFIELD, V.A. et MORR, C.V. 1972. Effect of calcium ions on the structure of native bovine casein micelles. *Biochem.* 11 : 1818

LITTLE, L. 1968. Techniques for acidified dairy products. *J. Dairy Sci.* 50 : 434

MABBIT, L.A., CHAPMAN, H.R. et BERRIDGE, N. 1956. Experiments in cheesemaking without starter. *J. Dairy Res.* 22 : 365

Mc MAHON, D.J, BROWN, R.J et ERSTRON, C.A. 1984. Enzymic coagulation of milk casein micelles. *J. Dairy Sci.* 67 : 745.

MANDELBROT, B.B. 1977. *The fractal geometry of nature.* (Ed.) FREEMAN, New York

MEAKIN, P. 1983. Formation of fractal clusters and network by irreversible diffusion-limited aggregation. *Phys. Rev. Lett.* 51: 1119

MERCIER, J.C., GROSCLAUDE, F. et RIBADEAU-DUMAS, B. 1972. Primary structure of bovine caseins : A review. *Milchwissenschaft* . 27 : 402

MORR, C.V. 1967. Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *J. Dairy Sci.* 50 : 174-175

- MUNYA, J.K. et LARSSON-RAZNIKIEWICZ. 1980. The influence of Ca^{++} on the size and light scattering properties of casein micelles. 1. Ca^{++} removal. *Milchwissenschaft*. 35 : 604
- NOELKEN, M. et REIBSTEIN, M. 1968. The conformation of β -casein B. *Arch. Biochem. Biophys.* 123 : 397
- ONO, T. et OBATA, T. 1989. A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits. *J. Dairy Res.* 56 : 453
- OSTER. 1947. Light scattering from polymerizing and coagulating systems. *J. Colloid Sci.* 2 : 291
- OVERBEEK, J. Th. G. 1982. In *Colloid dispersions..* (Ed.) GOODWIN, J.W., p.1. Royal Society of Chemistry, London
- PATEL, R.S. et CHAKRABORTY, B.K. 1985. Acid curd cheese by direct acidification. *Jap. J. Dairy and Food Sci.* 34 : A53
- PARRY, R.M.Jr. et CARROLL, R.J. 1969. Lactation of κ -casein in milk micelles *Bioch. Biophys. Acta* 194 : 138
- PAYENS, T.A.J. 1966. Association of caseins and their relation to structure of the casein micelle. *J. Dairy Sci.* 49 : 1317
- PAYENS, T.A.J. 1978. On different modes of casein clotting : the kinetics of enzymatic and non-enzymatic coagulation compared. *Neth. Milk Dairy J.* 32 : 170
- PAYENS, T.A.J. 1979. Casein micelles ; the colloid-chemical approach. *J. Dairy Res.* 46 : 291

PAYENS, T.A.J. et VREEMAN, H.J. 1982. Casein micelles and micelles of κ and β casein. In *Solution Behaviour of Surfactants* . (Ed.) MITTAL et FENDLER. Plenum Publishing Corp., New York

PEARCE, K.N. 1976. Moving boundary electrophoresis of native and rennet-treated casein micelles. *J. Dairy Res.* 43 : 27

PEPPER, L. et FARRELL, H.M. Jr. 1982. Interactions leading to formation of casein submicelles, *J. Dairy Sci.* 65 : 2259

POST, C.B. et ZIMM, B.H. 1982. Theory of DNA condensation : collapse versus aggregation. *Biopolymers* 21 : 2123

ROEFS, S.P.F.M., WALSTRA, P., DALGLEISH, D.G. et HORNE, D.S. 1985. Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification. *Neth. Milk Dairy J.* 39 : 119

ROEFS, S.P.F.M. 1986. " Structure of acid casein gels . A study of gels formed after acidification in the cold". Thèse Wageningen, Netherlands.

ROLLEMA, H.S. et BRINKHUIS, J.A. 1989. A $^1\text{H-NMR}$ study of bovine casein micelles ; influence of pH, temperature and calcium ions on micellar structure. *J. Dairy Res.* 56 : 417

ROSE, D. 1968. Relation between micellar and serum casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 51 : 1897

SCHER, J. et HARDY, J. 1987. Utilisation d'une méthode turbidimétrique pour étudier l'effet des étapes de préparation des laits sur leur coagulabilité. *Sci. Alim.* 7:159

SCHER J. 1988. "Contribution à l'étude de l'influence de la composition du lait et de la taille des micelles sur la coagulation enzymatique . Approche statistique et phénoménologique". Thèse INPL , Nancy, France.

SCHMIDT, D.G. 1980. Colloidal aspects of casein. *Neth. Milk Dairy J.* 34 : 42

SCHMIDT, D.G. 1982. *Developments in Dairy Chemistry.* (Ed.) FOX, P.F. Applied Science Publishers, London.

SCHMIDT, D.G. et POLL, J.K. 1986. Electrokinetic measurements on heated and unheated casein micelle systems. *Neth. Milk Dairy J.* 40 : 269

SCOTT, R. 1986. Acid precipitated curds. In *Cheesemaking Practice.*, p.168. Elsevier Applied Science Publishers, London

SERPELLONI, M., LEFEVRE, P. et DUSAUTOIS, C. 1990. Glucono-Delta-Lactone in milk ripening. *Dairy Ind. Int.* 55 : 35

SHIMMIN, P.D. et HILL, R.D. 1964. An electron microscope study of the internal structure of casein micelles. *J. Dairy Res.* 31 : 121

SLATTERY, 1976. Review : casein micelle structure : an examination of models. *J. Dairy Sci.* 59 : 1547

SLATTERY, C.W. 1978. Variation in the glycosylation pattern of bovine κ -casein with micellar size and its relationship to a micelle model. *Biochemistry* 17 : 1100

SNOEREN, T.H.M., DAMMAM, A.J. et KLOK, H.J. 1982. The viscosity of skim milk concentrates. *Neth. Milk Dairy J.* 36 : 305

SNOEREN, T.H.M., KLOK, H.J., VAN HOOYDONK, A.C.M. et DAMMAM, A.J. 1984. The voluminosity of casein micelles. *Milchwissenschaft* 39 : 461

SONTAG, H. et STRENGE, K. 1987. *Coagulation kinetics and structure formation* ,(Ed.) VINCENT, B. Plenum Press, New York and London.

SURKOV, B.A., KLIMOVSKII, I.I. et KRAYUSHKIN, V.A. 1982. Turbidimetric study of kinetics and mechanism of milk clotting by rennet. *Milchwissenschaft* 37 : 393

SWAISGOOD, H.E., BRUNNER, J.R., LILLEVIK, H.A. 1964. Physical parameters of κ -casein from cow's milk. *Biochemistry* 3 : 1616

TARODO DE LA FUENTE, B et ALAIS, C. 1975. Solvation of casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 58 : 293

TEIXERA, J. 1986. Experimental Methods for Studying Fractal Aggregates. In *Growth and Form* , (Ed.) STANLEY, H.E. et OSTROWSKY, N, p. 145.

TROP, M. 1984. Simulation of bacterial fermentation of milk and possible acylation of its proteins by acidogen hydrolysis. *J. Dairy Sci.* 67 : 1381

VAN DIJK, H. J.M. 1990a. The properties of casein micelles . 1. The nature of the micellar calcium phosphate. *Neth. Milk Dairy J.* 44 : 65

VAN DIJK, H. J.M. 1990b. The properties of casein micelles . 2. Formation and degradation of the micellar Calcium Phosphate. *Neth. Milk Dairy J.* 44 : 111

VAN DIJK, H. J.M. 1990c. The properties of casein micelles . 3. Changes in the casein micelles . *Neth. Milk Dairy J.* 44 : 125

VAN HOOYDONK, A.C.M., HAGERDOON, H.G. et BOERRIGTER, I.J. 1986. pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. I. Effect of acidification on physico-chemical properties. *Neth. Milk Dairy J.* 40 : 281

VISSER, J., MINIHAN, A., SMITS, P., TJAN, S.B. et HEERTJE, I. 1986. Effects of pH and temperature on the milk salt system. *Neth. Milk Dairy J.* 40 : 351

WALSTRA, P. 1979. The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *J. Dairy Res.* 46 : 317

WALSTRA, P., BLOOMFIELD, V.A., WEI, G.J. et JENNESS, R. 1981. Effect of chymosin action on the hydrodynamic diameter of casein micelles. *Biochimica Biophysica Acta* 669 : 258

WALSTRA, P. 1984. In *Dairy Chemistry Physics*. (Ed.) WALSTRA, P et JENNESS, R. WILEY, J. et SONS, New York

WALSTRA, P. 1990. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73 : 1965

WAUGH, D. F., CREAMER, L.K., SLATTERY, C.W. et DRESDNER, G.W. 1970. Core polymers of casein micelles. *Biochemistry* 9 : 785

WHEELLOCK, J.V. 1980. Influence of Physiological Factors Affecting the Yields And Contents of Milk Constituents of Commercial Importance. (Ed.) MOORE, J.H. et ROOK, J.A.F. *Int. Dairy Fed. Doc.*

WEITZ, D.A., LIN, M.Y. et SANDROFF, C.J. 1985. Colloidal aggregation revisited: new insights based on fractal structure and surface enhanced Raman scattering. *Surface Sci.* 158 : 147

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur TARODO DE LA FUENTE, Professeur, Université de Montpellier,
Monsieur DODDS, Directeur de Recherches CNRS, ENSIC/INPL.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame DESOBRY-BANON Sylvie

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse
intitulée :

**"Modification de la structure des micelles de caseine lors de l'acidification par
hydrolyse de Glucono Delta Lactone"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : "BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"

Fait à Vandoeuvre le, 5 Septembre 1991

Le Président de l'IN.P.L.,

M. GANTOÏS





The first part of this study deals with the structure, the colloidal properties and the compartment in an acid medium of the milk casein micelles. The steric stabilization of the micelles by an outer " hairy " layer is particularly bring to the fore.

Milk acidification by hydrolysis of Glucono-Delta-Lactone (GDL) is followed optically in various conditions of temperature and GDL concentrations. This has permitted to validate a turbidimetric method which principle is based on light reflection. Then, an acido-turbidimetric profile can be considered as a characteristic of one acidification temperature (15°C, 20°C, 30°C and 42°C).

The micellar compartment during acidification is studied (chapter III) with colloidal techniques as capillary viscosimetry, laser granulometry or electrophoretic mobility (zeta potential).

With the help of literature, a schematical representation of the micellar mechanisms occurring during milk acidification is finally proposed. The neutralization of the repulsive electrostatic forces should give rised to the collapse of the outer hairy layer and to micellar material solubilization (calcium and casein monomers). Subjected to Brownian motion, the collisions between these destabilized particles should lead to their flocculation.

The casein aggregates formation is studied according to the fractal theory. The fractal dimension values (D) obtained by spectrophotometry are in agreement with literature.

The temperature dependance of D could signified that the casein aggregate structure is more dense with lower temperature.

La synthèse bibliographique, constituant la première partie de ce travail se divise selon trois thèmes la structure, les propriétés colloïdales et le comportement en milieu acide des micelles de caséine du lait. Le rôle stabilisateur de l'enveloppe protéique diffuse des micelles est particulièrement mis en évidence.

L'acidification par hydrolyse de la Glucono-Delta-Lactone (GDL) conduit à la gélification du lait. Le suivi optique de ce processus (chapitre II), dans diverses conditions de température et de concentration en GDL, aboutit à la validation d'une méthode turbidimétrique basée sur la réflexion de la lumière. Les profils acido-turbidimétriques, ainsi obtenus, se révèlent caractéristiques d'une température d'acidification (15, 20, 30 et 42°C).

Le comportement des micelles de caséine durant l'acidification du lait est étudié (chapitre III) grâce à diverses techniques colloïdales telles la viscosimétrie capillaire, la granulométrie laser ou la mobilité électrophorétique (potentiel zéta).

Confortée par de nombreux travaux de la littérature, une représentation schématique des mécanismes micellaires conduisant à la gélification du lait est finalement proposée. Ainsi la neutralisation des forces de répulsion électrostatiques des micelles provoquerait une contraction de leur enveloppe protéique diffuse et la fragilisation de leur structure interne (solubilisation de calcium et de caséines). Soumises à l'agitation Brownienne, les collisions entre ces particules déstabilisées résulteraient en leur floculation.

La formation d'agrégats caséiques est finalement (chapitre IV) traitée selon la théorie des objets fractals. Les valeurs de dimension fractale (D) obtenues à l'aide d'une méthode spectrophotométrique sont en accord avec celles de la littérature.

La dépendance de D vis à vis de la température d'acidification mettrait en évidence une structure plus dense à 20°C qu'à 30°C et 42°C et un phénomène d'agrégation type floc-floc ou floc-particule.