



HAL
open science

Etude structurale et rhéologique des systèmes mixtes caséinates/carraghénanes

Merveille Clay Nono Djamen

► **To cite this version:**

Merveille Clay Nono Djamen. Etude structurale et rhéologique des systèmes mixtes caséinates/carraghénanes. Autre. Université du Maine, 2011. Français. NNT : 2011LEMA1012 . tel-00652071

HAL Id: tel-00652071

<https://theses.hal.science/tel-00652071>

Submitted on 14 Dec 2011

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.

THESE

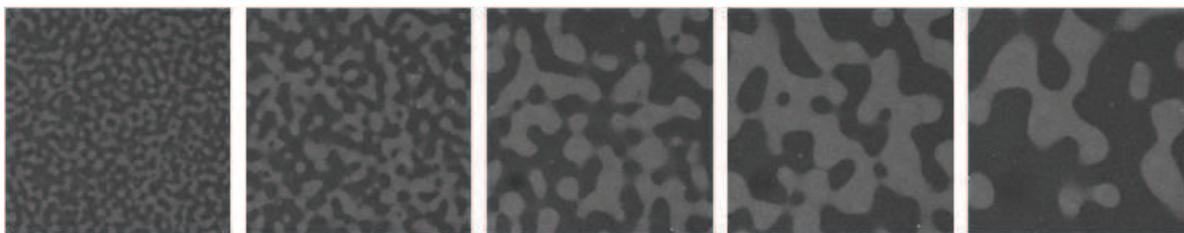
Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur

Spécialité CHIMIE ET PHYSICO-CHIMIE DES POLYMERES

par

Merveille Clay NONO DJAMEN



Etude structurale et rhéologique des systèmes mixtes caséinates/carraghénanes

Soutenue publiquement le 14 février 2011 devant le jury composé de :

Mme Camille MICHON	SPAB-IPA, AgroParisTech, Paris	<i>Rapporteur</i>
Mme Sylvie TURGEON	STELA, Université de Laval, Québec	<i>Rapporteur</i>
M. Alan PARKER	FIRMENICH SA, Genève	<i>Président du jury</i>
Mme Anne PITKOWSKI	Groupe BEL, Vendôme	<i>Examinateur</i>
M. Dominique DURAND	CNRS- PCI, Université du Maine, Le Mans	<i>Examinateur</i>
M. Taco NICOLAI	CNRS- PCI, Université du Maine, Le Mans	<i>Examinateur</i>

A ma famille,

A ma Clarice.

Avant-propos

Cette thèse, a été réalisée à l'université du Maine, au sein du laboratoire PCI (Polymères, Colloïdes et Interfaces), sous la direction conjointe de M. Dominique DURAND et de M. Taco NICOLAI. Je tiens particulièrement à les remercier pour la confiance et l'aide qu'ils m'ont apporté au cours de ces trois dernières années. Je profite de cette occasion pour souligner la chance qui m'a été offerte de pouvoir profiter de leur complémentarité tant d'un point de vue scientifique qu'humain.

Ce travail a été rendu possible grâce à une collaboration, aussi bien scientifique que financier, avec le Département de Recherche Appliqué du Groupe Bel. J'adresse mes sincères remerciements à Marie-Hélène Chassagne, Benoît Goldschmidt et Anne Pitkowski pour avoir suivi et encadré ce travail. Leur gentillesse et leur disponibilité ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Je remercie également Guillaume Houze pour ces conseils et sa gentillesse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mme Camille Michon, professeur à AgroParisTech et Mme Sylvie Turgeon, professeur à l'université de Laval, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs. Je remercie également M. Alan Parker, senior Scientist au centre de recherche Firmenich, pour avoir accepté de présider le jury.

J'exprime également mes sincères remerciements à tous les membres du laboratoire PCI pour leur aide, leur conseil et leur disponibilité, et plus particulièrement mon Danie, très chère à mon cœur. Un grand merci à Jean-lucounet pour sa disponibilité et son aide à toute épreuve.

Enfin mes plus vifs et sincères remerciements vont à tous les thésards du laboratoire que j'ai rencontré tout au long de ces trois années. Un merci particulier à mon Eliseounette de m'avoir fait passer un séjour agréable et inoubliable au Mans.

Une très grande pensée et un grand merci à tous les membres de ma famille et mes proches qui ont toujours été là à mes côtés, m'ont soutenue et encouragée pendant toutes mes études.

Sommaire

Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Introduction générale..... 20

Chapitre I: Etude bibliographique

A- Caséines et caséinates de sodium 24

I.1. Les caséines 24

I.2. Les micelles de caséines : la composition, la structure..... 25

I.2.1. La composition25

I.2.2. La structure25

I.3. Dissociation par précipitation acide..... 28

I.4. Les caséinates de sodium..... 29

I.4.1. Caractérisation structurale.....29

I.4.2. Comportement en suspension29

I.4.3. Influence du pH et de la température.....30

I.4.4. Influence de la force ionique.....30

B- Les carraghénanes 31

<i>I.1. Structure chimique des différents types de carraghénane.....</i>	<i>31</i>
<i>I.2. Les propriétés structurales et rhéologiques.....</i>	<i>32</i>
<i>I.2.1. Conformation en solution et transition pelote - hélice</i>	<i>32</i>
Influence des ions.....	35
<i>I.2.2. Gélification</i>	<i>37</i>
I.2.2.1. Influence du temps et de la température	37
I.2.2.2. Influence de la force ionique	38
I.2.2.3. Influence du pH	39
I.2.2.4. Influence de la concentration et de la masse molaire	39
I.2.2.5. Modèles de gélification.....	39
<i>I.3. Les mélanges iota et kappa carraghénane</i>	<i>41</i>
<i>C- Mélange caséines et polysaccharides</i>	<i>42</i>
<i>I.1. Comportement et structure des mélanges polysaccharides - protéines</i>	<i>42</i>
<i>I.1.1. Nature des interactions dans les systèmes polysaccharides-protéines.....</i>	<i>42</i>
<i>I.1.2. Mécanismes</i>	<i>42</i>
I.1.2.1. Co-solubilité.....	43
I.1.2.2. Séparation de phase ségrégative.....	43
I.1.2.2.1. Incompatibilité thermodynamique	44
I.1.2.2.2. Phénomène de déplétion- floculation	44
I.1.2.2.3. Diagramme de phase	45

I.1.2.3. Co-agrégation.....	46
<i>I.2. Mélanges carraghénanes et caséines</i>	46
I.2.1. Travaux antérieurs.....	46
I.2.1.1. Co - agrégation.....	50
I.2.1.2. Séparation de phase ségrégative.....	51
I.2.2. Les propriétés rhéologiques des mélanges caséines et carraghénane.....	52
<i>References bibliographiques.....</i>	56

Chapitre II: Matériels et méthodes

<i>II.1. Matériels.....</i>	72
II.1.1. Préparation des échantillons	72
II.1.1.1. Caséinate de sodium.....	72
II.1.1.2. Submicelles de caséines.....	73
II.1.1.3. Carraghénanes	73
II.1.2. Préparation des mélanges caséines/ carraghénanes	74
<i>II.2. Méthodes.....</i>	75
II.2.1. Protocole	75
II.2.1.1. Dosage des caséines	75
II.2.1.2. Dosage des carraghénanes	75
I.2.1.3. Marquage des caséines	76

II.2.1.4. Marquage des carraghénanes	76
II.2.2. Techniques expérimentales	77
II.2.2.1. Techniques de diffusion de la lumière.....	77
II.2.2.1.1. Diffusion statique de la lumière classique	77
II.2.2.1.2. Diffusion dynamique de la lumière	81
II.2.2.1.3. Diffusion statique de la lumière en milieu turbide (3DLS)	83
II.2.2.2. Microscopie confocale à balayage laser en mode fluorescence.....	84
II.2.2.3. Rhéologie	86
II.2.2.3.1. Etude en régime permanent.....	86
II.2.2.3.2. Etude en régime oscillant	87
II.2.2.3.3. Appareillage et protocole expérimental	88
II.a. Influence de la géométrie et du gap.....	88
II.b. Influence de la vitesse de rampe	90
<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>91</i>

Chapitre III: Etude des mélanges SC et KC sous forme pelote

<i>III.1. Morphologie des mélanges.....</i>	<i>94</i>
III.1.1. Observation des images prises immédiatement après mélange (t_0).....	94
III.1.1.1. Système sans sel ou en présence de sel non spécifique (NaCl) et à pH 7	94
III.1.1.2. Etude du contraste	97
III.1.1.3. Système en présence de sel spécifique (KCl) et à pH 7	98

III.1.2. Observation au cours du vieillissement	99
III.1.2.1. Domaine monophasique	99
III.1.2.2. Domaine biphasique	100
III.2. Analyse des agrégats	102
III.2.2. Influence du vieillissement	104
III.2.3. Influence de la dilution.....	105
III.2.4. Influence de la force ionique et du pH.....	106
III.3. Diagramme de phase	108
III.3.1. Système en présence de NaCl et pH 7.....	109
III.3.2. Système sans sel et à pH 7	110
III.4. Conclusion.....	111
Références bibliographiques.....	112

<p>Chapitre IV: Gélification des mélanges monophasiques de SC et de KC</p>

IV.1. Système sans sel.....	114
IV.1.1. Température critique de gélification	114
IV.1.2. Etude cinétique.....	116
IV.1.3. Température critique de fonte	117
IV.1.4. Dépendance en fréquence des modules à 2°C.....	118

<i>IV.2. Système avec un sel non spécifique du KC : sodium</i>	<i>119</i>
IV.2.1. Influence de la température et dépendance en fréquence des modules à 2°C.....	119
IV.2.2. Influence de la concentration de SC et de KC.....	121
<i>IV.3. Système avec un sel spécifique du KC : le potassium</i>	<i>122</i>
<i>IV.4. Système mixte en présence d'iodure de sodium</i>	<i>123</i>
<i>IV.5. Structure du gel mixte</i>	<i>128</i>
<i>IV.6 Conclusion.....</i>	<i>131</i>
<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>132</i>

<p>Chapitre V: Etude comparative des SC et des submicelles de caséines</p>

<i>V.1. Etude des mélanges submicelles de caséines et KC sous forme pelote</i>	<i>134</i>
V.1.1. Morphologie	134
V.1.2. Séparation de phase	135
V.1.3. Formation des agrégats.....	136
<i>V.2. Gélification des mélanges submicelles de caséines et KC.....</i>	<i>137</i>
V.2.1. Etude de la solution de KC	137
V.2.2. Etude des mélanges homogènes	139

V.2.2.1. Influence de la nature du sel	139
V.2.2.2. Influence de la nature de la caséine	140
V.2.3. Systèmes submicelles de caséine et KC.....	141
<i>V.3. Conclusion.....</i>	<i>143</i>

Propriétés structurales et rhéologiques des systèmes mixtes SC et IC

<i>VI.1. Etude d'une solution de IC pur.....</i>	<i>145</i>
VI.1.1. Etude cinétique.....	145
VI.1.2. Effet du type de sel	146
VI.1.3. Effet de la concentration de IC	148
VI.1.4. Effet de la force ionique	149
VI.1.5. Comparaison KC et IC	150
<i>VI.2 Etude des mélanges SC et IC sous forme pelote</i>	<i>152</i>
VI.2.1. Morphologie	152
VI.2.2. Diagramme de phase.....	153
<i>VI.3. Gélification des mélanges monophasiques SC et IC.....</i>	<i>154</i>
VI.3.1. Influence de la concentration de SC	154
VI.3.2. Influence de la force ionique	157
<i>VI.4. Conclusion.....</i>	<i>160</i>

Références bibliographiques..... 161

Conclusion générale..... 164

Annexes

Résumé

RESUME

Les produits laitiers d'aujourd'hui contiennent souvent des polysaccharides qui permettent de les texturer et de les stabiliser. La compréhension et le contrôle de ces mélanges sont essentiels pour la fabrication et le développement de nouveaux produits.

Le carraghénane est un polysaccharide sulfaté provenant des algues. Il existe principalement trois types de carraghénanes : le λ -carraghénane, le κ -carraghénane (KC) et l' ι -carraghénane (IC). Les deux derniers sont ceux utilisés pour notre étude. Le KC et l'IC présentent une transition pelote-hélice en dessous d'une température critique qui dépend du type et de la concentration de cations. Dans la conformation hélice, les chaînes peuvent s'agréger, puis gélifier.

La caséine est la protéine majoritaire du lait. Dans le lait, elle est présente sous forme d'un complexe stabilisé par le phosphate de calcium colloïdal (CCP). Le caséinate de sodium (SC) est obtenu à partir de la caséine native en enlevant le CCP par acidification, puis par addition de soude. Dans l'eau, les particules de SC ont un rayon de 11 nm et sont constituées d'environ 15 molécules de caséines. Les mêmes particules peuvent être formées par chélation du CCP par le triphosphate de sodium. Elles sont alors appelées submicelles de caséines.

Le projet de cette thèse vise à approfondir les connaissances sur la nature des interactions dans les systèmes mixtes caséinates/carraghénane. Ce mélange est un modèle pour certains produits laitiers.

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

Etude des mélanges de SC et de KC sous forme pelote. Nous avons établi un diagramme de phase à l'aide de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL), de la spectroscopie UV et de la rhéologie. Deux domaines ont été définis : un domaine biphasique aux fortes concentrations de SC où la séparation de phase est ségrégative et un domaine monophasique aux faibles concentrations des deux composés. Dans les mélanges monophasiques ou biphasiques, nous avons observé des agrégats riches en protéines qui sont irréversibles. Ces agrégats contiennent très peu de carraghénane et ont un impact sur la viscosité du mélange. La teneur en protéine dans ces agrégats augmente linéairement avec l'augmentation de la concentration de KC mais est indépendante de la concentration de SC. Cette fraction est également influencée par le pH et la force ionique.

Gélification des mélanges monophasiques de SC et de KC. Les caséines n'influencent pas la température critique de gélification, mais augmentent la température critique de fonte ainsi que le module du gel. Nous avons montré que le système forme un gel mixte. Ce gel mixte contient deux types de liaisons : des liaisons entre SC-KC et des liaisons entre KC-KC purs. La compétition entre ces deux types d'interactions dépend de la force ionique et de la nature du sel.

Etude comparative des SC et des submicelles de caséines. On n'observe aucune différence entre les deux systèmes, à part la diminution de la température critique de gélification due au triphosphate de sodium.

Etude comparative de KC et d'IC en présence de SC. La séparation de phase ségrégative des mélanges d'IC est déplacée vers les hautes concentrations de SC. Le pourcentage d'agrégats dans le mélange est négligeable. On observe également la présence d'un gel mixte, mais de module plus faible.

En conclusion, cette thèse a permis de mieux comprendre le comportement complexe des carraghénanes dans les suspensions de caséines, ce qui devrait permettre le développement plus rationnel de certains produits laitiers.

Mots clés : caséinates, carraghénanes, gel mixte, interaction, séparation de phase, diagramme de phase, structure, agrégation, gélification, rhéologie, diffusion de la lumière, microscopie confocale.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

SC : Caséinate de sodium

KC : Kappa carraghénane

IC : Iota carraghénane

LC : Lambda carraghénane

NaCl : Chlorure de sodium

[NaCl] : Concentration de chlorure de sodium

KCl : Chlorure de potassium

[KCl] : Concentration de chlorure de potassium

CCP : Phosphate de calcium colloïdal

NaTPP : Triphosphate de sodium

pH : Potentiel Hydrogène

pI : Potentiel Hydrogène

PPCN : Poudre de caséine micellaire

RITC : Marqueur Rhodamine B isothiocyanate

λ : Longueur d'onde

ϵ : Coefficient d'extinction molaire

A_{280nm} : Absorbance à 280 nm

L : Largeur

PMT : Détecteur photomultiplicateur à tube

G' : Module élastique

G'' : Module visqueux

T : Température

T_c : Température critique de refroidissement

T_h : Température critique de chauffage

G' : Module élastique

G'' : Module visqueux

C : Concentration

C_{SC} : Concentration de SC

C_{KC} : Concentration de KC

C_T : Concentration totale

t₀ : Temps initial

t : Temps

j : Jours

DTAF : Marqueur 5-(4,6-Dichloro-s-triazin-2-amino-fluorescein)

F : Teneur ou fraction en protéines dans les complexes

C₀ : Contraste

MAT : Matière azotée totale

ES : Extrait sec

M_a : Masse apparente

R_a : Rayon apparent

q : Norme du vecteur de diffusion

I_r : Intensité relative diffusée

K : constante d'appareil

a_C : Déplacements horizontaux

b_C : Déplacements verticaux

Techniques

MCBL : Microscopie confocale à balayage laser

CLSM : Confocal laser scanning microscopy

DRX : Diffraction des rayons X

RMN : Rayonnement magnétique nucléaire

DSC : Calorimétrie différentielle à balayage

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

SLS : Diffusion statique de la lumière

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

3DLS : Diffusion statique de la lumière en milieu turbide

UV : Spectroscopie à ultra-violet

Introduction générale

Introduction générale

Les produits alimentaires sont souvent composés d'ingrédients tels que les protéines et les polysaccharides à cause de leurs propriétés épaississantes, gélifiantes, stabilisantes et émulsifiantes.

Les paramètres qui influencent les propriétés de chacun de ces biopolymères sont la masse molaire et la polymolécularité, la conformation chimique, la concentration, la densité de charges, le pH, la force ionique, la température, la qualité du solvant, la nature et la force des interactions intermoléculaires et intramoléculaires.

Lorsque ces 2 biopolymères sont mélangés, les propriétés physico-chimiques deviennent plus complexes. La stabilité et la microstructure des produits ne dépendent plus seulement des propriétés physico-chimiques des protéines ou des polysaccharides isolés mais aussi de la nature et de la force des interactions entre les 2 constituants. Ces interactions affectent les propriétés structurales, rhéologiques, physicochimiques et la stabilité des mélanges.

Généralement, les mélanges de protéines et de polysaccharides conduisent à un phénomène de séparation de phase avec une phase riche en protéines et une phase riche en polysaccharides. Deux mécanismes peuvent expliquer ce comportement : l'incompatibilité thermodynamique ou le phénomène de déplétion-floculation. Dans ces systèmes mixtes, il peut aussi se produire un phénomène de co-agrégation si les deux biopolymères portent des charges opposées.

Il est donc important de comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces mélanges afin de les maîtriser lors des processus de mise en œuvre.

Notre travail a eu pour objectif de contribuer à une meilleure compréhension de ces mécanismes par l'étude structurale et rhéologique de systèmes modèles caséinates/carraghénane. Cette étude s'inscrit également dans le cadre d'un projet de recherche en collaboration avec les fromageries BEL qui a pour objet les « polysaccharides en fonte ».

La stratégie d'étude adoptée a consisté à travailler sur des mélanges modèles caséinate/carraghénanes. En effet, le carraghénane est un polysaccharide gélifiant qui a été beaucoup étudié au laboratoire Polymères Colloïdes Interfaces. C'est un polysaccharide sulfaté provenant des algues. Il existe 3 principaux types de carraghénanes : le kappa

carraghénane, le iota carraghénane et le lambda carraghénane. Le kappa et le iota carraghénane montre une transition pelote-hélice en dessous d'une température critique qui dépend du type et de la concentration en cations. Dans la conformation hélice, les chaînes de kappa et de iota carraghénane peuvent s'agréger, puis conduire à un gel.

Ces systèmes mixtes caséinate /carraghénanes constituent un modèle pour certains produits laitiers.

Ce manuscrit est composé de 6 chapitres :

Le premier chapitre recense les travaux antérieurs réalisés sur les caséinates, les carraghénanes et les mélanges caséinates/carraghénanes. L'accent a été mis sur la co-agrégation, la séparation de phase ségrégative et les propriétés rhéologiques de ces mélanges.

Le deuxième chapitre décrit la préparation des échantillons ainsi que les protocoles expérimentaux et les différentes techniques utilisées au cours de ce travail.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude des mélanges caséinates de sodium (SC)/kappa carraghénane (KC). Nous présentons dans un premier temps la morphologie des mélanges, puis l'analyse des agrégats formés entre le SC et le KC et enfin le diagramme de phase.

Le quatrième chapitre traite de la gélification des mélanges monophasiques caséinates de sodium/kappa carraghénane. Les influences de différents paramètres (concentration en biopolymères, force ionique, nature du sel) sur les modules et les températures critiques des systèmes mixtes sont étudiés. Puis, nous décrivons la structure du gel mixte.

Le cinquième chapitre est consacré à la comparaison des systèmes mixtes caséinates de sodium/kappa carraghénane, puis submicelles de caséines/kappa carraghénane. La morphologie, l'agrégation et les propriétés rhéologiques ont été étudiés.

Le sixième chapitre est consacré à l'étude du système mixte caséinates de sodium/iota carraghénane et à sa comparaison avec le kappa carraghénane.

Chapitre I : Etude bibliographique

A- Caséines et caséinates de sodium

I.1. Les caséines

Les caséines représentent 80% des protéines du lait de vache (Lucey, Johnson and Horne, 2003) .

Il existe 4 types de molécules de caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ , dans les proportions 3 :1 :3 :1 (de Kruif and Holt, 2003; Walstra and Jenness, 1984) . On retrouve également une petite quantité de γ -caséines qui proviennent essentiellement de la dégradation des β -caséines par l'action des plasmines (Bastian and Brow, 1996). Ces différentes caséines ont des masses molaires variant entre 20 et 25 kg/mol et des points isoélectriques situés entre 4.96 et 5.64. Les caséines proviennent de la polycondensation de différents aminoacides dont essentiellement la leucine, la proline, l'acide glutamique et la sérine. La composition en acides aminés leur confère une certaine hydrophobicité ce qui leur permet de s'associer aisément. Les points de ressemblance entre les caséines sont : leur faible solubilité à pH 4.6, l'absence de résidus disulfures et de structures secondaires ainsi que la présence de groupements phosphates. Cependant, elles se distinguent entre elles par leur hydrophobicité, leur sensibilité à la précipitation du calcium et la distribution de leur charge.

- α_{s1} -caséine (Ginger and Grigor, 1999) (masse molaire 23Kg/mol, 199 résidus) : Elle est constituée de 2 régions hydrophobes, séparées par une région hydrophile très chargée contenant 8 groupes de phosphate, ce qui en fait la protéine la plus chargée du lait. Elle peut être précipitée avec de très faibles quantités de calcium.

- α_{s2} -caséine (Brignon, Ribadeau-Dumas, Mercier, Pelissier and Das, 1977; Ginger et al., 1999) (masse molaire 25 kg/mol, 207 résidus) : Les charges négatives sont concentrées près de l'extrémité N-terminale et les charges positives près de l'extrémité C-terminale, ce qui en fait la protéine la plus hydrophile. Elle peut également être précipitée avec de très faibles quantités de calcium.

- β -caséine (Ginger et al., 1999; Rollema, 1992) (masse molaire 24Kg/mol, 209 résidus) : Elle est composée d'une région N-terminale hydrophile très chargée négativement et d'une région C-terminale hydrophobe, ce qui lui donne une structure amphiphile. C'est la plus hydrophobe des protéines. Elle est très sensible à la température mais moins au calcium.

- κ -caséine (Ginger et al., 1999; Rollema, 1992) (masse molaire 19Kg/mol, 169 résidus) : Elle contient une région N-terminale hydrophobe et une région C-terminale hydrophile faiblement chargée. C'est un copolymère amphiphile. La région comprise entre les résidus peptidiques 20 et 115 est chargée positivement ; ces régions restent positives même à des pH alcalins (Snoeren, 1975) . Elle diffère des autres caséines par sa faible sensibilité au calcium car elle ne possède qu'un seul groupement phosphoséryl. Ainsi, elle permet de stabiliser les autres caséines.

Dans le lait, ces molécules sont présentes sous forme de grandes particules qui sont communément appelées micelles de caséines. Ces micelles de caséines coexistent à l'équilibre avec des molécules libres de caséines. La structure exacte de ces agrégats de caséine n'a pas encore été élucidée bien que divers modèles aient été proposés.

I.2. Les micelles de caséines : la composition, la structure

I.2.1. La composition

La micelle de caséines est formée par la combinaison d'environ 92% de protéines (α_{s1} , α_{s2} , β et κ), de quelques fragments peptidiques provenant de la protéolyse de la caséine β (Fox, 1989) et de 8% de produits minéraux dont les principaux sont les phosphates de calcium, plus souvent appelés phosphates de calcium colloïdal (CCP) qui assurent en partie la cohésion (Schmidt, 1980) . La micelle est une particule plus ou moins sphérique avec un aspect granuleux ressemblant à une framboise. Dans le lait, il existe plusieurs types d'interactions entre les caséines : les interactions électrostatiques, hydrophobes, les liaisons hydrogène et les ponts disulfures (Schmidt, 1982) . Leur équilibre dépend de différents paramètres tels que le pH, la température et la force ionique (Horne, 1998; Rollema, 1992)

I.2.2. La structure

Horne suggère qu'il existe 2 types de liaisons à l'intérieur de la micelle de caséines (Horne, 1998) : Les interactions hydrophobes et l'interaction entre le phosphate de calcium et les résidus phosphorylés des molécules de caséines (Holt, 2004) Les caséines κ seraient situées

en périphérie car elles ne peuvent se combiner que par des interactions hydrophobes. La quantité de caséines κ étant insuffisante pour recouvrir l'intégralité de la périphérie, la surface serait également recouverte par la caséine β . Ainsi, la micelle ne serait perméable uniquement qu'aux petites molécules.

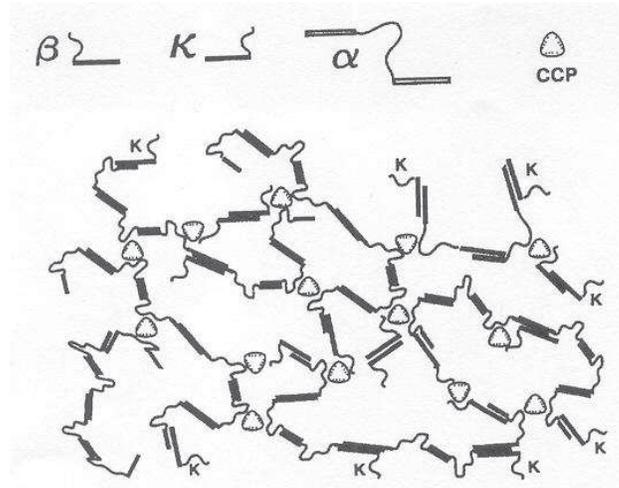


Figure I. 1 : Liaisons à l'intérieur de la micelle de caséine, d'après Horne (1998)

Actuellement, 2 grands modèles se dégagent pour décrire la structure de la micelle de caséines :

* **Le premier modèle** est basé sur des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS) (Walstra, 1999) . Celui-ci propose que la micelle serait constituée de submicelles sphériques d'environ 10 nm de diamètre reliées entre elles par des phosphates de calcium colloïdaux (CCP). Il existerait 2 types de submicelles dans la micelle : le premier, constitué de caséines α_{s1} et β , est situé essentiellement à l'intérieur de la micelle. Le second, composé de caséines α_{s1} , α_{s2} et κ , est localisé à la périphérie de la micelle.

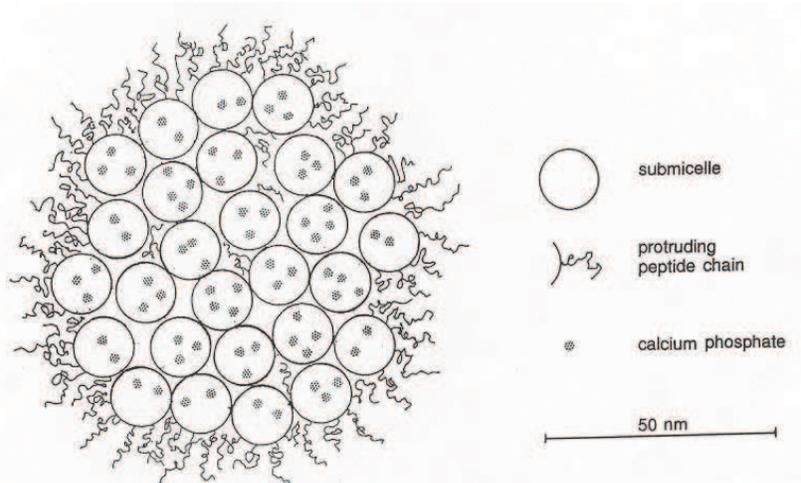


Figure I. 2: Modèle de la micelle de caséine, d'après Walstra (1999)

* D'après le **deuxième modèle** (Holt, 1992) , la micelle serait une sorte de gel minéralisé de protéines associées entre elles par les nanoclusters de phosphate de calcium colloïdal. La neutralisation des charges par le phosphate de calcium permettrait aux interactions hydrophobes de maintenir la forme de la micelle. L'intérieur de la micelle serait hydrophobe et l'extérieur hydrophile. Les expériences de diffusion de rayons X faites par Marchin et al. montrent qu'il n'existerait pas de structure submicellaire à l'intérieur de la micelle et qu'il y aurait des domaines denses correspondant aux particules de CCP (Marchin, Putaux, Pignon and Léonil, 2007) .

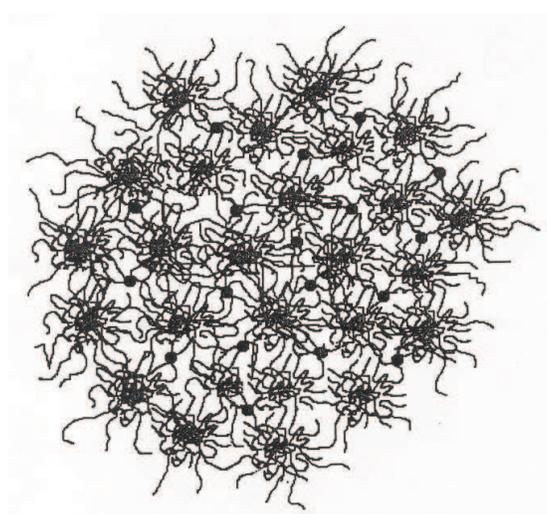


Figure I. 3: Modèle de la micelle de caséine, d'après Holt (1992).

De tous ces modèles, il ressort que la micelle de caséines est une particule plus ou moins sphérique, constituée d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile composée de

caséines κ et β . Cette couronne souvent appelée « couche chevelue », est négativement chargée et a une épaisseur d'environ de 10 nm. Elle permet la stabilisation stérique et électrostatique de la micelle (Dalglish, 1998) .

La taille de ces micelles n'est pas monodisperse et a un diamètre allant de 50nm à 500nm (de Kruif, 1998) , dont la valeur moyenne en z est de l'ordre de 150nm (Morris, Foster and Harding, 2000) . Leurs masses sont également situées entre $2 \cdot 10^5$ et $2 \cdot 10^6$ Kg/mol (Holt, 1992) et leur voluminosité est comprise entre 4 et 5 mL/g (Morris et al., 2000) . Cette grande valeur est due à la présence d'eau au sein des micelles. La caséine κ est surtout localisée en surface et la partie hydrophile des ses chaînes peptidiques, d'environ 12 nm de longueur, permet de stabiliser stériquement la micelle.

I.3. Dissociation par précipitation acide

Les micelles de caséines peuvent être dissociées de plusieurs façons : un traitement à haute pression (De La Fuente, 1998) , un abaissement de la température (De La Fuente, 1998) , une dialyse (Jang and Swaisgood, 1990) , une chélation du calcium (Panouillé, 2004; Pitkowski, 2007; Udabage, McKinnon and Augustin, 2000) ou une précipitation acide (Povey, Golding, Higgs and Wang, 1999) . Cette dernière méthode est utilisée pour préparer industriellement les caséinates.

Le caséinate est obtenu à partir des caséines du lait acidifié à pH 4.6, sous l'action des acides (HCl ou H₂SO₄) ou des ferments lactiques (Kumosinski, Pessen, Farrell and Brumberger, 1988; Povey et al., 1999) . A ce pH, le complexe micellaire est détruit et les caséines s'assemblent et précipitent sous la forme d'un coagulum. Le coagulum est séparé du lactosérum acide par centrifugation. Il est lavé plusieurs fois à l'eau pour éliminer le lactose, les sels et l'acide. La caséine acide obtenue contient environ 50% d'eau. A cette étape, pour obtenir une poudre de caséine acide, on fait directement le séchage et le broyage. Mais, si on veut extraire le caséinate, on solubilise la caséine dans de l'eau par addition d'une solution alcaline qui dépendra du type de caséinate souhaité. Enfin, le séchage du caséinate est effectué par atomisation ou sur un sécheur à cylindres. La qualité microbiologique, la composition chimique des caséinates et les propriétés (la solubilité, la viscosité, la capacité émulsifiante et moussante) détermineront le choix du caséinate à utiliser en fonction des

applications souhaitées. La structure micellaire de la caséine est détruite pendant l'élaboration du caséinate de sodium.

I.4. Les caséinates de sodium

Ils sont obtenus par précipitation acide et neutralisation des caséinates acides par NaOH. Dans une solution aqueuse et à force ionique suffisante, elles forment des petits agrégats d'environ 11 nm (HadjSadok, Pitkowski, Benyahia, Nicolai and Moulai-Mostefa, 2008) . Les particules formées par les caséinates de sodium obtenues par la méthode de chélation ont à peu près la même taille que celles obtenues par précipitation acide (Panouillé, Benyahia, Durand and Nicolai, 2005a) .

I.4.1. Caractérisation structurale

Par des techniques de diffusion de la lumière à 20°C, des auteurs ont observé deux populations distinctes dans une solution de caséinate de sodium : des petites particules de caséinates de sodium contenant environ 15 molécules de caséines avec un rayon hydrodynamique d'environ 11 nm et des grands agrégats d'une taille d'environ 60 nm (Chu, Zhou, Wu and Farrell, 1995; HadjSadok et al., 2008; Nash, Pinder, Hemar and Singh, 2002) . Bien que sa contribution à la diffusion de la lumière soit importante, la concentration massique des grandes particules représente moins d'un pourcent (HadjSadok et al., 2008) . Plusieurs auteurs ont montré que la taille des particules dépend du pH (O'Kennedy, Mounsey, Murphy, Duggan and Kelly, 2006) , de la force ionique (Panouillé, Nicolai, Benyahia and Durand, 2005b) et de la température (Panouillé et al., 2005b) .

I.4.2. Comportement en suspension

A faible concentration de protéines, à 20°C, à pH 7 et à 0.1M NaCl, la solution de caséinate de sodium est transparente. Au dessus de 10 g/L, les solutions deviennent légèrement opaques à cause de la présence des grandes particules qu'on ne peut pas complètement enlever par centrifugation et filtration (HadjSadok et al., 2008) .

La viscosité des caséinates est très faible pour des concentrations inférieures à 100g/L. Au delà de cette concentration, elle augmente fortement (Pitkowski, Durand and Nicolai, 2008) . La viscosité diminue lorsque la température augmente. Les caséinates de sodium s'agrègent à des températures supérieures à 135°C, ce qui peut entraîner une modification de leurs propriétés fonctionnelles (Dalglish, Pouliot and Paquin, 1987) .

I.4.3. Influence du pH et de la température

La gélification acide des caséinates de sodium se déroule entre les pH 5.2-4.7 et elle est très sensible à l'environnement ionique (HadjSadok et al., 2008; Koh, Merino and Dickinson, 2002; O'Kennedy et al., 2006) . En présence de sel, la gélification commence à pH 5.

La viscosité diminue avec l'augmentation de la température (Guo, Fox, Flynn and Mohammad, 1989) mais augmente avec la baisse du pH (Baretto et al., 2003; Carr, Munro and Campanella, 2002) . A des hautes températures (supérieures à 135°C), les caséinates de sodium peuvent s'agréger, ce qui peut entraîner une modification de leurs propriétés fonctionnelles (Dalglish et al., 1987; Guo, Fox, Flynn and Kindstedt, 1996) .

I.4.4. Influence de la force ionique

La présence de sels tels que NaCl ralentit la gélification acide du caséinate et diminue également le pH auquel a lieu la gélification (O'Kennedy et al., 2006) . A 0.1M NaCl, la gélification intervient à pH 5 alors qu'en absence de sel, elle a lieu à pH 4.75. Ceci peut s'expliquer par l'écrantage des charges de la protéine par le sel qui induit une diminution des interactions entre les particules. En présence de sel, le gel formé est faible et une très forte concentration de sel peut même empêcher la gélification.

L'agrégation de caséinates de sodium peut être induite par l'addition du calcium. L'agrégation rend la solution turbide. Avec le temps, les agrégats croissent et précipitent. La quantité de caséines dans les agrégats augmente avec la concentration de calcium mais ne dépend pas de la concentration de caséines. Il y a très peu de calcium qui participe à l'agrégation des caséines (Dalglish and Parker, 1980; Dalglish, Paterson and Horne, 1981; Dickinson et al., 2001; Pitkowski, Nicolai and Durand, 2009)

B- Les carraghénanes

I.1. Structure chimique des différents types de carraghénane

Les carraghénanes sont des polysaccharides linéaires constitués de molécules de galactoses et d'anhydro-galactose plus ou moins sulfatés (Morris, 2007) . La chaîne est constituée de sous-unités appelées carrabioses comprenant deux galactoses liés par une liaison β (1-3). Ces carrabioses sont liés entre eux dans la chaîne par des liaisons α (1-4). Selon la position et le nombre de groupements sulfates sur le cycle carboné, on distingue les kappa (κ), les iota (ι) et les lambda (λ) carraghénanes.

Rees et son équipe (Rees, 1969) ont déterminé les structures des carraghénanes. Ce sont des copolymères alternés du type $(AB)_n$ (Anderson et al., 1968a) . Les structures du KC, du IC et du LC sont représentées sur la figure I. 4 :

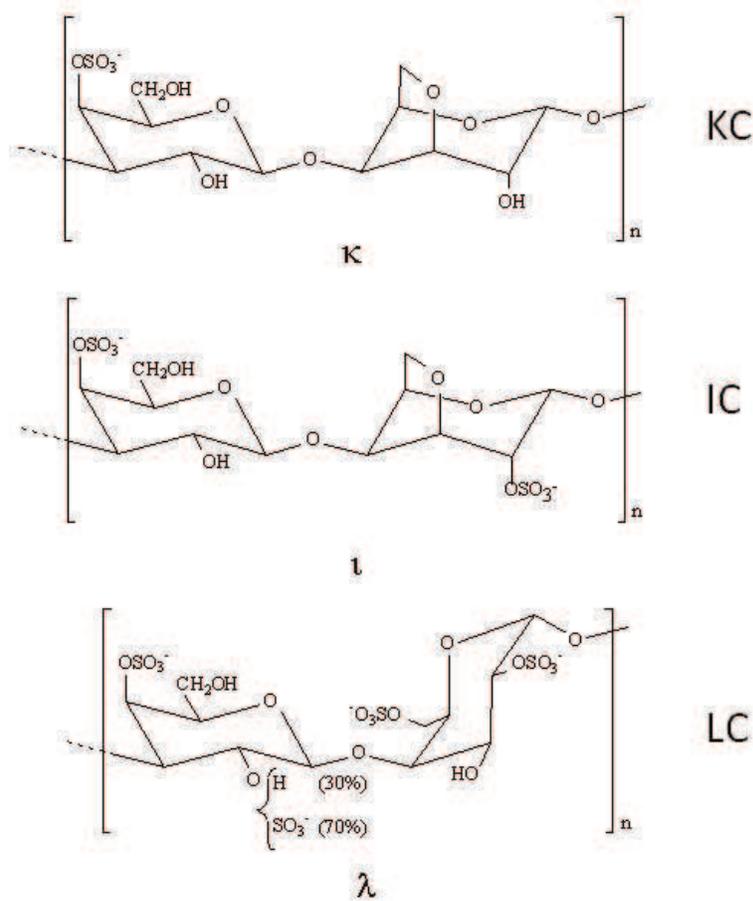


Figure I. 4: Structures du κ , ι et λ carraghénane.

L'identification de la structure chimique des carraghénanes est réalisée suivant des méthodes classiques : l'oxydation, la méthylation et l'hydrolyse partielle ou totale (Anderson, Dolan and Rees, 1968b; Anderson, Dolan and Rees, 1973) . La structure conformationnelle est déterminée par la diffraction des rayons X, la RMN, la spectrométrie de masse et la spectrophotométrie infrarouge (Anderson, Campbell, Harding, Rees and Samuel, 1969; Lowson and D.A. Rees, 1968; Lowson, Rees, Stancioff and Stanley, 1973) . Il est possible de séparer les différentes formes structurales par électrophorèse ou perméation du gel (Roberts, Zhong, Prodolliet and Goodall, 1998; Sloomackers, Dijk, Varkevisser, Treslong and Reynaers, 1991) .

Les différents types de carrabioses confèrent aux carraghénanes différentes propriétés structurales et mécaniques. Au cours de cette étude, nous avons étudié l'impact du kappa carraghénane et du iota carraghénane sur les propriétés des caséinates.

I.2. Les propriétés structurales et rhéologiques

Les propriétés du KC et IC ont été résumées par Morris et Piculell (Morris, 2007; Piculell, 2006) Elles dépendent à la fois de la température et de l'environnement ionique. Les carraghénanes sont utilisés pour 3 propriétés principales : la formation d'un gel qui peut gonfler en absorbant de l'eau, l'épaississement et la stabilisation des émulsions et des dispersions.

I.2.1. Conformation en solution et transition pelote - hélice

En solution à chaud, les carraghénanes se comportent comme des pelotes statistiques dont le degré d'expansion dépend du degré de sulfatation et de l'environnement ionique en raison de leur caractère polyélectrolyte. La viscosité du KC dans 0.1M NaCl croît avec la concentration de KC. Pour des fortes concentrations, on observe un comportement en loi de puissance proche de celui des polymères enchevêtrés en bon solvant (Croguennoc, Meunier, Nicolai and Durand, 2000) . Au refroidissement, ils adoptent une structure hélicoïdale plus ou moins ordonnée. Ceci a été montré par des mesures de diffraction des rayons X des carraghénanes à l'état solide (Millane, Chandrasekaran, Arnott and Dea, 1988) (figure I. 5). Cette transition pelote – hélice dépend de la nature et de la concentration de cations (Rochas and Rinaudo,

1980) . L'absence du pont 3,6 anhydrogalactose dans la molécule de LC empêche son changement conformationnel (Snoeren, 1976) .

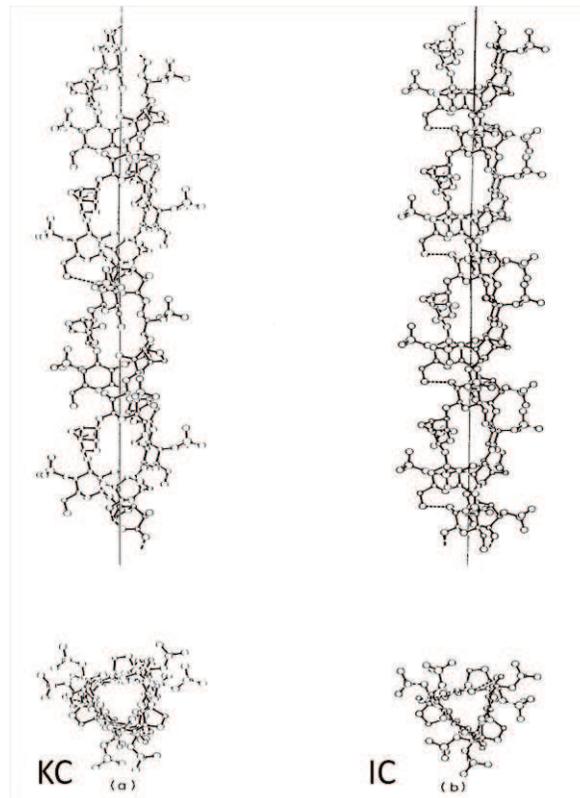


Figure I. 5 : Structure en double hélice du κ -carraghénane (KC) (a) et du ι -carraghénane (IC) (b) (Millane et al., 1988) .

Les études de polarimétrie (Meunier, 1999; Rees, Steele and Williamson, 1969; Snoeren, 1976) ont montré une augmentation du pouvoir rotatoire pendant le refroidissement d'une solution de KC ou de IC ce qui manifeste une transition pelote - hélice (Figure I. 6).

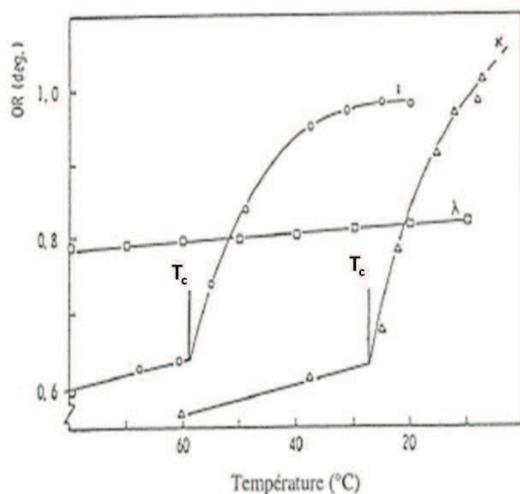


Figure I. 6: Evolution du pouvoir rotatoire en fonction de température pour une solution de KC, IC et LC à 0.3M NaCl (Snoeren, 1976) .

Cette transition a également été mise en évidence par diffusion de la lumière (Meunier, Nicolai and Durand, 2000; Sloodmaekers, Jonghe, Reynaers, Varkevisser and Treslong, 1988) , par la calorimétrie (Rochas and Mazet, 1984a) , par la RMN (Rochas et al., 1980) et par rhéologie (Baussay, 2005; Meunier, 1999; Parker, Brigand, Miniou, Trespoeu and Vallée, 1993; Piculell, Nilsson and Muhrbeck, 1992b) .

La rhéologie a été utilisée dans notre étude afin de mettre en évidence le phénomène d'agrégation et de gélification. Pendant le refroidissement, la transition se manifeste par une augmentation brutale des modules à une certaine température qu'on appelle la température critique de refroidissement T_c . Cette augmentation est due à la formation d'agrégats (voir partie I.2.2) qui conduit à un liquide viscoélastique ou à un gel. Pendant le chauffage, la transition se manifeste par une diminution brutale des modules à une température critique de chauffage T_h . C'est donc un processus thermoréversible. Les solutions de carraghénanes peuvent parfois présenter une hystérèse. L'hystérèse entre les températures critiques T_c et T_h est généralement attribuée à une stabilisation de la conformation hélicoïdale par une agrégation des doubles hélices (Millane et al., 1988; Rees, 1969) . L'hystérèse est observée pour le KC (figure I. 7) (Borgstrom, Piculell, Viebke and Talmon, 1996) mais pas pour l'IC (figure I. 8) (Michon, 1995) probablement parce que les liaisons entre les hélices de KC sont plus fortes (Chronakis, Piculell and Borgström, 1996) .

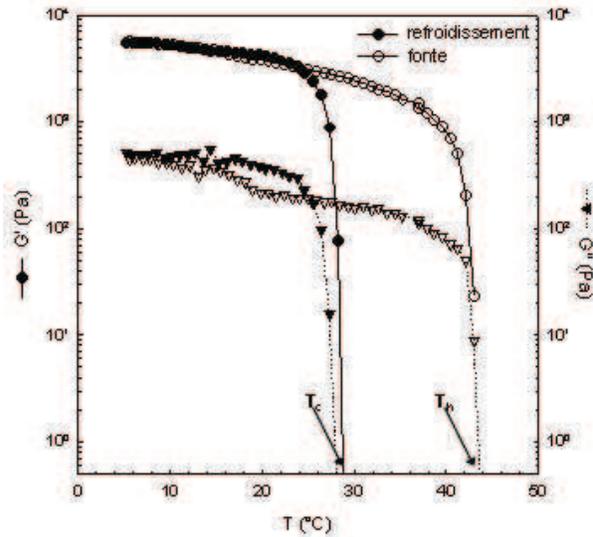


Figure I. 7: Evolution de G' et G'' à 0.1 Hz en fonction de la température pendant le refroidissement et la fonte (4g/L KC, 0.1M NaCl et 0.02M KCl) (Baussay, 2005)

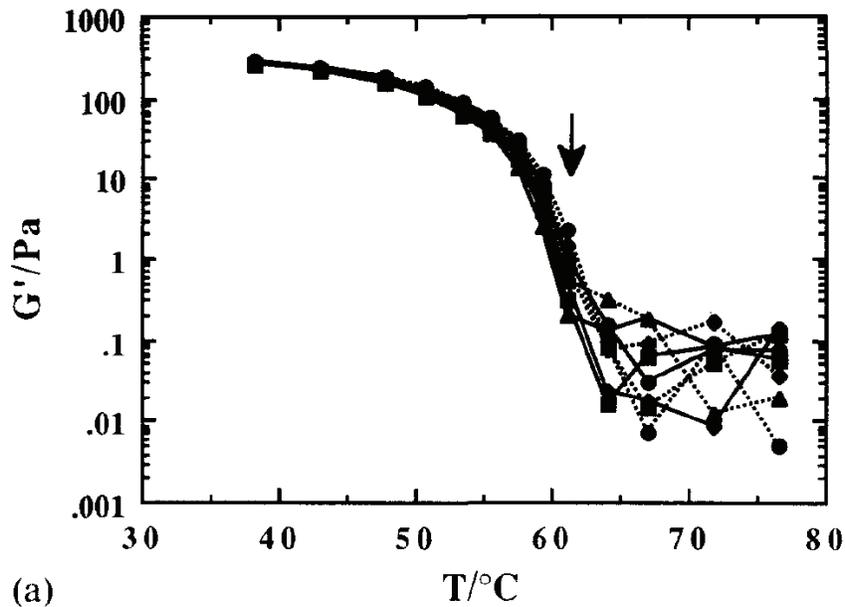


Figure I. 8: Evolution de G' en fonction de la température pendant le refroidissement (traits continus) et le chauffage (traits pointillés) (25g/L IC, 0.25M NaCl et à 0.2, 0.5, 1 et 2 Hz) (Piculell et al., 1992b).

Influence des ions

La transition pelote – hélice ne dépend pas de la concentration de KC ou de IC, mais elle est influencée par la quantité, la taille, la nature et la valence des ions.

La stabilité de la conformation hélicoïdale est renforcée par l'augmentation de la concentration d'ions qui peut entraîner la gélification. L'IC et le KC ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis des ions (Nilsson and Piculell, 1991; Piculell, 1995) .

Rochas et al. (Rochas et al., 1980) ont déterminé par polarimétrie les températures de transition pelote-hélice (T_c) du KC en fonction de la nature des ions et de leur concentration. Ces résultats ont également été observés en rhéologie. Rochas et al. ont montré que l'inverse de T_c varie linéairement avec le logarithme de la concentration en sel, voir figure I. 9.

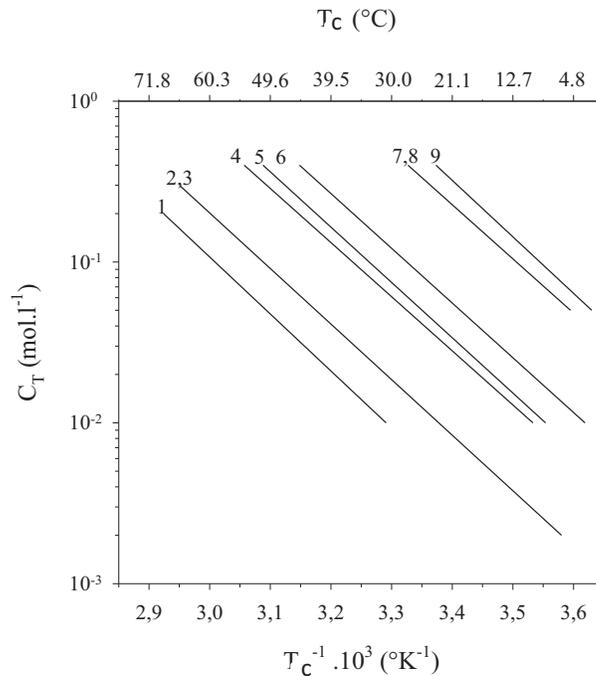


Figure I. 9: T_c (obtenue par refroidissement) en fonction de la concentration totale C_T en ions libres pour le KC (Rochas et al., 1980) .

1 à 4 = Rb^+ , K^+ , Cs^+ , NH_4^+ 5 à 6 = Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} 7 à 9 = Na^+ , $N(CH_3)_4^+$, Li^+

Ces auteurs ont également classifié les ions monovalents et divalents suivant leur capacité à stabiliser la conformation hélicoïdale.

Par ordre d'efficacité décroissante, ils ont montré que l'on avait :

- pour les cations monovalents : $Rb^+ > Cs^+ > K^+ > NH_4^+ > N(CH_3)_4^+ > Na^+ > Li^+$.
- pour les cations divalents : $Ba^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+}$.

L'étude systématique de Rochas et al. montre que les cations divalents sont non spécifiques sans doute à cause de leur taille et des pontages ioniques intermoléculaires. Par contre, les

cations monovalents K^+ , Rb^+ , Cs^+ ou NH_4^+ sont spécifiques. Il semblerait qu'il existe des sites spécifiques sur le KC, mais leur localisation n'est pas établie avec exactitude.

Certains anions tels que le I^- , SCN^- , NO_3^- peuvent aussi stabiliser les hélices de KC. Dans le cas du KC, il a été montré que l'iodure la température de transition, stabilise la conformation hélicoïdale et empêche l'agrégation en fagots donc la gélification (voir partie I.2.2) (Slootmaekers et al., 1988)

Grâce à la RMN¹²⁷I, Nerdal et al. (Nerdal, Haugen, Knutsen and Grasdalen, 1993) ont mis en évidence des sites spécifiques de tailles suffisantes à l'intérieur de la double hélice pouvant accueillir l'iodure. D'autres auteurs (Zhang and Furo, 1993; Zhang, Piculell and Nilsson, 1992) ont montré par des mesures de RMN¹²⁷I, une forte corrélation entre l'apparition de liaisons spécifiques iodure-carraghénane et la transconformation. La liaison iodure-carraghénane semblerait stabiliser de façon particulière la conformation hélice.

L'IC possède une densité de charges supérieure au KC, ce qui le rend plus sensible à la valence des contre-ions. De plus, la transition pelote-hélice de l'IC n'est pas sensible aux anions des sels (Piculell, 1995) . Pour l'IC, il n'y a pas d'ions spécifiques.

En l'absence d'ions spécifiques, la stabilité des hélices d'IC nécessite une concentration en sels moindre que celle pour KC (Piculell, 1995) .

I.2.2. Gélification

Comme dit précédemment, pendant le refroidissement, la solution de KC ou de IC gélifie, si les concentrations en sel et en KC (ou en IC) sont suffisantes. Le module du gel dépend de la concentration de KC ou de IC, du temps, de l'environnement ionique et de la nature des contres-ions (Baussay, 2005) .

Les gels d'IC sont assez faibles (Michon, 1995; Michon, Cuvelier, Launay and Parker, 1996a; Michon, Cuvelier, Launay and Parker, 1996b) , contrairement aux gels de KC qui sont beaucoup plus cassants à cause de la forte association des chaînes (Chronakis et al., 1996) .

I.2.2.1. Influence du temps et de la température

Dans l'étude des propriétés mécaniques des gels de KC, le facteur cinétique est important dans la formation du gel. Meunier et al. (Meunier, Nicolai, Durand and Parker, 1999) montrent que le système s'équilibre lentement quand on est proche de la température critique T_c qui est d'environ 25°C et qu'il faut attendre plus que 12Heures pour atteindre l'état final du gel (figure I. 10). Ces observations ont également été faites sur des solutions de IC (Michon, 1995; Piculell, 1995; Piculell et al., 1992b) .

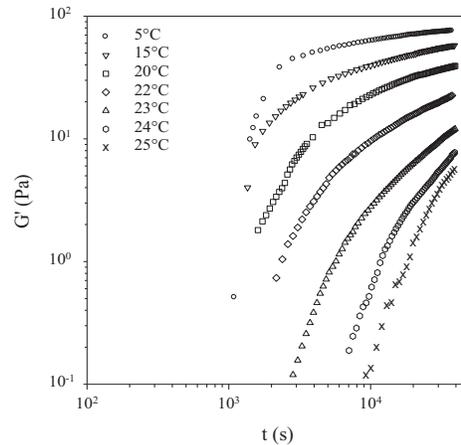


Figure I. 10 : Evolution des modules de conservation G' en fonction du temps pour différentes températures. 1g/L KC dans 0.1M NaCl et 0.01M KCl (Meunier, 1999) .

I.2.2.2. Influence de la force ionique

La force du gel augmente avec la force ionique jusqu'à atteindre un plateau, puis diminue (Hermansson, Eriksson and Jordansson, 1991; MacArtain, Jacquier and Dawson, 2003; Michel, Mestdagh and Axelos, 1997; Parker et al., 1993; Rochas, Rinaudo and Landry, 1990; Thrimawithana, S. Young, Dunstan and Alany, 2010) .

Les propriétés rhéologiques du KC en présence d'anions ont également été étudiées (Piculell, 1998; Piculell, Borgström, Chronakis, Quist and Viebke, 1997) . Pour une solution de KC supérieure à 0.9% et à 0.1M NaI, Chronakis et al.(Chronakis et al., 1996) observent la formation de gels faibles, alors que l'iodure devrait empêcher la gélification. De plus, il n'y a pas de phénomène d'hystérèse. Dans des mélanges de NaI et CsI, lorsque la fraction molaire de Cs est supérieure à 0.4, les gels obtenus sont proches de ceux formés en présence de KCl et lorsqu'elle est inférieure à 0.4 ils sont semblables à ceux formés en présence de NaI (Chronakis, Doublier and Piculell, 2000) .

I.2.2.3. Influence du pH

Le pH dans la gamme de 5.5 à 9 ne semble pas influencer les propriétés viscoélastiques des gels d'IC pour une concentration de sel donnée. Pour des pH en dessous de 5.5, l'IC s'hydrolyse et peut perdre sa capacité à gélifier (Michon, 1995) .

Plus le pH est acide, plus l'hydrolyse des chaînes KC et IC augmente avec le temps et la masse moyenne du carraghénane diminue (Capron, Yvon and Muller, 1996) . De plus, la dépolymérisation de KC est plus rapide à l'état liquide qu'à l'état gel (Capron et al., 1996) . L'IC semble plus résistant à l'hydrolyse acide que le KC.

I.2.2.4. Influence de la concentration et de la masse molaire

Plusieurs auteurs ont montré que le module élastique des gels de KC varie avec le carré de la concentration de KC (Baussay, 2005; Meunier et al., 1999) .

Michon trouve que le module G' au plateau varie avec la concentration d'IC et suit une loi de puissance avec un exposant de 2.4 (Michon, 1995) , ce qui est proche des résultats de Morris et al qui trouve un exposant de 2 (Morris, Rees and Robinson, 1980) .

I.2.2.5. Modèles de gélification

Dans la littérature, il existe plusieurs modèles pour décrire le mécanisme de gélification du carraghénane. Quelque soit le modèle proposé, les différents auteurs sont en accord sur l'existence de 2 étapes dans le mécanisme de gélification (Meunier, 1999; Rochas and Rinaudo, 1984b) : la première est la transition pelote-hélice (double ou simple) et la seconde est l'agrégation des hélices qui conduit à la gélification.

Les deux principaux modèles sont :

- Le modèle de Morris et al. (Morris et al., 1980) donné dans la figure I. 11 montre que le carraghénane à l'état ordonné a une conformation de double hélice (Dea, Mckinnon and Rees, 1972) . Puis, ces doubles hélices s'associent entre elles par le biais des cations spécifiques (Rees, 1969) .

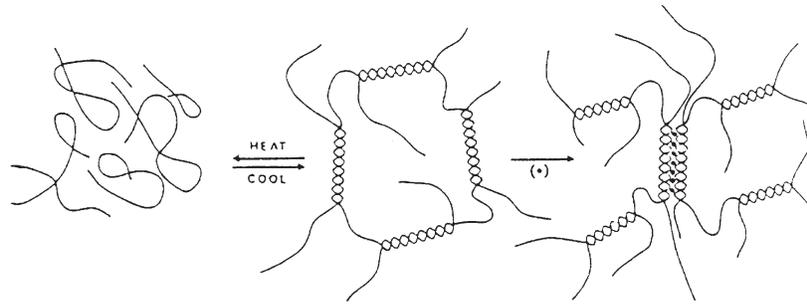


Figure I. 11 : Modèle de gélification selon Morris

- Le modèle de Smidsrod (Smidsröd, Andressen, Grasdalen, Larsen and Painter, 1980) donné dans la Figure I. 12 propose également une transition en structure ordonnée, mais en simple hélice. La jonction entre les simples hélices se fait comme dans le modèle précédent par les cations.

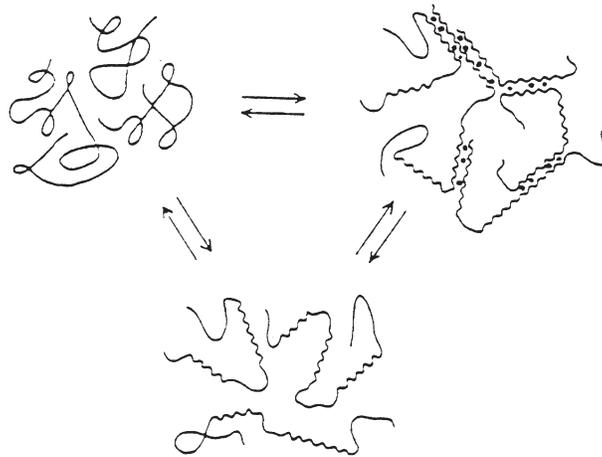


Figure I. 12 : Modèle de gélification selon Smidsrod

I.3. Les mélanges iota et kappa carraghénane

Plusieurs auteurs ont montré par DSC et rhéologie que dans les mélanges de KC et de IC les 2 polysaccharides forment 2 réseaux indépendants et interpénétrés (Parker et al., 1993; Ridout, Garza, Brownsey and Morris, 1996) .

A cause de l'absence d'interactions électrostatiques entre eux, l'IC forme un gel à une température plus haute que le KC, pour différentes conditions ioniques (Parker et al., 1993) . Ces résultats ont également été observés par Piculell et al., en contaminant l'IC par une petite quantité de KC (Piculell et al., 1992b) .

En règle générale, les 2 types de mécanisme ne sont jamais observés lorsqu'on a un système pur sodium ou pur potassium. Dans les systèmes contenant le mélange de sodium et de potassium avec le sodium en faible quantité, Parker et al. observent toujours 2 types de mécanisme. Dans les systèmes purs sodium, le KC forme des gels à des températures critiques très faibles alors que dans les systèmes purs potassium, le gel de KC est plus fort et se forme en premier, ce qui masque la contribution du gel d'IC. Les comportements rhéologiques à faible déformation et à la rupture confirment les 2 types de mécanisme de gélification (Parker et al., 1993) .

C- Mélange caséines et polysaccharides

I.1. Comportement et structure des mélanges polysaccharides - protéines

I.1.1. Nature des interactions dans les systèmes polysaccharides-protéines

Les polysaccharides et les protéines peuvent interagir par l'intermédiaire d'interactions répulsives ou attractives.

Les interactions répulsives résultent majoritairement des effets de volume exclu ou des interactions électrostatiques.

Les interactions attractives peuvent être des interactions électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes ou de van der Waal (Dickinson, 1998; Schmitt, Sanchez, Desobry-Banon and Hardy, 1998; Turgeon, Beaulieu, Schmitt and Sanchez, 2003)

En général, ce sont des interactions de types électrostatiques qui prédominent. Ces interactions électrostatiques sont fortement affectées par les paramètres qui modifient la densité de charge électrique et donc le pH, ainsi que la force ionique par écrantage des charges.

I.1.2. Mécanismes

Dans l'eau, le mélange de protéines et de polysaccharides peut conduire à 3 situations : la co-solubilité, l'incompatibilité thermodynamique et la co-agrégation (De Kruif, Weinbreck and De Vries, 2004; Schmitt et al., 1998; Syrbe, Bauer and Klostermeyer, 1998; Tolstoguzov, 2003) . Ces différentes situations sont illustrées schématiquement dans la figure I. 13.

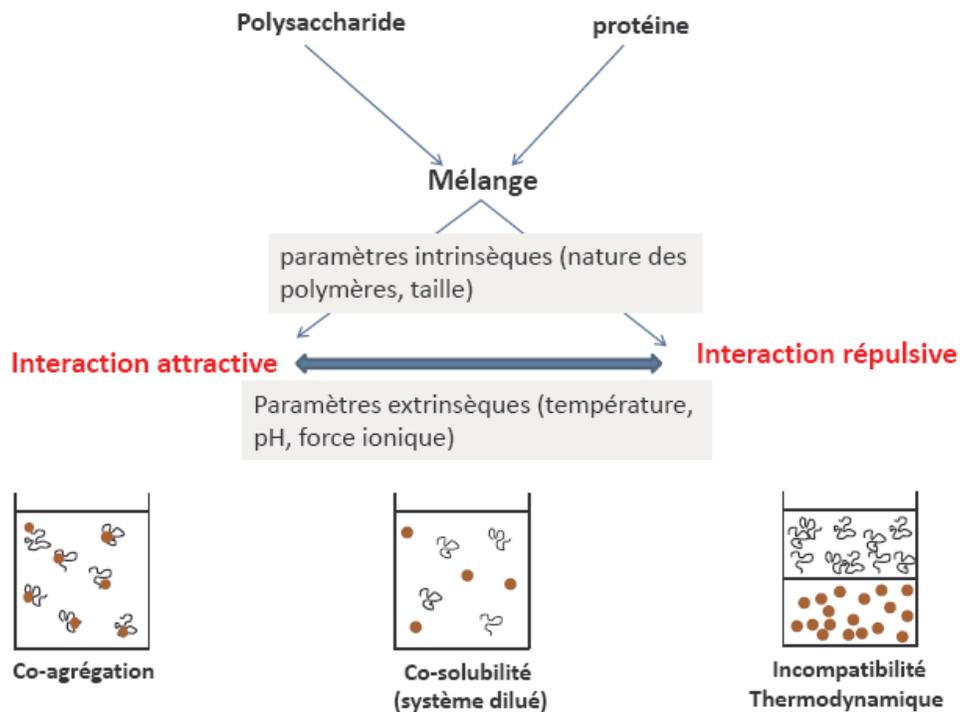


Figure I. 13 : Différentes situations de mélanges polysaccharides - protéines dans de l'eau.

I.1.2.1. Co-solubilité

Dans les solutions diluées et en absence d'interactions fortes, les biopolymères sont co-solubles car cela augmente l'entropie (McClements, 2005; Tolstoguzov, 2007; Tolstoguzov, 2003).

I.1.2.2. Séparation de phase ségrégative

La séparation de phase est due à la préférence de chaque biopolymère d'être entourée par des molécules de même nature plutôt que par celles de l'autre biopolymère. Le mélange se sépare alors en deux phases distinctes au-delà d'une concentration critique et chacune des deux phases contient principalement un des deux biopolymères (Grinberg and Tolstoguzov, 1997; Polyakov, Grinberg and Tolstoguzov, 1997; Schmitt et al., 1998; Tolstoguzov, 2003) La séparation de phase ségrégative est due à une incompatibilité thermodynamique ou au phénomène de déplétion – floculation.

La séparation de phase est fortement influencée par la force ionique, le pH, la concentration des biopolymères, la viscosité et la gélification (Doublier, Garnier, Renard and Sanchez, 2000; Kim, Decker and McClements, 2006; McClements, 2005; Norton and Frith, 2001) .

I.1.2.2.1. Incompatibilité thermodynamique

La séparation de phase ségrégative due à l'incompatibilité thermodynamique se produit si les interactions protéines-protéines (ou polysaccharides-polysaccharides) sont favorisées par rapport aux interactions protéines-polysaccharides (Piculell and Lindman, 1992a) , conduisant ainsi à deux phases : une phase riche en protéine et une autre phase riche en polysaccharide (Doublier et al., 2000) .

I.1.2.2.2. Phénomène de déplétion- floculation

Une autre origine de la séparation de phase ségrégative est le phénomène de déplétion – floculation. Ce phénomène est dû au fait que le centre de masse des polymères est exclu de la zone de déplétion (Figure I. 14). Quand deux particules s'approchent l'une de l'autre, leurs couches de déplétion commencent à se chevaucher, ce qui permet aux polymères d'avoir plus d'espace et donc de gagner de l'entropie, ce qui entraîne des interactions attractives entre particules conduisant à une séparation de phase (De Bont, Van Kempen and Vreeker, 2002; Doublier et al., 2000) .

Le phénomène de déplétion peut être influencé par le rapport entre les tailles des 2 biopolymères et leur concentration (Hemar, Tamehana, Munro and Singh, 2001b) . Il se manifeste généralement dans les suspensions colloïdales en présence de polymères non adsorbants.

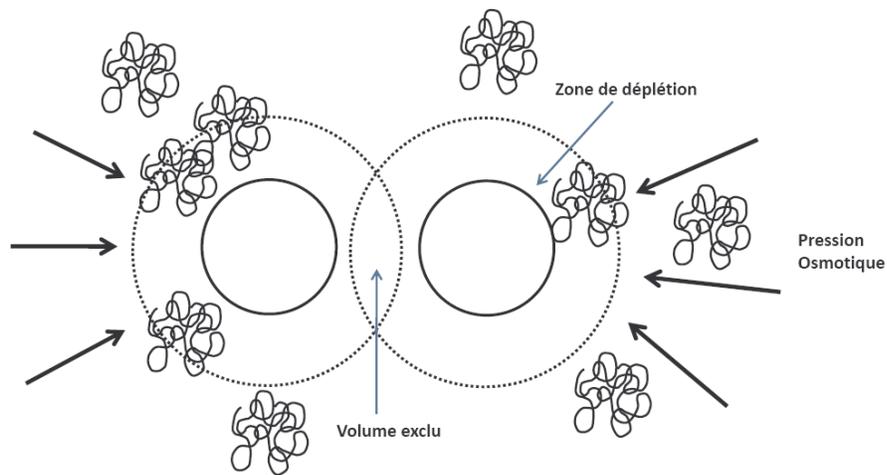


Figure I. 14: Mécanisme de l'interaction de déplétion.

I.1.2.2.3. Diagramme de phase

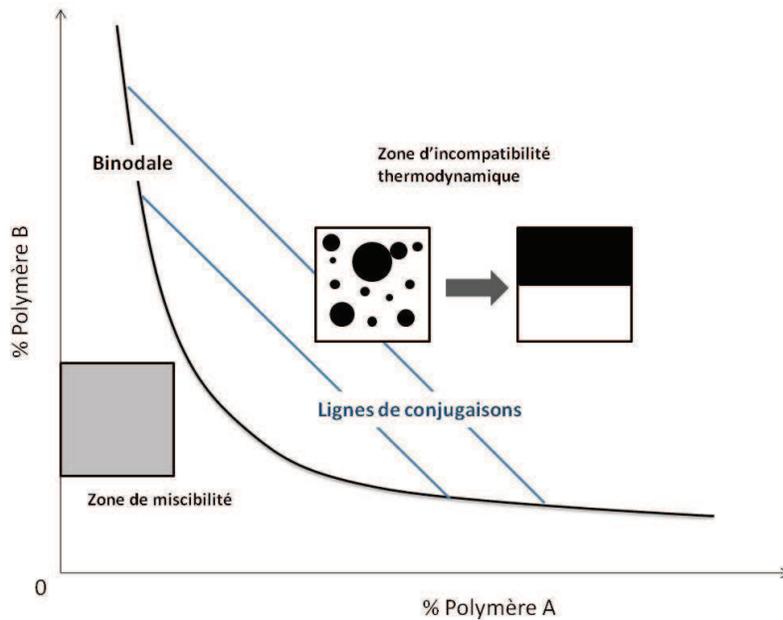


Figure I. 15: Diagramme de phase montrant le comportement d'un mélange de 2 polymères dans de l'eau à un pH fixe, à une température et une force ionique données.

Généralement, le comportement d'un mélange incompatible est représenté sous la forme d'un diagramme de phase (Figure I. 15) (Bourriot, Garnier and Doublier, 1999a; Thaiudom and Goff, 2003; Tolstoguzov, 2003) . La limite entre la zone monophasique et biphasique est appelée binodale. Les lignes de conjugaisons permettent de connaître les compositions des 2

phases à l'équilibre. Tout mélange se trouvant sur cette droite est sujet à une séparation de phase avec des compositions à l'équilibre identiques, seules les volumes des deux phases diffèrent.

I.1.2.3. Co-agrégation

La co-agrégation se fait souvent dans un mélange de polymères de charges opposés. Les agrégats formés restent en suspension dans la solution quand ils sont de petites tailles. Mais, lorsqu'ils sont grands, ils peuvent précipiter et conduire au phénomène communément appelé coacervation complexe (Schmitt et al., 1998; Turgeon et al., 2003; Turgeon and Laneville, 2009).

I.2. Mélanges carraghénanes et caséines

I.2.1. Travaux antérieurs

Le mélange de caséines et de polysaccharides à des pH plus grands que le pI des caséines forme un système ternaire : caséine-carraghénane-eau. Les différentes forces impliquées dans ces systèmes peuvent conduire soit à la formation d'agrégats, soit à la séparation de phase (Doublier et al., 2000; Tolstoguzov, 2007). La plupart des études faites sur les mélanges caséines et polysaccharides ont été résumées dans le tableau I.1 suivant :

- Mélanges micelles de caséines et polysaccharides

N°	Caséine-polysaccharide en milieu aqueux	Conditions	Origines	Références
1	<p>Protéines laitières (Micelles de caséine + protéines sériques) + Pectine (Hautement méthylé à 62.7%).</p> <p>Protéines laitières (Micelles de caséine + protéines sériques) + gomme arabique.</p> <p>Protéines laitières (Micelles de caséine + protéines sériques) + arabinogalactane.</p>	20°C, pH 6.0-10.5, NaCl 0-0.5M	Incompatibilité Thermodynamique	<i>(Antonov, Grinberg, Zhuravskaya and Tolstoguzov, 1982)</i>

2	Micelles de caséines + Alginate	25°C, pH 7.2	Incompatibilité Thermodynamique	(Suchkov, Grinberg and Tolstoguzov, 1981)
3	Micelles de caséines (2.5%) + Pectine (faiblement méthylé : 35%, hautement méthylé : 73%, mélange faiblement méthylé à 35% et amidé à 20%) (0.1-0.2%).	60°C, pH 6.7/5.3	Interaction de déplétion.	(Ambjerg Pedersen and Jørgensen, 1991; Marozienne and De Kruif, 2000)
4	Micelles de caséines (0.8-4%) + Galactomannes (gomme de guar, gomme de caroube) (0.09-0.3%)	5/20°C, pH 6.8/7, 0.08/0.25M NaCl, sucre (10-40%)	Interaction de déplétion.	(Bourriot et al., 1999a; Bourriot, Garnier and Doublie, 1999c; Schorsch, Jones and Norton, 1999)
5	Micelles de caséines (1%) + Carraghénanes (ι -, κ -, λ -formes) (0.12%)	5/20/50/60°C, pH6.7/7, 0.25M/0.05M NaCl-0.01M KCl	Interaction de déplétion	(Bourriot, Garnier and Doublie, 1999b; Dalgleish and Morris, 1988; Drohan, Tziboula, McNulty and Horne, 1997; Langendorff et al., 1999; Langendorff, Cuvelier, Launay and Parker,

				1997; <i>Langendorff, Cuvelier, Michon, Parker and De Kruif, 2000; Schorsch, Jones and Norton, 2000; Spagnuolo, Dalgleish, Goff and Morris, 2005)</i>
6	Micelles de caséines (0.1%) + exopolysaccharides (5%) (<i>Acide lactique B40</i>)	25°C, pH 6.6	Interaction de déplétion	(<i>Tuinier and De Kruif, 1999a; Tuinier, Ten Grotenhuis, Holt, Timmins and De Kruif, 1999b</i>)
7	Micelles de caséines + Gomme de guar dépolymérisée	25°C, pH7	Interaction de déplétion	(<i>Tuinier, Ten Grotenhuis and De Kruif, 2000</i>)
8	Micelles de caséines + Carraghénanes		Co - agrégation	(<i>Dalgleish et al., 1988; Flett, Corredig and Goff, 2010; Ji, Corredig and Goff, 2008; Martin, Goff, Smith and Dalgleish, 2006; Spagnuolo et al.,</i>

				2005)
--	--	--	--	-------

Tableau I. 1: Interactions micelles de caséines-polysaccharides en milieu aqueux.

- Mélanges caséinates de sodium et polysaccharides

N°	Caséines-polysaccharides en milieu aqueux	Conditions	Origines	Références
1	Caséines (κ -, α - et β - formes) + Carraghénanes (κ -)		Co - agrégation	(Payens, 1972; Snoeren, 1975; Snoeren, Both and Schmitt, 1976)
2	Caséinates de sodium (0.1-0.5%) + gomme arabique (0.01-5%)	20°C, pH 2-7, 0.5M NaCl, acidification lente avec le GDL	Co - agrégation	(Ye, Flanagan and Singh, 2006)
3	Caséinates de sodium (2%) + Pectine (0.01-0.08%)	pH 4	Co - agrégation	(Matia-Merino, Lau and Dickinson, 2004)
4	Caséinates de sodium (6%) + Alginate de sodium (1%)	23°C, pH 7	Incompatibilité thermodynamique	(Guido, Simeone and Alfani, 2002; Simeone, Molè and Guido, 2002)

5	Caséinates de sodium (2.5%) + Carraghénanes (κ -) (0.5-2%)	pH 7	Incompatibilité thermodynamique	(Hemar, Hall, Munro and Singh, 2002)
6	Caséinates de sodium (1 ou 3%) + Xanthane	20°C	Interaction de déplétion	(Hemar, Tamehana, Munro and Singh, 2001a)

Tableau I. 2: Interactions caséinates de sodium-polysaccharides en milieu aqueux.

I.2.1.1. Co - agrégation

Payens (Payens, 1972) a montré par turbidimétrie la formation d'agrégats dans le lait ou les solutions de caséines isolées, en présence de carraghénanes et à température ambiante. Snoeren et al. ont confirmé ces résultats en montrant l'existence d'interactions électrostatiques entre les groupements sulfates chargés négativement du kappa carraghénane et les résidus peptidiques 97 et 112 chargés positivement de la κ -caséine (Snoeren, 1975; Snoeren et al., 1976) . Dans cette étude, ils ont également montré l'absence d'interaction entre les fractions α -caséine ou β -caséine et le carraghénane en absence d'ions calcium. Ils ont supposé que pour ces fractions, la répartition des charges le long des chaînes est beaucoup plus uniforme, ce qui rend impossible toute interaction de nature électrostatique avec les carraghénanes. Ils ont également supposé qu'étant donné que la κ -caséine se situe préférentiellement à la surface de la micelle, le même mécanisme d'interaction peut intervenir entre la micelle de caséines et le kappa carraghénane (Snoeren, 1975; Snoeren et al., 1976) . Les travaux de Dalgleish et Morris (Dalgleish et al., 1988) montrent que le potentiel zêta de la micelle de caséines devient plus électronégatif quand la concentration de kappa carraghénane augmente, ce qui se traduit par une interaction entre le kappa carraghénane chargé négativement et la micelle de caséines. La présence de cette interaction a également été montrée par une augmentation du diamètre des micelles de caséines en présence de kappa carraghénane (Spagnuolo et al., 2005) . La microscopie électronique montre que le kappa carraghénane se lie à plusieurs micelles de caséines (Martin et al., 2006) .

Plus récemment, Ji et al. (Ji et al., 2008) ont montré que sous cisaillement les caséines et les kappa carraghénanes forment des agrégats dans le lait. Les 2 biopolymères forment des agrégats suivant différents mécanismes qui dépendent de la concentration de kappa carraghénane. Les agrégats peuvent être formés directement par la micelle de caséine et le kappa carraghénane ou pendant la gélification du kappa carraghénane. Selon la concentration de carraghénane, différentes structures peuvent être obtenues. La distribution des tailles des particules dépend de la concentration de kappa carraghénane et de la vitesse de cisaillement. Les propriétés rhéologiques des mélanges sont affectées par la concentration de kappa carraghénane mais pas par la vitesse de cisaillement. Ces particules restent stables sous cisaillement. Dès que ces particules sont formées, leurs tailles ne varient plus même si on applique une déformation. La température initiale du mélange n'influence pas la distribution de taille des particules. La taille des agrégats est facilement contrôlable quand le mélange est fait à haute température.

A faible concentration de kappa carraghénane et en dessous de sa concentration de gélification, des études montrent que les micelles de caséines interagissent avec le kappa carraghénane à l'état hélice et forment des particules agrégées (Flett et al., 2010; Ji et al., 2008) . Au dessus de cette concentration, les interactions kappa carraghénane/kappa carraghénane dominent les interactions micelles de caséines/kappa carraghénane et il forme un gel qui piège les micelles de caséines (Ji et al., 2008; Martin et al., 2006; Schorsch et al., 2000) .

I.2.1.2. Séparation de phase ségrégative

Le phénomène de séparation de phase ségrégative entre les micelles de caséines et les polysaccharides peut être attribué à un mécanisme de déplétion-floculation ou à une incompatibilité thermodynamique, comme indiqué dans le tableau I. 1. La grande taille de la micelle de caséines et sa nature colloïdale conduit à penser que ce phénomène est un mécanisme de déplétion-floculation. En effet, les diagrammes de phase construits à partir de la théorie de la déplétion-floculation sont cohérents avec les diagrammes de phase expérimentaux (Tuinier et al., 2000; Tuinier et al., 1999b) . En outre, les différentes techniques de diffusion montrent que les micelles de caséines deviennent très attractives avec l'augmentation de la concentration de polysaccharide (Tuinier et al., 1999a) . L'augmentation

de la masse molaire du polysaccharide favorise également la démixtion du système (Bourriot et al., 1999c; Tuinier et al., 2000) .

En travaillant avec le KC ou le IC à l'état désordonné, il a été montré un processus de séparation de phase dû à la déplétion-floculation des micelles de caséines par les chaînes de carraghénanes (Bourriot et al., 1999b; Langendorff et al., 2000; Schorsch et al., 2000) . Des phénomènes de démixtion ont également été remarqués en présence du λ -carraghénane qui n'adopte jamais la conformation ordonnée (Langendorff et al., 1997; Langendorff et al., 2000) . A l'aide des techniques microscopiques (MBCL et MCP), il a été clairement mis en évidence que le système est biphasique avec une phase riche en caséine et une autre riche en carraghénane. Lorsque le carraghénane est en état ordonné : le kappa carraghénane ou l'iota carraghénane s'absorbe sur la surface de la micelle de caséine et peut ainsi limiter la séparation de phase. Il a été suggéré que les interactions entre la micelle de caséines et les hélices de carraghénanes sont impliquées dans le gel (Langendorff et al., 2000) . Les résultats obtenus par Tziboula et al. (Tziboula and Horne, 1999) à une très faible vitesse de refroidissement (1°C/ 15min) pourraient être interprétés dans ce sens.

D'autres auteurs ont montré que bien qu'il existe des interactions spécifiques entre les caséines et le carraghénane, l'essentiel des effets synergiques observés dans ces systèmes proviendrait de séparations figées par la gélification avant que la séparation ne devienne macroscopique (Garnier et al., 2003; Michon et al., 2003; Ribeiro, Rodrigues, Sabadini and Cunha, 2004; Schorsch et al., 2000) . Par microscopie confocale, Hemar et al. ont également mis en évidence ces différents phénomènes (Hemar et al., 2002) .

A notre connaissance, il n'y a pas d'études sur la co-agrégation ou la séparation de phase des mélanges de caséinates de sodium et de carraghénane.

I.2.2. Les propriétés rhéologiques des mélanges caséines et carraghénane

Plusieurs recherches ont été effectuées sur la rhéologie des mélanges carraghénanes / caséines.

Dans le lait, Langendorff et al. (Langendorff et al., 1999) ont montré que le carraghénane en état ordonné interagit avec les micelles de caséines. La présence des micelles de caséines induit une augmentation très sensible de la température de gélification et de la force du gel.

Selon la concentration de l'iota carraghénane différents types de réseaux gélifiés ont été mis en évidence à partir des dépendances en fréquence. A faible concentration d'iota carraghénane, il se forme un seul type de réseau pendant le refroidissement impliquant probablement des ponts entre micelle de caséines et hélices de carraghénane. Ce réseau est thermiquement plus stable comparé au gel de iota carraghénane pur. Cependant à une concentration au dessus de 0.2%, Langendorff et al. observent 2 réseaux, un premier réseau qui correspond à celui décrit plus haut et un deuxième réseau thermoréversible similaire au gel de carraghénane sans protéine (Langendorff et al., 1999; Langendorff et al., 1997) .

Quand aux mélanges de micelles de caséines et de kappa carraghénane, plusieurs études montrent que le kappa carraghénane se lie aux micelles de caséines et que le système peut conduire à une gélification même si, dans ces conditions, le kappa carraghénane pur n'est pas un gel. Les propriétés du gel dépendent alors très nettement de la force ionique et de la concentration de carraghénane (Drohan et al., 1997; Langendorff et al., 2000; Puvanenthiran, Goddard and McKinnon, 2003; Trcková, Stetina and Kánský, 2004) . Dans différents mélanges, l'ajout de micelles de caséines augmente le module élastique. Les résultats trouvés par Alexander et Dalgleish confirment les études précédentes à savoir que les carraghénanes se lient aux micelles de caséines et qu'un gel mixte est formé (Alexander and Dalgleish, 2007) .

Il y a peu d'études faites sur les mélanges de caséinates de sodium et de carraghénane. Lynch et al. ont étudié la gélification des mélanges de carraghénane avec des caséines individuelles ou des caséinates de sodium (SC) (Lynch and Mulvihill, 1994a; Lynch and Mulvihill, 1994b; Lynch and Mulvihill, 1996) . L'ajout de caséines au kappa carraghénane modifie très nettement les propriétés rhéologiques des gels en absence et en présence de calcium. Lynch et Mulvihill ont montré qu'en absence de calcium, la force du gel dépend du type de caséines : κ -caséine < β -caséine \sim SC < α -caséine. Le module élastique en présence de κ -caséine serait plus élevé parce que les hélices de carraghénanes s'associent ensemble via les caséines. La faible augmentation des modules élastiques en présence d' α -caséine ou de β -caséine serait due au phénomène de séparation de phase. D'autre part en présence de calcium, ils observent toujours une augmentation de module élastique en présence de κ -caséine, mais une diminution de la force du gel en présence d' α -caséine ou de β -caséine(Lynch et al., 1994b) .

En l'absence de caséinates de sodium, la température critique de la gélification du kappa carraghénane est de 7°C, mais à 20g/L de caséinate de sodium, la température critique de

gélification du système augmente jusqu'à 12°C. Par contre, la concentration de protéine n'a pas d'effet sur les modules élastiques. Ceci est dû à la grande affinité entre le calcium et les 2 fractions de caséines. Les mêmes résultats ont été obtenus en remplaçant le kappa carraghénane par l'iota carraghénane (Lynch et al., 1994a; Lynch et al., 1996) .

Oakenfull et al. (Oakenfull, Miyoshi, Nishinari and Scott, 1999) ont étudié les mélanges de kappa carraghénane et de caséinate de sodium en utilisant la rhéologie et la DSC. Ils ont fait varier d'une part, la concentration de kappa carraghénane pour une concentration de caséinates de sodium fixée (10g/L) ou d'autre part, la concentration de protéine en maintenant fixée la concentration de kappa carraghénane (5g/L). Les températures critiques mesurées à l'aide de la rhéologie ou de la DSC sont les mêmes et augmentent avec la concentration de kappa carraghénane. On s'attend à cette augmentation parce que la poudre qu'ils ont utilisée pour cette étude contenait des ions potassium, et que lorsque la concentration de kappa carraghénane augmente en solution, la concentration de potassium augmente également.

L'ajout de caséinates de sodium jusqu'à 50g/L a peu d'effet sur la température critique : une légère diminution de 24°C à 22°C jusqu'à 10g/L de caséinates de sodium, puis une légère augmentation à 24°C pour 50g/L. Les mesures de DSC montrent également que l'enthalpie de transition ne dépend pas du caséinate de sodium. Pendant la fonte, la transition s'étale sur une large gamme de température ce qui est la signature d'un processus non coopératif. A une concentration de caséinates de sodium donnée, le module élastique augmente avec la concentration de kappa carraghénane. A une concentration de kappa carraghénane fixée, le module élastique diminue légèrement jusqu'à 5g/L, puis augmente.

Pour un mélange à 5g/L de kappa carraghénane et 1g/L de caséinates de sodium, Oakenfull et al. observent un processus à 2 étapes pendant la fonte et des températures critiques de fonte d'environ 45°C peu dépendantes de la concentration de caséinates de sodium. Au vue de leurs résultats, ils suggèrent que dans le mélange et au dessus de la transition pelote-hélice, une fraction de kappa carraghénane se lie au caséinate de sodium pendant qu'une autre fraction reste libre. En dessous de cette température critique, ils supposent qu'on a des hélices libres et des hélices liées au caséinate de sodium. Ainsi pendant la gélification du système, il y aurait formation de 2 réseaux interpénétrés : un réseau d'hélices de kappa carraghénane pur et un autre réseau qui impliquerait des interactions entre les caséinates de sodium et les hélices de kappa carraghénane, selon, le modèle suivant (Figure I. 16) (Oakenfull et al., 1999; Singh, Tamehana, Hemar and Munro, 2003) .

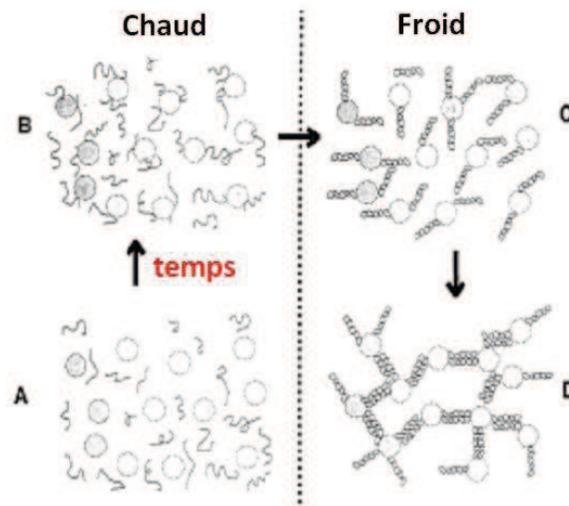


Figure I. 16: Modèle de gélification des systèmes caséinate de sodium (SC) et kappa carraghénane (KC) (Oakenfull et al., 1999) .

A : immédiatement après mélange de SC et de KC.

B : avec le temps, une co-agrégation entre le KC sous forme pelote et le SC.

C : pendant le refroidissement, le KC agrégé au SC et le KC libre passe de la conformation pelote à hélice.

D : avec le temps, les hélices de KC libres et les hélices de KC agrégées au SC se lient entre elles et forment un réseau mixte.

References bibliographiques

- Alexander, M. & Dalgleish, D. G. (2007), The interaction of casein micelles with κ -carrageenan studied by diffusing wave spectroscopy, *Food Hydrocolloids*, **21**, 128-136.
- Ambjerg Pedersen, H. C. A. & Jørgensen, B. B. (1991), Influence of pectin on the stability of casein solutions studied in dependence of varying pH and salt concentration, *Food Hydrocolloids*, **5**, 323-328.
- Anderson, N. S., Campbell, J. W., Harding, S. E., Rees, D. A. & Samuel, J. W. B. (1969), X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: Double helix models for κ - and ι -carrageenans., *Journal of Molecular Biology*, **45**, 85.
- Anderson, N. S., Dolan, T. C. S., Penman, A., Rees, D. A., Mueller, G. P., Stancioff, D. J. & Stanley, N. F. (1968a), Carrageenans. Part IV. Variations in the structure and gel properties of κ -carrageenan, and the characterisation of sulphate esters by infrared spectroscopy., *Journal of Chemical Society C*, 596.
- Anderson, N. S., Dolan, T. C. S. & Rees, D. A. (1968b), Carrageenans. Part III. Oxidative hydrolysis of methylated κ -carrageenan and evidence for a masked repeating structure., *Journal of the Chemical Society C*, 596.
- Anderson, N. S., Dolan, T. C. S. & Rees, D. A. (1973), Carrageenans. Part VII. Polysaccharides from *Eucheuma Spinosum* and *Eucheuma Cottonii*. The covalent structure of ι -carrageenan., *Journal of the Chemical Society Perking I*, 2173.
- Antonov, Y. A., Grinberg, V. Y., Zhuravskaya, N. A. & Tolstoguzov, V. B. (1982), Concentration of the proteins of skimmed milk by membraneless, isobaric osmosis, *Carbohydrate Polymers*, **2**, 81-90.
- Baretto, P. L. M., Roeder, J., Crespo, J. S., Maciel, G. R., Terenzi, H., Pires, A. T. N. & Soldi, V. (2003), Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate / sorbitol solutions and glass transition of their films, *Food Chemistry*, **82**, 425-431.

- Bastian, E. D. & Brow, R. J. (1996), Plasmin in milk and dairy products: an update, *International Dairy Journal*, **6**, 435-457.
- Baussay, K. (2005). Influence de la gélification de polysaccharide sur les systèmes mixtes agrégats de protéine globulaire/polysaccharide. Le Mans- France, Université Du Maine: 156.
- Borgstrom, J., Piculell, L., Viebke, C. & Talmon, Y. (1996), On the structure of aggregated kappa-carrageenan helices. A study by cryo-TEM, optical rotation and viscometry *International Journal of Biological Macromolecules*, **18**, 223-229.
- Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.-L. (1999a), Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein–guar gum mixtures, *Food Hydrocolloids*, **13**, 43-49.
- Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.-L. (1999b), Micellar-casein–κ-carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure, *Carbohydrate Polymers*, **40**, 145-157.
- Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.-L. (1999c), Phase separation, rheology and structure of micellar casein-galactomannan mixtures, *International Dairy Journal*, **9**, 353-357.
- Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B., Mercier, J.-C., Pelissier, J. & Das, B. C. (1977), Complete amino-acids sequence of bovine as2 casein, *FEBS Lett*, **76**, 274-279.
- Capron, I., Yvon, M. & Muller, G. (1996), In-vitro gastric stability of carrageenan, *Food Hydrocolloids*, **10**, 239-244.
- Carr, A. J., Munro, P. A. & Campanella, O. H. (2002), Effect of added monovalent or divalent cations on the rheology of sodium caseinate solutions, *Journal of Dairy Research*, **12**, 487-492.
- Chronakis, I. S., Doublier, J.-L. & Piculell, L. (2000), Viscoelastic properties for kappa- and iota-carrageenan in aqueous NaI from the liquid-like to the solid-like behaviour, *International Journal of Biological Macromolecules*, **28**, 1-14.
- Chronakis, I. S., Piculell, L. & Borgström, J. (1996), Rheology of kappa-carrageenan in mixtures of sodium and cesium iodide: two types of gels, *Carbohydrate Polymers*, **31**, 215-225.

- Chu, B., Zhou, Z., Wu, G. & Farrell, H. M. J. (1995), Laser light scattering of model casein solutions: effects of high temperature, *Journal of Colloid and Interface Science*, **170**, 102-112.
- Croguennoc, P., Meunier, V., Nicolai, T. & Durand, D. (2000), Characterization of semidilute k-carrageenan solutions, *Macromolecules*, **33**, 7471-7474.
- Dalgleish, D. G. (1998), Casein micelles as colloids: Surface structures and stabilities, *Journal of Dairy Science*, **81**, 3013-3018.
- Dalgleish, D. G. & Morris, E. R. (1988), Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles, *Food Hydrocolloids*, **2**, 311-320.
- Dalgleish, D. G. & Parker, T. G. (1980), Binding of calcium ions to bovine α_{s1} -casein and precipitability of the protein-calcium ion complexes, *Journal of Dairy Research*, **47**, 113-122.
- Dalgleish, D. G., Paterson, E. & Horne, D. S. (1981), Kinetics of aggregation of α_{s1} -casein / Ca^{2+} mixtures: charge and temperature effects, *Biophysical Chemistry*, **13**, 307-314.
- Dalgleish, D. G., Pouliot, Y. & Paquin, P. (1987), Studies on the heat stability of milk. I. Behaviour of divalent cations and phosphate in milks heated in a stainless steel system, *Journal of Dairy Research*, **54**, 29-37.
- De Bont, P. W., Van Kempen, G. M. P. & Vreeker, V. (2002), Phase separation in milk protein and amylopectin mixtures, *Food Hydrocolloids*, **16**, 127-138.
- de Kruif, C. G. (1998), Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation, *Journal of Dairy Science*, **81**, 3019-3028.
- de Kruif, C. G. & Holt, C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions, In K. A. P.F. Fox and P.L.H. McSweeney *Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins*, 3rd edn (pp. Plenum Publishers
- De Kruif, C. G., Weinbreck, F. & De Vries, R. (2004), Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **9**, 340-349.

- De La Fuente, M. A. (1998), Changes in the mineral balance of milk submitted to technological treatments., *Trends in Food Science & Technology*, **9**, 281-288.
- Dea, I. C. M., Mckinnon, A. A. & Rees, D. A. (1972), Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems which model cell wall cohesion: Reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans, *Journal of Molecular Biology*, **68**, 153-172.
- Dickinson, E. (1998), Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions, *Trends in Food Science & Technology*, **9**, 347-354.
- Dickinson, E., Semenova, M. G., Belyakova, L. E., Antipova, A. S., Ll'in, M. M., Tsapkina, E. N. & Ritzoulis, C. (2001), Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: relationship to emulsion flocculation, *Journal of Colloid and Interface Science*, **239**, 87-97.
- Doublier, J.-L., Garnier, C., Renard, D. & Sanchez, C. (2000), Protein-polysaccharide interactions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **5**, 202-214.
- Drohan, D. D., Tziboula, A., McNulty, D. & Horne, D. S. (1997), Milk protein-carrageenan interactions, *Food Hydrocolloids*, **11**, 101-107.
- Flett, K. L., Corredig, M. & Goff, H. D. (2010), Heat stability of aggregated particles of casein micelles and kappa carrageenan, *Journal of food science*, **0**,
- Fox, P. F. (1989), Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening, *Journal of Dairy Science*, **72**, 1379-1400.
- Garnier, C., Michon, C., Durand, S., Cuvelier, G., Doublier, J.-L. & Launay, B. (2003), Iota-carrageenan/casein micelles interactions: evidence at different scales, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, **31**, 177-184.
- Ginger, M. R. & Grigor, M. R. (1999), Comparative aspects of milk caseins, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **B 124**, 133-145.
- Grinberg, V. Y. & Tolstoguzov, V. B. (1997), Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions, *Food Hydrocolloids*, **11**, 145-458.

- Guido, S., Simeone, M. & Alfani, A. (2002), Interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate by drop deformation in shear flow, *Carbohydrate Polymers*, **48**, 143-152.
- Guo, M., Fox, P. F., Flynn, A. & Mohammad, K. S. (1989), Heat-induced changes in sodium caseinate, *Journal of Dairy Research*, **56**, 503-512.
- Guo, M. R., Fox, P. F., Flynn, A. & Kindstedt, P. S. (1996), Heat-induced modifications of the functional properties of sodium caseinate, *International Dairy Journal*, **6**, 473-483.
- HadjSadok, A., Pitkowski, A., Benyahia, L., Nicolai, T. & Moulai-Mostefa, N. (2008), Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering, *Food Hydrocolloids*, **22**, 1460-1466.
- Hemar, Y., Hall, C. E., Munro, P. A. & Singh, H. (2002), Small and large deformation rheology and microstructure of κ -carrageenan gels containing commercial milk protein products, *International Dairy Journal*, **12**, 371-381.
- Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P. A. & Singh, H. (2001a), Influence of xanthan gum on the formation and stability of sodium caseinate oil-in-water emulsions, *Food Hydrocolloids*, **15**, 513-519.
- Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P. A. & Singh, H. (2001b), Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum, *Food Hydrocolloids*, **15**, 565-574.
- Hermansson, A. M., Eriksson, E. & Jordansson, E. (1991), Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of kappa-carrageenan gels, *Carbohydrate Polymers*, **16**, 297.
- Holt, C. (1992), Structure and stability of bovine casein micelles, *Advances of protein chemistry*, **43**, 63-151.
- Holt, C. (2004), An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk, *Journal of European Biophysics*, **33**, 421-434.

- Horne, D. S. (1998), Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products, *Int. Dairy Journal*, **8**, 171-177.
- Jang, H. D. & Swaisgood, H. E. (1990), Characteristics of the interaction of calcium with casein submicelles as determined by analytical affinity chromatography, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **283**, 318-325.
- Ji, S., Corredig, M. & Goff, H. D. (2008), Aggregation of casein micelles and κ -carrageenan in reconstituted skim milk, *Food Hydrocolloids*, **22**, 56-64.
- Kim, H.-J., Decker, E. A. & McClements, D. J. (2006), Preparation of multiple emulsions based on thermodynamic incompatibility of heat-denatured whey protein and pectin solutions, *Food Hydrocolloids*, **20**, 586-595.
- Koh, M. W. W., Merino, L. M. & Dickinson, E. (2002), Rheology of acid induced sodium caseinate gels containing added gelatin, *Food Hydrocolloids*, **16**, 619-623.
- Kumosinski, T. F., Pessen, H., Farrell, H. M. J. & Brumberger, H. (1988), Determination of the quaternary structural states of bovine casein by small-angle x-ray scattering: submicellar and micellar forms, *Arch. Biochem. Biophys.*, **266**, 548-561.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Launay, B., Michon, C., Parker, A. & De Kruif, C. G. (1999), Casein micelle/iota carrageenan interactions in milk: influence of temperature, *Food Hydrocolloids*, **13**, 211-218.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Launay, B. & Parker, A. (1997), Gelation and flocculation of casein micelle/carrageenan mixtures, *Food Hydrocolloids*, **11**, 35-40.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Parker, A. & De Kruif, C. G. (2000), Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures, *Food Hydrocolloids*, **14**, 273-280.
- Lowson, C. J. & D.A. Rees, D. A. (1968), Carrageenans. Part VI. Reinvestigation of acetolysis products of l-carrageenan, revision of the structure of "a-1,3-galactotriose", and a further example of the reverse specificities of glycoside hydrolysis and acetolysis., *Journal of Chemical Society C*, 1301.

Lowson, C. J., Rees, D. A., Stancioff, D. J. & Stanley, N. F. (1973), Carrageenans. Part VIII. Repeating structures of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Journal of Chemical Society, Perkin I*, 2177.

Lucey, J. A., Johnson, M. E. & Horne, D. S. (2003), Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese, *Journal of Dairy Science*, **86**, 2725-2743.

Lynch, M. G. & Mulvihill, D. M. (1994a), The influence of caseins on the rheology of ι -carrageenan gels, *Food Hydrocolloids*, **8**, 317-329.

Lynch, M. G. & Mulvihill, D. M. (1994b). The influence caseins on the rheology of kappa carrageenan gels, In G. O. Phillips, P. A. Williams & D. J. Wedlock *Gums and stabilisers for the food industry*. (7) (pp. 323-332), Oxford: IRL Press

Lynch, M. G. & Mulvihill, D. M. (1996), Rheology of ι -carrageenan gels containing caseins, *Food Hydrocolloids*, **10**, 151-157.

MacArtain, P., Jacquier, J. C. & Dawson, K. A. (2003), Physical characteristics of calcium induced κ -carrageenan networks, *Carbohydrate Polymers*, **53**, 395-400.

Marchin, S., Putaux, J.-L., Pignon, F. & Léonil, J. (2007), Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo-transmission electron microscopy and small angle x-ray scattering/ultra small-angle x-ray scattering, *Journal of Chemical Physics*, **126**, 126-135.

Marozzine, A. & De Kruif, C. G. (2000), Interaction of pectin and casein micelles, *Food Hydrocolloids*, **14**, 391-394.

Martin, A. H., Goff, H. D., Smith, A. & Dalgleish, D. G. (2006), Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM), *Food Hydrocolloids*, **20**, 817-824.

Matia-Merino, L., Lau, K. & Dickinson, E. (2004), Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels, *Food Hydrocolloids*, **18**, 271-281.

McClements, D. J. (2005). In Food Emulsion: Principles, Practises and Techniques, In D. J. McClements *Food emulsions in practise* (pp. 515-544), Boca Raton, Florida: CRC Press

- Meunier, V. (1999). Etude de l'agrégation et de la gélification du k-carraghénane, Université Du Maine: 206.
- Meunier, V., Nicolai, T. & Durand, D. (2000), Structure and Kinetics of Aggregating k-carrageenan Studied by Light Scattering, *Macromolecules* **33**, 2497-2504.
- Meunier, V., Nicolai, T., Durand, D. & Parker, A. (1999), Light Scattering and Viscoelasticity of Aggregating and Gelling k-carrageenan, *Macromolecules*, **32**, 2610-2616.
- Michel, A.-S., Mestdagh, M. M. & Axelos, M. A. V. (1997), Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations, *International Journal of Biological Macromolecules*, **21**, 195-200.
- Michon, C. (1995). Thèse: Etude des gels de gélatine, de iota-carraghénane et de leurs mélanges. Paris, Université paris 7 et Paris 11, ENSIA: 1-265.
- Michon, C., Cuvelier, G., Launay, B. & Parker, A. (1996a), Viscoelastic properties of κ -carrageenan/gelatin mixtures, *Carbohydrate Polymers*, **31**, 161-169.
- Michon, C., Cuvelier, G., Launay, B. & Parker, A. (1996b), Concentration dependence of the properties of gelatin and iota-carrageenan systems at the gel point, *Journal De Chimie Physique et Physico-Chimie Biologie*, **93**, 819-827.
- Michon, C., Garnier, C., Chapuis, C., Durand, S., Cuvelier, G., Doublier, J. L. & Launay, B. (2003). Structure and properties of carrageenan/micellar casein mixtures, In E. Dickinson & T. VanVliet *Food colloids-Proteins, lipids and polysaccharides* (pp. 345-353), Cambridge: The Royal Society of Chemistry
- Millane, R. P., Chandrasekaran, R., Arnott, S. & Dea, I. C. M. (1988), The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan., *Carbohydrate Research*, **182**, 1-17.
- Morris, E. R., Rees, D. A. & Robinson, G. (1980), Cation-specific aggregation of carrageenans helices: Domain Model of polymer gel structure, *Journal of Molecular Biology*, **138**, 349-362.

Morris, G. A., Foster, T. J. & Harding, S. E. (2000), Further observations on the size, shape, and hydration of casein micelles from novel analytical ultracentrifuge and capillary viscosimetry approaches, *Biomacromolecules*, **1**, 764-767.

Morris, V. J. (2007). Polysaccharides: their role in food microstructure, In D. J. McClements *Understanding and controlling the microstructure of complex foods* (pp. Boca Raton: CRC Press

Nash, W., Pinder, D. N., Hemar, Y. & Singh, H. (2002), Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures, *International journal of biological macromolecules*, **30**, 269-271.

Nerdal, W., Haugen, F., Knutsen, S. & Grasdalen, H. (1993), Evidence for double helical kappa-carrageenan in aqueous LiI-solution and model for iodide binding, *Journal of biomolecular Structure and dynamics*, **10**, 785.

Nilsson, S. & Piculell, L. (1991), HELIX-COIL TRANSITIONS OF IONIC POLYSACCHARIDES ANALYZED WITHIN THE POISSON-BOLTZMANN CELL MODEL .4. EFFECTS OF SITE-SPECIFIC COUNTERION BINDING, *Macromolecules*, **24**, 3804-3811.

Norton, I. T. & Frith, W. J. (2001), Microstructure design in mixed biopolymer composites, *Food Hydrocolloids*, **15**, 543-553.

O'Kennedy, B. T., Mounsey, J. S., Murphy, F., Duggan, E. & Kelly, P. M. (2006), Factors affecting the acid gelation of sodium caseinate, *International Dairy Journal*, **16**, 1132-1141.

Oakenfull, D., Miyoshi, E., Nishinari, K. & Scott, A. (1999), Rheological and thermal properties of milk gels formed with κ -carrageenan. I. Sodium caseinate, *Food Hydrocolloids*, **13**, 525-533.

Panouillé, M. (2004). Thèse: Agrégation et gélification des submicelles de caséines. Le Mans, Université du Maine: 118.

Panouillé, M., Benyahia, L., Durand, D. & Nicolai, T. (2005a), Dynamical mechanical properties of suspensions of micellar casein particles, *Journal of Colloid and Interface Science*, **287**, 468-475.

Panouillé, M., Nicolai, T., Benyahia, L. & Durand, D. (2005b). Formation, aggregation and gelation of casein sub-micelles. Food Colloids Interactions, Microstructure and Processing, Cambridge, Royal Society of Chemistry.

Parker, A., Brigand, G., Miniou, C., Trespoey, A. & Vallée, P. (1993), Rheology and fracture of mixed ι - and κ -carrageenan gels: Two-step gelation, *Carbohydrate Polymers*, **20**, 253-262.

Payens, T. A. J. (1972), Light Scattering of Protein Reactivity of Polysaccharides Especially of Carrageenans, *Journal of Dairy Science*, **55**, 141-150.

Piculell, L. (1995). Gelling Carrageenans, In A. M. Stephen *Food Polysaccharides and Their Applications*. (2) (pp. 205), New York: Marcel Dekker

Piculell, L. (1998), Gelling polysaccharides, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **3**, 643-650.

Piculell, L. (2006). Gelling carrageenans, In A. M. Stephen, G. O. Phillips & P. A. Williams *Food Polysaccharides and Their Applications*. (2) (pp. 239-287), Boca Raton, London, New York: Taylor & Francis

Piculell, L., Borgström, J., Chronakis, I. S., Quist, P.-O. & Viebke, C. (1997), Organisation and association of κ -carrageenan helices under different salt conditions, *International Journal of Biological Macromolecules*, **21**, 141-153.

Piculell, L. & Lindman, B. (1992a), Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant and surfactant/surfactant mixtures similarities and differences, *Advances in Colloid and Interface Science*, **41**, 149-78.

Piculell, L., Nilsson, S. & Muhrbeck, P. (1992b), EFFECTS OF SMALL AMOUNTS OF KAPPA-CARRAGEENAN ON THE RHEOLOGY OF AQUEOUS IOTA-CARRAGEENAN, *Carbohydrate Polymers*, **18**, 199-208.

Pitkowski, A. (2007). Processus de gélification des caséines en présence de polyphosphates. Le Mans, Université du Maine: 156.

Pitkowski, A., Durand, D. & Nicolai, T. (2008), Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate, *Journal of Colloid and Interface Science*, **326**, 96-102.

- Pitkowski, A., Nicolai, T. & Durand, D. (2009), Stability of caseinate solutions in the presence of calcium, *Food Hydrocolloids*, **23**, 1164-1168.
- Polyakov, V. I., Grinberg, V. Y. & Tolstoguzov, V. (1997), Thermodynamic incompatibility of proteins, *Food Hydrocolloids*, **11**, 171-180.
- Povey, M. J. W., Golding, M., Higgs, D. & Wang, Y. (1999), Ultrasonic spectroscopy studies of casein in water, *Int. Dairy Journal*, **9**, 299-303.
- Puvanenthiran, A., Goddard, S. J. & McKinnon, I. R. (2003), Milk-based gels made with kappa-carrageenan, *Journal of Food Science*, **68**, 137-141.
- Rees, D. A. (1969), Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks, *Advance in Carbohydrate Chemistry*, **24**, 267.
- Rees, D. A., Steele, I. W. & Williamson, F. B. (1969), Conformational analysis of polysaccharides. III. The relation between stereochemistry and properties of some natural polysaccharide sulfates., *Journal of Polymer Science*, **28**, 261.
- Ribeiro, K. O., Rodrigues, M. I., Sabadini, E. & Cunha, R. L. (2004), Mechanical properties of acid sodium caseinate- κ -carrageenan gels: effect of co-solute addition, *Food Hydrocolloids*, **18**, 71-79.
- Ridout, M. J., Garza, S., Brownsey, G. J. & Morris, V. J. (1996), Mixed iota-kappa carrageenan gels, *International Journal of Biological Macromolecules*, **18**, 5-8.
- Roberts, M. A., Zhong, H.-J., Prodoliet, J. & Goodall, D. M. (1998), Separation of high-molecular-mass carrageenan polysaccharides by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection *Journal of Chromatography A*, **817**, 353-366.
- Rochas, C. & Mazet, J. (1984a), The conformational transition of kappa-carrageenan using microcalorimetry, *Biophysical Chemistry*, **23**, 2825-2833.
- Rochas, C. & Rinaudo, M. (1980), Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems, *Biopolymers*, **19**, 1675-1687.
- Rochas, C. & Rinaudo, M. (1984b), Mechanism of gel formation in k-carrageenan, *Biopolymers*, **23**, 735-745.

Rochas, C., Rinaudo, M. & Landry, S. (1990), Role of the molecular weight on the mechanical properties of kappa carrageenan gels, *Carbohydrate Polymers*, **12**, 255-266.

Rollema, H. S. (1992), Casein association and micelle formation, *Advanced Dairy Chemistry*, **1**, 111-140.

Schmidt, D. G. (1980), Colloidal aspects of casein, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **34**, 42-64.

Schmidt, D. G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure, In P.F.Fox *Developments in Dairy Chemistry*. (I) (pp. 61-86), London: Applied Science Publishers, Essex

Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S. & Hardy, J. (1998), Structure and techno-functional properties of protein-polysaccharide complexes: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **38**, 689-753.

Schorsch, c., Jones, M. G. & Norton, I. T. (1999), Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems, *Food Hydrocolloids*, **13**, 89-99.

Schorsch, c., Jones, M. G. & Norton, I. T. (2000), Phase behaviour of pure micellar casein/ κ -carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate, *Food Hydrocolloids*, **14**, 347-358.

Simeone, M., Molè, F. & Guido, S. (2002), Measurement of average drop size in aqueous mixtures of Na-alginate and Na-caseinate by linear oscillatory tests, *Food Hydrocolloids*, **16**, 449-459.

Singh, H., Tamehana, M., Hemar, Y. & Munro, P. A. (2003), Interfacial compositions, microstructures and properties of oil-in-water emulsions formed with mixtures of milk proteins and κ -carrageenan: 1. Sodium caseinate *Food Hydrocolloids*, **17**, 539-548.

Slootmaekers, D., Dijk, J. A. P. P. v., Varkevisser, F. A., Treslong, C. J. B. v. & Reynaers, H. (1991), Molecular characterisation of k- and l-carrageenan by gel permeation chromatography, light scattering, sedimentation analysis and osmometry., *Biophysical Chemistry*, **41**, 51.

Slotmaekers, D., Jonghe, C. D., Reynaers, H., Varkevisser, F. A. & Treslong, C. J. B. v. (1988), Static light scattering from k-carrageenan solutions, *International Journal of Biological Macromolecules*, **10** 160.

Smidsröd, O., Andressen, I. L., Grasdalen, H., Larsen, B. & Painter, T. (1980), Evidence for a salt-promoted "freeze-out" of linkage conformations in carrageenan as a pre-requisite for gel-formation, *Carbohydrate Research*, **80**, 11.

Snoeren, T. H. M. (1975), Electrostatic interaction between kappa carrageenan and k-casein, *Milchwissenschaft*, **30**, 393-395.

Snoeren, T. H. M. (1976). Kappa carrageenan: A study on its physico-chemical properties, sol-gel transition and interactions with milk proteins. Wageningen, Université de Wageningen: 1-103.

Snoeren, T. H. M., Both, M. P. & Schmitt, D. G. (1976), An electron-microscopic study of carrageenan and its interaction with k-casein, *Milk Dairy*, **30**, 132-141.

Spagnuolo, P. A., Dalglish, D. G., Goff, H. D. & Morris, E. R. (2005), Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers, *Food Hydrocolloids*, **19**, 371-377.

Suchkov, V. V., Grinberg, V. Y. & Tolstoguzov, V. B. (1981), Steady-state viscosity of the liquid two-phase disperse system water-casein-sodium alginate, *Carbohydrate Polymers*, **1**, 39-53.

Syrbe, A., Bauer, W. J. & Klostermeyer, H. (1998), Polymer Science Concepts in Dairy Systems--An Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloid Interaction, *International Dairy Journal*, **8**, 179-193.

Thaiudom, S. & Goff, H. D. (2003), Effect of κ -carrageenan on milk protein polysaccharide mixtures, *International Dairy Journal*, **13**, 763-771.

Thrimawithana, T. R., S. Young, S., Dunstan, D. E. & Alany, R. G. (2010), Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions, *Carbohydrate Chemistry*, **82**, 69-77.

Tolstoguzov, V. (2007). Ingredient interactions in complex foods: aggregation and phase separation, In D. J. McClements *Understanding and controlling the microstructure of complex foods* (pp. 185-206), Boca Raton: CRC Press

Tolstoguzov, V. B. (2003), Some thermodynamic considerations in food formulation, *Food Hydrocolloids*, **17**, 1-23.

Trcková, J., Stetina, J. & Kánský, J. (2004), Influence of protein concentration on rheological properties of carrageenan gels in milk, *International Dairy Journal*, **14**, 337-343.

Tuinier, R. & De Kruif, C. G. (1999a), Phase behavior of casein micelles/exocellular polysaccharide mixtures: experiment and theory, *Journal of Chemical Physics*, **110**, 9296-9304.

Tuinier, R., Ten Grotenhuis, E. & De Kruif, C. G. (2000), The effect of depolymerised guar gum on the stability of skim milk, *Food Hydrocolloids*, **14**, 1-7.

Tuinier, R., Ten Grotenhuis, E., Holt, C., Timmins, P. A. & De Kruif, C. G. (1999b), Depletion interaction of casein micelles and an exocellular polysaccharide, *Physical Review E*, **60**, 848-856.

Turgeon, S. L., Beaulieu, M., Schmitt, C. & Sanchez, C. (2003), Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects, *Colloids and surfaces*, **8**, 401-414.

Turgeon, S. L. & Laneuville, S. I. (2009). Protein+Polysaccharide Coacervates and Complexes: From Scientific Background to their Application as Functional Ingredients in Food Products, In S. Kasapis, I. T. Norton & J. B. Ubbink *Modern Biopolymer Science: Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application* (pp. 327-363), USA: Academic Press publications

Tziboula, A. & Horne, D. S. (1999), Influence of milk proteins on κ -carrageenan gelation, *International Dairy Journal*, **9**, 359-364.

Udabage, P., McKinnon, I. R. & Augustin, M. A. (2000), Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium-chelating agents, *Journal of Dairy Research*, **67**, 361-370.

Walstra, P. (1999), Casein sub-micelles: do they exist?, *Int. Dairy Journal*, **9**, 189-192.

Walstra, P. & Jenness, R. (1984), *Dairy Chemistry and Physics*. New York:

Ye, A. Q., Flanagan, J. & Singh, H. (2006), Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic, *Biopolymers*, **82**, 121-133.

Zhang, W. & Furo, I. (1993), ^{127}I NMR studies of anion binding to k-carrageenan, *Biopolymers*, **33**, 1709.

Zhang, W., Piculell, L. & Nilsson, S. (1992), Effects of specific anion binding on the helix-coil transition of lower charged carrageenans. NMR data and conformational equilibrium analysed within the Poisson-Boltzmann cell model., *Macromolecules*, **25**, 6165.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1 Matériels

II.1.1. Préparation des échantillons

II.1.1.1. Caséinate de sodium

La poudre de caséinate de sodium (SC) utilisée dans cette étude a été fournie par DMV international-France. Le SC est d'abord mis en solution dans de l'eau Millipore ultra pure contenant 200ppm d'azoture de sodium pour prévenir tout risque de contamination bactériologique. Pour améliorer la solubilisation de la protéine, la solution est agitée et chauffée à 70 °C pendant 2 heures. Ensuite, nous procédons à l'étape de purification (HadjSadok, Pitkowski, Benyahia, Nicolai and Moulai-Mostefa, 2008) . La solution ainsi obtenue est centrifugée pendant 3 heures à 50000g. A la fin de l'opération, il apparaît un précipité au fond qui correspond à la matière insoluble, une couche surnageante riche en matière grasse et entre ces deux phases se situe la phase riche en protéine. Cette phase protéique est dialysée plusieurs fois contre de l'eau millipore ultra pure contenant 200ppm d'azoture de sodium pour extraire les impuretés (sels). Puis, la solution obtenue est amenée à la concentration en sel souhaitée. Ensuite, elle est chauffée à 70°C pendant 3 heures : il apparaît au fond un sédiment qui contient moins de 5% de la protéine mise en solution. Puis, cette solution est ultracentrifugée pendant 1 heure à 50000g et le surnageant est récupéré. Le pH de la solution est réglé à 7 et la concentration en protéine est déterminée par spectroscopie UV à 280nm, avec un coefficient d'extinction molaire de $0.81 \text{ mol.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Pour toutes les analyses en diffusion de lumière, la solution est filtrée sur $0.45\mu\text{m}$ pour enlever les impuretés.

Poudre de SC	mg/100g			ES (%)	MAT (%)
	Na	Ca	K		
	1500	56	10	93	88.6

Tableau II. 1 : Composition chimique de la poudre de caséinate de sodium

Les images confocales des solutions traitées et non traitées de SC sont données sur la figure suivante (figure II.1) :



Figure II. 1 : Photographie en microscopie confocale des solutions de caséinate de sodium respectivement non traitées et traitées. Taille des images 160 μ m.

II.1.1.2. Submicelles de caséines

La poudre de caséines micellaires a été fournie par l'INRA de Rennes. Elle a été dispersée dans de l'eau Millipore ultrapure contenant 200 ppm d'azote de sodium. Cette solution à pH 6 a ensuite été mélangée avec une solution concentrée de triphosphate de sodium à pH 6 dans des quantités permettant d'obtenir les concentrations de caséines et de triphosphates de sodium désirées. On obtient ainsi des submicelles de caséines qui peuvent s'agréger au cours du temps. La vitesse d'agrégation augmente avec la température. A 20°C, elle est très lente (Pitkowski, 2007). Cette agrégation est très dépendante de la température et de la concentration en protéines et peut être considérée comme négligeable à température ambiante.

Poudre de caséine micellaire	mg /100g			ES (%)	MAT (%)
	Na	Ca	K		
	23	2773	69	96.5	88

Tableau II. 2: Composition chimique de la poudre de caséine micellaire

II.1.1.3. Carraghénanes

La poudre de kappa carraghénane (KC) a été fournie par Cargill (lot HMRXZ) ainsi que celle de iota carraghénane (IC) (lot HMRXSI). La SEC montre que les 2 poudres contiennent entre 70-90% de carraghénane. La RMN du proton montre que la poudre HMRXZ contient environ 95% de kappa carraghénane et 5% d'iota carraghénane tandis que la poudre HMRXSI contient 95% de iota et 5% kappa. Le carraghénane lyophilisé est sous une forme sodique (KC) ou potassique (IC). Sa mise en solution n'est pas immédiate. Il faut tout d'abord le

mettre en suspension dans de l'eau Millipore ultra pure contenant 200ppm d'azote de sodium par simple agitation pendant 2 heures. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 9 pour empêcher tout risque d'hydrolyse pendant le traitement thermique. Puis, elle est chauffée pendant 3 heures à 70 °C pour permettre la solubilisation complète du carraghénane. La solution à 100mM NaCl et à pH 7 ou 6 est dialysée plusieurs fois contre de l'eau millipore respectivement à pH 7 ou 6, contenant 200ppm d'azote de sodium et 100mM NaCl, afin d'éliminer toute trace de sels résiduels parasites (en particulier le potassium et le calcium). Pour toutes les analyses en diffusion de lumière, la solution est filtrée sur 0.45µm.

Poudre de kappa carraghénane	mg/100g			ES (%)
	Na	Ca	K	
	5500	71	300	90

Tableau II. 3: Composition chimique de la poudre de kappa carraghénane purifiée

Poudre de iota carraghénane	mg/100g			ES (%)
	Na	Ca	K	
	3820	120	6480	73

Tableau II. 4: Composition chimique de la poudre de iota carraghénane purifiée

II.1.2. Préparation des mélanges caséines/ carraghénanes

Les caséines sont mélangées à température ambiante avec la solution de carraghénane de sodium à la concentration de sel souhaitée (NaCl, KCl ou triphosphate de sodium (NaTPP)), à pH 7 ou pH 6, dans le but de voir l'effet du sel ou du pH. Puis, le mélange est chauffé à 60 °C (pour les solutions avec du NaCl) ou à 80°C (pour des solutions avec du KCl) pendant 5 min. Les concentrations en caséines dans les mélanges finaux varient de 0 à 100g/L et celles en carraghénane de 0 à 15 g/L. L'ordre d'addition des ingrédients n'influence pas les propriétés fonctionnelles finales des produits.

II.2. Méthodes

Les propriétés structurales et mécaniques des systèmes mixtes ont été déterminées grâce à la diffusion statique de la lumière en milieu turbide (Brown, 1996) , la microscopie confocale à balayage laser et la rhéologie. Cette partie présente d'une part, les protocoles de mesure et d'autre part les techniques de caractérisation sans exposer en détails les principes théoriques de ces dernières, voir pour cela des ouvrages de référence : la diffusion de la lumière (Brown, 1996; Nicolai, 2007) , la microscopie confocale (Prasad, Semwogerere and Weeks, 2007; Webb, 1996) et la rhéologie (Macosko and Mewis, 1994) .

II.2.1. Protocole

II.2.1.1. Dosage des caséines

Ces mesures ont été réalisées par Spectroscopie UV-visible (Unicam UV2 UV-Vis).

La concentration de caséines (C) a été déterminée à partir de l'absorbance mesurée à 280nm (A_{280nm}) dans une cuve de largeur (L) avec un coefficient d'extinction molaire (ϵ) de 0.81 mL.mg⁻¹.cm⁻¹ (valeur déterminée par étalonnage et conforme à celle trouvée dans la littérature) (Oliva, Llabres and Farina, 2001) . La loi de Beer-Lambert nous donne la concentration selon l'équation (II.1) :

$$c = \frac{A_{280nm}}{\epsilon L} \quad \text{II. 1}$$

II.2.1.2. Dosage des carraghénanes

La concentration de carraghénane est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en prenant comme incrément d'indice de réfraction pour le KC 0.145mL/g et pour le IC 0.127mL/g (Viebke, Borgström and Piculell, 1995) . On a la relation :

$$Surface = K_{RD} \left(\frac{\partial n}{\partial C} \right) M_{injectée} \quad \text{II. 2}$$

K_{RD} : constante d'appareillage

$M_{injectée}$: masse injectée

$\frac{\partial n}{\partial C}$: Incrément d'indice de réfraction

I.2.1.3. Marquage des caséines

La protéine est marquée de manière non covalente à pH 7 par la rhodamine B isothiocyanate (RITC), dont les maxima d'excitation et d'émission se situent respectivement à $\lambda = 543$ et 580 nm dans le méthanol. La RITC se fixe au moyen d'interactions hydrophobes sur les groupements apolaires de la protéine. Le marquage s'effectue par ajout de la solution de RITC directement dans le mélange de caséines et de KC de manière à ce que la concentration en RITC soit à 5ppm dans l'échantillon. La concentration en rhodamine de la solution mère est déterminée par spectroscopie UV-Visible à la longueur d'onde d'absorbance de 555nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire de $0.21 \text{ mol.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

II.2.1.4. Marquage des carraghénanes

Nous avons essayé différentes méthodes pour marquer le carraghénane : le dosage par la méthode Dubois (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers and Smith, 1956) , le marquage covalent au DTAF (Helbert, Chanzy, Husum, Schülein and Ernst, 2003) et la réfractométrie. Ces différentes méthodes n'ont pas été concluantes pour les raisons suivantes:

- par la méthode Dubois, en présence de protéines, le pic d'absorbance du carraghénane marqué disparaissait, donc il devenait impossible de déterminer la concentration du carraghénane dans le mélange.
- par le marquage covalent du carraghénane avec le DTAF, les mesures obtenues étaient très aléatoires : un même mélange pouvait présenter un comportement associatif ou ségrégatif.
- par la réfractométrie, l'incrément d'indice de réfraction du mélange était supérieur à la somme des incréments d'indice des 2 solutions de départ qui étaient la solution de SC

et la solution de KC. Il y avait donc une contribution supplémentaire dans le mélange qui augmentait la valeur de l'incrément d'indice totale, mais nous n'avons pas pu déterminer cette contribution.

Aussi, pour déterminer la concentration du carraghénane dans le mélange, nous avons utilisé les mesures viscosimétriques puisque la viscosité du carraghénane est directement corrélée à sa concentration (Croguennoc, Meunier, Nicolai and Durand, 2000).

II.2.2. Techniques expérimentales

II.2.2.1. Techniques de diffusion de la lumière

La technique de diffusion de la lumière permet d'avoir des informations quantitatives tant du point de vue statique que dynamique, telles que la masse molaire, la taille, la structure, les interactions, la flexibilité et la diffusion des particules. C'est une méthode d'analyse non destructive et bien adaptée à l'étude des systèmes colloïdaux et des phénomènes d'agrégation.

La diffusion de la lumière classique (diffusion statique et dynamique) exige que les échantillons observés soient transparents pour éviter les phénomènes de diffusion multiple. Dans le cas des échantillons turbides, nous avons utilisé un appareillage spécifique permettant d'éliminer par corrélation croisée la diffusion multiple. Son principe sera détaillé par la suite.

II.2.2.1.1. Diffusion statique de la lumière classique

Le principe général consiste à envoyer une source lumineuse sur un échantillon de volume diffusant V , placé dans une cellule contenant un fluide ayant le même indice de réfraction que le verre (Figure II. 2).

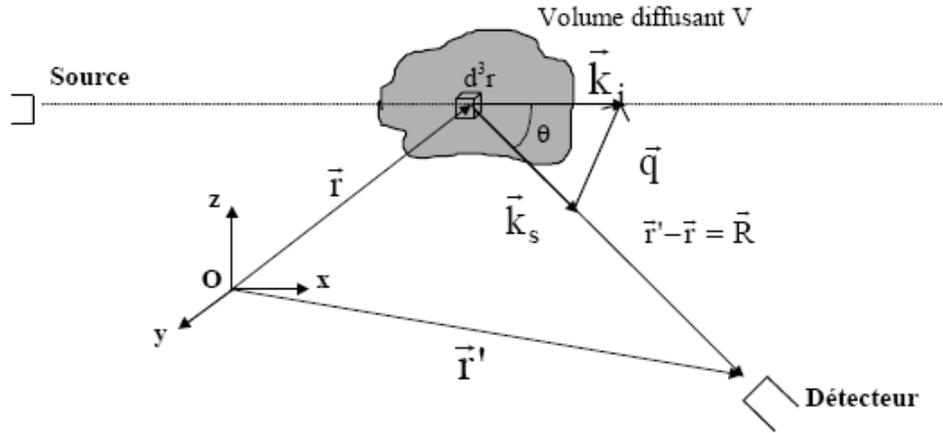


Figure II. 2: Schéma du principe de la diffusion de la lumière

Le faisceau incident, de longueur d'onde λ_0 et de vecteur d'onde incidente \vec{k}_i est diffusé par l'échantillon. Le vecteur d'onde de la lumière diffusée dans la direction θ (angle d'observation), à la distance R de l'échantillon est \vec{k}_s . Pour la diffusion élastique ou quasi-élastique, la norme de ces vecteurs est pratiquement la même et vaut $k_i=k_s=2\pi n/\lambda_0$ où n est l'indice de réfraction du milieu.

On définit le vecteur de diffusion comme :

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_s \quad \text{II. 3}$$

et sa norme vaut :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin(\theta/2) \quad \text{II. 4}$$

Les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée proviennent essentiellement des fluctuations de densité et de température. Ces dernières souvent négligeables lorsqu'on est en présence d'un liquide pur. Si on considère maintenant une solution, il faut ajouter les fluctuations de concentration. Pour des concentrations suffisamment faibles, les fluctuations de densité de la solution sont équivalentes à celles du solvant pur, l'excès d'intensité diffusée n'est alors dû qu'aux fluctuations de concentration.

En diffusion statique, on détermine l'intensité diffusée moyenne dans le temps. L'intensité relative diffusée (I_r) par la solution est définie comme l'intensité diffusée moyennée (I_m) moins l'intensité diffusée par le solvant (I_{sol}) divisée par l'intensité diffusée par une référence ($I_{réf}$) (par exemple le toluène) :

$$I_r = \frac{I_m - I_{sol}}{I_{réf}} = KCRT \left(\frac{\partial \pi}{\partial C} \right)^{-1} S(q) \quad \text{II. 5}$$

Avec $K = \frac{4\pi^2 n^2}{\lambda^4 N_a} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \left(\frac{n_{réf}}{n} \right)^2 \frac{1}{R_{réf}}$ Où

- K : constante d'appareil correspond au pouvoir de diffusion ou contraste des particules
- C : concentration de particules
- R : constante des gaz parfaits
- T : température absolue (K)
- $\frac{\partial \pi}{\partial C}$: compressibilité osmotique
- S(q) : facteur de structure, combinaison des facteurs de structure inter et intra moléculaire des particules considérées
- n : indice de réfraction du milieu qui est proche de celui du solvant pour une solution diluée
- $n_{réf}$: indice de réfraction de la référence
- $\frac{\partial n}{\partial C}$: incrément d'indice de réfraction
- N_a : nombre d'Avogadro
- $R_{réf}$: rapport de Rayleigh de la référence qui permet d'obtenir des valeurs absolues d'intensité diffusée.

Pour les solutions diluées, la compressibilité osmotique $\frac{\partial \pi}{\partial C}$ peut être décrite sous la forme d'un développement du viriel :

$$\frac{\partial \pi}{\partial C} = RT \frac{1}{M_w} (1 + 2A_2 M_w C + \dots) \quad \text{II. 6}$$

Toujours pour les solutions diluées (C tendant vers 0), il est possible de négliger les interactions entre particules et on obtient alors :

$$I_r = KCM_w S(q)$$

II. 7

Le calcul de $S(q)$ nécessite de connaître la fonction de corrélation de paire $g(r)$ de l'agrégat. Ceci est possible dans le cas d'agrégats avec des géométries simples et bien déterminées mais la plupart du temps ce calcul est impossible. Des simplifications sont cependant possibles dans certains cas limites en fonction de l'échelle sondée, comme le suggère la figure II.3 :

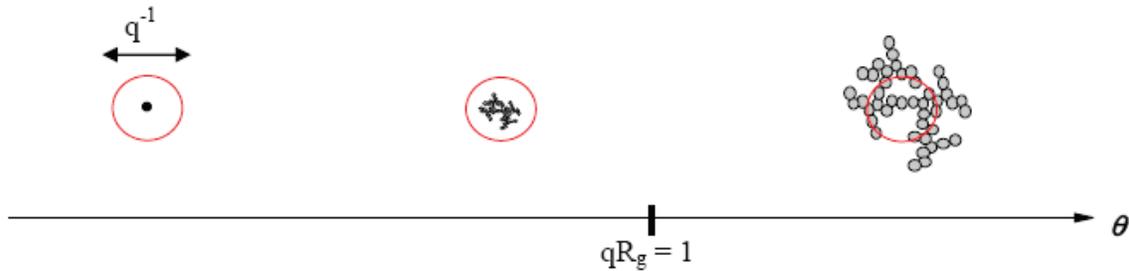


Figure II. 3: Schématisation de l'échelle spatiale sondée en fonction de q et de la taille des particules ou agrégats considérés

✚ $qR_g < 1$

On obtient par des développements limités la relation suivante :

$$S(q) = 1 - \frac{q^2 R_g^2}{3} \quad \text{II. 8}$$

✚ $qR_g \gg 1$

Les processus d'agrégation en solution conduisent le plus souvent à la formation d'objets ayant à la fois des structures et des distributions autosimilaires. On parle alors d'objet fractal, caractérisé par une dimension fractale D_f . La masse (M) varie alors avec la taille R_g selon la relation :

$$M \propto (R_g)^{D_f} \quad \text{II. 9}$$

Le facteur de structure suit aussi une loi de puissance :

$$S(q) \propto q^{-D_f} \quad \text{II. 10}$$

avec $1 < D_f < 3$

Exemples :

- Pour une pelote de polymère linéaire gonflée en bon solvant : $D_f = 5/3$.
- Pour une pelote gaussienne en solvant θ , $D_f = 2$

Dans le cas de solutions concentrées, on peut également utiliser les mêmes équations, mais on détermine alors une masse apparente M_a et un rayon apparent R_a . Le facteur de structure prend alors en compte les interactions entre les particules.

II.2.2.1.2. Diffusion dynamique de la lumière

Contrairement à la diffusion statique où l'on mesure la valeur moyenne de l'intensité en fonction du temps, la diffusion dynamique est basée sur l'étude des fluctuations temporelles d'intensité autour d'une valeur moyenne qui reflètent les fluctuations temporelles de concentration et de densité des particules en solution.

En pratique, on peut mesurer avec un corrélateur la fonction d'autocorrélation ($G_2(q, t)$) associée aux fluctuations d'intensité diffusée au cours du temps t . Elle mesure la perte de corrélation du signal avec le temps. Si les particules sont grandes, le signal change lentement et la corrélation persiste longtemps. Dans le cas où les particules sont petites et bougent rapidement, la corrélation est plus rapidement perdue.

Elle est définie par :

$$G_2(q, t) = \langle I(0).I(t) \rangle \quad \text{II. 11}$$

Après normalisation par l'intensité moyenne, on définit $g_2(q, t)$ par :

$$g_2(q, t) = \frac{G_2(q, t)}{\langle I(q, t) \rangle^2} \quad \text{II. 12}$$

On ne peut pas relier les fluctuations de l'intensité directement aux mouvements des unités de diffusion. Celles-ci sont liées aux fluctuations du champ électrique diffusé. Lorsque la distribution des fluctuations de l'intensité est gaussienne autour de sa valeur moyenne, la fonction d'autocorrélation de l'intensité, $g_2(q, t)$, est reliée à la fonction d'autocorrélation du champ électrique, $g_1(q, t)$, par la relation de Siegert :

$$g_2(q, t) = 1 + a.(g_1(q, t))^2 \quad \text{II. 13}$$

où a représente l'intercepte et dépend des caractéristiques internes de l'appareillage utilisé. C'est une constante comprise entre 0 et 1.

La fonction $g_1(q, t)$ est uniquement fonction de fluctuations de concentration qui sont liées à différents phénomènes : le mouvement de diffusion, de rotation ou la dynamique interne. Quand on sonde les objets à $qR_g \leq 1$ $g_1(q, t)$ prend une forme très simple pour des solutions monodisperses dilués :

$$g_1(q, t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{II. 14}$$

$$\text{Avec } \frac{1}{\tau} = D \times q^2$$

Sachant que pour une sphère de rayon R , le coefficient de friction à dilution infinie pour une molécule de soluté est $f_0 = 6\pi\eta_s R$, avec η_s la viscosité du solvant, on définit pour une particule de forme quelconque, un rayon hydrodynamique effectif R_h comme le rayon d'une sphère de même coefficient de diffusion D_0 selon la formule de Stokes-Einstein :

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta_s R_h} \quad \text{II. 15}$$

La diffusion dynamique permet d'accéder au rayon hydrodynamique des particules. Dans le cas où les particules sont polydisperses ou s'il existe plusieurs populations de particules, les fonctions de corrélation expérimentales peuvent être décrites par une distribution de temps de relaxation :

$$g_1(t) = \int A(\tau) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d\tau \quad \text{II. 16}$$

Des programmes d'analyse existent pour traiter ces distributions et déterminer $A(\tau)$.

✚ **Le programme GEX** permet d'ajuster les distributions larges et continues de temps de relaxation que REPES a tendance à découper en plusieurs pics. L'expression de $A(\tau)$ est la suivante :

$$A(\tau) = \frac{|s| \tau^{p-1} \tau_a^{-p} \exp\left(-\left(\frac{\tau}{\tau_a}\right)^s\right)}{\Gamma(p/s)} \quad \text{II. 17}$$

où p , s et τ_a sont des paramètres ajustables, τ_a détermine la position de la distribution sur l'axe des temps de relaxation, p et s déterminent la largeur de la distribution et l'asymétrie de la courbe. Γ représente la fonction gamma.

II.2.2.1.3. Diffusion statique de la lumière en milieu turbide (3DLS)

La diffusion classique de la lumière nécessite que les échantillons soient transparents c'est-à-dire que le phénomène de diffusion multiple n'existe pas : l'intensité collectée par le détecteur n'a été diffusée que par une seule particule. Dans les solutions turbides, un photon diffusé de façon multiple ne porte pas la même information qu'un photon diffusé une seule fois :

$$I_{\text{mesurée}} = I_{\text{diffusion simple}} + I_{\text{diffusion multiple}} \quad \text{II. 18}$$

Les techniques classiques qui permettent de lier l'intensité diffusée (diffusion simple) à la structure des systèmes restent donc parfaitement valables pour le traitement de l'intensité diffusée mesurée en 3DLS, une fois la diffusion multiple soustraite et la correction pour la turbidité de l'échantillon prise en compte.

Pour obtenir des informations sur la structure d'une solution turbide, il faut donc soustraire les photons diffusés de façon multiple.

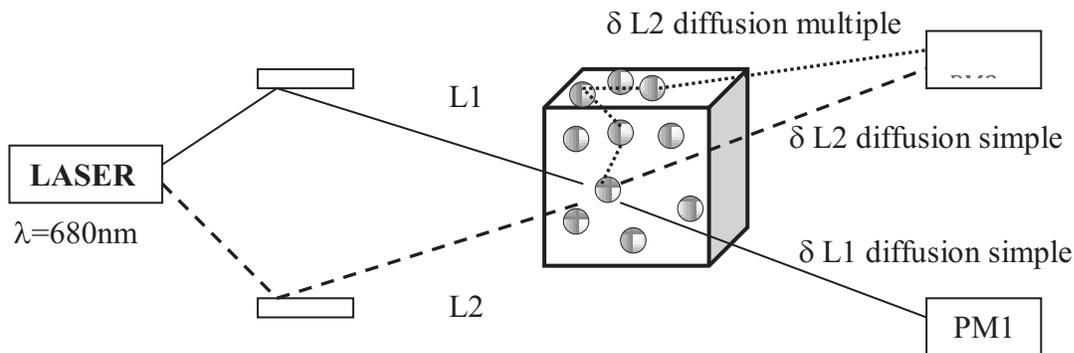


Figure II. 4: Schéma du principe de la diffusion de lumière en milieu turbide

En pratique, comme le montre le schéma représenté sur la figure II. 4, deux faisceaux L1 et L2 provenant de la même source traversent la solution et sont détectés par deux photomultiplicateurs PM1 et PM2. La corrélation entre la lumière diffusée par les deux faisceaux est :

$$G_2(t) = \langle I_{L1}(t) \cdot I_{L2}(t) \rangle \quad \text{II. 19}$$

Si on a seulement de la diffusion simple de lumière, l'intensité mesurée par les deux PM sera en phase. Par contre, quand le phénomène de diffusion multiple intervient, la phase mesurée par les deux PM sera décorrélée pour les photons diffusés de multiple fois. L'intercepte

mesuré $G_2(t \rightarrow 0)_{\text{mesuré}}$ sera alors inférieur à l'intercepte idéal mesuré pour une solution transparente. La fraction de photons diffusés une fois s'écrit donc sous la forme :

$$F_s = \left(\frac{G_2(t \rightarrow 0)_{\text{mesuré}}}{G_2(t \rightarrow 0)_{\text{idéal}}} \right)^{0.5} = \left(\frac{B}{B_0} \right)^{0.5} \quad \text{II. 20}$$

où B est l'intercepte de la fonction de corrélation croisée de la solution étudiée et B_0 celui d'un échantillon référence transparent.

Les mesures de diffusion de la lumière réalisées au cours de cette étude ont été effectuées à 20°C en utilisant la technique de diffusion en milieu turbide. L'appareil utilisé est une version commerciale de l'instrument de corrélation croisée 3D (LS Instrument, Fribourg, Suisse). La source lumineuse est un laser diode de longueur d'onde 680 nm.

II.2.2.2. Microscopie confocale à balayage laser en mode fluorescence

En microscopie à fluorescence classique, on a une perte de résolution de l'image due à l'excitation des fluorochromes se situant hors du plan focal. En effet, les fluorochromes sont excités par le laser sur toute l'épaisseur de la préparation, ce qui se traduit par une image contaminée par un bruit de fond. Le principe de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL en français et CLSM pour confocal laser scanning microscopy en anglais) est d'éliminer la lumière provenant des plans défocalisés qui parasite le plan focal.

Le principe de l'appareil est donné sur la figure (figure II. 5) :

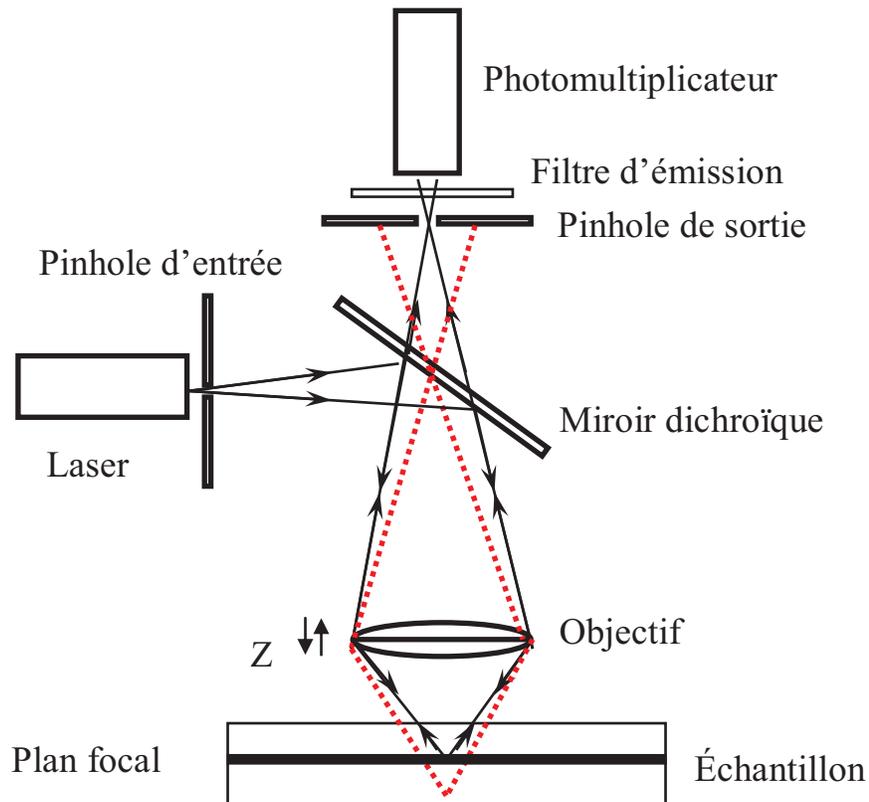


Figure II. 5: Schéma de principe du microscope confocal à balayage laser

Le rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes, auparavant choisis en fonction de leurs capacités à se fixer sur les sites particuliers d'une structure ou d'un objet d'intérêt. Lors de l'impact optique, il y a émission des rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable (pinhole), il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de la préparation et d'éliminer ainsi le signal provenant des autres plans. Ces rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueur d'onde, puis détectés par des photomultiplicateurs. Le signal reçu est enfin converti en signal numérique conduisant à la création d'une image.

La MCBL comprend donc des lasers, des éléments optiques, des dispositifs de balayage rapide et des ordinateurs qui traitent numériquement les images.

En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut reconstruire une représentation tridimensionnelle de l'objet.

Les clichés de MCBL ont été réalisés avec un microscope inversé Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems Heidelberg, Allemagne) équipé de 3 lasers qui regroupent 6 raies : 458, 488, 514, 543 et 633 nm et en utilisant différents objectifs à immersion eau ou huile. Pour nos observations, l'objectif à immersion huile n'est pas adéquat parce que la différence d'indice de réfraction entre le milieu d'immersion et la préparation est trop grande. L'objectif HCx PL APO 63x 1,2W à immersion eau a été utilisé, bien qu'il ait un champ d'observation réduit, car il a une meilleure résolution.

La valeur du gain a été choisie dans un domaine où le bruit est négligeable et où il n'y a pas de saturation. On est entre 560 et 580V pour 5 ppm de rhodamine RITC.

Le mode xyz a été choisi pour sonder l'échantillon dans les 3 dimensions. En général, pour des mesures quantitatives, il faut se mettre en xyz de façon à éviter les effets interfaciaux sur la structure (il faut regarder dans le cœur de l'échantillon).

La protéine marquée est observée en utilisant un laser à la longueur d'onde de 543nm (le PMT : émission enregistrée entre 555 et 700 nm). Les solutions de référence ou les mélanges préalablement chauffés à 60°C pendant 5 min sont placées dans les puits de labtek et regardées immédiatement. Les observations sont ensuite faites à 20°C à différents endroits de l'échantillon pour moyenner.

II.2.2.3. Rhéologie

Les produits peuvent être caractérisés rhéologiquement de différentes manières, notamment en régime oscillant ou en régime permanent.

II.2.2.3.1. Etude en régime permanent

L'ensemble des forces (F) appliquées sur l'échantillon induit une contrainte de cisaillement (σ) qui est parallèle à la surface de la couche du produit (S). La variation de déplacement des couches de matériau les unes sur les autres correspond à la déformation γ . Sa dérivée par rapport au temps $\dot{\gamma}$ est le gradient de vitesse, autrement appelé taux de cisaillement.

II.2.2.3.2. Etude en régime oscillant

Elle permet de déterminer les propriétés viscoélastiques d'un matériau (module de conservation G' et de perte G'') en appliquant à l'échantillon une déformation sinusoïdale de pulsation ω (en rad.s^{-1}), et donc, de fréquence $f = \frac{\omega}{2\pi}$ (en Hz) :

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad \text{II. 21}$$

La contrainte associée est alors de la forme :

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad \text{II. 22}$$

où δ désigne l'angle de déphasage entre la déformation et la contrainte et est appelé également angle de perte. Pour une déformation imposée suffisamment faible ($\gamma_0 < 10^{-2}$), le module complexe G^* , défini comme le rapport entre la contrainte $\sigma(t)$ et la déformation maximale γ_0 comporte une partie réelle et une partie imaginaire.

La partie réelle représente le module de conservation G' qui est en phase avec la déformation et la partie imaginaire correspond au module de perte G'' qui est en quadrature de phase avec la déformation. Ce qui nous donne :

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad \text{II. 23}$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad \text{II. 24}$$

- Pour un solide parfaitement élastique : δ et G'' sont nuls.
- Pour un liquide visqueux idéal, $\delta = \pi/2$ et G' est nul.

la tangente de l'angle de perte $\tan \delta$ est reliée à G' et G'' par :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{II. 25}$$

Le comportement mécanique de l'échantillon peut être étudié en faisant varier la fréquence des oscillations, ce qui permet d'observer les différents temps de relaxation. Cette technique est particulièrement intéressante pour étudier des phénomènes d'agrégation et de gélification. Pour sonder un matériau dans son état d'équilibre il faut rester dans le domaine linéaire, domaine dans lequel la déformation ne modifie pas la structure.

II.2.2.3.3. Appareillage et protocole expérimental

Les rhéomètres à contrainte imposée qui ont été utilisés sont : AR2000 et ArG2 (TA, instruments). Ils possèdent un système de régulation de température à effet Peltier. Afin d'éviter les problèmes d'évaporation à haute température, de l'huile de paraffine est ajoutée sur les échantillons aqueux et est maintenue en place grâce à un piège en silicone. La principale différence entre ces 2 rhéomètres est un palier magnétique pour l'ArG2 au lieu d'un palier à air pour AR2000, ce qui lui donne une sensibilité plus grande. Au préalable, différents tests ont été effectués pour déterminer les conditions optimales de mesure des échantillons. Nous avons ainsi regardé l'effet du type de géométrie, du gap et de la vitesse sur la mesure.

II.a. Influence de la géométrie et du gap

Les tests sont faits à une concentration de 50g/L de SC et 1.5g/L de KC avec 0.1M de NaCl. On effectue une rampe de température de 35 à 5°C dans les mêmes conditions de déformation (1%), de fréquence (1Hz) et de vitesse (-1°C/min) et on suit l'évolution du module de conservation G' en fonction de la température.

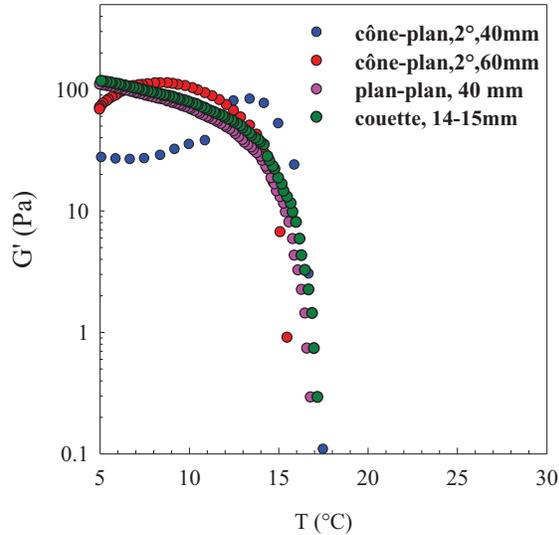


Figure II. 6: Evolution de G' en fonction de la température de refroidissement pour 4 géométries différentes.

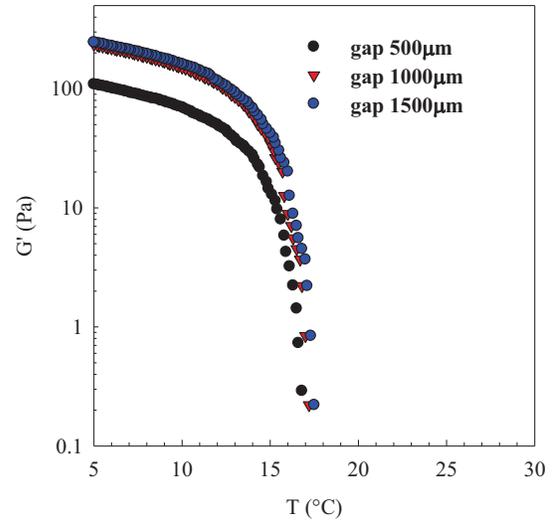


Figure II. 7: Evolution de G' en fonction de la température de refroidissement dans la géométrie plan-plan pour 3 gaps différents.

En comparant les évolutions de G' obtenues pour chacune des géométries (cône-plan ($27\ \mu\text{m}$), plan-plan (gap de 1mm) et couette (gap de 10mm) (voir figure II.6), nous constatons que pour la géométrie cône-plan, au lieu d'avoir une augmentation continue de G' , nous observons une chute brutale de G' . L'effet est plus accentué avec le cône-plan car on a un petit entrefer de $27\ \mu\text{m}$. Par contre, avec la géométrie plan-plan et le couette, le pic disparaît complètement car l'entrefer est plus grand, ce qui permet de diminuer les effets d'interface.

Le même type de rampe de température est effectué sur le mélange avec la géométrie plan-plan en choisissant des gaps différents. L'évolution de G' obtenue est représentée sur la figure II. 7. Nous n'observons pas de pic et le module augmente avec le gap puis se stabilise avec un gap d'environ 1 mm. Donc, à cette valeur, le module ne dépend plus du gap.

Cette étude a permis de montrer que la géométrie optimale de mesure pour nos systèmes est une géométrie plan-plan avec un gap de 1mm ou le couette avec un gap de 10 mm.

II.b. Influence de la vitesse de rampe

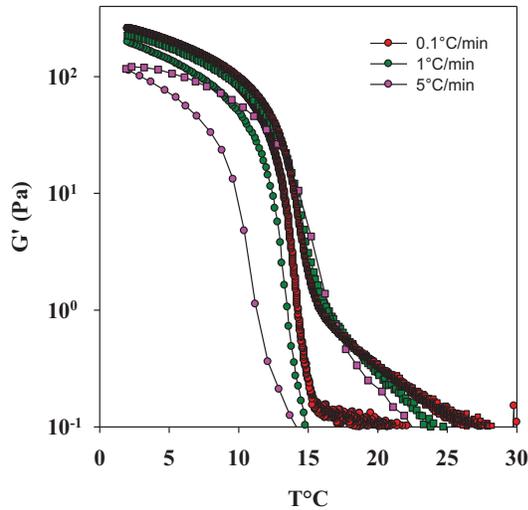


Figure II. 8: Evolution de G' pendant la gélification (rond) et la fonte (carré) à différentes vitesses de rampe indiquées sur la figure (SC 3 g/L, KC 10g/L, 0.1M NaCl et pH 7).

Les modules et les températures critiques de transitions ne peuvent être considérés comme indépendants de la vitesse qu'à partir de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Nous voyons clairement que la vitesse de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ est trop rapide.

Aussi, nous avons décidé de travailler à $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

En conclusion, toutes les mesures ont été effectuées soit avec une géométrie plan-plan de 40 mm et un gap de 1 mm, soit avec une géométrie couette et un gap de 10 mm, et avec une vitesse de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, en s'assurant au préalable qu'on était dans le domaine linéaire (à l'aide des rampes en contrainte).

Références bibliographiques

- Brown, W. (1996), *Light scattering. Principles and developments*. Oxford: Clarendon Press.
- Croguennoc, P., Meunier, V., Nicolai, T. & Durand, D. (2000), Characterization of semidilute κ -carrageenan solutions, *Macromolecules*, **33**, 7471-7474.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956), Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356.
- HadjSadok, A., Pitkowski, A., Benyahia, L., Nicolai, T. & Moulai-Mostefa, N. (2008), Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering, *Food Hydrocolloïds*, **22**, 1460-1466.
- Helbert, W., Chanzy, H., Husum, T. L., Schüleïn, M. & Ernst, S. (2003), Fluorescent Cellulose Microfibrils As Substrate for the Detection of Cellulase Activity, *Biomacromolecules*, **4**, 481-487.
- Macosko, C. W. & Mewis, J. (1994). Suspension rheology, In VCH *Rheology principles, measurements, and applications* (pp.
- Nicolai, T. (2007). Food structure characterisation using scattering methods, In D. J. McClements *Understanding and controlling the microstructure of complex foods* (pp. 288-310), Cambridge: Woodhead
- Oliva, A., Llabres, M. & Farina, J. B. (2001), Comparative study of protein molecular weights by size-exclusion chromatography and laser-light scattering, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **25**, 833-841.
- Pitkowski, A. (2007). Processus de gélification des caséïnes en présence de polyphosphates. Le Mans, Université Du Maine: 155.
- Prasad, V., Semwogerere, D. & Weeks, E. R. (2007), Confocal microscopy of colloids, *JOURNAL OF PHYSICS: CONDENSED MATTER*, **19**, 5.

Viebke, C., Borgström, J. & Piculell, L. (1995), Characterisation of kappa- and iota-carrageenan coils and helices by MALLS/GPC, *Carbohydrate Polymers*, **27**, 145-154.

Webb, R. H. (1996), Confocal optical microscopy, *Rep.Prog.Phys.*, **59**, 427-471.

Chapitre III : Etude des mélanges SC et KC sous forme pelote

III.1. Morphologie des mélanges

III.1.1. Observation des images prises immédiatement après mélange (t_0)

Les mélanges sans ou avec 0.1M NaCl (ou 0.1M KCl) et à pH 7 sont observés par microscopie confocale à balayage laser (MCBL). Les protéines sont marquées avec la rhodamine RITC à 5ppm et sont colorées en blanc sur les photos. Les mélanges de KC et SC ont été préparés pour des concentrations de SC allant jusqu'à 100g/L et des concentrations de KC allant jusqu'à 15g/L. Les images prises immédiatement après mélange à 20°C sont montrées dans les figures III. 1, 2, 4 et 7. Toutes les images confocales ont une taille de 160 μm , sauf indication contraire. Les clichés des mélanges obtenus en utilisant différents protocoles d'agitation (manuelle ou vortex) et différentes températures de chauffage (50-80°C) sont identiques.

III.1.1.1. Système sans sel ou en présence de sel non spécifique (NaCl) et à pH 7

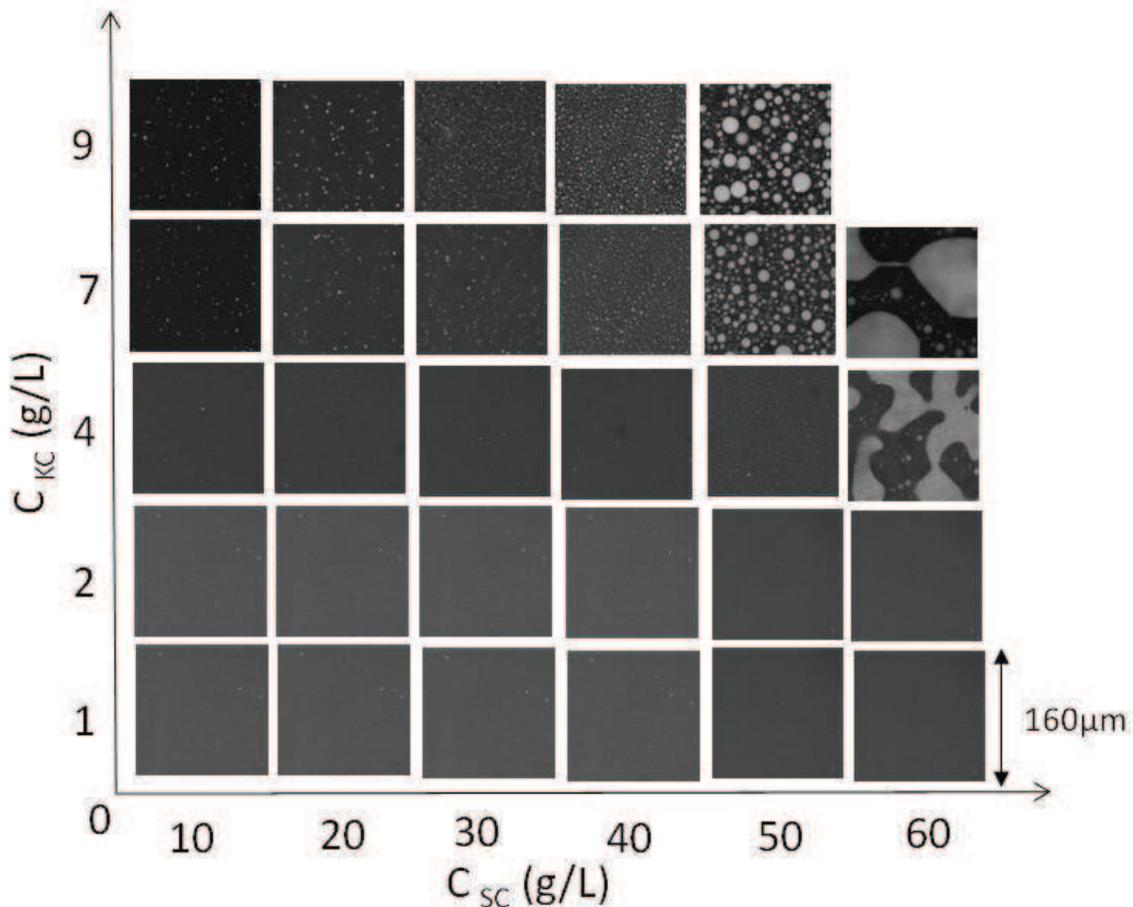


Figure III. 1: Images confocales des mélanges SC/KC à des concentrations indiquées dans la figure, en absence de sel et pH 7.

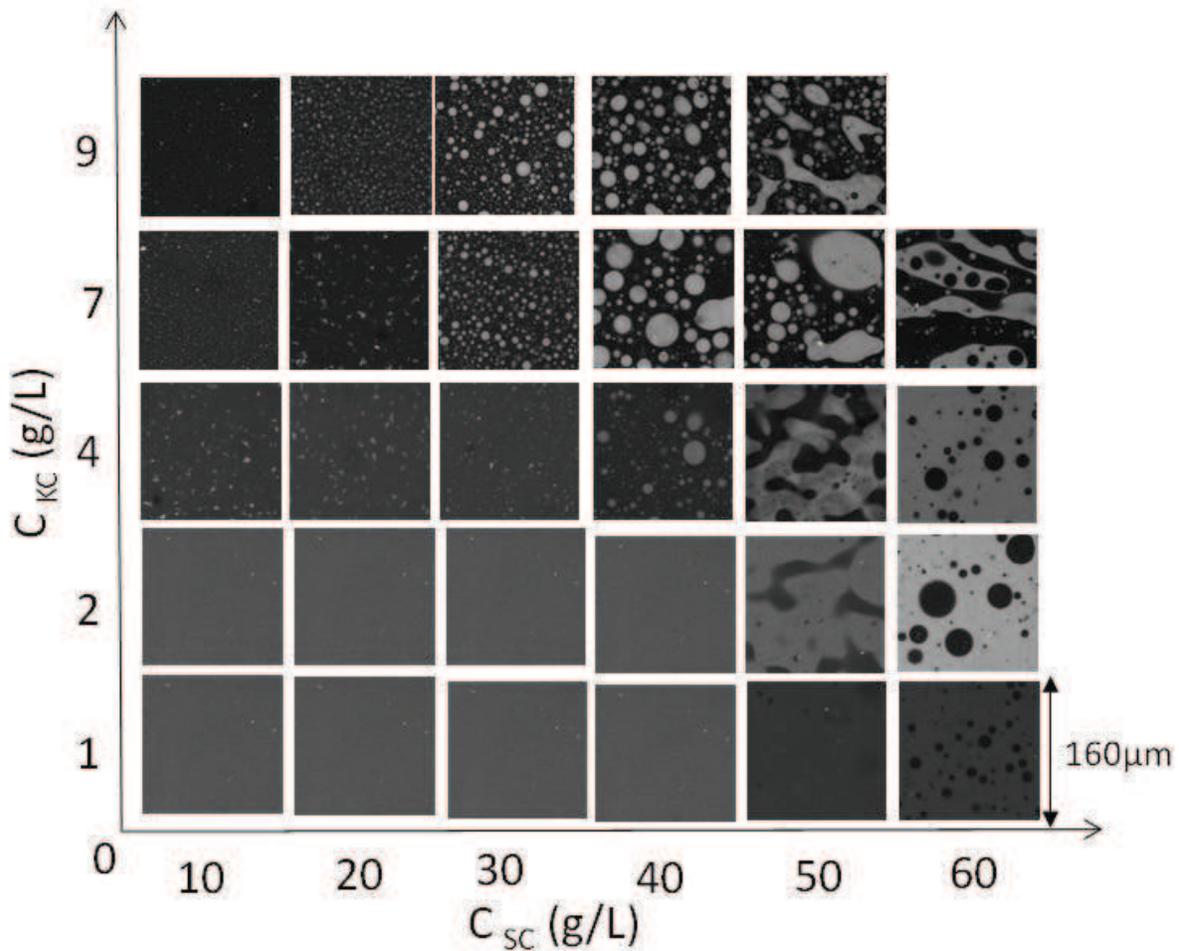


Figure III. 2: Images confocales des mélanges SC/KC à des concentrations indiquées dans la figure, à 0.1M NaCl et pH 7.

Dans les systèmes en absence ou en présence de sel (figures III. 1 et 2), on observe 2 situations :

- A faible concentration de SC et de KC, le système est homogène (Figure III. 3a) mais évolue avec le temps comme nous le verrons dans la suite du chapitre.
- A haute concentration de SC, on observe une microséparation de phase ségrégative (incompatibilité thermodynamique). Avec le temps, la séparation de phase ségrégative peut devenir macroscopique avec une phase supérieure riche en KC et une phase inférieure riche en SC (Figure III. 3b).

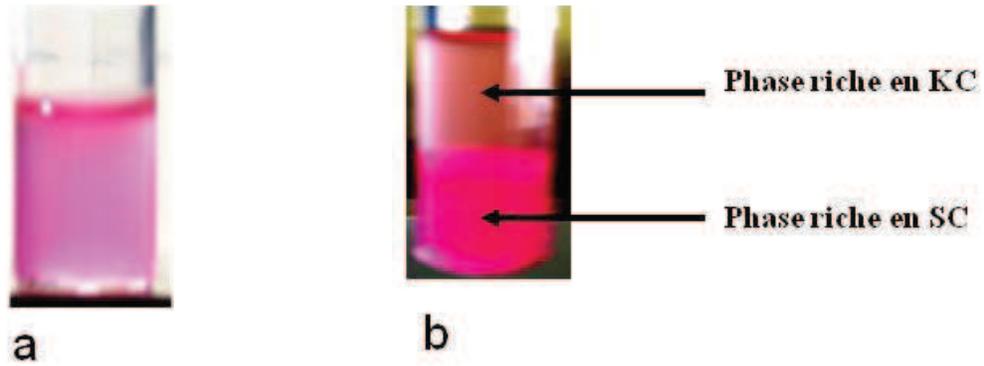


Figure III. 3: Systèmes homogènes (a) et systèmes hétérogènes (b) à 0.1 M NaCl et pH 7.

A haute concentration de SC, on trouve des inclusions riches en KC dans une matrice continue riche en SC. A haute concentration de KC, on a une inversion de phases, avec des inclusions riches en SC dans une matrice continue riche en KC. Pour des concentrations intermédiaires, on observe une décomposition de type spinodale avec la formation rapide de 2 domaines bicontinus (figure III. 4).

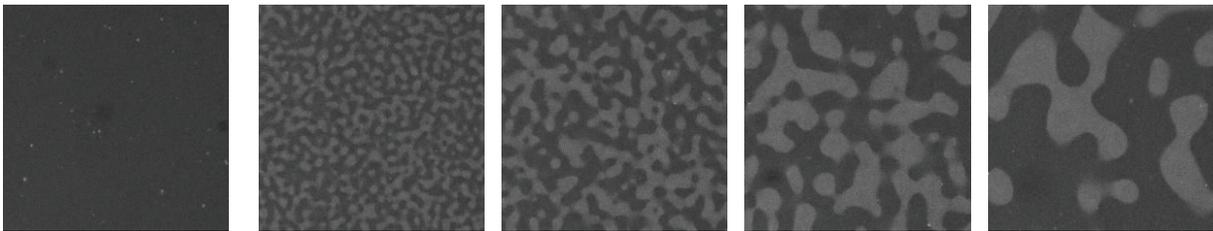


Figure III. 4: Evolution cinétique d'un système hétérogène sans sel, à pH 7 et avec une hauteur relative proche de 50/50. SC 60g/L et KC 3g/L. La hauteur relative est le rapport entre le volume des 2 phases. Durée= 2 min.

Juste après le mélange à 60°C, le système est homogène et instable (hors équilibre). Puis rapidement, il y a une décomposition spinodale (processus brusque et rapide) qui se traduit dans un premier temps par la formation de microdomaines riches en SC dans un réseau continu riche en KC (figure III. 4). Ensuite, on observe des domaines bicontinus et enfin, une séparation de phase macroscopique.

Les différents états observés à un instant t que ce soit dans un mélange sans ou avec sel dépendent de la concentration des biopolymères et donc, de leur viscosité.

Nous observons par ailleurs, à la fois dans les mélanges homogènes et hétérogènes, des agrégats irréversibles riches en protéines. Le SC forme des agrégats avec le KC (coloration rouge), voir figure III. 5 et **paragraphe 2**.

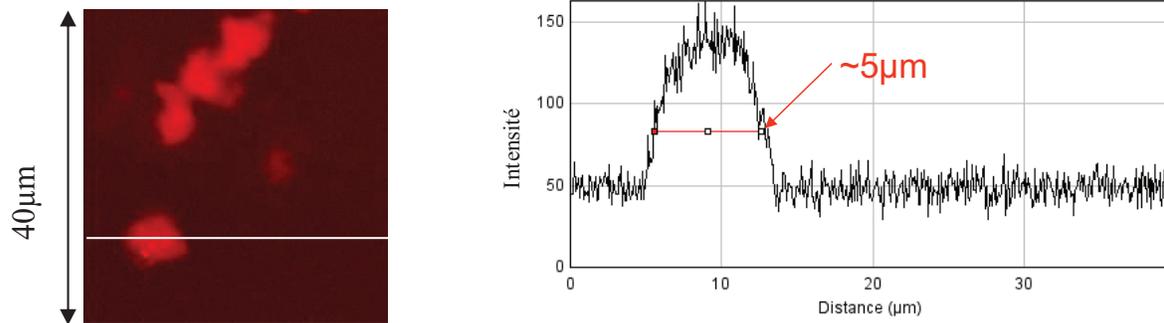


Figure III. 5: Profil d'intensité des agrégats pour un mélange contenant 3g/L de SC et 4g/L de KC (100mM NaCl et à pH 7).

Comme nous l'avons dit dans le chapitre bibliographique, l'agrégation et la séparation de phase dans les mélanges SC et KC n'avaient pas été étudiés systématiquement, bien que certains auteurs avaient montré une séparation de phase pour des mélanges de micelle de caséines natives et de kappa carraghénane sous forme hélice (Bourriot, Garnier and Doublier, 1999b; Langendorff, Cuvelier, Michon, Parker and De Kruif, 2000; Schorsch, Jones and Norton, 2000). Dans ces systèmes, quelques grammes par litre de KC étaient suffisants pour induire une séparation de phase. La séparation de phase dans ces systèmes avait été attribuée soit à un phénomène de déplétion, soit à un phénomène d'incompatibilité thermodynamique. Ces auteurs n'avaient pas observé de précipitation car la micelle de caséine était complètement recouverte de KC, ce qui peut expliquer l'absence d'agrégation entre les micelles de caséines et le kappa carraghénane.

III.1.1.2. Etude du contraste

Le contraste est défini comme le rapport du signal lumineux de la phase riche en SC sur le signal de la phase pauvre en SC. La figure III. 6 donne l'évolution du contraste en fonction de la concentration en caséinates de sodium et de la concentration en kappa carraghénane sans ou avec sel et à pH 7.

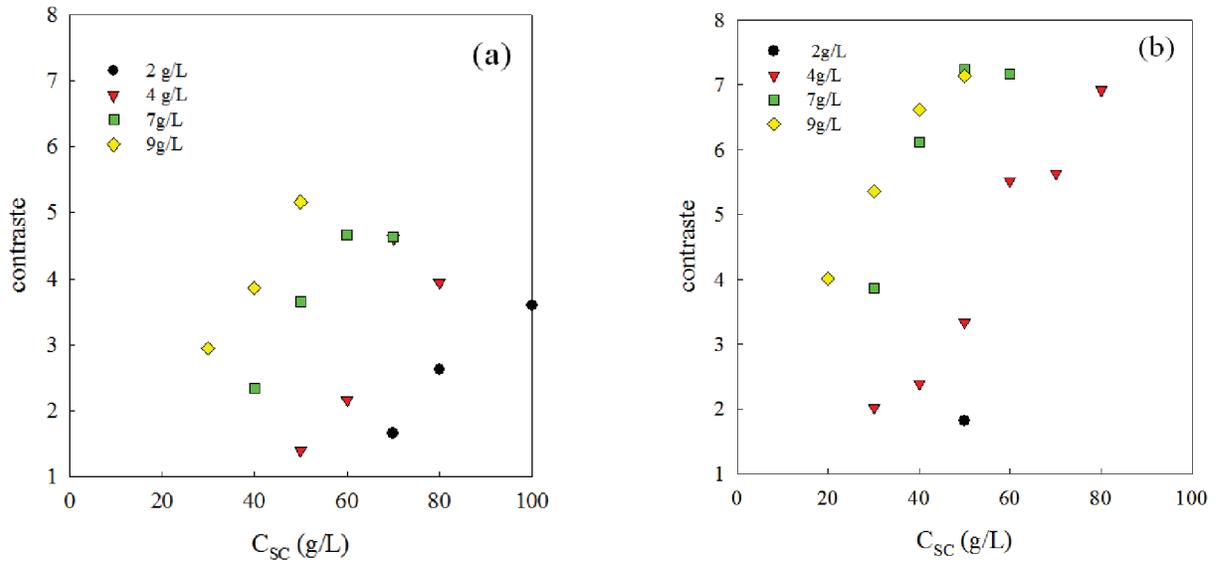


Figure III. 6: Evolution du contraste en fonction de la concentration en protéines à différentes concentrations en KC indiquées sur les figures, en absence de sel (a) et en présence de 0.1M NaCl (b), à pH 7.

Le contraste augmente systématiquement avec la concentration de SC. Pour une concentration donnée en SC, le contraste augmente avec l'augmentation de la concentration en KC. On observe également que le contraste est plus élevé pour un système mixte en présence de NaCl que pour un système mixte sans sel. La séparation de phase est donc favorisée en présence de NaCl et à hautes concentrations en biopolymères, comme, l'a été décrit dans la littérature pour des mélanges de micelle de caséines et de polysaccharides.

III.1.1.3. Système en présence de sel spécifique (KCl) et à pH 7

Dans cette partie, on utilise un sel spécifique de KC : le KCl à 0.1M pour que la gélification se fasse immédiatement pendant le refroidissement à 20°C car à 0.1M KCl, le KC gélifie vers 50°C. On observe une micro séparation de phase autour des mêmes concentrations de protéine que pour les systèmes à 0.1M NaCl.

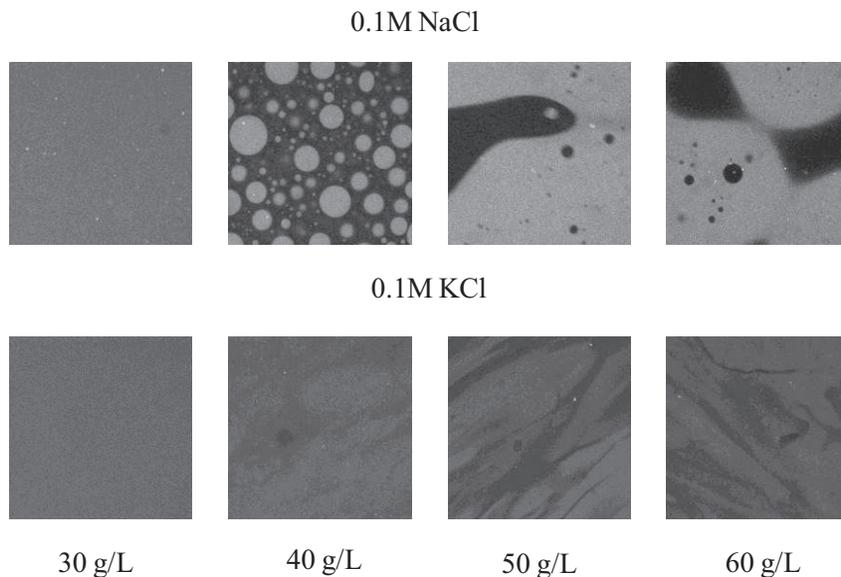


Figure III. 7: Morphologie des systèmes gélifiés pour des mélanges à 0.1 M KCl ou 0.1M NaCl, à 4g/L de KC et à différentes concentrations de SC indiquées sur la figure.

En présence de potassium, on n'observe jamais une séparation de phase complète à 20°C car les hélices de KC s'agrègent et gélifient. Le système est figé dans son évolution et le contraste est faible.

III.1.2. Observation au cours du vieillissement

L'étude du vieillissement a été effectuée sur des systèmes homogènes et séparés à 20°C.

III.1.2.1. Domaine monophasique

Pour de faibles concentrations de SC (coloration rouge), nous n'observons pas de séparation de phase ségrégative mais la formation d'agrégats irréversibles, voir la figure III. 8.

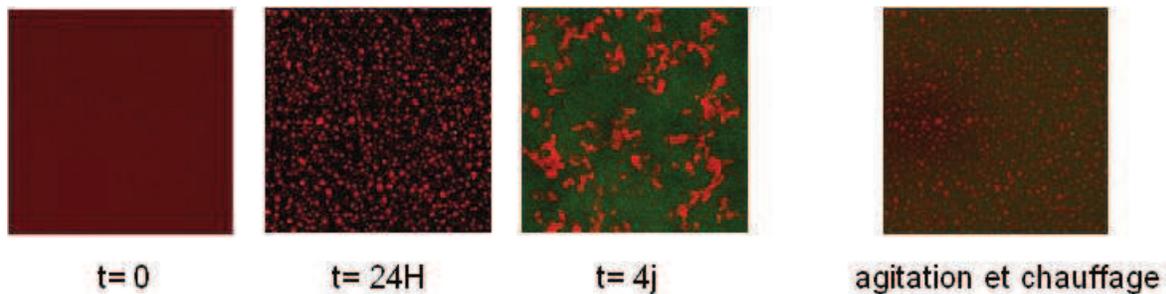


Figure III. 8: Observation de l'effet du vieillissement et du chauffage sur des systèmes mixtes homogènes SC 10 g/L et KC 4g/L dans l'état sol, à 20°C, à 0.1M NaCl et à pH 7.

Si dans un premier temps, nous n'observons pas la présence d'agrégats (à l'échelle du microscope), ils apparaissent après 24h. Le système continue ensuite d'évoluer ; ces agrégats se collent entre eux (formation de clusters), puis flocculent. Une courte période de chauffage et d'agitation permet de casser les clusters et de rajeunir le système. Puis, au bout de 24h, ces clusters se reforment. Par la suite, nous désignerons par le terme « clusters réversibles » ce type de structures, pour les différencier des agrégats irréversibles.

Le vieillissement d'un système mixte avec plus de 4 g/L de KC présente le même comportement.

En conclusion, il y a une première étape de formation des agrégats, puis ultérieurement association des agrégats au cours du temps. Les interactions qui forment ces agrégats sont sans doute de nature ionique et ne sont pas détruites par chauffage et agitation. En revanche, le vieillissement des agrégats conduit à leur association en clusters réversibles via des interactions faibles qui sont détruites par chauffage et agitation.

III.1.2.2. Domaine biphasique

La séparation de phase est observée à des grandes concentrations en SC. Comme, nous l'avons dit plus haut, il existe 3 phases dans le système séparé selon la concentration des 2 espèces. On donnera comme exemple ici, le système à 11g/L de KC et 20g/L de SC (coloration rouge).

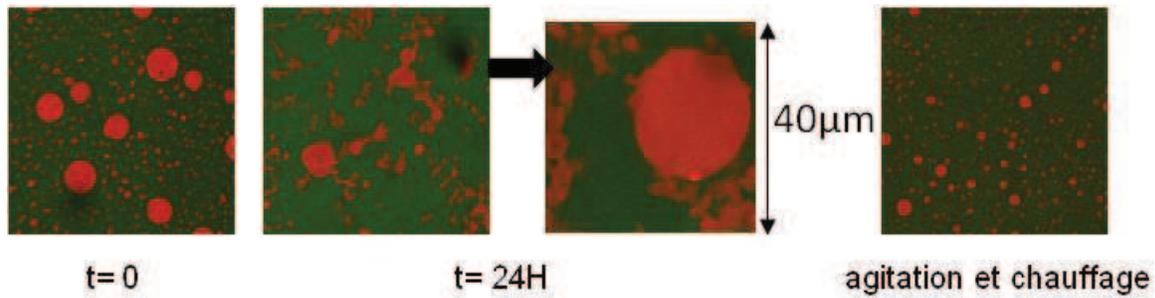


Figure III. 9: Observation de l'effet du vieillissement et du chauffage sur des systèmes mixtes hétérogènes SC 20 g/L et KC 11g/L dans l'état sol, à 20°C, à 0.1M NaCl et à pH 7.

La présence des agrégats dans la phase continue riche en KC est déterminante sur le vieillissement du système. En effet avec le temps, les agrégats s'agrègent (floculation) et forment de gros clusters qui peuvent alors interagir avec les inclusions ou les microdomaines riches en SC. Ces interactions sont faibles car une étape de chauffage et d'agitation permet de rompre à nouveau ces liens et de revenir à l'état initial, comme le montre la photo la plus à droite (figure III. 9).

Lorsqu'on attend suffisamment longtemps (plus de 24H) sans rajeunir le système, on observe la formation de 3 domaines dans le tube, comme on l'a décrit précédemment. La phase surnageante riche en KC comporte des inclusions de SC et des agrégats. La deuxième phase, dite intermédiaire est composée de clusters. Enfin dans le fond du tube, on observe une phase riche en SC avec des inclusions de KC d'une dizaine de microns.

Dans les systèmes homogènes ou hétérogènes, on observe des agrégats à haute concentration de KC. Ces agrégats sont très riches en protéines et sont formés par l'association entre les SC et les KC, même si les 2 biopolymères ont des charges nettes négatives. Ces interactions sont possibles parce que la répartition des charges le long de la chaîne des κ -caséines n'est pas uniforme. En effet, il existe des régions positives entre les résidus peptidiques 20 et 115. Des auteurs (Snoeren, 1975; Snoeren, Both and Schmitt, 1976) ont proposé l'existence d'interactions électrostatiques entre les régions positives des κ -caséines et les groupements sulfates des carraghénanes. Ils ont également fait les mêmes hypothèses pour les liaisons formées entre les micelles de caséines et les carraghénanes car les caséines α et β sont stabilisées à l'intérieur de la micelle par la κ -caséine localisée en périphérie (Payens, 1972)

III.2. Analyse des agrégats

Les systèmes monophasiques ont été étudiés par diffusion de la lumière et par spectroscopie UV. En diffusion, les données de l'intensité diffusée ont été analysées à partir de l'équation.

$$\frac{I_r}{KC} = \frac{M_a}{1 + \frac{q^2 R_a^2}{3}}$$

où M_a et R_a représentent respectivement la masse et le rayon apparent des agrégats.

Cette méthodologie d'analyse permet de bien décrire les agrégats protéiques (Nicolai, 2007) .

III.2.1. Influence de la concentration de SC ou de KC

Nous avons suivi l'intensité diffusée à $t=0$ en fonction du vecteur de diffusion pour différents mélanges à 0.1M de NaCl, à pH 7. Nous avons 2 cas de figures :

- Une concentration de SC fixée à 0.5g/L et différentes concentrations de KC (figure III. 10a).
- Une concentration de SC fixée à 10g/L et différentes concentrations de KC (figure III. 10b).

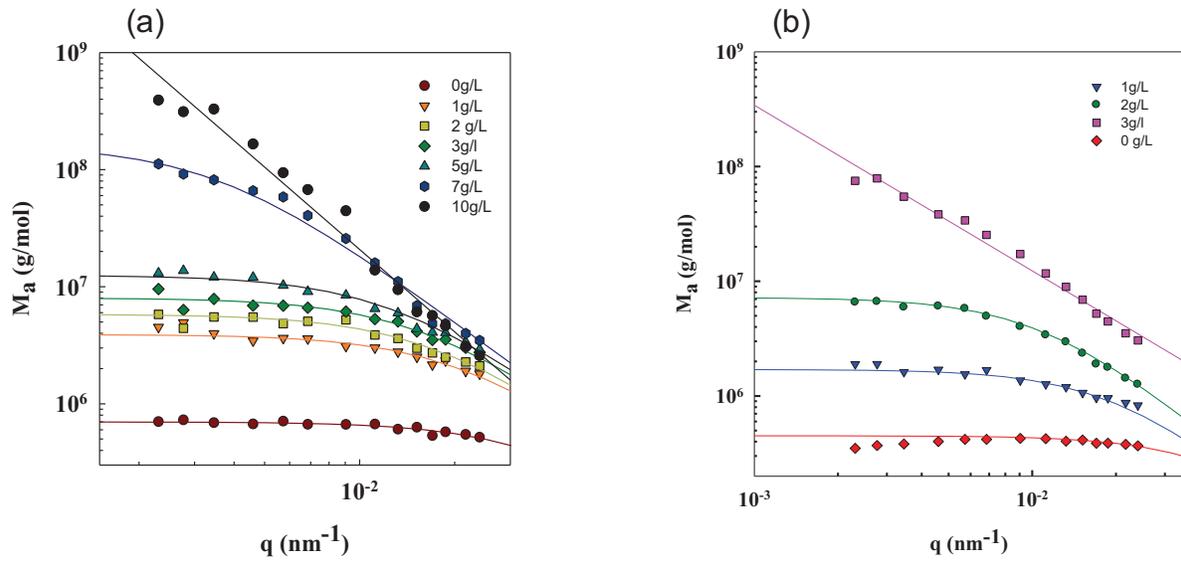


Figure III. 10: Evolution de M_a en fonction du vecteur d'onde q pour des mélanges à 1.5 g/L (a) et à 10 g/L (b) de SC pour différentes concentrations en KC indiquées dans les figures en présence de 100mM NaCl, à pH 7.

Dans les 2 cas, nous constatons que la taille et la masse apparentes des objets augmentent lorsque la concentration de KC augmente. A partir d'une certaine concentration en KC, on observe le caractère fractal des objets dans la fenêtre spatiale de la diffusion de la lumière.

On a laissé mûrir la solution. Puis, la fraction des SC dans les agrégats (F) a été déterminée au bout de 4 jours pour les systèmes homogènes après centrifugation à 20000g, à 40°C et pendant 1 h. Cette fraction correspond à la différence entre la concentration totale de caséinate de sodium et la concentration de caséinate de sodium dans le surnageant, divisée par la concentration totale de SC.

$$F (\%) = \frac{100 * (C_{tot} - C_s)}{C_{tot}}$$

C_{tot} = concentration totale de SC

C_s = concentration de SC dans la phase surnageante.

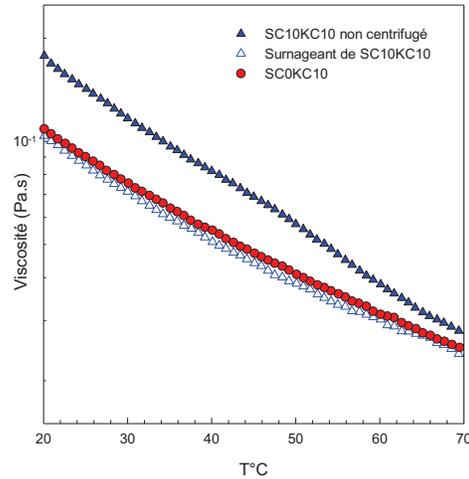
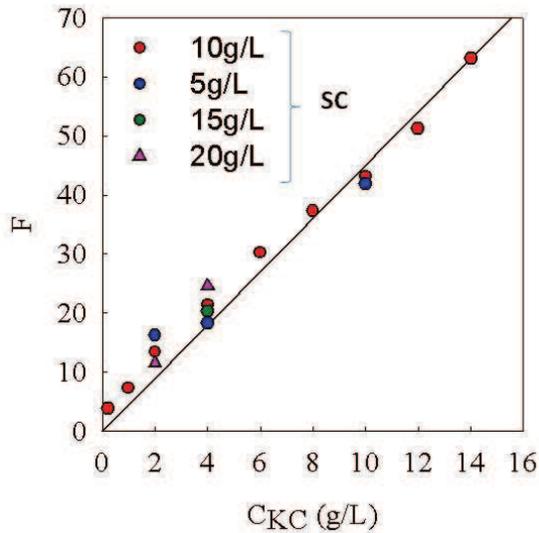


Figure III. 11 : Fraction de SC dans les agrégats en fonction de la concentration de KC pour différentes concentrations totales en SC, à 0.1M NaCl et pH 7. Figure III. 12: Evolution de la viscosité en fonction de la température à 0.1M NaCl et 0.1M NaCl et pH 7.

Cette fraction augmente linéairement avec l'augmentation de la concentration de KC, mais ne dépend pas de la concentration totale de SC (figure III. 11). Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature pour des solutions de SC en présence de calcium. En effet, Pitkowski et al. ont observé que la fraction de SC dans les agrégats augmente avec la concentration de calcium, mais ne dépend pas de la concentration de SC (Pitkowski, Nicolai and Durand, 2009) .

Les viscosités du surnageant et de la solution de KC pur sont identiques pour une même concentration totale de KC. Cela montre que les agrégats contiennent très peu de KC, moins de 5% de KC dans les agrégats (figure III. 12). De plus, on observe qu'en présence d'agrégats, on a des viscosités plus élevées. La viscosité en présence des agrégats dépend du temps de murissement des agrégats (c'est-à-dire de leur degré d'agrégation).

III.2.2. Influence du vieillissement

Nous avons également observé l'impact du vieillissement sur les systèmes homogènes.

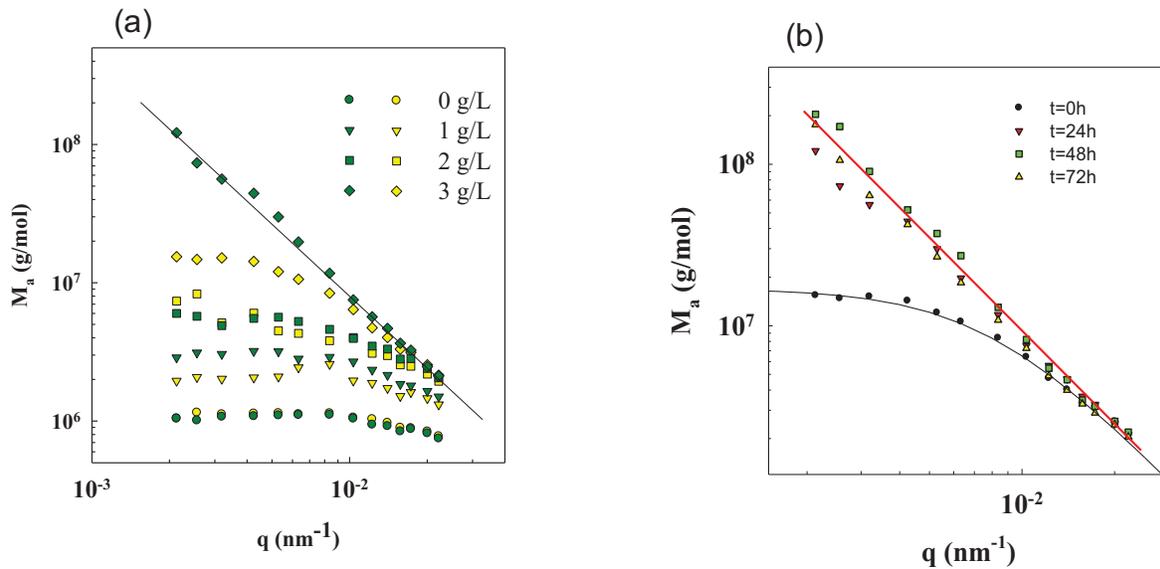


Figure III. 13: Evolution de M_a en fonction de q à $t=0h$ (jaune) et à $t=24h$ (vert) pour SC à 1.5g/L et différentes concentrations de KC, dans 100mM NaCl, à pH 7 (a).

Figure III. 14: Effet du vieillissement pour un système comportant 1.5 g/L de SC et 3g/L de KC (b).

Nous avons ainsi noté que les agrégats se formaient au cours du temps et que la vitesse de leur formation était d'autant plus rapide que la concentration de KC était élevée (figure III.13). Au bout de 24H, les agrégats deviennent stables (figure III. 14).

III.2.3. Influence de la dilution

L'impact de la dilution a également été étudié sur les mélanges homogènes.

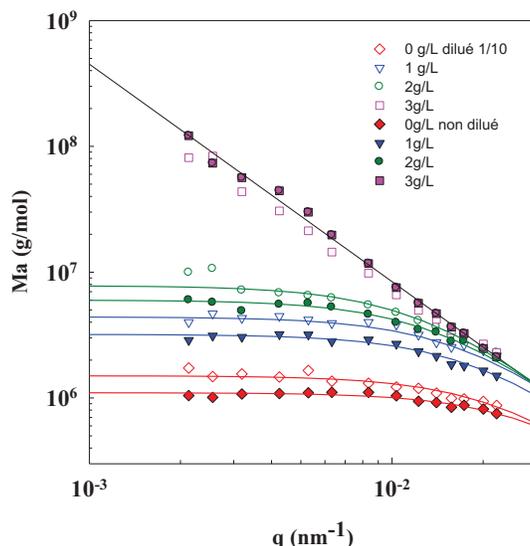


Figure III. 15: Comparaison de l'évolution des masses apparentes en fonction du vecteur d'onde q des systèmes dilués et non dilués à différentes concentrations de KC et une concentration fixe de SC 1.5g/L dans 100mM NaCl, à pH 7.

On n'observe pas d'effet de la dilution. Les agrégats restent stables, donc les liaisons sont fortes contrairement aux interactions entre les agrégats qui forment les floes. Cependant, la dilution permet de diminuer les interactions entre les particules, ce qui entraîne une augmentation de la taille et de la masse des particules parce qu'on mesure leurs vraies tailles et masses molaires (figure III. 15).

III.2.4. Influence de la force ionique et du pH

L'évolution de la fraction de SC dans les agrégats a été mesurée en fonction de la force ionique (figure III. 16) et en fonction du pH (figure III. 17).

La fraction augmente avec l'augmentation de la concentration de NaCl jusqu'à 0.2M, puis, diminue brusquement jusqu'à 20% et reste à cette valeur même à des hautes concentrations de NaCl. Des observations similaires ont été rapportées par Snoeren pour les mélanges de κ -caséine pur et de KC (Snoeren, 1975). Cette augmentation peut être expliquée par l'écrantage de charges. La diminution peut être attribuée au fait que l'on écrante aussi les charges positives des protéines diminuant ainsi les liaisons entre les protéines et le KC (figure III.16).

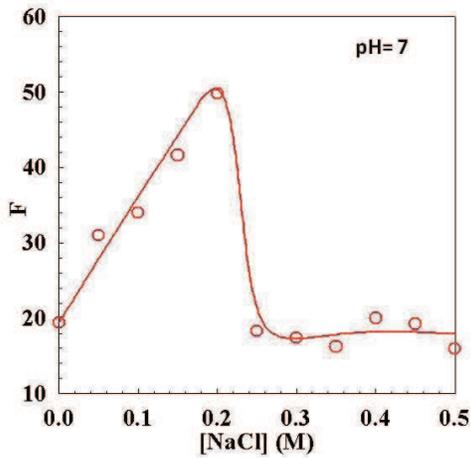


Figure III. 16: Fraction de SC dans les agrégats en fonction de la concentration de NaCl, à pH 7. SC 10g/L et KC 6g/L.

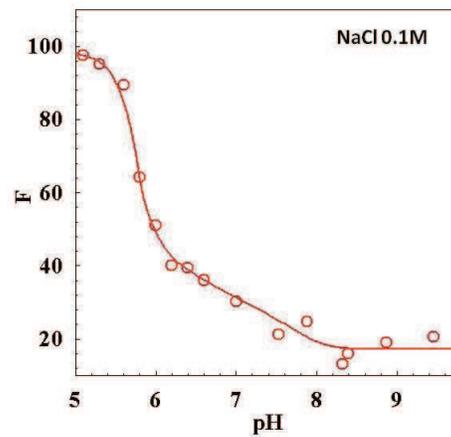


Figure III. 17: Fraction de SC dans les agrégats en fonction du pH, à 0.1M NaCl. SC 10g/L et KC 6g/L.

La fraction augmente avec la diminution du pH spécialement à pH 6 où elle augmente fortement. Ceci s'explique par la diminution des charges négatives sur les protéines quand on s'approche du point isoélectrique (figure III. 17).

Ce tableau récapitule les valeurs de la masse et de la taille apparentes des agrégats pour des mélanges KC et SC pris dans ces gammes de concentrations : de 1 à 2 g/L KC et de 1.5 à 10 g/L SC, à 0.1M NaCl et pH 7.

$M_a \times 10^{-6}$ (g/mol) :	C_{SC}			
	C_{KC}	1.5 g/L	3 g/L	10 g/L
	1 g/L	3.2	2.9	1.7
2 g/L	6	8	7	

R_a (nm)	C_{SC}			
	C_{KC}	1.5 g/L	3 g/L	10 g/L
	1 g/L	83	89	82
2 g/L	112	125	149	

Tableau III. 1 : Influence de la concentration en KC sur la masse et de la taille des agrégats à t=24h pour différentes concentrations en SC (0.1M NaCl, pH7).

En conclusion, les agrégats ont un impact sur les propriétés rhéologiques du système quand le KC est en état pelote. De plus, en jouant sur différents paramètres tels que la force ionique, le pH et la concentration de KC, on peut faire varier la taille des agrégats et la teneur en protéines dans ces agrégats.

III.3. Diagramme de phase

Comme expliqué dans le chapitre II, nous avons utilisé les mesures de viscosité pour déterminer la concentration de KC dans chaque phase et la spectroscopie UV à 280 nm pour déterminer la concentration de SC.

Après séparation complète du mélange, le tube contient 3 phases. Les compositions de la phase supérieure riche en KC et de la phase inférieure riche en SC ont été déterminées. Dans un premier temps, on a regardé les 2 phases par MCBL pour être sûr que la séparation soit terminée. Puis, à l'aide de la Spectroscopie UV, on a mesuré la concentration de caséine dans les 2 phases (C_1 et C_2). A partir de ces concentrations et des hauteurs relatives des deux phases (h_1 et h_2) nous avons déterminé la vraie concentration dans les mélanges (sans comptabiliser la concentration des caséines dans les agrégats).

$$\text{On a } C_{\text{vraie}} = h_1 C_1 + h_2 C_2$$

Le diagramme de phase a été déterminé pour les systèmes en absence et en présence de 0.1M NaCl.

III.3.1. Système en présence de NaCl et pH 7

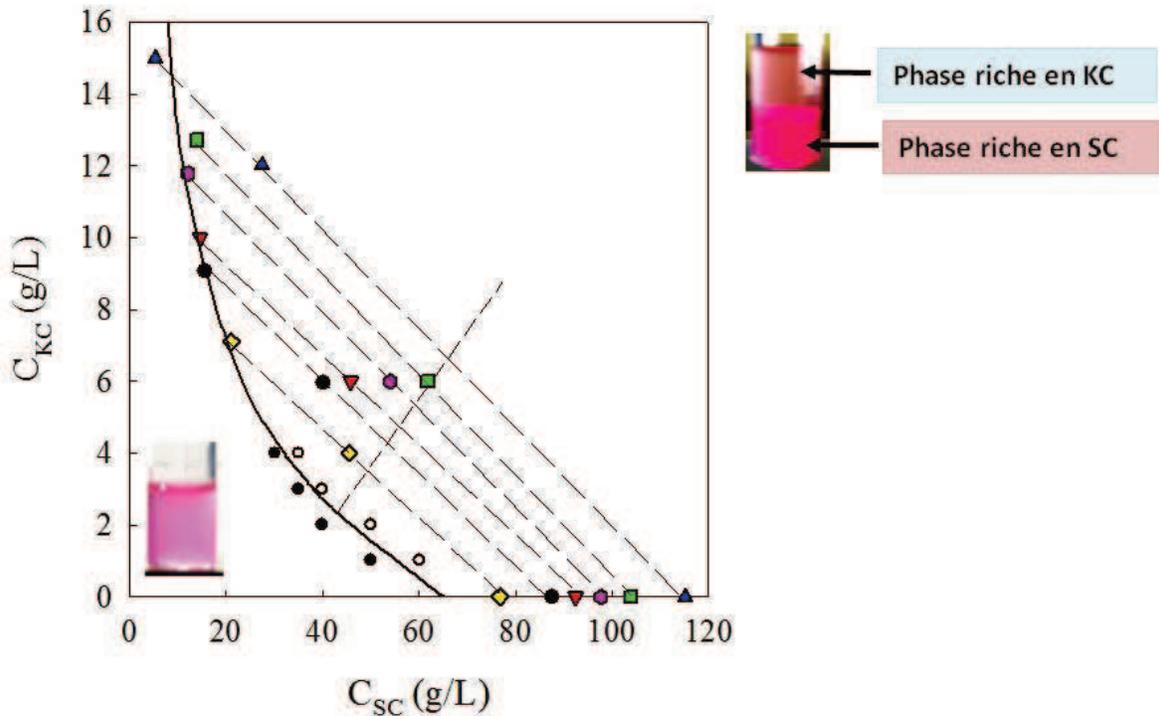


Figure III. 18: Diagramme de phase des mélanges SC/KC à 0.1M NaCl et à pH 7.

-La binodale sépare la région où les systèmes sont homogènes (cercles fermés) de la région où les systèmes sont hétérogènes (cercles ouverts).

-La ligne en pointillée représente les mélanges dont les 2 phases (supérieure et inférieure) ont même volume. Au dessus de cette ligne, on obtient des phases riches en KC et en dessous de cette ligne, des phases riches en SC.

-Les lignes de conjugaison donnent la composition de chaque phase. La phase riche en protéine contient très peu de KC. Toutes les lignes de conjugaison sont parallèles entre elles.

Nous observons donc une phase riche en KC dans le haut du tube et une phase riche en SC dans le bas du tube avec la présence d'une phase intermédiaire correspondant aux agrégats irréversibles entre KC et SC.

III.3.2. Système sans sel et à pH 7

Les diagrammes de phase des systèmes en absence et en présence de 0.1M NaCl ont été comparés.

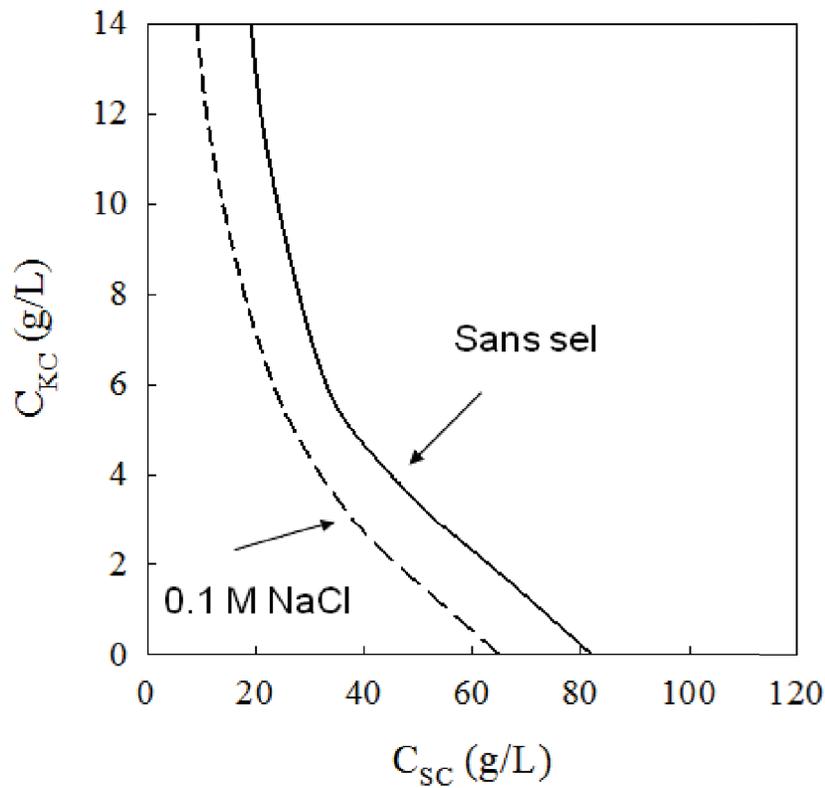
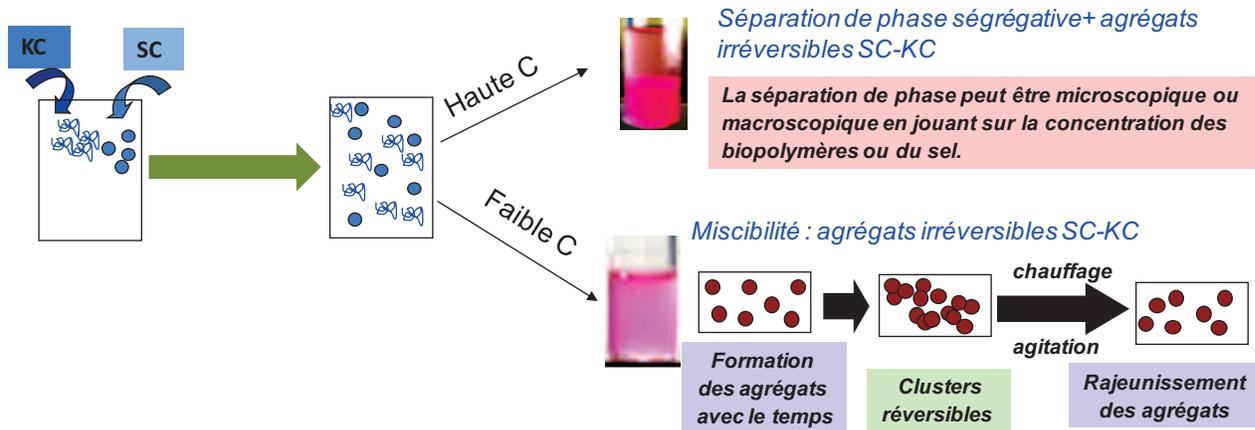


Figure III. 19: Comparaison des diagrammes de phase des mélanges SC/KC à pH 7, en absence et en présence de 0.1M NaCl.

En absence de sel, la binodale est déplacée vers les hautes concentrations de SC et de KC, voir figure III.19. La séparation de phase se déplace vers les hautes concentrations de SC parce que les répulsions électrostatiques sont plus importantes sans sel ajouté.

III.4. Conclusion

Nous avons étudié systématiquement dans ce travail la morphologie et les propriétés structurales des systèmes caséinates de sodium / kappa carraghénane. Les principaux résultats sont les suivants :



2 situations : des mélanges homogènes avec la présence d'agrégats irréversibles de petite taille et des mélanges hétérogènes (incompatibilité thermodynamique).

Les agrégats irréversibles riches en SC peuvent influencer la viscosité du système mixte. Avec le temps, ces agrégats irréversibles s'associent et forment des clusters réversibles.

La teneur en protéines dans les agrégats est influencée par le pH, la force ionique et la concentration de KC, mais ne dépend pas de la concentration totale de protéines. La masse et le rayon apparents des agrégats augmentent avec le temps et avec l'augmentation de la concentration de KC, mais ne dépendent pas de la dilution. Ils sont stables après 24H.

Références bibliographiques

Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.-L. (1999b), Micellar-casein- κ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure, *Carbohydrate Polymers*, **40**, 145-157.

Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Parker, A. & De Kruif, C. G. (2000), Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures, *Food Hydrocolloids*, **14**, 273-280.

Nicolai, T. (2007). Food structure characterisation using scattering methods, In D. J. McClements *Understanding and controlling the microstructure of complex foods* (pp. 288-310), Cambridge: Woodhead

Payens, T. A. J. (1972), Light Scattering of Protein Reactivity of Polysaccharides Especially of Carrageenans, *Journal of Dairy Science*, **55**, 141-150.

Pitkowski, A., Nicolai, T. & Durand, D. (2009), Stability of caseinate solutions in the presence of calcium, *Food Hydrocolloids*, **23**, 1164-1168.

Schorsch, c., Jones, M. G. & Norton, I. T. (2000), Phase behaviour of pure micellar casein/ κ -carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate, *Food Hydrocolloids*, **14**, 347-358.

Snoeren, T. H. M. (1975), Electrostatic interaction between kappa carrageenan and κ -casein, *Milchwissenschaft*, **30**, 393-395.

Snoeren, T. H. M., Both, M. P. & Schmitt, D. G. (1976), An electron-microscopic study of carrageenan and its interaction with κ -casein, *Milk Dairy*, **30**, 132-141.

*Chapitre IV: Gélification des mélanges monophasiques de SC et de
KC*

IV.1. Système sans sel

Les systèmes analysés dans ce paragraphe sont dans la région où les mélanges sont homogènes. Les systèmes mixtes étudiés sont à 2g/L de KC et à différentes concentrations de SC, à pH 7 et sans sel (à part les 3mM d'agent bactéricide).

IV.1.1. Température critique de gélification

La figure IV. 1 montre l'évolution de G' et G'' à 1 Hz pendant le refroidissement à une vitesse de 1°C/min. Pour des concentrations $C_{SC} < 30$ g/L, on n'a pas d'effet des caséinates de sodium sur les propriétés rhéologiques des mélanges. Les résultats sont identiques à ceux d'une solution de KC pur.

A haute concentration de SC, G'' augmente fortement durant le refroidissement à partir d'une température critique de refroidissement T_c . Ici T_c est définie comme la température à laquelle G'' augmente brusquement pour une vitesse de refroidissement de 1°C/min. La vitesse d'augmentation est lente proche de T_c et la mesure de T_c dépend de la vitesse de refroidissement comme l'avaient déjà montré Tziboula and Horne (Tziboula and Horne, 1999) . Cependant, la vitesse augmente rapidement avec la diminution de la température, l'effet n'est donc pas très important. La forte augmentation de G' est causée par la transition pelote-hélice qui est suivie par une agrégation des hélices de KC pouvant conduire à une gélification.

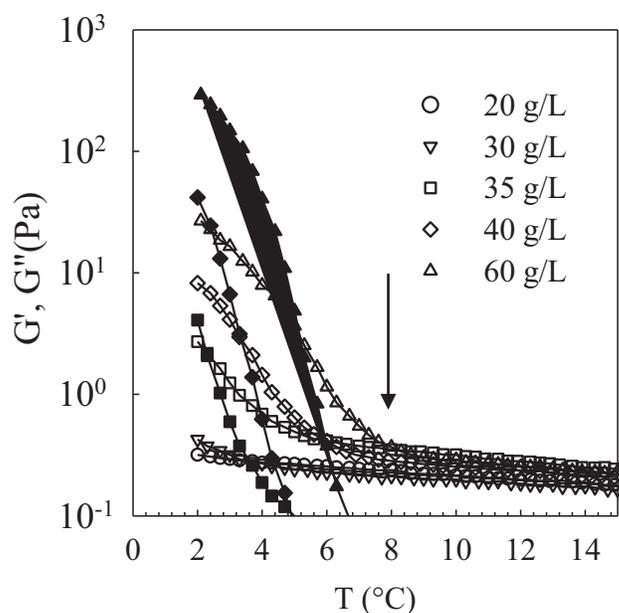


Figure IV. 1: Evolution des modules G' (symboles fermés) et G'' (symboles ouverts) à 1 Hz pendant le refroidissement d'un système à 2 g/L de KC pour différentes concentrations de SC, indiquées sur la figure. La flèche indique T_c à 60 g/L de SC.

La température critique T_c est à 4°C pour 30 g/L et monte à 8°C pour 60 g/L. Pour $C_{SC} < 35$ g/L, les modules G' sont négligeables, mais à haute concentration de SC, ils augmentent fortement pour $T < T_c$ (figure IV. 1).

Ces températures critiques sont compatibles avec celles trouvées par Rochas et Rinaudo (Rochas and Rinaudo, 1980) :

$$T \text{ (}^\circ\text{C)} = 64.44 \times [\text{NaCl}] + 4.65$$

SC (g/L)	10	20	30	35	40	50	60
$10^2 \times \text{NaCl}$ (M)	0.65	1.3	2	2.27	2.6	3.25	4
T (°C)	5.1	5.5	5.9	6.1	6.3	6.74	7.2

Tableau IV. 1 : Corrélation entre la concentration en sodium provenant des caséines et la température critique de refroidissement correspondante (Rochas et al., 1980)

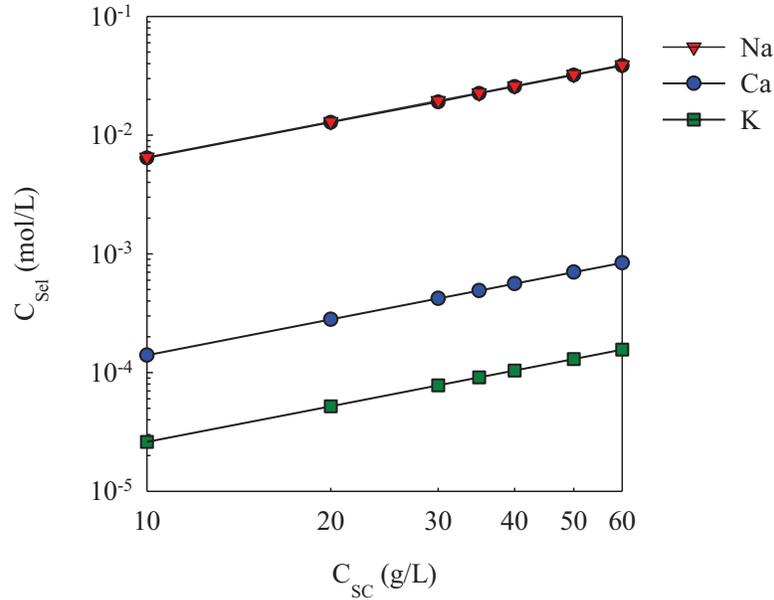


Figure IV. 2: Evolution de la concentration en sel en fonction de la concentration de SC.

La transition pelote – hélice est causée par les sels provenant de la poudre de SC. Les pourcentages de potassium et de calcium dans la poudre de SC sont insuffisants pour expliquer cette transition. Mais le pourcentage de contre – ions sodium peut expliquer les valeurs de T_c (figure IV. 2 et Tableau IV. 1).

IV.1.2. Etude cinétique

Les systèmes mixtes à 2°C ont été étudiés en fonction du temps. La valeur de G' à 2°C augmente avec l'augmentation de la concentration de protéines. Le système continue à évoluer après que la température se soit stabilisée à 2°C (figure IV. 3).

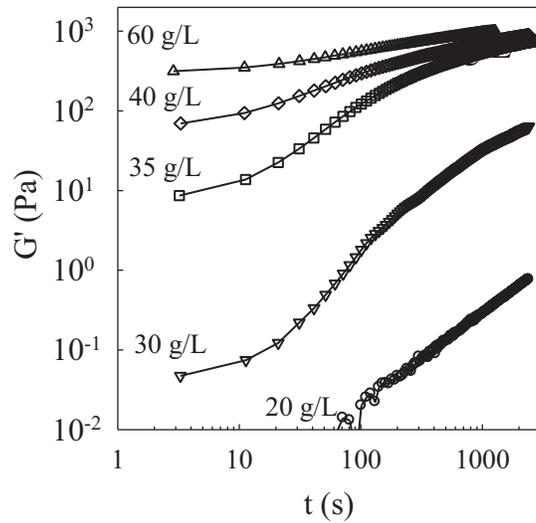


Figure IV. 3: Evolution de G' à 2°C et à 1 Hz en fonction du temps pour des systèmes à 2 g/L de KC et à différentes concentrations de SC indiquées sur la figure.

Le module G' atteint approximativement la même valeur de 10^3 Pa pour tous les systèmes dont la concentration de SC est comprise entre 35 et 60 g/L .

Après 10^3 s , l'augmentation de G' avec le temps devient très lente, excepté pour les systèmes à 20 g/L et 30 g/L de SC qui sont loin de leur état final après $2.5 \cdot 10^3\text{ s}$.

IV.1.3. Température critique de fonte

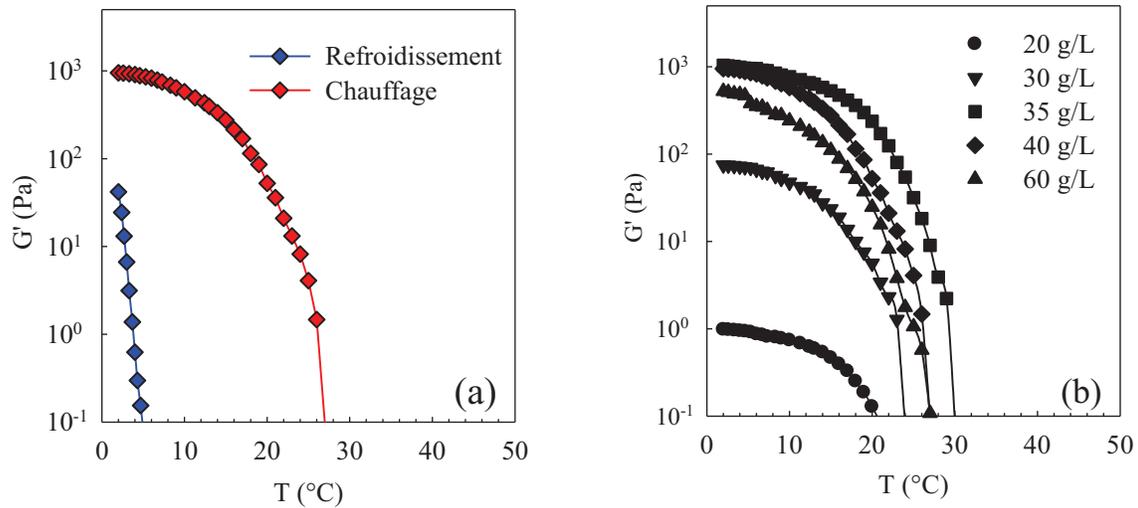


Figure IV. 4: Observation de l'hystérèse pour une solution de 2g/L KC et 40 g/L de SC (a). Evolution des modules G' à 1 Hz au cours du chauffage d'un système à 2 g/L de KC et différentes concentrations de SC indiquées sur la figure (b).

Un écart est observé entre la température critique où le gel se forme pendant le refroidissement (T_c) et la température critique où le gel fond pendant le chauffage (T_h). Cet écart correspond à un phénomène d'hystérèse et implique que la cassure des liaisons nécessite le passage d'une barrière d'énergie.

Pour $C_{SC} \geq 35$ g/L, la température critique T_h de chauffage est d'environ 31°C et pour $C_{SC} < 35$ g/L, la température critique T_h est inférieure de seulement quelques degrés (figure IV. 4b).

IV.1.4. Dépendance en fréquence des modules à 2°C

Les dépendances en fréquence des modules ont été mesurées après $2.5 \cdot 10^3$ s à 2°C.

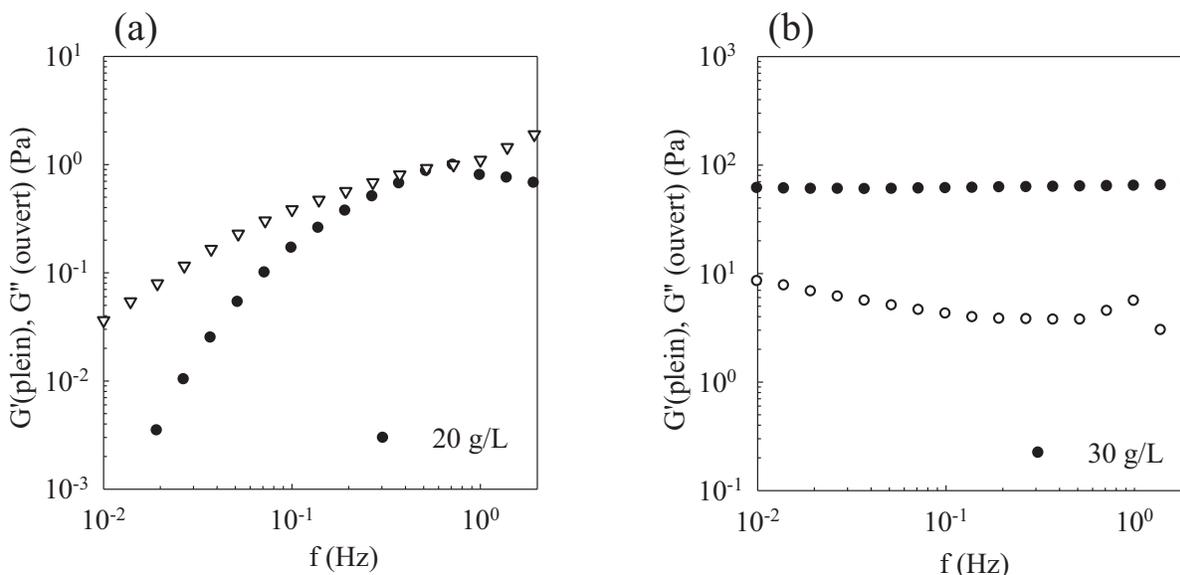


Figure IV. 5: Dépendance en fréquence des modules G' à 2°C pour des systèmes à 2 g/L de KC et à différentes concentrations de SC indiquées sur la figure.

Pour $C_{\text{SC}} \geq 30\text{ g/L}$, G' est indépendant de la fréquence et est 10 fois plus grand que G'' (figure IV. 5b). G'' montre un très faible minimum entre 0.1 Hz et 1 Hz , similaire aux observations de Lynch et al. (Lynch and Mulvihill, 1994b).

Pour $C_{\text{SC}} \leq 20\text{ g/L}$, la dépendance en fréquence montre que les systèmes sont des liquides viscoélastiques (figure IV. 5a).

IV.2. Système avec un sel non spécifique du KC : sodium

Nous avons étudié l'effet de l'ajout de SC sur le KC à 0.1M NaCl sur les températures critiques (T_c et T_h) et le module du gel. 0.1M NaCl est suffisant pour écranter significativement les interactions électrostatiques. Des mélanges monophasiques de KC (1.5g/L , 4g/L et 7g/L) à différentes concentrations de SC sont préparés en présence de 0.1M NaCl et à $\text{pH } 7$. En présence de 0.1M NaCl et à 2°C , les systèmes n'évoluent que très peu après 20 min .

IV.2.1. Influence de la température et dépendance en fréquence des modules à 2°C

Pour le mélange à 4 g/L de KC et différentes concentrations de SC, 0.1 M NaCl et à pH 7, nous avons suivi l'évolution de G' en fonction de la température.

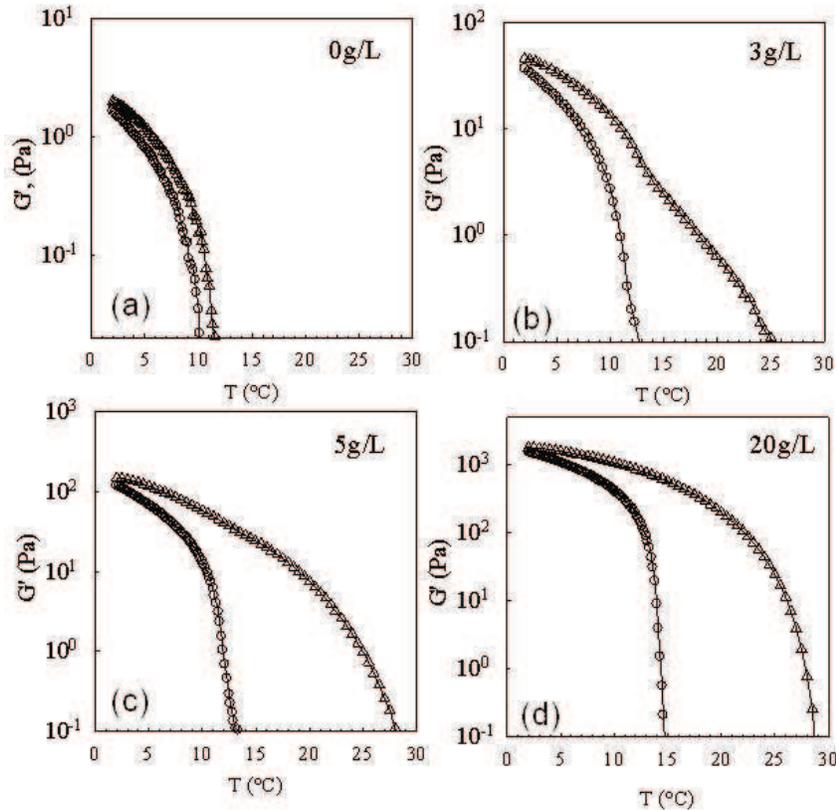


Figure IV. 6: Evolution de G' à 1 Hz mesuré pendant le refroidissement (cercles) et le chauffage (triangles) des mélanges à 4 g/L de KC dans 0.1 M NaCl et différentes concentrations de SC indiquées sur la figure.

Comme nous l'avons dit précédemment, nous constatons une forte augmentation de G' quand nous baissions la température à partir d'une température critique T_c . Dans le système mixte, T_c vaut environ 12- 15°C et la dépendance de la température en fonction de la concentration en SC est faible, quelques degrés seulement (figure IV. 6). On remarque également que la fonte se produit pour des températures critiques de chauffage plus élevées que celles de refroidissement. A 20g/L, un écart de 15°C est observé entre T_h (30°C) et T_c (15°C).

A faible quantité de SC, la fonte se déroule en 2 étapes. La première est la cassure des liaisons entre les hélices de KC similaire à celle observée avec le KC pur. La seconde est la fonte du gel mixte qui nécessite la cassure des liaisons qui impliquent les protéines (figure IV. 6b). En

excès de SC, on ne voit que la 2^{ème} étape. Ceci indique que les interactions mixtes SC/KC dominant dans le mélange (figure IV. 6d).

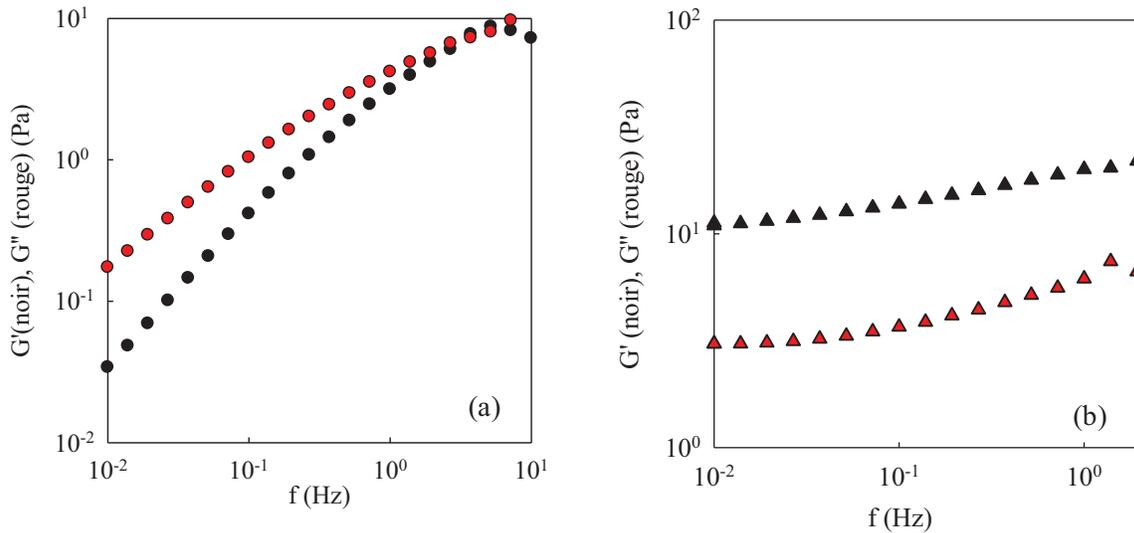


Figure IV. 7: Evolution de G' et de G'' à 2°C en fonction de la fréquence pour une solution de KC pur à 4 g/L (a) et un système mixte à 3 g/L de SC et 4 g/L de KC (b) à 0.1M NaCl et à pH 7.

La dépendance en fréquence des modules montre que le KC pur dans ces conditions ne forme pas de gel à 2°C mais un liquide visqueux (figure IV. 7a). Cependant, à partir de 3 g/L ou plus de SC, le système forme un gel (figure IV. 7b). La force du gel augmente avec la concentration de SC dans les mélanges avec 0.1 M NaCl, comme nous l'avons observé pour les mélanges sans sel.

IV.2.2. Influence de la concentration de SC et de KC

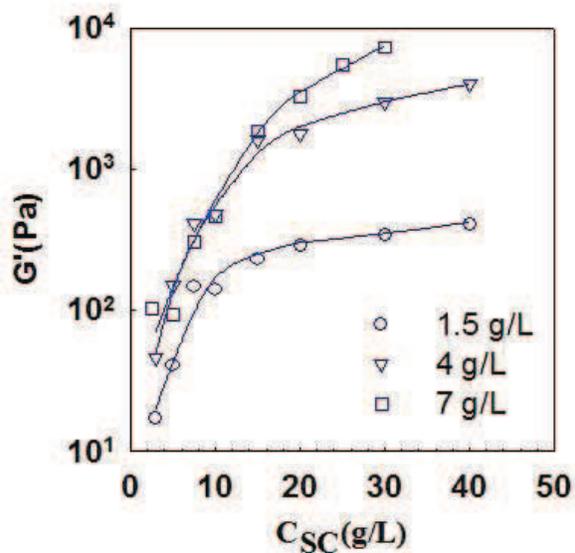


Figure IV. 8: Evolution du module élastique G' à 2°C en fonction de la concentration en SC (100mM NaCl et à pH 7).

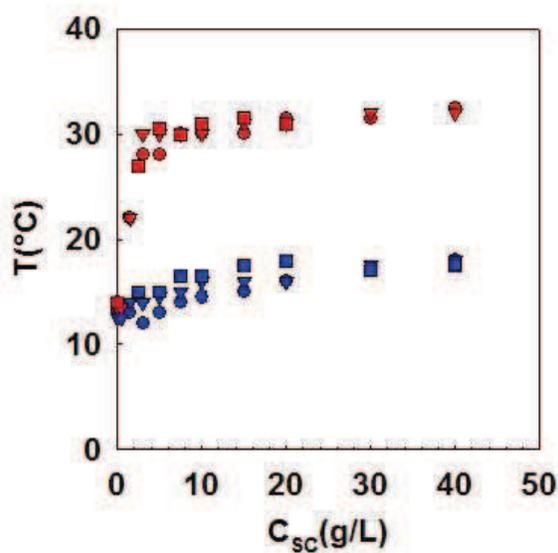


Figure IV. 9: Evolution des températures critiques de refroidissement (symboles bleus) et de chauffage (symboles rouges) en fonction de la concentration en SC (100mM NaCl et à pH 7).

Pour toutes les concentrations de KC (1.5 g/L, 4 g/L et 7 g/L), le module élastique à 2°C augmente avec l'augmentation de la concentration de SC. Pour une concentration de SC donnée, il augmente avec l'augmentation de la concentration de KC (figure IV. 8). La température critique de gélification augmente faiblement avec la concentration de SC. La température critique de fonte augmente brusquement lorsqu'on ajoute une petite quantité de SC et reste à cette valeur à des plus hautes concentrations de SC. Ces températures critiques ne dépendent pas de la concentration de KC (figure IV. 9).

IV.3. Système avec un sel spécifique du KC : le potassium

Nous avons étudié l'effet du KCl sur les systèmes mixtes SC 20g/L et KC 4 g/L dans lesquels on suppose que toutes les protéines forment un gel mixte avec le KC afin de déterminer l'impact du SC en présence d'un ion spécifique du KC : le potassium. Nous avons également fait varier la concentration de potassium.

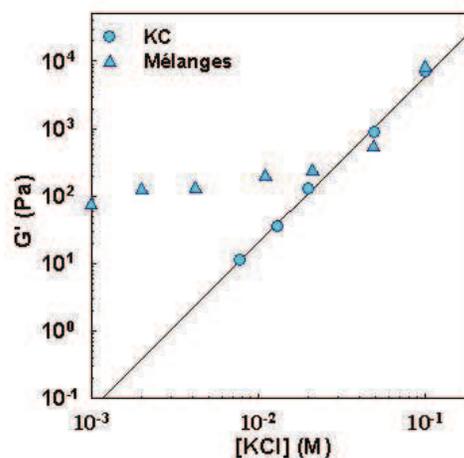
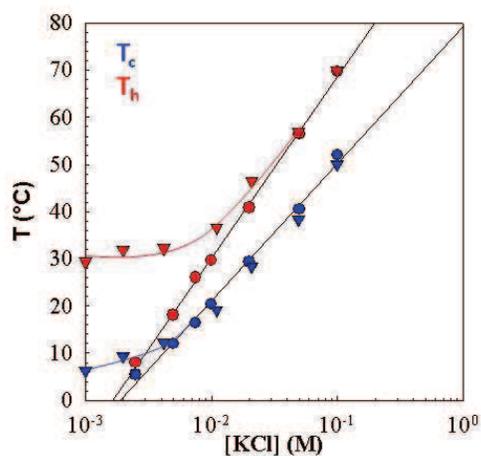


Figure IV. 10: Influence de la concentration de KCl sur les températures critiques pendant le refroidissement (bleu) et le chauffage (rouge) du KC pur (cercles) et du mélange SC 20g/L et KC 2g/L (triangles).

Figure IV. 11: Influence de la concentration de KCl sur les modules élastiques à 2°C de KC pur (cercles) et du mélange SC 20g/L et KC 2g/L (triangles).

A faible concentration de KCl, la température critique de gélification est influencée par les cations contenus dans la poudre de SC. La température critique de fonte est déterminée par la présence de protéines et la force du gel dépend des protéines (figure IV 10 et 11).

Au dessus d'une concentration critique d'environ 0.02M KCl, les températures critiques du KC pur et des mélanges sont identiques car l'effet des protéines et des cations contenus dans les protéines devient négligeable. Le gel de KC pur et le gel du système mixte ont alors les mêmes modules (figure IV 10 et 11).

En conclusion, dans le système mixte on a 2 types de liaisons : des liaisons mixtes KC-SC et des liaisons purement KC-KC. Quand on se trouve au dessus de la concentration critique de potassium, les liaisons induites par le potassium dominent.

IV.4. Système mixte en présence d'iodure de sodium

Des mélanges à 4 g/L de KC avec différentes concentrations en SC sont préparés à chaud (60°C) en présence de NaI qui induit la transition pelote-hélice, mais bloque la formation d'un gel de KC. Le but est de voir si les protéines peuvent provoquer la gélification du KC.

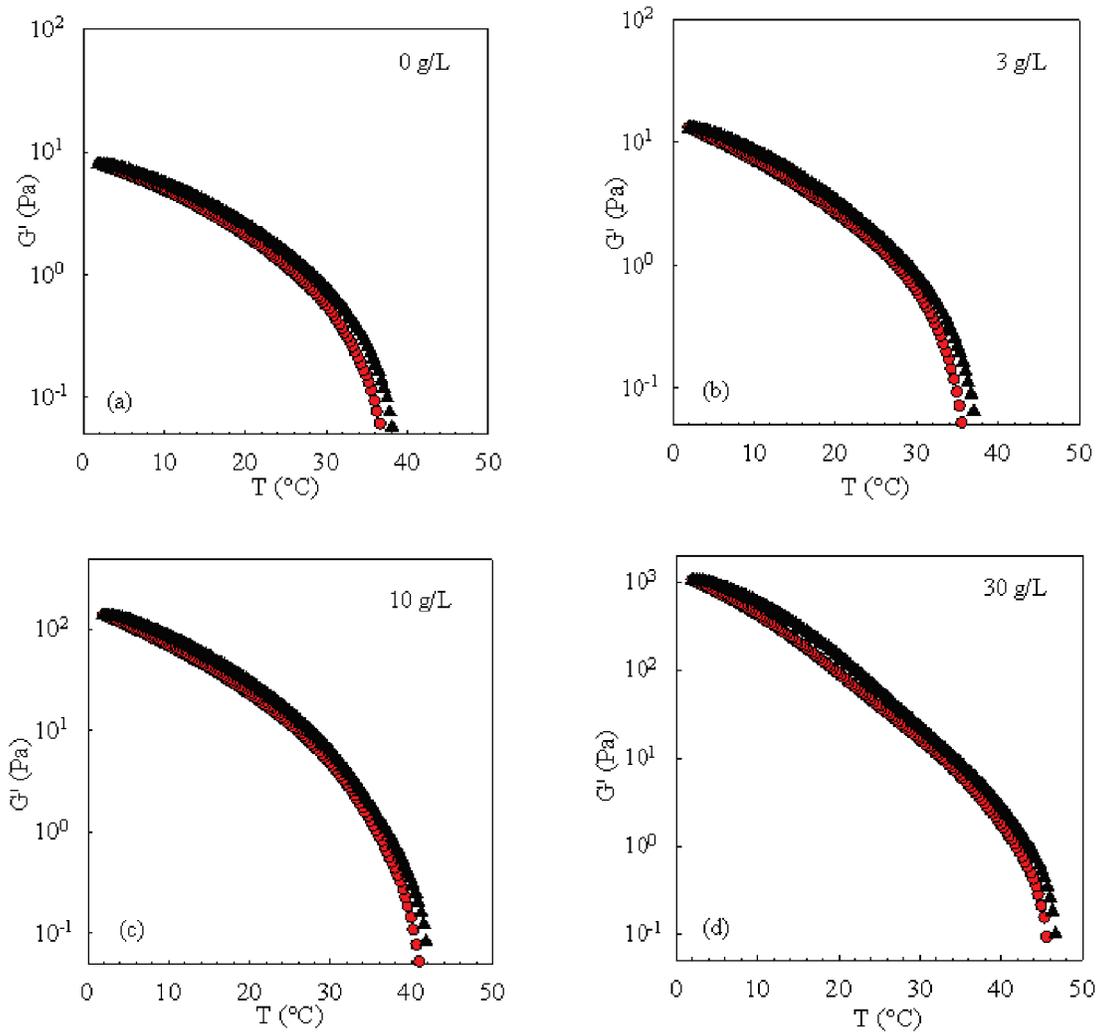


Figure IV. 12: Evolution de G' à 1 Hz mesuré pendant le refroidissement (cercles rouges) et le chauffage (triangles noirs) des mélanges à 4 g/L de KC dans 0.1 M NaI et différentes concentrations de SC indiquées sur la figure.

On constate que la solution de KC à 0.1M NaI présente une transition pelote – hélice vers 39°C et qu'il n'existe pas d'hystérèse (figure IV. 12a). En présence de SC, la température de transition pelote–hélice augmente de quelques degrés et on n'observe toujours pas d'hystérèse (les températures critiques de refroidissement et de chauffage sont identiques) (figure IV. 12b, 12c, 12d). Dans ces conditions (0.1M NaI et pH 7), la cassure des liaisons de SC et de KC n'est pas observée parce que le KC pur fond à des températures plus élevées que le gel mixte. On se trouve dans la même situation qu'en excès de potassium où ce sont les interactions des hélices libres de KC qui dominent.

Pour chacun des mélanges, la dépendance en fréquence des modules à 2°C a été effectuée. Les résultats obtenus sont donnés sur la figure IV. 13.

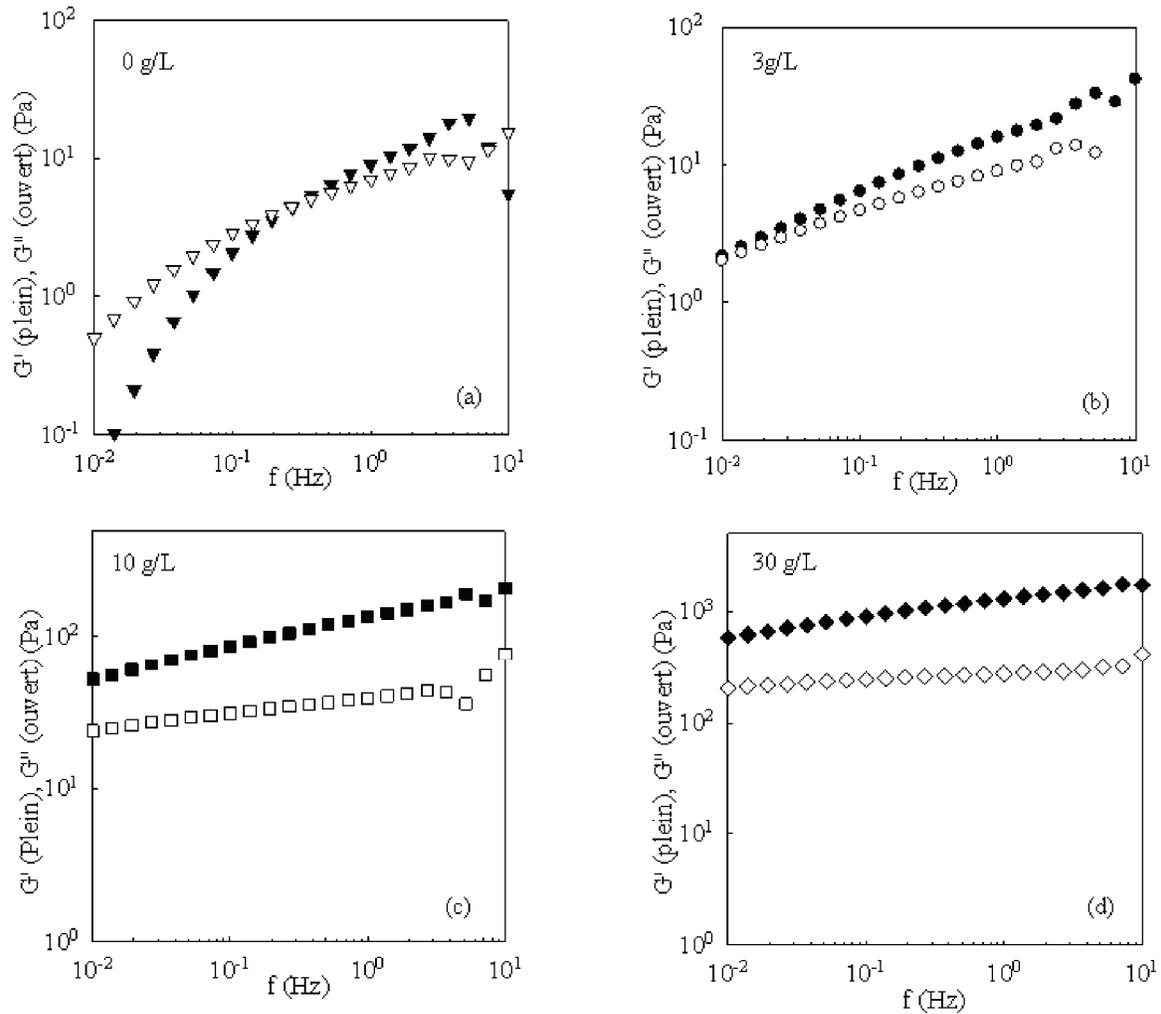


Figure IV. 13: Evolution de G' et de G'' à 2°C en fonction de la fréquence pour des mélanges à 4 g/L de KC dans 0.1 M NaI et différentes concentrations de SC indiquées sur les figures.

La dépendance en fréquence des modules montre que le KC pur en présence de 0.1 M NaI ne forme pas de gel à 2°C mais un liquide visqueux (figure IV. 13a). Cependant, à partir de 10 g/L ou plus de SC, $G' > G''$ et on observe une dépendance en fréquence des modules à 2°C sur la gamme de fréquence explorée (figure IV. 13b, 13c, 13d). Les mélanges avec NaI ont des comportements rhéologiques différents des mélanges avec 0.1M NaCl.

Chronakis et al. ont construit pour des solutions de KC pur une courbe maitresse concentration – fréquence pour des concentrations en KC inférieures à 1.5% et à 0.2M NaI.(Chronakis, Doublier and Piculell, 2000). Dans cette gamme de concentration, KC est un liquide viscoélastique bien que visuellement KC se comporte comme un gel pour des concentrations au dessus de 0.8%. Ils trouvent également que pour des concentrations supérieures à 0.8%, la vitesse de relaxation des gels est lente ce qui pourrait être dû à la rigidité des hélices de KC. En présence d’iodure, l’augmentation de KC a pour effet de ralentir la relaxation sans modifier le module élastique.

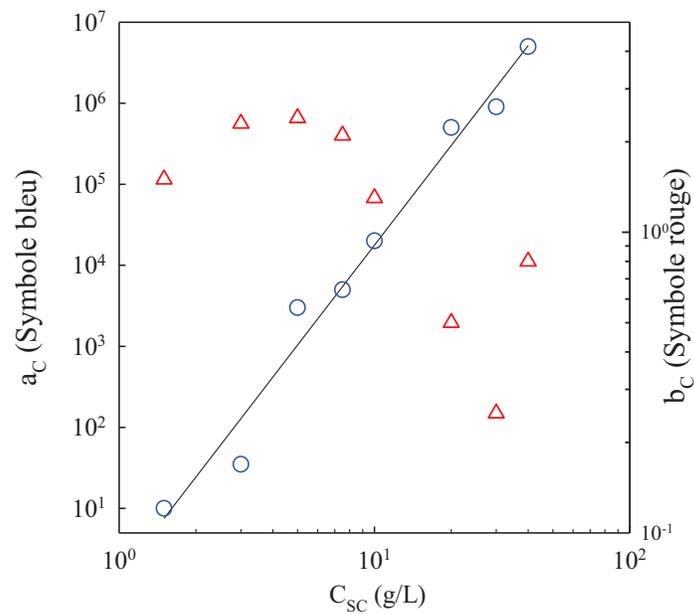


Figure IV. 14: Evolution des constantes de normalisation a_C et b_C en fonction de la concentration de SC.

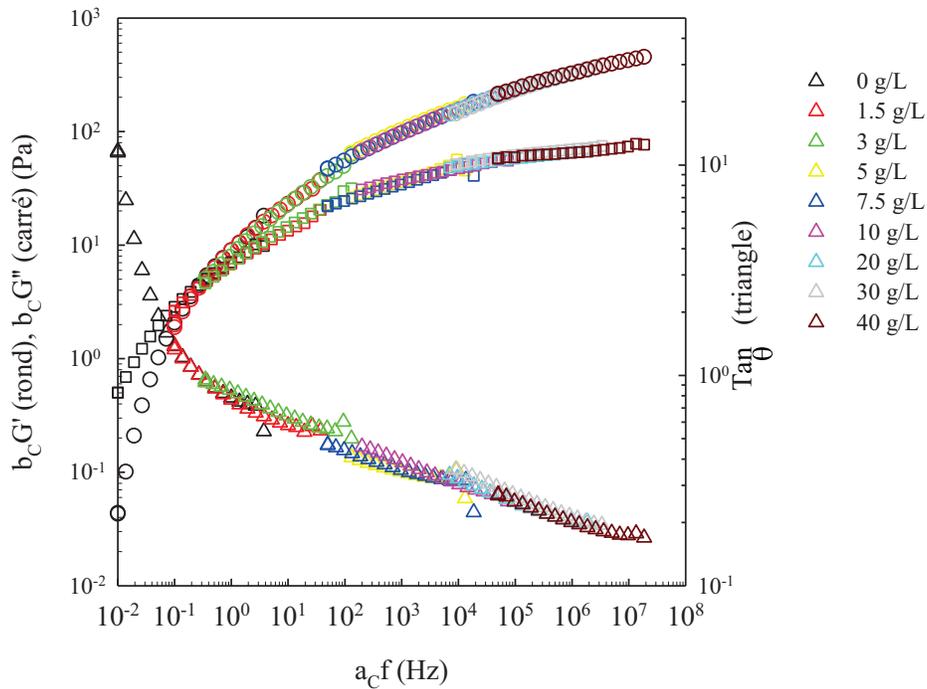


Figure IV. 15 : courbes maitresses de G' , G'' obtenues par normalisation de la fréquence et des modules respectivement par les constantes a_c et b_c .

En présence d'iodure, l'effet de SC est également de ralentir la relaxation sans modifier significativement le module élastique. En effet, une bonne superposition est obtenue en appliquant des déplacements horizontaux et verticaux, voir la figure IV. 15. Les déplacements horizontaux sont importants tandis que les déplacements verticaux sont relativement faibles, voir la figure IV. 14.

Le ralentissement de la relaxation est très important et peut être décrit par une loi de puissance, $a_c \propto C_{SC}^5$, au moins entre 1.5 g/L et 40g/L (figure IV. 14).

La conclusion de cette étude en présence d'iodure est que le système mixte en présence de NaI ne forme pas de gel et que la formation d'un gel par KC est nécessaire pour former des gels mixtes avec SC. Néanmoins, il est évident que le SC s'associe également avec les hélices de KC en présence de NaI, ce qui conduit à une très forte augmentation de la viscosité.

IV.5. Structure du gel mixte

La figure IV. 16 montre les images confocales des systèmes mixtes contenant 3 g/L de SC et différentes concentrations de KC. Les systèmes ont été stockés à 5°C pendant une nuit et les images ont été prises à 20°C à l'état gélifié. On visualise le réseau de KC en MCBL par les protéines associées avec les KC.

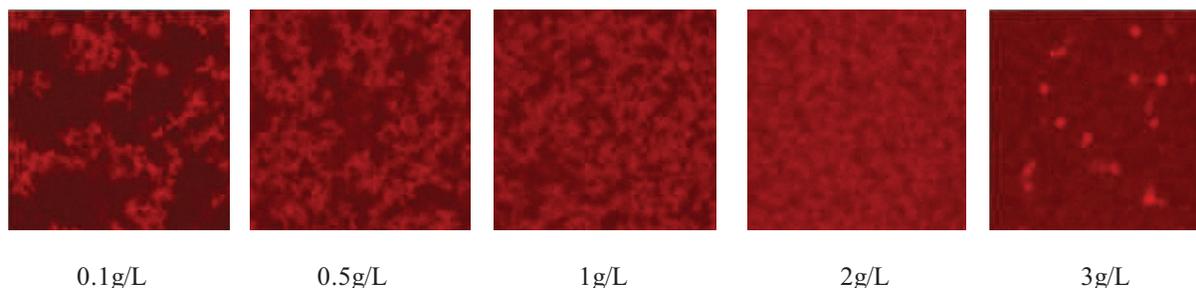


Figure IV. 16: Evolution de la structure des gels en MCBL après 24 heures à 5°C pour des mélanges à différentes concentrations en KC indiquées sur la figure et à une concentration en SC fixée à 3g/L (0.1M NaCl, pH7). Taille des images 40µm.

Le réseau devient dense et le contraste diminue avec l'augmentation de la concentration de KC. A 3 g/L de KC, les images apparaissent homogènes, excepté la présence de clusters riches en SC qui se forment à haute concentration de KC lorsque le KC est sous forme pelote.

Nous avons également varié la concentration de SC en gardant la concentration de KC fixée à 1 g/L, comme le montre la figure IV. 17.

A 3 g/L de SC, le système est gélifié à 2°C et devient un liquide homogène à 20°C. A partir de 1.5 g/L de SC, les images montrent un réseau mixte qui devient plus homogène avec l'augmentation de la concentration de SC.

L'augmentation de la concentration de SC et de la concentration de KC conduit à des gels plus homogènes. Des structures similaires ont été montrées par Schorsch et al. pour des mélanges de KC et de caséine micellaire native (Schorsch, Jones and Norton, 2000) .

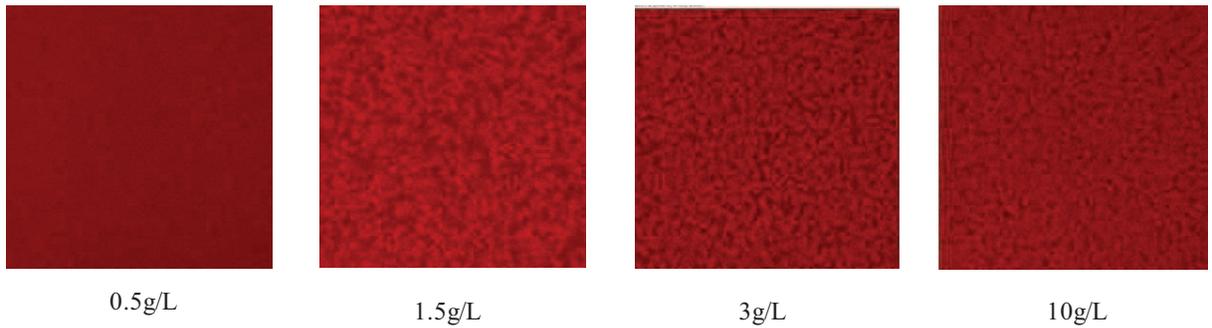


Figure IV. 17: Evolution de la structure des gels en MCBL après 24heures à 5°C pour des mélanges à différentes concentrations en SC indiquées sur la figure et à une concentration en KC fixée à 1g/L (0.1M NaCl, pH7). Taille des images 160µm.

L'effet de la gélification sur la structure a également été étudié par diffusion de la lumière. Pour un mélange de 1g/L de KC et 3 g/L de SC, le phénomène de gélification cause une forte augmentation de l'intensité (figure IV. 18). L'intensité de la lumière diffusée par un gel de KC pur est négligeable par rapport au gel mixte.

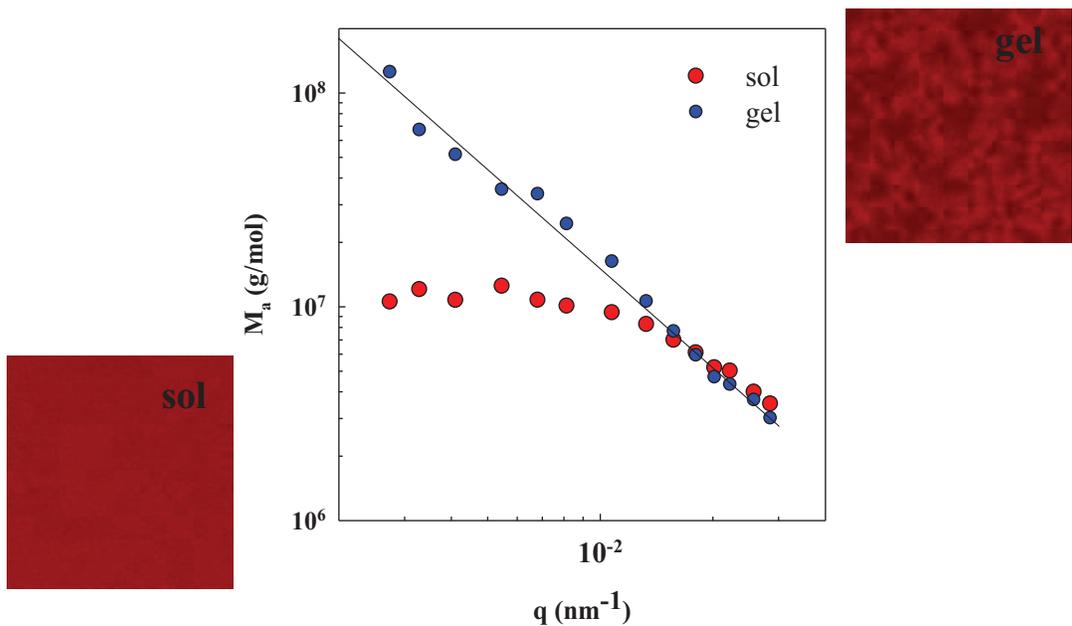


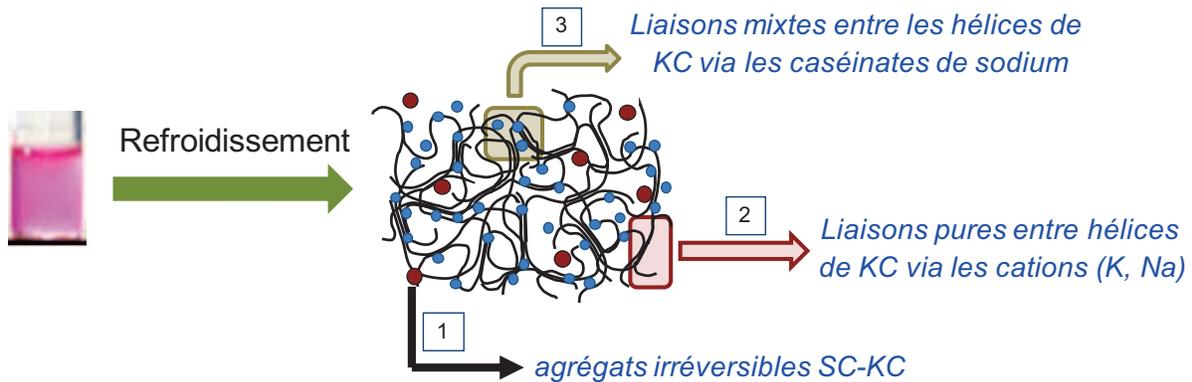
Figure IV. 18: Dépendance de la masse apparente (proportionnelle à l'intensité diffusée) avec le vecteur d'onde pour un mélange comportant 3g/l de SC et 1g/l de KC (100mM NaCl et à pH7) à l'état sol et à l'état gel. Taille des images 40 µm.

Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres systèmes mixtes SC et KC .

Dans chaque cas, le gel montre une forte dépendance de l'intensité avec le vecteur d'onde qui peut être décrit par une loi de puissance $I \propto q^{-d_f}$, ce qui montre que la structure locale du gel est auto – similaire avec une dimension fractale d_f qui est pour tous les mélanges étudiés comprise entre 1.5 et 2.

IV.6 Conclusion

Le schéma ci-dessous représente un système mixte monophasique de KC et de SC gélifié :



[2] : Liaisons de KC pur.

[3] : Liaisons mixtes entre les hélices de KC et les SC. Cependant, la nature moléculaire de ces liaisons n'est pas encore connue.

En plus le système contient des grands agrégats de SC contenant peu de KC qui sont liés irréversiblement, mais qui n'ont pas d'impact sur les systèmes gélifiés.

Dans le système gélifié, il existe 2 types de liaisons : des liaisons formées par le KC pur induit par les sels présents et des liaisons mixtes protéines-KC. D'autres auteurs avaient déjà montré la présence de ces deux types de liaisons dans les mélanges de SC et de KC (Oakenfull, Miyoshi, Nishinari and Scott, 1999). Les deux types de liaisons sont thermoréversibles. Les liaisons où sont impliquées les protéines renforcent les gels faibles de KC. La compétition entre ces deux types de liaisons dépend de la nature du sel et de la force ionique. Si la concentration d'ions spécifiques (par exemple le potassium) est supérieure à 0.02M, le gel de KC pur induit par ces ions domine le système. Cependant, en présence de NaI, le système mixte ne forme pas de gel car l'iodure bloque la gélification, comme montré dans la littérature pour les solutions de KC pur (Piculell, Nilsson and Muhrbeck, 1992; Slootmaekers, Jonghe, Reynaers, Varkevisser and Treslong, 1988) .

En présence de NaCl ou de KCl, l'augmentation de SC ou de KC conduit à des gels plus homogènes.

Références bibliographiques

Chronakis, I. S., Doublier, J.-L. & Piculell, L. (2000), Viscoelastic properties for kappa- and iota-carrageenan in aqueous NaI from the liquid-like to the solid-like behaviour, *International Journal of Biological Macromolecules*, **28**, 1-14.

Lynch, M. G. & Mulvihill, D. M. (1994b). The influence caseins on the rheology of kappa carrageenan gels, In G. O. Phillips, P. A. Williams & D. J. Wedlock *Gums and stabilisers for the food industry*. (7) (pp. 323-332), Oxford: IRL Press

Oakenfull, D., Miyoshi, E., Nishinari, K. & Scott, A. (1999), Rheological and thermal properties of milk gels formed with κ -carrageenan. I. Sodium caseinate, *Food Hydrocolloids*, **13**, 525-533.

Piculell, L., Nilsson, S. & Muhrbeck, P. (1992), EFFECTS OF SMALL AMOUNTS OF KAPPA-CARRAGEENAN ON THE RHEOLOGY OF AQUEOUS IOTA-CARRAGEENAN, *Carbohydrate Polymers*, **18**, 199-208.

Rochas, C. & Rinaudo, M. (1980), Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems, *Biopolymers*, **19**, 1675-1687.

Schorsch, c., Jones, M. G. & Norton, I. T. (2000), Phase behaviour of pure micellar casein/ κ -carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate, *Food Hydrocolloids*, **14**, 347-358.

Slootmaekers, D., Jonghe, C. D., Reynaers, H., Varkevisser, F. A. & Treslong, C. J. B. v. (1988), Static light scattering from κ -carrageenan solutions, *International Journal of Biological Macromolecules*, **10** 160.

Tziboula, A. & Horne, D. S. (1999), Influence of milk proteins on κ -carrageenan gelation, *International Dairy Journal*, **9**, 359-364.

*Chapitre V : Etude comparative des SC et des submicelles de
caséines*

V.1. Etude des mélanges submicelles de caséines et KC sous forme pelote

Les submicelles de caséines sont des particules obtenues après la dissociation de la micelle de caséines par la chélation du CCP par les sels de fonte (triphosphate de sodium (NaTPP)). Ces particules ont presque la même taille que celles de SC, soit environ 11 nm, et sont composées également d'environ 15 molécules de caséines. Contrairement aux SC, les suspensions des submicelles obtenues sont instables, elles s'agrègent et peuvent gélifier au cours du temps si la concentration de caséines est suffisante. Dans l'industrie, les submicelles de caséines sont utilisées pour certains produits laitiers. C'est pourquoi nous avons comparé les submicelles de caséines et les Caséinates de sodium. De plus, du point de vue scientifique, nous voulons étudier les comportements structuraux et rhéologiques de ces protéines face au kappa carraghénane. Et nous voulons étudier l'effet de la gélification des protéines sur les propriétés rhéologiques du kappa carraghénane.

V.1.1. Morphologie

Deux mélanges mixtes à une même concentration de kappa carraghénane (KC) 4g /L et à différentes concentrations de protéine ont été comparés : l'un avec des caséinates de sodium (SC) en présence de 0.1M NaCl et l'autre avec des submicelles de caséines en présence de 0.1M de tripolyphosphate de sodium (NaTPP).

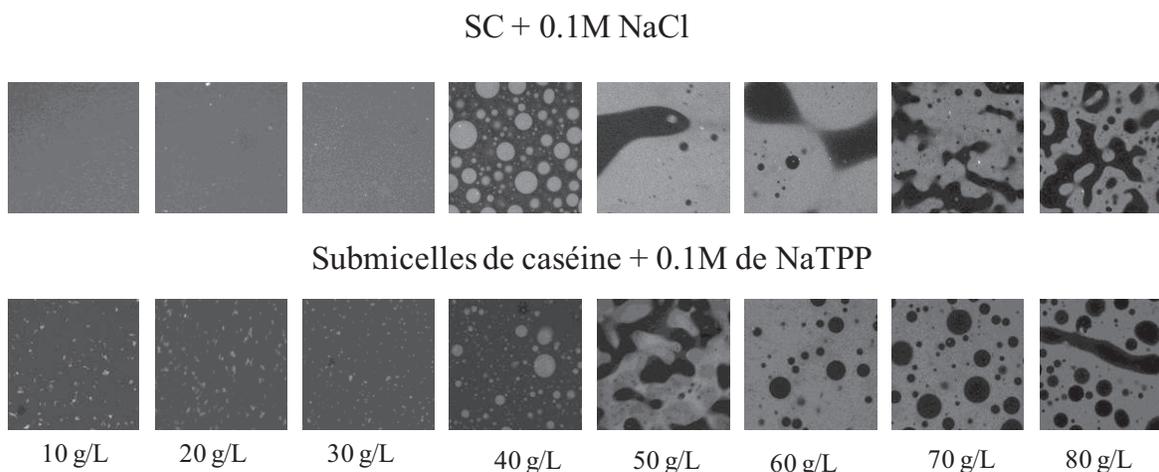


Figure V. 1: Comparaison des comportements de phase des caséinates de sodium (SC) et des submicelles de caséines à 4 g/L de KC et à différentes concentrations de SC indiquées sur la figure. Taille des images sur la figure 160 μ m.

Pour ces conditions, la séparation de phase des systèmes arrive au même moment et conduit à une phase riche en protéine et une phase riche en kappa carraghénane (figure V. 1). Cependant, le système avec SC reste plus longtemps co-continu que celui avec les submicelles de caséines pour lequel on bascule rapidement vers un milieu protéique continu.

V.1.2. Séparation de phase

Le contraste est défini comme le rapport du signal de la phase riche en SC sur le signal de la phase pauvre en SC. La figure V.2 montre l'évolution du contraste pour les différents systèmes étudiés.

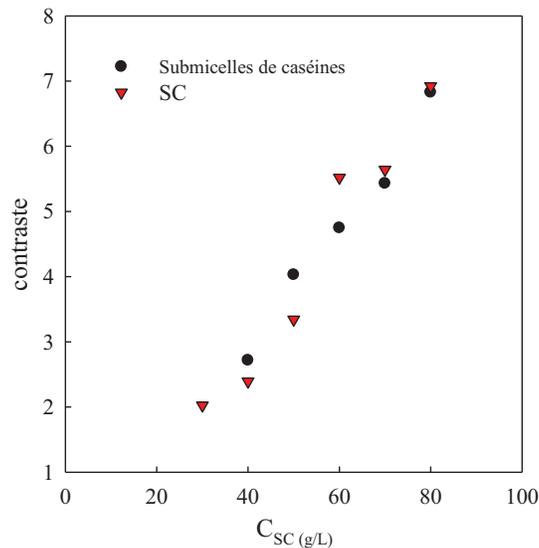


Figure V. 2: Comparaison des contrastes entre les submicelles de caséines et les SC à 0.1 M NaCl.

Le contraste augmente avec la concentration de protéine qui favorise la séparation de phase.

Le contraste évolue linéairement et de façon identique pour les deux types de systèmes ce qui indique que la séparation de phase se déroule de façon identique pour les deux systèmes.

V.1.3. Formation des agrégats

Les mélanges dilués de SC et de submicelles de caséines ont été étudiés à différentes concentrations de KC, à 0.1M Na⁺ à pH 7 pour SC et à pH 6 pour les submicelles de caséines. Pour ces conditions, on se trouve dans la région monophasique (figure V. 3).

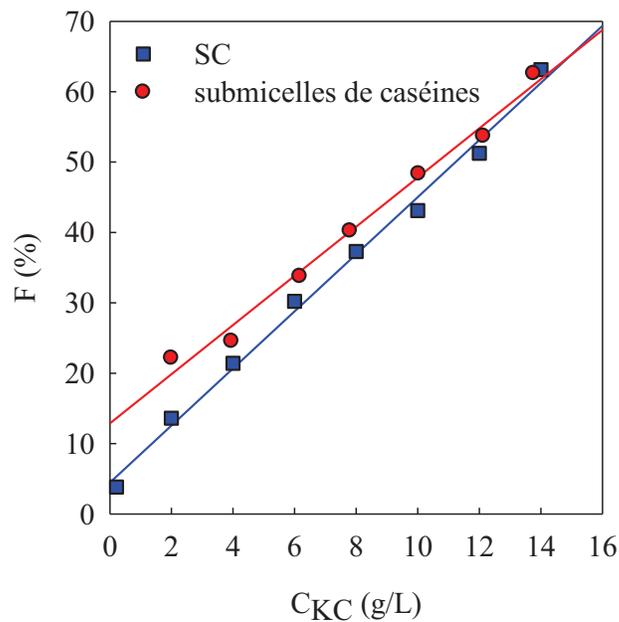


Figure V. 3: Comparaison entre les submicelles de caséines à pH 6 et le SC à pH 7 (0.1 M Na⁺) : Evolution de la fraction de protéines F(%) dans les agrégats en fonction de la concentration de KC.

Dans les deux cas, la fraction des caséines dans les agrégats augmente avec la concentration de KC. Cependant, la fraction des caséines dans les agrégats formés dans les mélanges de submicelles de caséine est légèrement supérieure à celle des agrégats formés avec les caséinates de sodium puisque dans le mélange avec les submicelles de caséines on est à pH 6 parce qu'en abaissant le pH, on augmente les charges positives sur la protéine.

V.2. Gélification des mélanges submicelles de caséines et KC

V.2.1. Etude de la solution de KC

La solution de KC en présence de NaTPP a été comparée avec la solution de KC en présence de NaCl, afin d'étudier l'effet du co-ion sur les propriétés rhéologiques du KC. On a effectué un balayage en température et en fréquence. On a travaillé sur des solutions à 4g/L de KC et 0.5M de Na^+ pour avoir une transition plus marquée.

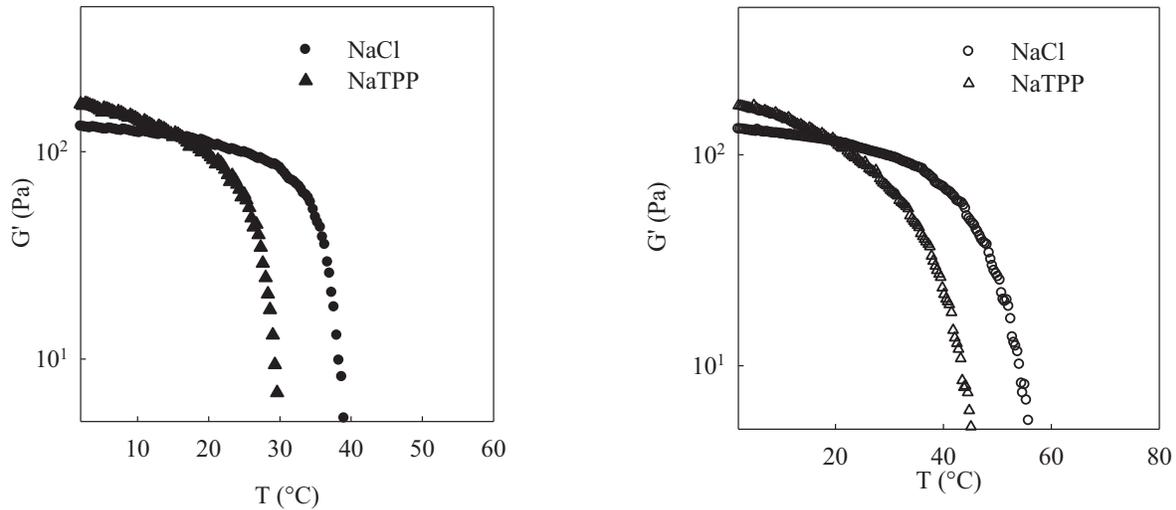


Figure V. 4: Refroidissement (gauche) et chauffage (droite) d'une solution de 4g/L de KC pur, à 0.5M d'ions Na^+ et à pH6. NaCl (cercle) et NaTPP (triangle).

Les températures critiques de fonte et de gélification du KC pur en présence d'ions sodium sont plus faibles avec le TPP qu'avec le Cl. On a un écart de 5°C pour 0.1M Na^+ et de 10°C pour 0.5M Na^+ (Figure V. 4).

En revanche, les dépendances en fréquence des modules élastiques des gels à 2°C sont très voisines (Figure V. 5).

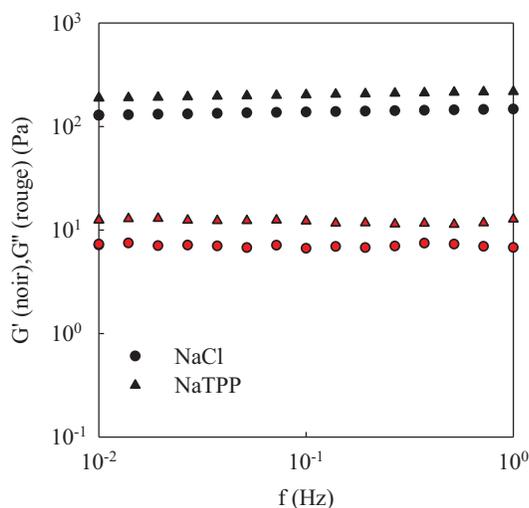


Figure V. 5: Evolution de G' et de G'' à 2°C en fonction de la fréquence, à 0.5M d'ions Na^+ , 4g/L de KC et pH 6. NaCl (cercle) et NaTPP (triangle).

Le suivi de la dépendance en température au cours du refroidissement et du chauffage, des modules des solutions de KC à 0.1M KCl, pH 6, sans ou avec NaTPP (0.1M) montre que les températures critiques de gélification et de fonte sont identiques pour des solutions de KC pur en présence de KCl, sans ou avec NaTPP (Figure V. 6). On a donc un effet dominant du KCl.

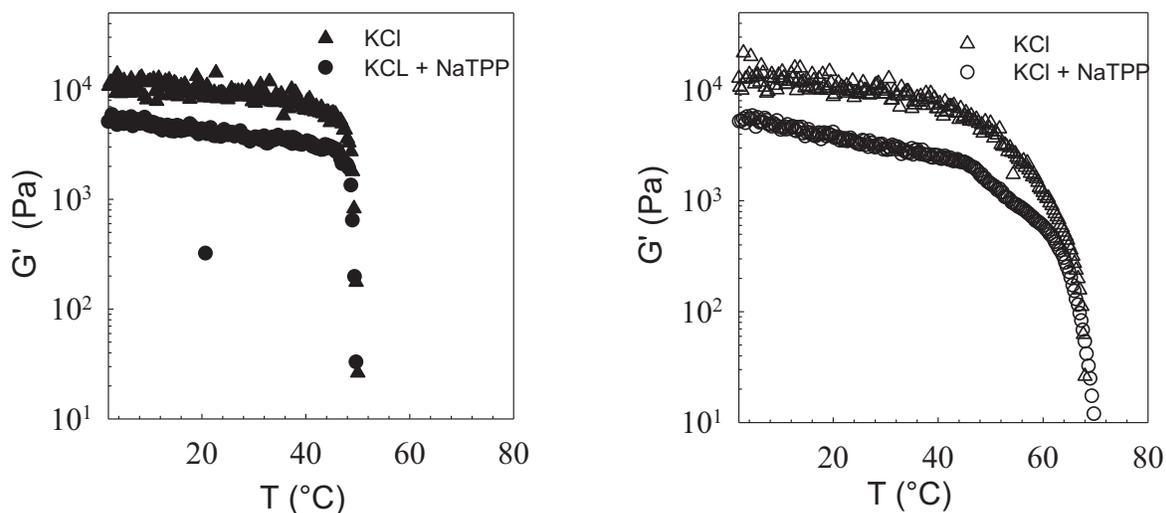


Figure V. 6: Refroidissement (gauche) et chauffage (droite) de 4g/L de KC pur en présence de KCl (0.1M), avec et sans NaTPP (0.1M) et à pH 6. KCl+NaTPP (cercle) et KCl (triangle).

Toutefois, les modules sont deux fois plus faibles en présence de TPP. Cette diminution du module peut être un artefact de mesure, comme par exemple une cassure du gel ou un détachement du produit à l'interface avec l'outil. Pour étudier correctement l'effet du co-ion provenant des sels spécifiques, on devrait comparer KCl et KPO_4 (phosphate de potassium).

V.2.2. Etude des mélanges homogènes

V.2.2.1. Influence de la nature du sel

Avant de comparer les systèmes SC et submicelles de caséine, nous étudierons l'influence des 2 types de sels utilisés (NaCl et NaTPP) sur les modules et les températures critiques du système idéal SC / KC.

Les mélanges de 30g/L de SC et de 4g/L de KC en présence de NaTPP ou de NaCl à 0.1M Na^+ et à pH 6 ont été comparés.

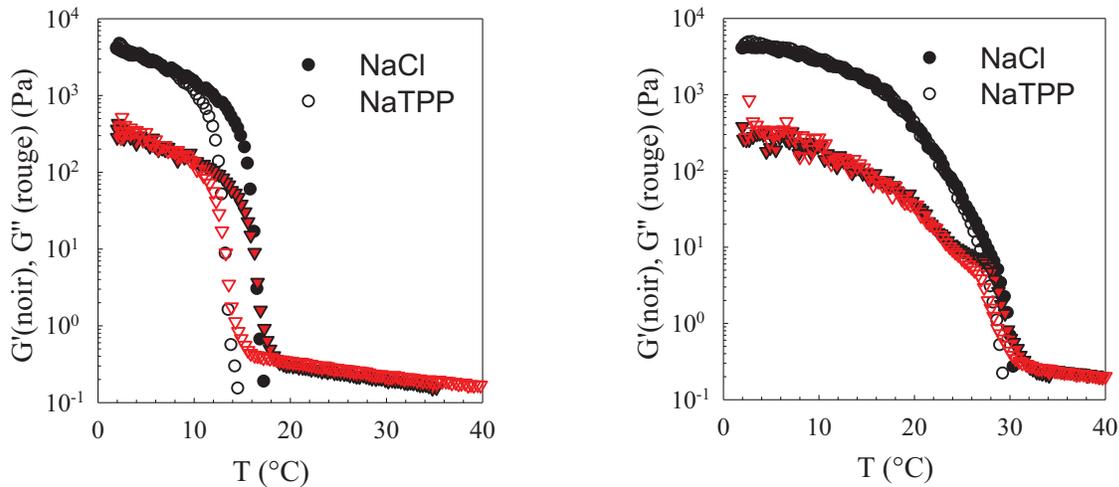


Figure V. 7: Refroidissement (gauche) et chauffage (droite) respectivement d'un mélange de 30g/L de SC et de 4 g/L de KC, à 0.1M Na^+ et à pH 6. NaCl (symbole plein) et NaTPP (symbole ouvert).

Les températures critiques de gélification du mélange en présence de sodium sont plus faibles avec le TPP qu'avec Cl⁻ (figure V. 7), on a un écart de 3°C. Cette différence est due à la nature du co-ion. En revanche, les températures critiques de fonte en présence de NaCl ou de NaTPP sont identiques. Elles correspondent à la fonte du gel mixte (cassure des liaisons

protéines-KC). En effet, on est en excès de protéines 30g/L et en présence d'un ion non spécifique du KC, c'est le gel induit par les protéines qui domine.

La dépendance en fréquence des modules des gels à 2 °C a été mesurée au bout de 10³ s.

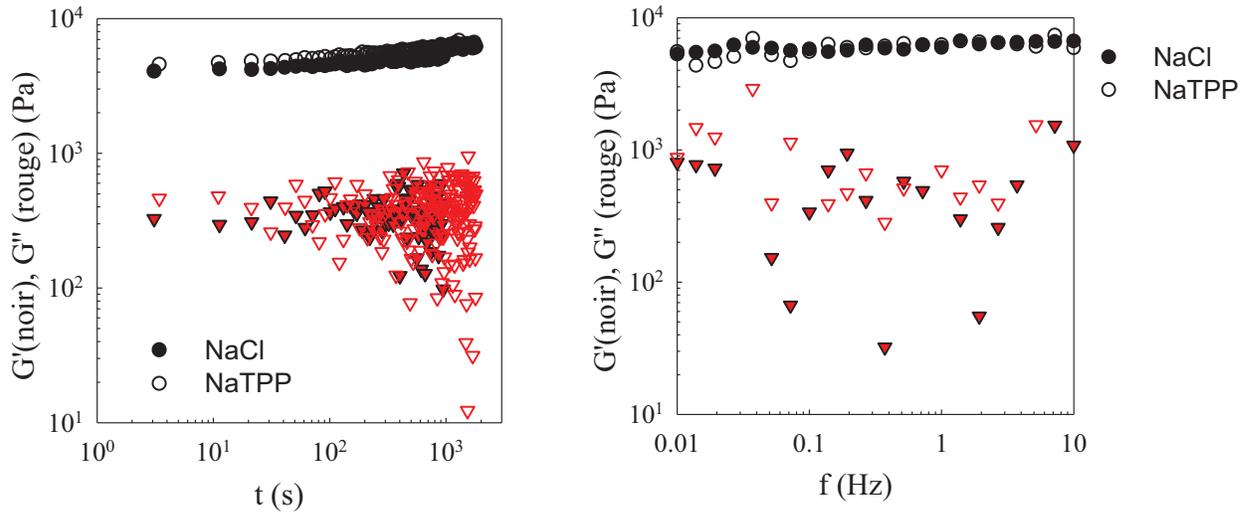


Figure V. 8: Evolution de G' et G'' à 2°C en fonction du temps (gauche) et de la fréquence (droite) pour 30g/L de SC et 4g/L de KC à pH 6 et à 0.1M Na⁺.

Les modules évoluent très peu à 2°C avec le temps (figure V. 8). Les fluctuations de G'' sont dues au fait que l'écart entre les modules élastiques et visqueux est très élevée et donc le déphasage très faible, ce qui empêche de mesurer correctement G'' . Les dépendances en fréquence des modules élastiques des gels à 2°C sont pratiquement identiques (figure V. 8). En effet, dans ces conditions, le module est apporté essentiellement par le gel mixte SC-KC, le co-ion n'a pas d'effet.

V.2.2.2. Influence de la nature de la caséine

Deux mélanges mixtes à 4g /L de KC et à 30g/L de protéine ont été comparés : le système avec SC et KC en présence de 0.1M NaCl et le système avec submicelles de caséines et KC en présence de 0.1M de tripolyphosphate de sodium.

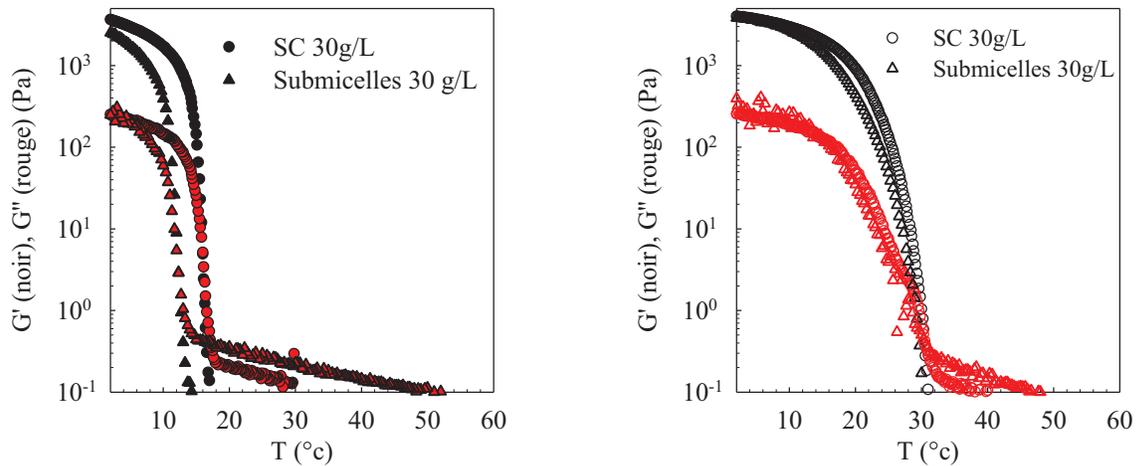


Figure V. 9: Refroidissement (gauche) et chauffage (droite) respectivement d'un mélange de 30g/L de protéine et de 4 g/L de KC, à 0.1M Na⁺ et à pH 6. Submicelles de caséines (triangle) et SC (cercle).

La figure V. 9 montre que la température critique de gélification est plus forte de 3°C pour les mélanges en présence de NaCl, effet du co-ion. Mais, les températures critiques de fonte restent identiques car c'est la fonte du gel mixte qui gouverne. Les modules sont également identiques. A partir de ces observations, on peut conclure que les deux systèmes ont le même comportement rhéologique et que l'on observe également la présence d'un gel mixte dans les mélanges submicelles de caséines et kappa carraghénane et qu'en excès de protéines, le gel induit par les protéines est favorisé.

V.2.3. Systèmes submicelles de caséine et KC

Les systèmes à différentes concentrations de submicelles de caséines (0-40g/L) et à 4g/L de KC, 0.5% de tripolyphosphate (conditions limites de dissociation) et à pH 6 ont été étudiés. On a regardé l'effet de la concentration en submicelles de caséines sur les températures critiques et les modules des gels.

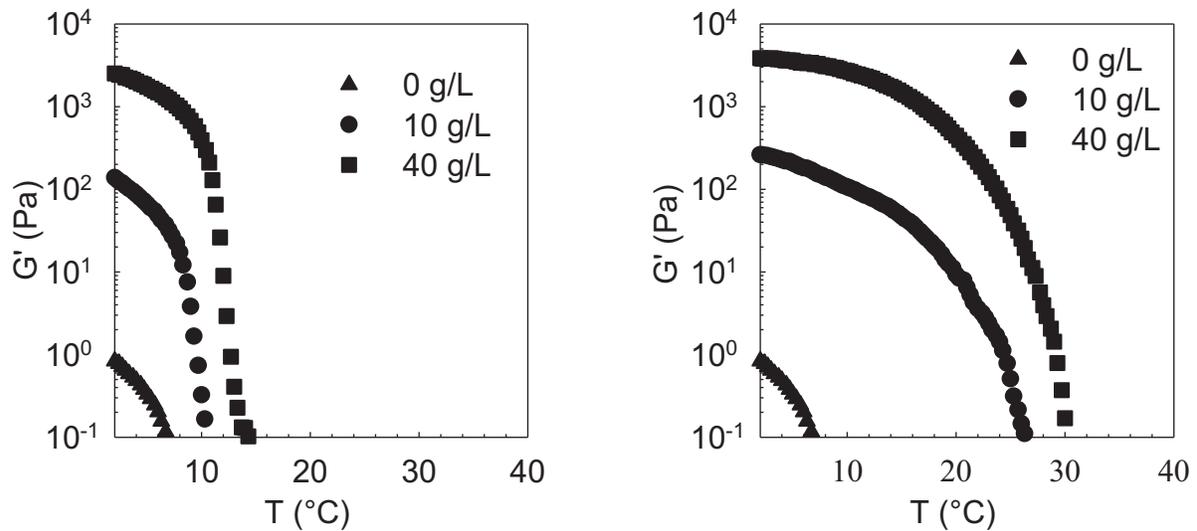


Figure V. 10: Evolution de G' pendant le refroidissement (gauche) et le chauffage (droite) à différentes concentrations de submicelles de caséines indiquées dans la figure, à 4 g/L de KC, 0.5% de NaTPP et pH 6.

Les températures critiques de gélification augmentent seulement faiblement avec la concentration de submicelles de caséines car elles sont légèrement influencées par les cations contenus dans la poudre de micelles de caséines. Par contre, les températures critiques de fonte augmentent brusquement lorsqu'on ajoute les submicelles de caséines (figure V. 10) car dans le mélange, la température critique de fonte est déterminée par les protéines. De plus, on observe une hystérèse plus importante. On retrouve les résultats obtenus pour les systèmes mixtes KC et SC.

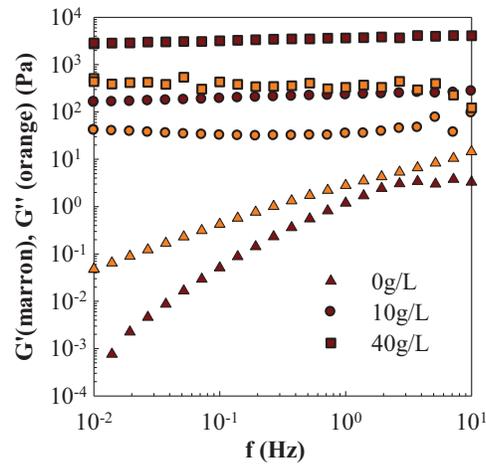


Figure V. 11: Evolution de G' et G'' en fonction de la fréquence à différentes concentrations de submicelles de caséines indiquées sur la figure, à 2°C , à 0.5% de NaTPP et pH 6.

La dépendance en fréquence des modules montre que dans ces conditions le KC pur ne forme pas de gel à 2°C mais seulement un liquide visqueux. Cependant, en présence de submicelles de caséines, le système forme un gel. La force du gel augmente avec la concentration en submicelles de caséines (figure V. 11). On note qu'on retrouve les mêmes comportements que pour les systèmes mixtes SC / KC. Ces résultats montrent que le système mixte avec les SC et le système mixte avec les submicelles non agrégées ont des comportements identiques.

V.3. Conclusion

En général, on ne trouve aucune différence entre les deux systèmes, à part un abaissement de la température critique de gélification en présence du co-ion triphosphate. Les modules à froid et les températures critiques de fonte restent identiques, car ce sont les liaisons caséines/KC qui dominent. En excès de potassium, ce sont les liaisons KC/KC qui gouvernent le système mixte.

*Chapitre VI : Propriétés structurales et rhéologiques des systèmes
mixtes SC et IC*

Dans l'industrie, le kappa carraghénane (KC) et le iota carraghénane (IC) sont fréquemment utilisés dans les produits laitiers. C'est pourquoi, nous avons étudié la structure et les propriétés rhéologiques des systèmes mixtes SC/IC et nous les avons comparées avec les systèmes SC/KC.

VI.1. Etude d'une solution de IC pur

Des solutions à 2 g/L de IC sont préparées à 60°C et à pH 7 avec différents types et concentrations de sel. Les propriétés rhéologiques des solutions sont mesurées avec la géométrie couette dans les conditions optimales suivantes : une déformation de 1%, une fréquence de 1 Hz et une vitesse de 1°C/min.

VI.1.1. Etude cinétique

La figure VI. 1 montre l'évolution des modules de conservation G' en fonction du temps à différentes températures pendant le refroidissement et le chauffage.

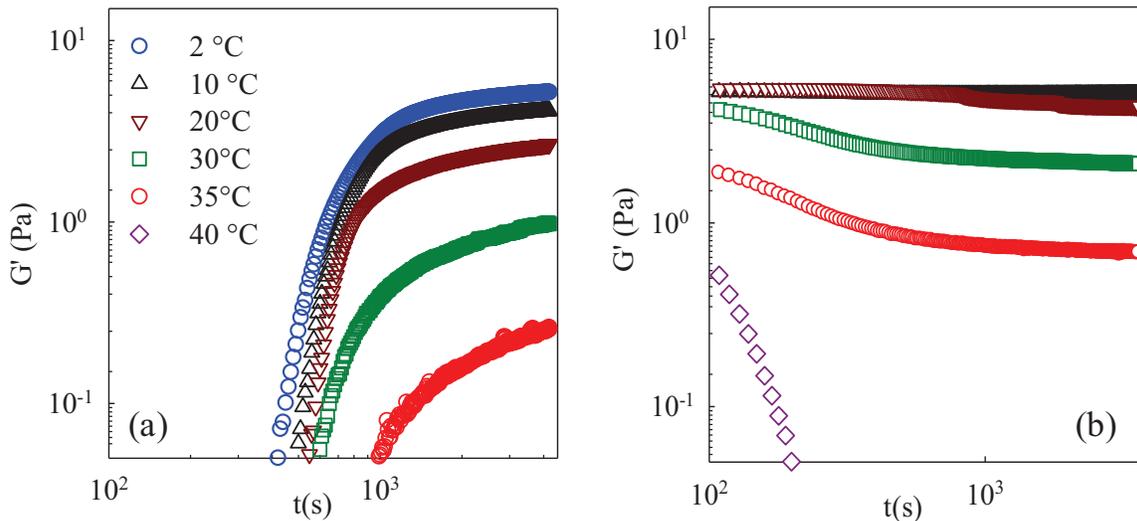


Figure VI. 1: Cinétique de gélification (a) et de fonte (b) à différentes températures pour une solution à 2 g/L IC, à 0.1 M NaCl et à pH 7.

A température donnée, le module G' évolue beaucoup au début, puis lentement après sans atteindre un équilibre. Les cinétiques de gélification et de fonte sont très dépendantes de la température. Plus on se situe loin en-dessous de T_c , plus la vitesse de formation du gel est importante. Plus on se situe loin au-dessus de T_h , plus la vitesse de fonte du gel est importante. Toutefois, quelle que soit la température, les modules se rapprochent à temps long. Le ralentissement de la gélification proche de T_c est similaire à celui observé dans la littérature par Meunier et al. pour les solutions de KC pur (Meunier, Nicolai, Durand and Parker, 1999).

VI.1.2. Effet du type de sel

A la fin de chaque mesure de cinétique de gélification ou de fonte, les dépendances en température et la dépendance en fréquence des modules ont été mesurées. Les résultats obtenus sont montrés respectivement sur les figures VI. 2 et VI. 3.

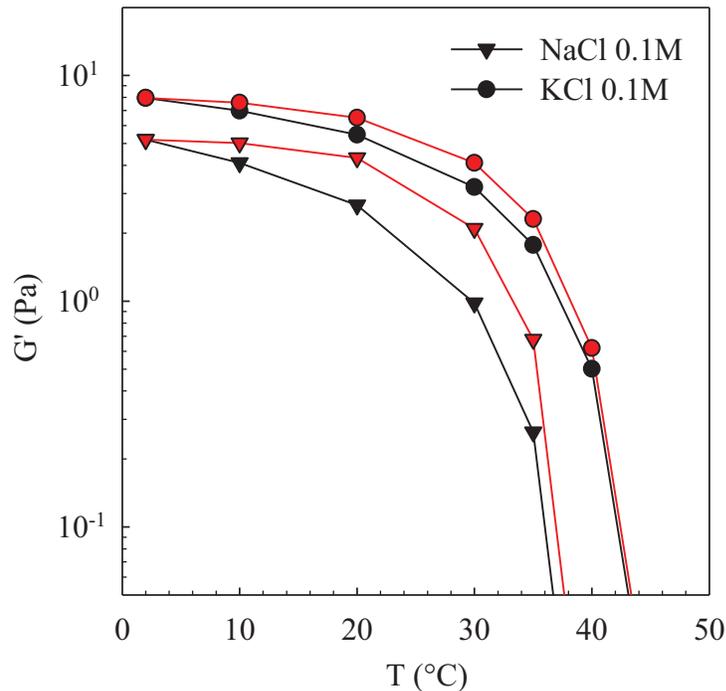


Figure VI. 2: Evolution de G' à 1 Hz pendant le refroidissement (symboles noirs) et chauffage (symboles rouges) pour une solution à 2 g/L de IC pur, à pH 7, à 0.1M NaCl (triangles) et à 0.1 M KCl (cercles).

Pendant le refroidissement, le IC pur en présence de NaCl ou de KCl montre une transition sol-gel à T_c . Cette transition est thermoréversible et pendant le chauffage, on observe la transition gel-sol à une température critique T_h voisine de T_c , il n'existe pas donc d'hystérèse.

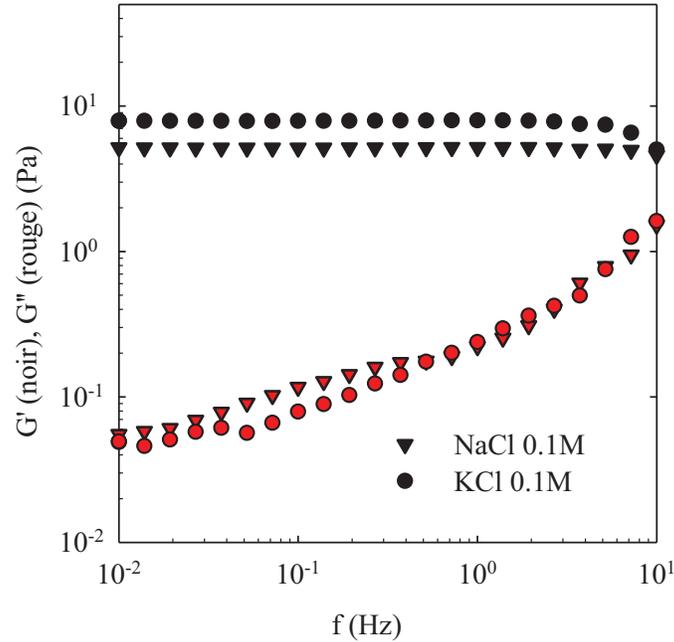


Figure VI. 3: Evolution de G' et G'' en fonction de la fréquence à 2°C pour une solution à 2g/L de IC, à pH 7, à 0.1M NaCl (triangles) et à 0.1 KCl (cercles).

Pour $T < T_c$, le module G' est pratiquement indépendant de la fréquence dans la gamme allant de 10^{-2} à 10 Hz, et est supérieur à G'' ce qui indique que le IC à 0.1 M NaCl ou à 0.1 M KCl et à pH 7 forme un gel. Comme pour KC, l'origine de la gélification est la transition pelote-hélice.

En présence de KCl, les températures critiques sont légèrement décalées vers les hautes températures et les modules légèrement plus élevés. KCl n'est donc pas un ion spécifique pour le IC.

Ces résultats confirment les observations trouvées dans la littérature (Nilsson and Piculell, 1991; Piculell, 1991; Piculell, Nilsson and Muhrbeck, 1992; Piculell, Nilsson and Ström, 1989)

VI.1.3. Effet de la concentration de IC

L'effet de la concentration de IC sur l'évolution du module G' en fonction de la température a été étudié pendant le refroidissement et le chauffage.

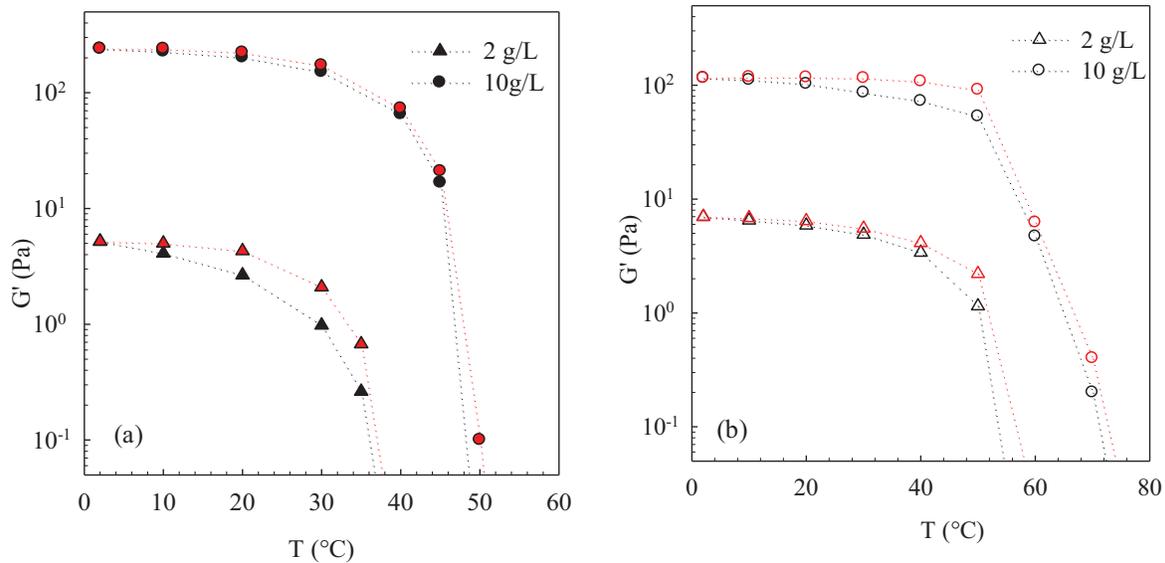


Figure VI. 4: Evolution de G' à 1 Hz pendant le refroidissement (symboles noirs) et chauffage (symboles rouges) pour des solutions à 2 g/L et 10 g/L de IC pur, à pH 7, à 0.1M NaCl (a) et à 0.25 M NaCl (b).

On constate que pour une température donnée, le module élastique est d'autant plus élevé que la concentration est importante. Cette augmentation est en accord avec la littérature (Morris and Belton, 1980; Morris and Chilvers, 1981)

Les températures critiques augmentent aussi avec la concentration parce qu'on ajoute du sel en augmentant la concentration en IC. Il en est de même quand on augmente la force ionique, voir figure VI. 4a et 4b. Ces observations rejoignent celles de Michon et al. (Michon, Cuvelier, Launay and Parker, 1996b)

VI.1.4. Effet de la force ionique

Nous avons fait varier la concentration en NaCl de 0 à 0.5 M. Les températures critiques et les modules élastiques G' ont été déterminés en fonction de la concentration totale en NaCl dans la solution qui résulte de l'addition du NaCl provenant des contre-ions de IC, du NaCl ajouté et de l'agent bactéricide (NaN_3).

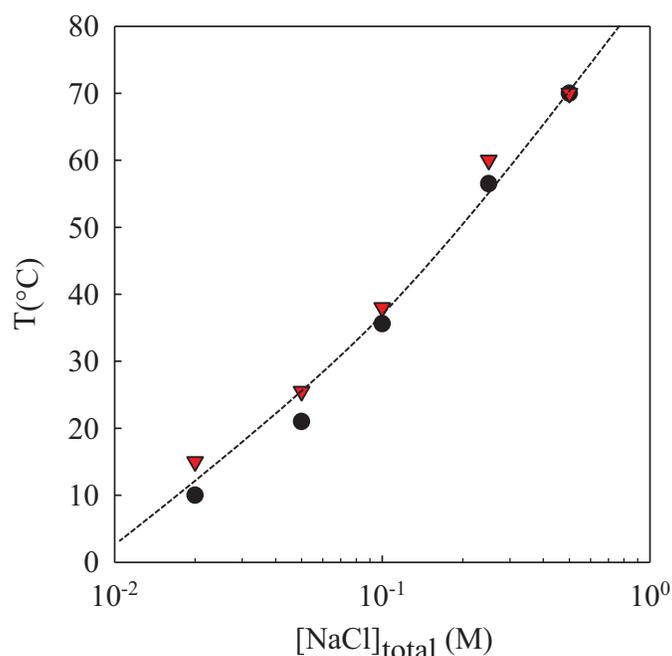


Figure VI. 5: Températures critiques d'une solution de IC à 2 g/L en fonction de la concentration totale en NaCl. T_c (cercles noirs) et T_h (triangles rouges).

La figure VI. 5 montre que les températures critiques de refroidissement (T_c) et de chauffage (T_h) augmentent avec la concentration totale en NaCl. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Parker et al. (Parker, Brigand, Miniou, Trespoey and Vallée, 1993). Les températures critiques sont voisines de celles obtenues par Rochas et al. (Rochas, Rinaudo and Landry, 1989) . Il n'existe pas d'hystérèse, ce qui confirme les observations de Piculell (Piculell et al., 1992) . Ceci peut être attribué à une faible association des hélices de IC.

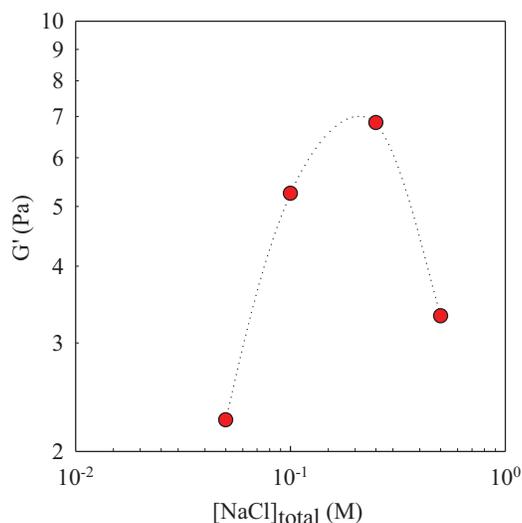


Figure VI. 6: Modules de conservation à 2°C et à 1 Hz d'une solution de IC à 2 g/L en fonction de la concentration totale en NaCl.

A 2°C, le IC pur forme un gel vers 5mM NaCl et le module élastique du gel augmente avec l'augmentation de la concentration en NaCl jusqu'à environ 0.25M pour atteindre 7.6 Pa, puis, diminue brusquement (Figure VI. 6). Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature (Parker et al., 1993; Rochas, Rinaudo and Landry, 1990; Thrimawithana, S. Young, Dunstan and Alany, 2010)

VI.1.5. Comparaison KC et IC

Les solutions de IC et de KC ont été comparées en présence de 0.1 M NaCl ou KCl, à pH 7. L'évolution des températures critiques en fonction de la force ionique pour une solution de IC ou de KC à 2 g/L est donnée sur la figure VI. 7.

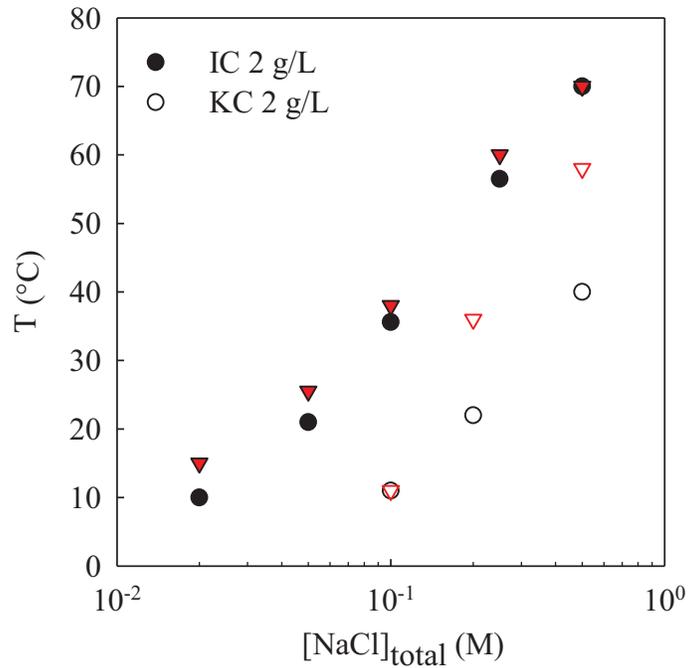


Figure VI. 7: Températures critiques des solutions de IC (symboles pleins) et de KC (symboles ouverts) à 2 g/L en fonction de la concentration totale en NaCl. T_c (cercles noirs) et T_h (triangles rouges).

Comme montré précédemment, les températures critiques pour IC et KC augmentent avec l'augmentation de la force ionique. Mais, les températures critiques de IC restent supérieures aux températures critiques de KC. De plus, on observe une hystérèse pour KC, mais pas pour IC.

On observe qu'en présence de 0.1 M KCl, les températures critiques de la solution de KC à 2 g/L ($T_c = 50^\circ\text{C}$ et $T_h = 70^\circ\text{C}$) sont plus élevées que les températures critiques de la solution de IC à 2 g/L ($T_c = T_h = 43^\circ\text{C}$).

Pour chacune des solutions de KC et de IC à 2 g/L, en présence de 0.1 M NaCl ou KCl, à pH 7, nous avons mesuré la dépendance en fréquence des modules à 2°C , figure VI .8.

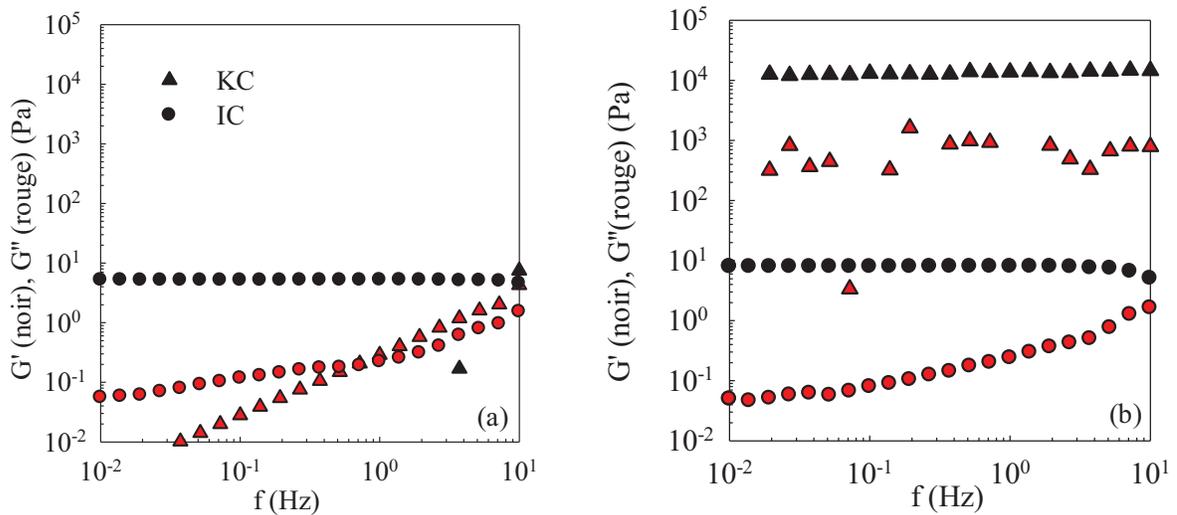


Figure VI. 8: Evolution de G' et de G'' à 2°C en fonction de la fréquence pour des solutions à 2 g/L de KC ou de IC dans 0.1 M NaCl (a) ou KCl (b).

Comme nous l'avons dit dans le chapitre IV, la dépendance en fréquence des modules montre que le KC à 0.1 M NaCl et pH 7 ne forme pas de gel à 2°C mais un liquide visqueux. Par contre dans les mêmes conditions, IC a un comportement de gel (figure VI. 8a). En présence de 0.1 M KCl, la dépendance en fréquence des modules élastiques à 2°C montre que les 2 solutions forment des gels et que le module du gel de KC est 10^4 fois plus élevé que celui de IC (figure VI. 8b).

En conclusion, l'élasticité des gels est plus forte avec NaCl pour le IC et avec KCl pour le KC.

VI.2 Etude des mélanges SC et IC sous forme pelote

VI.2.1. Morphologie

Les mélanges à 0.1M NaCl, pH 7 sont observés par MCBL. Les protéines sont marquées avec la rhodamine RITC à 5ppm et sont colorées en blanc sur les photos. Les mélanges de KC et SC ont été préparés à différentes concentrations de SC et de IC. Nous montrons ici deux images prises immédiatement après mélange à 20°C .

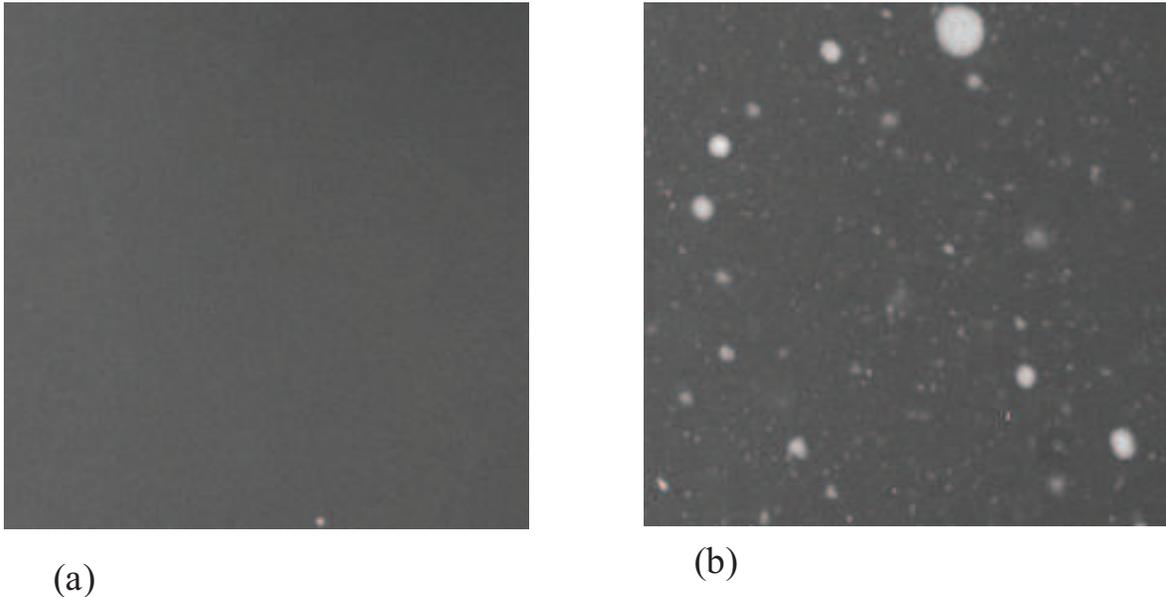


Figure VI. 9: Images confocales d'un mélange homogène à 70 g/L de SC et 1 g/L de IC (a) et d'un mélange hétérogène à 50 g/L de SC et 9 g/L de IC (b) à 0.1 M NaCl, pH 7. Taille des images 160 μ m.

On observe deux types de mélanges : un mélange homogène (figure VI. 9a) et un mélange hétérogène (figure VI. 9b). La séparation de phase se fait plus rapidement en présence de IC qu'en présence de KC, cette différence entre le KC et l'IC peut être due au nombre de charges sur les chaînes, mais, pas à la conformation car à cette température, le KC et l'IC sont sous forme pelote. Avec le temps, la séparation de phase ségrégative peut devenir macroscopique avec une phase supérieure riche en IC et une phase inférieure riche en SC. La séparation de phase complète des deux biopolymères dépend de la viscosité du milieu.

Dans les systèmes homogènes ou hétérogènes, on observe très peu d'agrégats et la fraction de SC ou de IC dans les agrégats est négligeable, environ 5%. L'absence d'agrégation dans le système mixte SC/IC peut être expliquée par la densité de charge de IC qui est plus grande que celle de KC.

VI.2.2. Diagramme de phase

Les compositions de la phase supérieure riche en IC et de la phase inférieure riche en SC ont été déterminées de la même façon que pour le mélange KC/SC (voir le chapitre III-3).

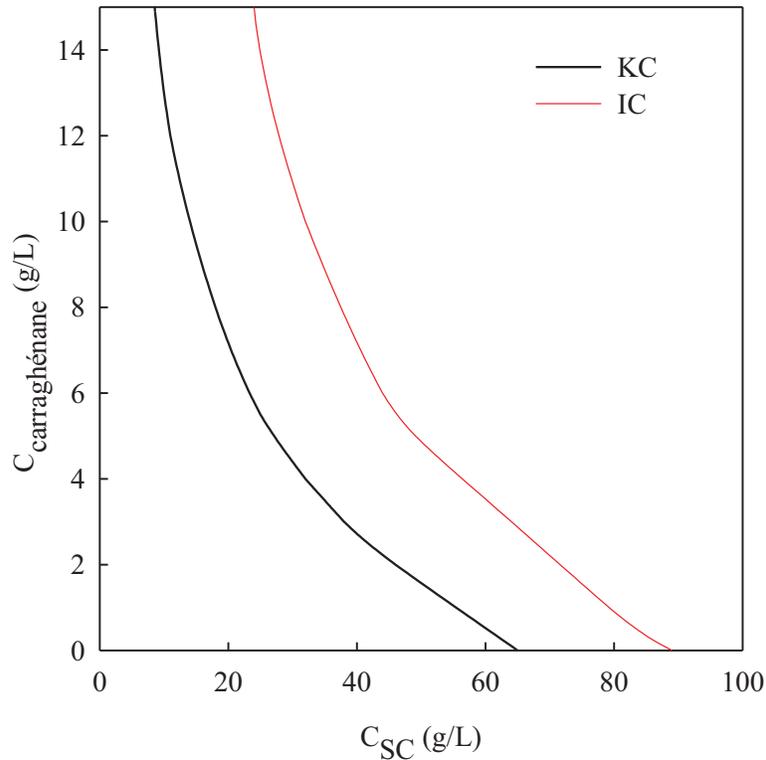


Figure VI. 10: Comparaison des diagrammes de phase des mélanges SC/KC et SC/IC à pH 7 et 0.1M NaCl. Les deux lignes sont les binodales.

En présence de IC, la binodale est déplacée vers les hautes concentrations de SC, voir figure VI. 10. La séparation de phase se déplace vers les hautes concentrations de SC parce que la chaîne de IC est plus chargée que celle de KC. Des auteurs ont montré une séparation de phase ségrégative par déplétion-floculation pour des systèmes mixtes lait/carraghénane à 60°C et des diagrammes de phase identiques pour KC et IC (Langendorff, Cuvelier, Michon, Parker and De Kruif, 2000) .

VI.3. Gélification des mélanges monophasiques SC et IC

VI.3.1. Influence de la concentration de SC

Nous avons étudié l'effet de l'ajout de SC à IC, 0.1M NaCl sur les températures critiques (T_c et T_h) et le module du gel. 0.1M NaCl est suffisant pour écranter significativement les interactions électrostatiques. Des mélanges monophasiques de IC à 2 g/L et à différentes concentrations de SC (0 à 60 g/L) ont été préparés en présence de 0.1M NaCl et à pH 7. Les valeurs des modules G' pendant le refroidissement et la fonte ont été mesurées après avoir laissé le système mixte au repos pendant une heure à la température voulue.

Les modules G' en fonction de la température pendant le refroidissement et la fonte sont donnés sur la figure VI. 11.

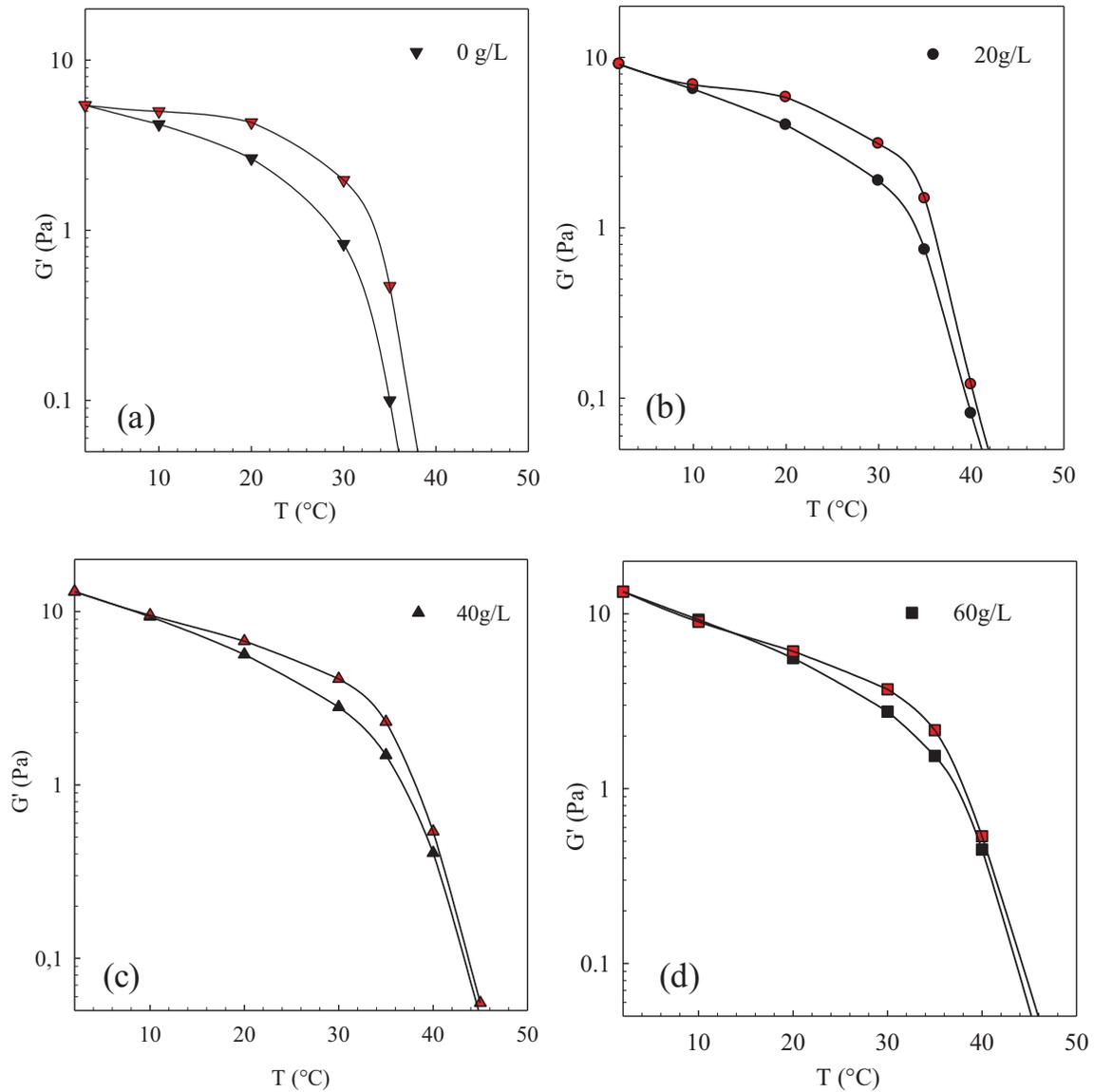


Figure VI. 11: Evolution de G' à 1 Hz mesuré pendant le refroidissement (symboles noirs) et le chauffage (symboles rouges) des mélanges à 2 g/L de IC dans 0.1 M NaCl et différentes concentrations de SC indiquées sur la figure.

Comme nous l'avons dit précédemment, on constate une augmentation de G' quand on baisse la température à partir d'une température critique T_c et une diminution de G' quand on augmente la température à partir d'une température critique T_h . Dans le système mixte, les températures T_c et T_h sont très voisines et dépendent très peu de la concentration en SC (figure VI. 11). On n'observe pas 2 étapes pendant la fonte comme pour le KC. Les liaisons entre IC pur se casseraient à des températures plus élevées que les liaisons entre IC et SC.

Les systèmes mixtes IC et SC comme les solutions de IC pur forment des gels à 2°C dans ces conditions et les modules des gels varient faiblement avec la concentration de SC.

Les modules de conservation G' à 1 Hz et 2°C ainsi que les températures critiques ont été mesurés en fonction de la concentration de SC pour 2 g/L de IC. Ces valeurs ont été comparées à celles de KC dans les mêmes conditions (figure VI. 12 et 13).

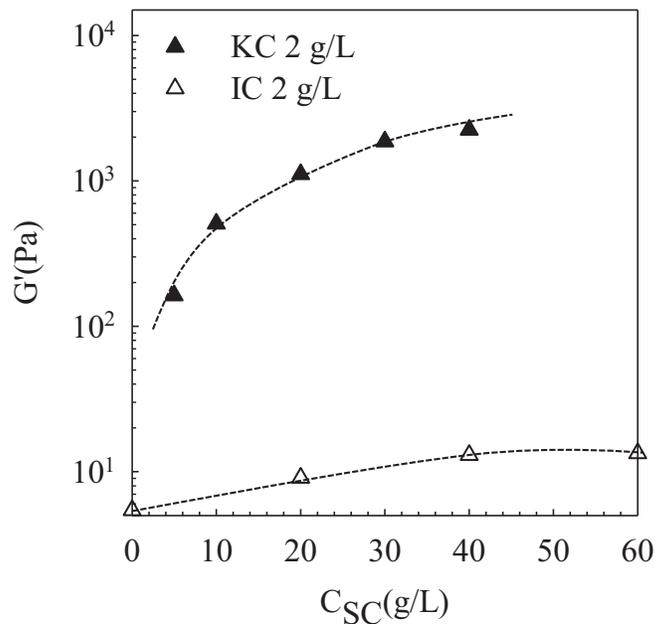


Figure VI. 12: Evolution des modules de conservation G' à 2°C en fonction de la concentration en SC (100mM NaCl et à pH 7) pour des systèmes mixtes avec IC ou KC.

Les modules évoluent peu avec la concentration de SC. Le module du mélange KC/SC est 100 fois supérieur au module du mélange IC/SC. Les gels du mélange de IC et de SC sont assez faibles, ce qui rejoint les résultats trouvés dans la littérature pour les systèmes lait/carraghénanes (Langendorff et al., 1999)

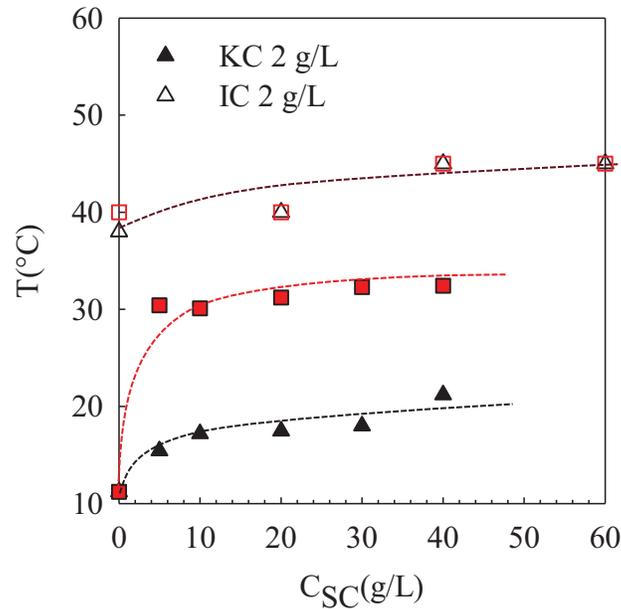


Figure VI. 13: Evolution des températures critiques de refroidissement (symboles rouges) et de chauffage (symboles noirs) en fonction de la concentration en SC (100mM NaCl et à pH 7) pour les systèmes mixtes avec IC ou KC.

Les températures critiques du mélange avec IC sont supérieures aux températures critiques du mélange avec KC en présence de NaCl parce que dans ces conditions expérimentales les températures critiques sont gouvernés par les liaisons purement IC. Par contre, en excès de KCl, les températures critiques du mélange avec KC sont supérieures aux températures critiques du mélange avec IC parce que dans ces conditions expérimentales les températures critiques sont gouvernés par les liaisons purement KC, on est en effet en présence d'un ion spécifique du KC.

VI.3.2. Influence de la force ionique

On a regardé l'effet de la force ionique sur les systèmes mixtes SC 60g/L et IC 2 g/L dans lesquels on suppose que toutes les protéines forment un gel mixte avec le IC. On a étudié l'impact du SC en faisant varier la quantité de sodium. On a également fait varier la concentration de NaCl, pour voir s'il existe une concentration critique de NaCl au-delà de laquelle l'effet de SC sur le gel mixte devient négligeable.

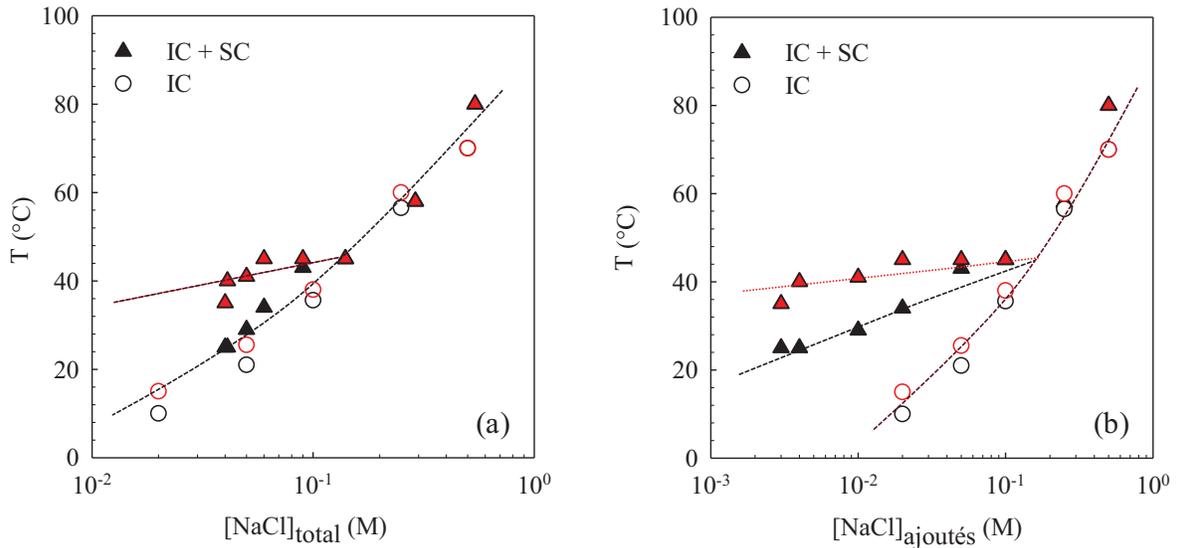


Figure VI. 14: Températures critiques en fonction de la concentration totale en NaCl (a) et de la concentration ajoutée en NaCl (b) pendant le refroidissement (noir) et le chauffage (rouge) du IC pur (cercles) et du mélange SC 60g/L et IC 2g/L (triangles).

La figure VI. 14a montre qu'à faible concentration totale en NaCl, la température critique de gélification du mélange est identique à la température critique de la solution de IC pur. Ces températures sont influencées par les cations présents dans la solution ou le mélange. La température critique de fonte est supérieure à la température critique de gélification et on observe une hystérèse. Dans cette gamme de concentration totale en NaCl, la température critique de fonte est déterminée par la présence de protéines.

Au dessus d'une concentration critique en NaCl, les températures critiques de IC pur et des mélanges sont identiques et on n'observe plus d'hystérèse car l'effet des protéines devient négligeable.

La comparaison de la figure VI. 14b (en fonction de la concentration ajoutée en NaCl) avec la figure VI. 14a (en fonction de la concentration totale en NaCl) montre clairement qu'à faible concentration en NaCl, la température critique de gélification est déterminée par les cations

contenus dans la poudre de SC et la température critique de fonte est influencée par la présence des protéines.

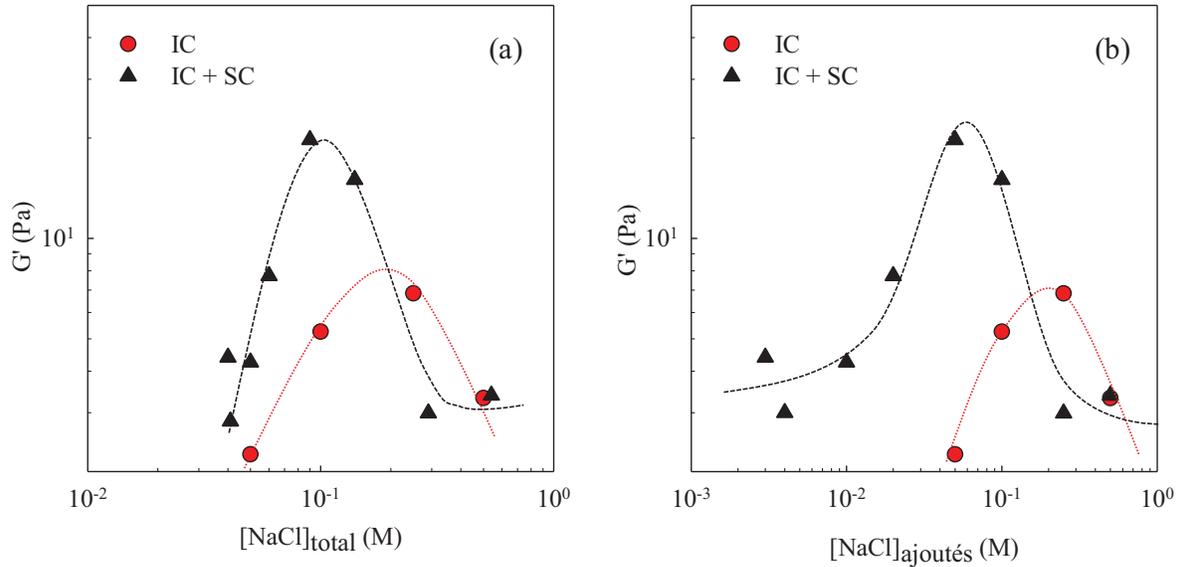


Figure VI. 15: Modules de conservation à 2°C et à 1 Hz en fonction de la concentration totale en NaCl (a) et de la concentration ajoutée en NaCl (b) pour le IC pur (cercles) et du mélange SC 60g/L et IC 2g/L (triangles).

Les modules élastiques des systèmes mixtes IC/SC ou de IC pur augmentent avec l'augmentation de la concentration de NaCl jusqu'à un maximum, puis diminuent (figure VI. 15). On note également qu'à faible concentration en NaCl, les systèmes mixtes ont des modules à 2°C et à 1 Hz légèrement supérieurs aux modules des gels de IC pur. En présence de NaCl, les protéines influencent peu les modules des gels de IC contrairement aux gels de KC. Ces résultats confirment ceux de Lynch et al. qui montrent qu'en absence de calcium, l'ajout de SC modifie peu les propriétés rhéologiques des gels de IC (Lynch and Mulvihill, 1996)

Puisque NaCl et KCl agissent de la même manière sur le gel de IC, on suppose qu'en présence de KCl, nous aurons aussi un effet similaire des protéines sur le gel de IC.

Des auteurs ont montré la présence d'un gel mixte pour le système lait/carraghénane. La présence de micelles de caséines induit une augmentation très sensible des températures critiques de gélification et des modules de conservation G' des gels. Selon la concentration de

IC, différents types de réseaux ont été mis en évidence dans le gel. A 0.2% de IC, ils observent 2 réseaux : un réseau similaire au gel de IC pur et un autre réseau impliquant probablement des ponts entre micelles de caséines et hélices de IC (Langendorff et al., 1999; Langendorff, Cuvelier, Launay and Parker, 1997) .

VI.4. Conclusion

L'étude des solutions de IC pur a montré qu'il y a pas de différence entre NaCl et KCl sur les comportements rhéologiques de IC. Les températures critiques dépendent de la concentration de IC à travers les ions présents dans le IC. La comparaison entre le IC et le KC montre qu'en présence de NaCl, le IC forme un gel à 2°C contrairement à KC qui forme une solution visco-élastique. En présence de KCl, les deux solutions forment un gel à 2°C et les modules élastiques de KC sont 10^3 fois supérieurs aux modules élastiques de IC.

La comparaison entre KC et IC dans le système mixte montre que :

- La séparation de phase est déplacée vers les hautes concentrations de SC en présence de IC. Il n'y a pas de phénomène d'agrégation dans le système mixte SC/IC, parce que le IC a une densité de charges plus élevée.
- Le système SC/IC forme un gel mixte à $T < T_c$ avec un module élastique 100 fois plus faible que le module élastique du gel mixte SC/KC. Ce gel contient deux types de liaisons : des liaisons mixtes IC-SC et des liaisons purement IC-IC. La fonte du gel mixte SC/IC n'est pas détectée en rhéologie car dans nos conditions expérimentales le gel mixte fond à des températures critiques inférieures au gel de IC pur. Les caséinates de sodium influencent peu les modules élastiques à 2°C et les températures critiques. On n'observe pas d'hystérèse pour la solution de IC en présence ou en absence de caséinates de sodium.

Références bibliographiques

Langendorff, V., Cuvelier, G., Launay, B., Michon, C., Parker, A. & De Kruif, C. G. (1999), Casein micelle/iota carrageenan interactions in milk: influence of temperature, *Food Hydrocolloids*, **13**, 211-218.

Langendorff, V., Cuvelier, G., Launay, B. & Parker, A. (1997), Gelation and flocculation of casein micelle/carrageenan mixtures, *Food Hydrocolloids*, **11**, 35-40.

Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Parker, A. & De Kruif, C. G. (2000), Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures, *Food Hydrocolloids*, **14**, 273-280.

Lynch, M. G. & Mulvihill, D. M. (1996), Rheology of ι -carrageenan gels containing caseins, *Food Hydrocolloids*, **10**, 151-157.

Meunier, V., Nicolai, T., Durand, D. & Parker, A. (1999), Light Scattering and Viscoelasticity of Aggregating and Gelling κ -carrageenan, *Macromolecules*, **32**, 2610-2616.

Michon, C., Cuvelier, G., Launay, B. & Parker, A. (1996b), Concentration dependence of the properties of gelatin and iota-carrageenan systems at the gel point, *Journal De Chimie Physique et Physico-Chimie Biologie*, **93**, 819-827.

Morris, V. J. & Belton, P. S. (1980), SPECIFIC ION EFFECTS IN IOTA-CARRAGEENATE GELS, *Journal of the Chemical Society*, **20**, 983-984.

Morris, V. J. & Chilvers, G. R. (1981), RHEOLOGICAL STUDIES ON SPECIFIC ION FORMS OF IOTA-CARRAGEENATE GELS, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **32**, 1235-1241.

Nilsson, S. & Piculell, L. (1991), HELIX-COIL TRANSITIONS OF IONIC POLYSACCHARIDES ANALYZED WITHIN THE POISSON-BOLTZMANN CELL MODEL .4. EFFECTS OF SITE-SPECIFIC COUNTERION BINDING, *Macromolecules*, **24**, 3804-3811.

Parker, A., Brigand, G., Miniou, C., Trespoey, A. & Vallée, P. (1993), Rheology and fracture of mixed ι - and κ -carrageenan gels: Two-step gelation, *Carbohydrate Polymers*, **20**, 253-262.

Piculell, L. (1991), Effects of ions on the disorder-order transitions of gel-forming polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, **5**, 57-69.

Piculell, L., Nilsson, S. & Muhrbeck, P. (1992), EFFECTS OF SMALL AMOUNTS OF KAPPA-CARRAGEENAN ON THE RHEOLOGY OF AQUEOUS IOTA-CARRAGEENAN, *Carbohydrate Polymers*, **18**, 199-208.

Piculell, L., Nilsson, S. & Ström, P. (1989), On the specificity of the binding of cations to carrageenans: Counterion N.M.R. spectroscopy in mixed carrageenan systems, *Carbohydrate Research*, **188**, 121-135.

Rochas, C., Rinaudo, M. & Landry, S. (1989), Relation between the molecular structure and the mechanical properties of carrageenan gels, *Carbohydrate Polymers*, **10**, 117-127.

Rochas, C., Rinaudo, M. & Landry, S. (1990), Role of the molecular weight on the mechanical properties of kappa carrageenan gels, *Carbohydrate Polymers*, **12**, 255-266.

Thrimawithana, T. R., S. Young, S., Dunstan, D. E. & Alany, R. G. (2010), Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions, *Carbohydrate Chemistry*, **82**, 69-77.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse consistait à comprendre les mécanismes qui contrôlent la structure et les propriétés rhéologiques des systèmes mixtes caséinates/carraghénane grâce à l'étude de l'influence de différents paramètres tels que la force ionique, le pH, la concentration en biopolymères et la nature du sel.

Pour ce faire, des études expérimentales ont été réalisées principalement en rhéologie, en microscopie confocale à balayage laser et en diffusion de la lumière en milieu turbide. Afin de comprendre les interactions mises en jeu dans les systèmes mixtes, nous avons comparé leurs comportements à ceux des systèmes purs, les caséinates d'une part et les carraghénanes d'autre part.

Dans un premier temps, nous avons étudié les mélanges caséinates de sodium/kappa carraghénane. Le diagramme de phase présente 2 domaines : un domaine monophasique aux faibles concentrations en caséinates de sodium et en kappa carraghénane et un domaine biphasique dû à une incompatibilité thermodynamique aux hautes concentrations en protéines. Dans les 2 domaines, nous observons également la présence d'agrégats irréversibles riches en protéines et pauvres en kappa carraghénane dont la taille et la masse molaire dépendent de la concentration en caséinates de sodium et en kappa carraghénane. Avec le temps, ces agrégats flocculent et précipitent, mais peuvent être redispersés en solution par chauffage et agitation. Ces agrégats influencent la viscosité du mélange. La teneur en caséinates de sodium dans les agrégats dépend de la concentration en kappa carraghénane, de la force ionique et du pH, mais ne dépend pas de la concentration en caséinates de sodium.

Ensuite, nous avons étudié la gélification des mélanges monophasiques caséinates de sodium/kappa carraghénane. En présence d'un sel non spécifique du kappa carraghénane (NaCl), les protéines n'influencent pas la température critique de gélification, mais augmente la température critique de fonte ainsi que le module élastique des gels mixtes.

Ces résultats ont été attribués à la présence d'un gel mixte. Ce gel mixte contient deux types de liaisons : des liaisons purement KC/KC et des liaisons KC/SC. L'importance relative des deux types de liaisons dépend de la concentration en caséinates de sodium.

En présence d'un ion spécifique du kappa carraghénane, KCl, et en excès de protéines, on forme le gel mixte. A faible concentration en KCl, la température de gélification dépend des sels apportés par la poudre de protéines tandis que la température de fonte et le module élastique dépendent des liaisons KC/SC. En excès de KCl, les températures critiques et les modules élastiques dépendent essentiellement des liaisons KC/KC.

En présence d'un sel qui bloque la gélification de kappa carraghénane, NaI, on n'observe pas de gel, mais un liquide viscoélastique. Dans ces conditions, les caséinates de sodium augmentent fortement la viscosité du système puisqu'ils s'associent aux hélices de kappa carraghénane, ce qui se manifeste par le ralentissement de la relaxation.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé les caséinates de sodium et les submicelles de caséines parce que les submicelles de caséines sont très utilisées dans la fabrication de certains produits laitiers. Nous avons montré que si la morphologie des mélanges, l'agrégation, les modules élastiques à 2°C et les températures critiques de fonte sont très voisins pour les deux systèmes mixtes, les températures critiques de gélification qui sont toujours inférieures pour les systèmes mixtes avec submicelles de caséines. Ceci s'explique par le fait que la température critique de gélification dépend essentiellement de la nature et de la concentration du sel dans le mélange alors que la température critique de fonte est associée à la cassure des liaisons SC/KC.

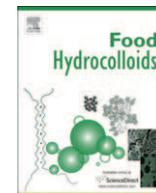
Enfin, nous avons comparé le iota carraghénane et le kappa carraghénane dans les mélanges car le iota carraghénane est également beaucoup utilisé dans l'industrie alimentaire. Les systèmes mixtes avec le iota carraghénane conduisent à une séparation de phase ségrégative pour des concentrations plus hautes que pour le kappa carraghénane. Il n'y a pas d'agrégation entre les caséinates de sodium et le iota carraghénane car le iota carraghénane est plus électronégatif que le kappa carraghénane. Le mélange caséinate de sodium/iota carraghénane forme également un gel mixte pendant le refroidissement, mais sa fonte n'est pas détectée en rhéologie car dans nos conditions expérimentales le gel mixte fond à des températures

critiques inférieures au gel de IC pur. Les caséinates de sodium influencent faiblement les modules élastiques à 2°C et les températures critiques. On n'observe pas d'hystérèse avec le iota carraghénane.

Le comportement du gel mixte caséinate de sodium/iota carraghénane est identique à celui du gel caséinate de sodium/kappa carraghénane : les liaisons caséinates de sodium/carraghénane domine à faible concentration en sel, mais à haute concentration en sel, ce sont les liaisons carraghénane/carraghénane qui gouvernent le système mixte. Cependant, le module du gel mixte induit par le iota carraghénane est 100 fois inférieur au module du gel induit par le kappa carraghénane.

Les mélanges kappa carraghénane/iota carraghénane étant généralement utilisés dans les produits laitiers, il serait intéressant par la suite d'étudier les propriétés structurales et rhéologiques de ces mélanges, puis leurs propriétés physico-chimiques en présence de caséinates de sodium en fonction de la force ionique, du pH, des concentrations en biopolymères et du rapport iota/kappa.

Annexe



Cluster formation and phase separation in mixtures of sodium κ -carrageenan and sodium caseinate

Merveille Nono, Lucie Lalouette, Dominique Durand, Taco Nicolai*

Polymères, Colloïdes, Interfaces, UMR-CNRS, Université du Maine, 72085 Le Mans Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2010

Accepted 23 August 2010

Keywords:

Casein

Carrageenan

Phase separation

Protein

Polysaccharide

ABSTRACT

Mixtures of the polysaccharide κ -carrageenan (KC) and caseinate proteins (SC) from milk were investigated at pH 7 in aqueous solution using confocal scanning laser microscopy and light scattering. Phase separation was observed at higher concentrations and the phase diagram was established. In the mixtures SC was observed to form large aggregates mediated by a relatively small amount of KC. At small KC concentrations the aggregates were initially relatively small and could be characterized by light scattering. At higher KC concentrations or on longer storage at 20 °C, dense clusters with a radius of a few microns were formed that slowly precipitated. The fraction of precipitated protein increased linearly with increasing KC concentration, but was independent of the protein concentration. It increased with decreasing pH from about 20% at pH 8 to 100% at pH 5.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

κ -Carrageenan (KC) is an anionic polysaccharide which is widely used to improve textural properties of dairy products. In order to control these properties it is important to understand the interaction of KC with milk proteins, notably casein. Casein is the main protein component of milk and consists mainly of four different kinds of amino acid chains (α ₁, α ₂, β and κ) each with a molar mass of approximately 2×10^4 g/mol (Fox, 2003). In milk, casein is present in the form of spherical complexes called micelles with a radius of about 100 nm containing so-called colloidal calcium phosphate (CCP) which is necessary for its integrity. Casein precipitates at pH 4 and the CCP dissolves. The precipitated casein can be redissolved in the form of sodium caseinate (SC) free of CPP by raising the pH with NaOH. SC forms small particles with a radius of about 11 nm and consists of approximately 15 casein molecules at 20 °C, increasing somewhat with increasing temperature (HadjSadok, Pitkowski, Benyahia, Nicolai, & Moulai-Mostefa, 2007).

κ -Carrageenan is one of a family of sulphonated polysaccharides extracted from seaweed (Piculell, 2006). In aqueous solution, KC has a random coil conformation at high temperatures, but a transition to a helix conformation occurs after cooling below a critical temperature. The transition temperature increases with increasing

salt concentration and is strongly dependent on the type of ions. Generally, in the helix conformation KC aggregates and forms a gel. Sodium is not very effective and induces gelation at room temperature only above 0.2 M, whereas potassium is very effective as 0.01 M causes gelation at room temperature (Rochas & Rinaudo, 1980). When gels are heated, they melt and the KC chains go back to the random coil conformation, but this occurs at a significantly higher temperature.

Mixtures of KC and casein have been investigated extensively, motivated in part by their application in the food industry. Most often, the interaction of KC with native casein micelles has been studied both in milk (Arltoft, Ipsen, Madsen, & De Vries, 2007; Drohan, Tziboula, McNulty, & Horne, 1997; Hemar, Hall, Munro, & Singh, 2002; Ji, Corredig, & Goff, 2008; Langendorff et al., 2000; Puvanenthiran, Goddard, McKinnon, & Augustin, 2003; Rodd, Davis, Dunstan, Forrest, & Boger, 2000; Trckova, Stetina, & Kansky, 2004) and in salt solutions (Bourriot, Garnier, & Doublier, 1999; Dalgleish & Morris, 1988; Schorsch, Jones, & Norton, 2000). Light scattering and electron microscopy showed that KC in the helical conformation binds to casein and may bridge different casein micelles (Dalgleish & Morris, 1988; Langendorff et al., 2000; Martin, Goff, Smith, & Dalgleish, 2006; Schorsch et al., 2000; Spagnuolo, Dalgleish, Goff, & Morris, 2005). Casein micelles crosslinked by bridging KC may form a system spanning network. Often an increase of the storage shear modulus (G') is reported after addition of casein at KC concentrations (C_{KC}) larger than 1 g/L (Hemar et al., 2002; Puvanenthiran et al., 2003; Trckova et al., 2004), but Drohan et al. (1997) observed little effect. At very low KC concentrations

* Corresponding author.

E-mail address: taco.nicolai@univ-lemans.fr (T. Nicolai).

(0.2 g/L), Drohan et al. found that the presence of casein micelles could inhibit gelation of KC, while Schorsch et al. (2000) found that it reinforced the gel. The latter observed that gelation was induced by addition of casein to dilute KC solutions (0.2 g/L) that did not gel in the absence of casein.

Strong heterogeneity was observed in gelled systems, perhaps due to partial phase separation frozen-in by gelation (Artoft et al., 2007; Bourriot et al., 1999; Hemar et al., 2002; Schorsch et al., 2000). Phase separation between casein and KC can be expected since proteins and polysaccharides are thermodynamically incompatible unless they are oppositely charged (Semenova & Dickinson, 2010; Tolstoguzov, 2003). If they have the same net charge, which is the case for KC and casein at $\text{pH} > 5$, segregative phase separation is the rule rather than the exception. Gels were not observed when KC had the random coil conformation, but at high concentrations macroscopic phase separation was observed (Bourriot et al., 1999; Langendorff et al., 2000; Schorsch et al., 2000). Depletion flocculation was suggested as the driving force for phase separation in addition to thermodynamic incompatibility. It is well established that in order to induce co-aggregation and gelation of KC/casein mixtures, KC needs to have a helix conformation. It is not entirely clear, however, whether KC in the helical conformation binds to casein micelles.

Interaction of KC with individual casein molecules or SC has been much less studied. It has been known for quite some time that in the absence of calcium ions KC co-aggregates with κ -casein, but not with α_1 - and β -casein (Payens, 1972; Snoeren, Both, & Schmidt, 1976; Snoeren, Payens, Jeunink, & Both, 1975) even at values of the pH where the net charge of both polymers is negative. It was suggested that κ -casein chains contain a distinct positively charged section that can bind the negatively charged KC. Lynch et al. (Lynch & Mulvihill, 1994) found almost no effect on G' for KC gels after adding SC, while Hemar et al. (2002) reported an increase with increasing SC concentration. Oakenfull, Miyoshi, Nishinari, and Scott (1999) observed a decrease of G' when small amounts of SC ($C_{SC} < 5$ g/L) were present and an increase at higher SC concentrations. Macroscopic phase separation has so far not been reported for mixtures of KC and individual caseins or SC, but Hemar et al. (2002) observed with confocal laser scanning microscopy (CLSM) heterogeneity on length scales of several microns in mixed gels.

The KC solutions used in these earlier studies on mixtures with SC contained ions (K^+ , Ca^{2+}) that induced the coil–helix transition and gelation of KC. For the present study we used KC with sodium counter-ions. We present the results of our investigation in two parts. Elsewhere, we discuss the influence of caseinate on the gelation of KC after it has undergone a coil–helix transition (Nono, Nicolai, & Durand, 2011). Here we will discuss the behaviour SC/KC mixtures at conditions where KC has a random coil conformation.

2. Materials and methods

The sodium caseinate powder, provided by DMV International (Veghel, Netherlands), was dissolved in deionised water (Millipore) containing 3 mM sodium azide as a bacteriostatic agent. The pH was adjusted by slow addition of 0.01 M HCl or 0.01 M NaOH under continuous stirring and was set at 7 unless otherwise indicated. About 100 mL solution was dialysed against about 4 L solvent for a period of 24 h renewing the solvent several times. The solution was then centrifuged (Beckman Coulter, Allegra 64R Centrifuge) at 6×10^4 g for 2 h after which we observed a sediment at the bottom, a turbid layer at the top, and a clear supernatant in the middle. After removal of the turbid layer the clear supernatant was collected and filtered through 0.45 μm pore size filters. The SC concentration (C_{SC}) was determined after filtration using UV absorption with an extinction coefficient of 0.81 $\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$. The amount of protein that

was eliminated by this purification method is less than 5%. The residual amount of calcium in the sample was less than 0.01% (w/w).

The sodium κ -carrageenan used for this study is an alkali treated extract from *Eucheuma cottonii* and was a gift from SKW Biosystems (Baupte, France). Using NMR it was found that the sample contained less than 5% ι -carrageenan (Meunier, 1999). A freeze-dried sample of KC was dissolved by stirring for a few hours in Milli-Q water (70 °C) with 3 mM sodium azide added as a bacteriostatic agent. The solution was extensively dialysed against Milli-Q water at pH7 and subsequently filtered through 0.45 μm pore size Anatop filters. The KC concentration (C_{KC}) was determined by measuring the refractive index using refractive index increment 0.145 g/mL. The weight average molar mass was determined by light scattering using the methodology described elsewhere (Meunier, Nicolai, Durand, & Parker, 1999): $M_w = 2.1 \times 10^5$ g/mol.

Confocal laser scanning microscopy was used in the fluorescence mode. Observations were made with a Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems Heidelberg, Germany). A water immersion objective lens was used HCx PL APO 63 \times NA = 1.2 with theoretical resolution 0.3 μm in the x–y plane. SC was labelled with the fluorochrome rhodamine B isothiocyanate (Rho), by adding a small amount of a concentrated rhodamine solution to the SC solutions before heat treatment. Rho was excited using a helium–neon laser with wavelength 543 nm and the fluorescence was detected with a photomultiplier. Care was taken not to saturate the fluorescence signal and it was verified that the amplitude of the signal was proportional to the polymer concentration in pure solutions.

Light scattering measurements were done at 20 °C using a so-called 3D cross-correlation instrument (LS Instruments, Fribourg, Switzerland). The light source was a diode laser with wavelength $\lambda = 680$ nm. The temperature was controlled by a thermostat bath to within ± 0.1 °C. The relative excess scattering intensity (I_r) was calculated as the intensity minus the solvent scattering divided by the scattering intensity of toluene. In dilute solutions I_r is related to the weight average molar mass (M_w) and the structure factor ($S(q)$) of the solute (Brown, 1996; Nicolai, 2007a):

$$I_r = KCM_w S(q) \quad (1)$$

with K a constant that depends on the refractive index increment of the solute. The z-average radius of gyration (R_{gz}) can be calculated from the initial q-dependence of $S(q)$:

$$S(q) = \left[1 + (q \cdot R_{gz})^2 / 3 \right]^{-1} \quad (2)$$

3. Results and discussion

The behaviour of KC/SC mixtures was studied at pH7 in the absence of added salt and in 0.1 M NaCl. Pure KC solutions were transparent over the whole concentration range investigated ($C_{KC} = 0$ –15 g/L). The viscosity at 20 °C increased strongly above the overlap concentration ($C^* \approx 0.5$ g/L) in a manner expected for flexible polymers as was reported in detail elsewhere (Croguennoc, Meunier, Durand, & Nicolai, 2000). Pure SC solutions at the same conditions were transparent at low concentrations, but they were weakly opalescent at concentration above 10 g/L, because they contained a very small weight fraction of large particles that could not be completely removed by centrifugation and filtration (HadjSadok et al., 2007). The viscosity of SC solutions was low for $C_{SC} < 100$ g/L, but increased rapidly at higher concentrations (Pitkowski, Nicolai, & Durand, 2007).

Mixtures of KC and SC solutions were prepared containing KC up to 15 g/L and SC up to 100 g/L. The solutions were thoroughly mixed at 60 °C for 5 min after which they were observed by CLSM at 20 °C. Images taken immediately after cooling are shown in Fig. 1. Repeating the measurement with different mixing protocols (manual or vortex) or longer heating gave the same results. At high concentrations of KC and SC the systems phase separated. The protein rich phase formed the continuous phase at relatively high SC concentrations, while at relatively high KC concentrations the inverse was found. At intermediate concentrations bicontinuous phase separation was observed. With time the systems coarsened and macroscopic phase separation occurred after some time with a KC rich top phase and SC rich bottom phase. Macroscopic phase separation was fast when a bicontinuous phase structure was formed initially. This is illustrated in Fig. 2 where a time series is shown of the phase separation at $C_{SC} = 40$ g/L and $C_{KC} = 3$ g/L. In some images in Figs. 1 and 2 protein rich phases surrounded by protein poor phases and the inverse can be observed in the same image. At high SC or KC concentrations the systems were viscous and macroscopic phase separation was very slow. In some cases gelation was observed while standing at 20 °C, but moderate heating (40 °C) was enough to melt the gels. An investigation of the relation of SC/KC mixtures will be reported elsewhere.

At $C_{KC} = 3$ g/L or lower the transition from a homogeneous mixture to a phase separating mixture is well defined at a critical SC concentration. However, at higher KC concentrations, dense protein clusters with a radius of a few microns could be seen in the CLSM images, see Fig. 3, even at SC concentrations as low as 0.5 g/L. The formation of these clusters should not be confused with the protein rich domains formed in the initial stages of the phase separation. Cluster formation was observed both in mixtures that phase separated and in mixtures that remained homogeneous. The mechanism that drives formation of clusters is thus different from the one that drives segregative phase separation. As will be shown below the clusters can be removed from the solution by centrifugation and they are stable against dilution in water. The amount of clusters increased with increasing KC concentration and decreasing pH, but their size remained approximately the same. The clusters were formed by aggregation of SC probably involving some KC as will be discussed in more detail below. The presence of a large

amount of these clusters at higher KC concentrations makes it more difficult to determine the critical SC concentration where phase separation occurs. Before discussing in more detail the phase separation driven by thermodynamic incompatibility we will first investigate the aggregation of SC induced by KC.

3.1. Cluster formation

Above about 3 g/L of carrageenan, large clusters were formed immediately and could be visualized with CLSM see Fig. 3a. With increasing storage time more clusters were formed and they were formed also at lower KC concentrations. The clusters associated into larger flocs without merging and precipitated slowly, see Fig. 3b. When the system phase separated macroscopically we observed the clusters only in the protein poor top phase. Flocculated clusters precipitated on top of the protein rich bottom phase, but did not merge with this phase. In Fig. 3c the protein rich phase is present in the form of spherical domains that are larger than the clusters. With time the clusters associated into larger flocs and even stuck to the protein rich phase without merging with each other or with the protein rich phase, see Fig. 3d. The clusters could be easily redispersed by shaking, but they did not disintegrate after dilution in water implying that the bonds in the clusters were strong. This observation implies that while the bonds within the clusters are strong, the ones between the clusters are relatively weak.

The fraction of SC that formed clusters (F) was determined for systems that did not phase separate. The clusters were precipitated by centrifugation and the SC concentration of the supernatant was determined by UV adsorption. The fraction of proteins that precipitated increased with time, but stabilized a few days after preparation of the mixtures. Remarkably, F increased linearly with increasing KC concentration, see Fig. 4a, but showed no systematic dependence on the SC concentration. This can be explained if it is assumed that the small micellar particles formed by SC do not have the same composition of the different types of casein molecules. The tendency of the particles to form clusters at a given KC concentration could vary depending on their composition. If the composition varies continuously, the fraction of SC particles that aggregates will increase continuously. A similar observation was reported earlier for the precipitation of SC upon addition of calcium

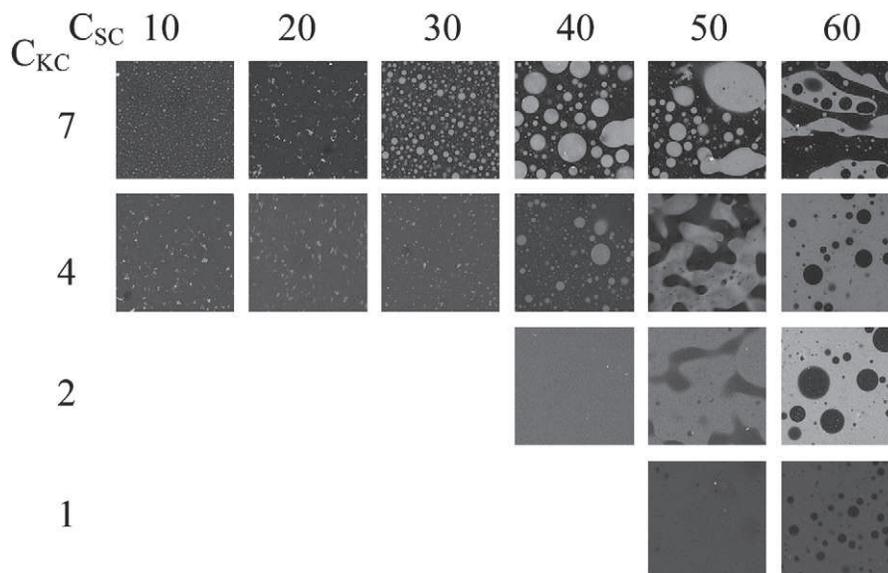


Fig. 1. CLSM images of SC/KC mixtures at 0.1 M NaCl at concentrations (g/L) indicated in the figure. The samples were mixed and heated at 60 °C for 5 min and observed immediately at 20 °C. The light areas are rich in protein. The images represent $160 \times 160 \mu\text{m}$.

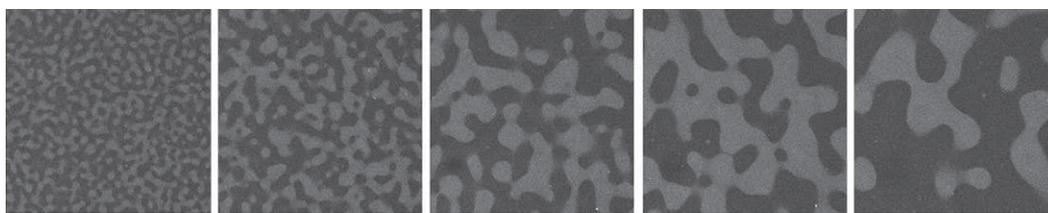


Fig. 2. CLSM images of a mixture at $C_{SC} = 40$ g/L and $C_{KC} = 3$ g/L during phase separation. The evolution of the system from left to right took less than 1 min. The light areas are rich in protein. The images represent 160×160 μm .

ions (Pitkowski, Nicolai, & Durand, 2009). In this case the fraction of SC that precipitated increased continuously with the CaCl_2 concentration, independent of the SC concentrations.

We deduced from viscosity measurements that the fraction of KC involved in the formation of the clusters was very small. The viscosity of the mixtures was dominated by the contribution of KC once the complexes are removed and is a strong function of C_{KC} . We found no significant decrease of the viscosity of the supernatant even if more than 50% of the SC was precipitated. From this observation we may conclude that less than 5% KC precipitated.

As mentioned in the introduction, cross-linking between individual caseins and KC has been reported before, but it was found to be limited to κ -casein in the absence of Ca^{2+} . It was suggested that bonds were formed between positively charged groups on the net negative SC chains and the sulphate groups of the KC chains. To investigate whether electrostatic interactions were important we repeated the measurement without added salt. In this case clusters appeared more slowly and F was slightly smaller, but it was still proportional to C_{KC} independent of C_{SC} , see Fig. 4a. With increasing NaCl concentration the amount of precipitated proteins increased, but it dropped abruptly above 0.2 M NaCl, see Fig. 4b. Repeated measurements showed that the peculiar response at this salt concentration dependence was reproducible. A similar abrupt decrease above 0.2 M NaCl was reported for mixtures of κ -casein and KC by Snoeren et al. (1975) who attributed it to strong screening of electrostatic interactions. The fraction of SC in the clusters varied weakly with the pH between 7 and 9, but it increased strongly at lower pH until at pH 5 almost all proteins precipitated, see Fig. 4c. We note that in the absence of KC no protein precipitated at these conditions.

The reported observation that cross-linking was limited to κ -casein appears in contradiction to the present finding that more than half of the SC could be involved in the aggregation, while κ -casein represents only about 10% of casein. However, SC is present in the form of small agglomerates of about 15 casein molecules. It is possible that KC cross-links these SC particles by forming bonds exclusively with κ -casein without breaking them up. A single KC chain could bridge between several SC particles in this way, which would explain why only relatively little KC is involved.

A further assumption that the SC particles contain varying amounts of KC, could explain the increase of F with increasing KC concentration.

3.2. Aggregate structure

At low KC and SC concentrations the turbidity of the mixtures was small so that they could be investigated using light scattering. We verified that the effect of multiple scattering was negligible. As was shown elsewhere, pure SC contained particles with a radius close to 60 nm (HadjSadok et al., 2007). Their weight fraction is very small, but their contribution to the scattering intensity remains significant even after centrifugation and filtration. In all cases the contribution from these spurious particles to the scattering intensity was subtracted. The scattering intensity of pure KC solutions was negligible compared to that of pure SC solutions at all concentrations used in the mixtures.

Immediately after mixing the scattering intensity increased rapidly with time, but after about an hour or so the increase became slow and was insignificant for the duration of the experiment. Fig. 5 shows the q -dependence of I_r/KC for mixtures containing 1.5 g/L SC and 1, 2 and 3 g/L KC. Both the scattering intensity and the q -dependence increased with increasing amount of KC. We have seen a significant increase of the scattering even when adding as little as 0.1 g/L KC. The data could be fitted to a relatively simple equation: $I_r/KC = M_a/(1 + q^2 \cdot R_a^2/3)$, where M_a and R_a represent an apparent molar mass and radius that are equal to the weight average molar mass (M_w) and the z -average radius of gyration (R_{gz}) of the aggregates if interactions are negligible. Aggregates formed by a variety of proteins have been found to be well described by this equation (Nicolai, 2007b).

The solutions were measured again 24 h later, see Fig. 5b. Only a small increase of the aggregate size was found at 1 and 2 g/L KC. However, the solution with 3 g/L KC now showed power law dependence over the whole q -range with a slope of -2 . Measurements after 48 h gave very similar results. CLSM showed that clusters with a diameter of a few microns had formed in this solution. The power law dependence indicates that the clusters have a self similar structure. From the slope the so-called fractal

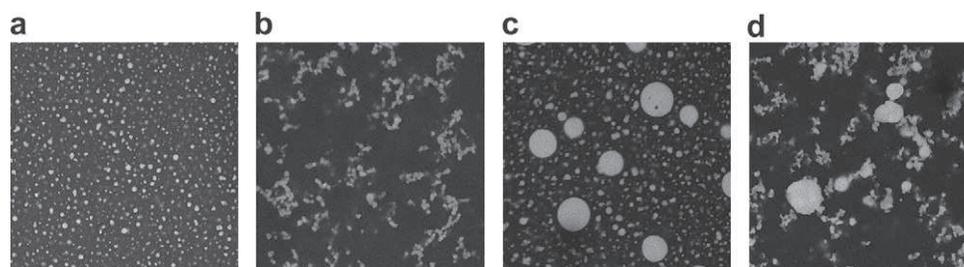


Fig. 3. CLSM images of clusters in homogeneous (a, b: 20 g/L SC, 9 g/L KC) and phase separating mixtures (c, d: 20 g/L SC, 11 g/L KC) shortly after mixing (a, c) and 24 h later (b, d). The light areas are rich in protein. The images represent 160×160 μm .

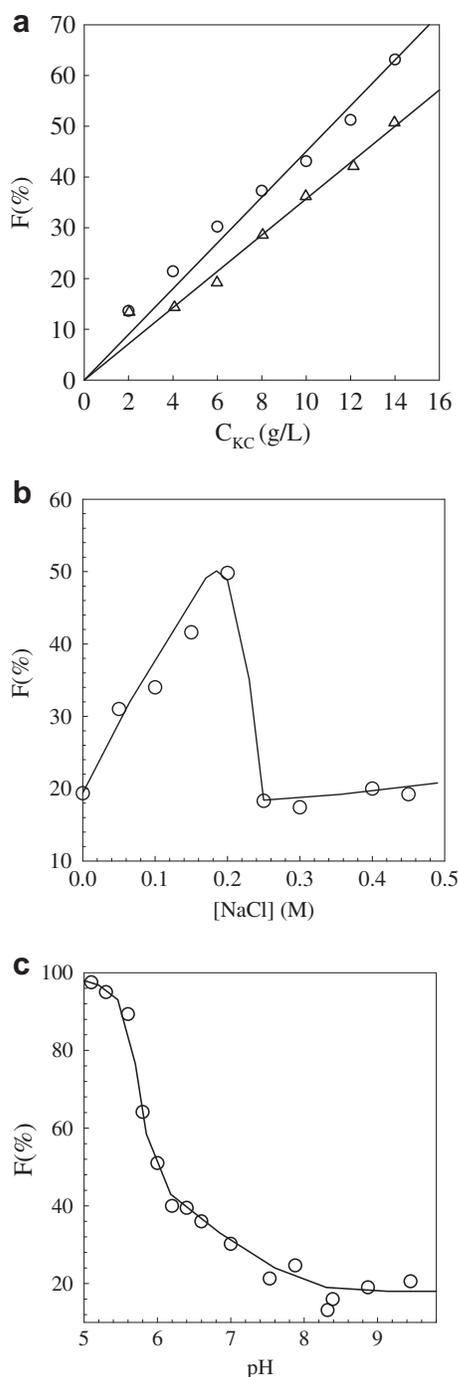


Fig. 4. (a) Fraction of precipitated SC (F) as a function of the KC concentration in mixtures at pH 7 without added salt (triangles) and at 0.1 M NaCl (circles). The SC concentration was 10 g/L. (b) Fraction of precipitated SC as a function of the NaCl concentration in mixtures at pH 7 with $C_{SC} = 10$ g/L and $C_{KC} = 6$ g/L. (c) Fraction of precipitated SC as a function of the pH in mixtures at 0.1 M NaCl with $C_{SC} = 10$ g/L and $C_{KC} = 6$ g/L.

dimension (d_f) could be derived: $I_r \propto q^{-d_f}$, yielding $d_f = 2$. These large clusters were formed rapidly after mixing if they contained 5 g/L or more KC (results not shown). We have some indication from CLSM measurements that the density of the clusters increases with increasing KC concentration.

The measurements were repeated after dilution with KC free solvent. They showed a weak increase of I_r/KC implying that the aggregates were connected by strong bonds and that the effect of

interaction between the aggregates on I_r was small for these mixtures. Similar measurements were done at $C_{SC} = 0.5$ g/L, 3 g/L and 10 g/L. In each case aggregates were formed in the mixtures with an average size that increased with increasing KC concentration, but varied little with the protein concentration. The average radius of gyration can be calculated using eq. (2). We found $R_{gz} = 80$ –90 nm at $C_{KC} = 1$ g/L and $R_{gz} = 110$ –150 nm at $C_{KC} = 2$ g/L. For the calculation of M_w one needs to know the refractive index increment and the concentration of the aggregates. We ignore the relatively small contribution of KC and use the refractive index increment of the proteins (0.185 L/g). A lower estimate of M_w can be obtained by assuming that all caseinate aggregated: $M_w = 2$ – 3×10^6 g/mol at $C_{KC} = 1$ g/L and $M_w = 6$ – 8×10^6 g/mol at $C_{KC} = 2$ g/L. If the true aggregate concentration is smaller, then M_w is larger. Notice that the molar mass of individual caseinate particles is about 10^5 g/mol (Hadjsadok et al., 2007).

Whatever is the exact mechanism that drives KC mediated aggregation of the SC particles, the process itself appears to be initially a random aggregation process leading to self similar structures. A similar aggregation process has also been observed for aggregates of SC particles that were formed after removing CCP from native casein by adding polyphosphate (Panouillé, Durand, Nicolai, Larquet, & Boisset, 2005). A fraction of the aggregates transforms more or less rapidly into dense clusters with a radius of a few μm , especially at higher KC concentrations. However, self similar aggregates were always still observed in light scattering experiments after removal of the dense clusters by centrifugation.

3.3. Phase diagram

We investigated the composition of the two phases for mixtures after complete phase separation. Flocculated clusters precipitated from the KC rich top phase and accumulated at the interface between the two phases. We verified with CLSM that the phases were homogeneous. The SC concentration of each phase was determined by UV absorbance, while the KC concentration was determined by rheology. The viscosity of the top phase was dominated by the contribution of KC, while that of the bottom phase was dominated by that of SC. By comparing the viscosity of the top phase with that of pure KC solutions it was found that almost all KC was present in the top phase. The phase diagram shown in Fig. 6a was established on the basis of these measurements and CLSM observations. The dotted line in Fig. 6a indicates where the volume fractions are approximately equal. At higher KC concentrations phase separation occurs above about 10 g/L caseinate, while at higher caseinate concentrations very little KC (<0.1 g/L) is needed to induce phase separation.

As mentioned above, a difficulty for the establishment of the phase diagram is that a significant fraction of SC aggregates and precipitates in the form of large flocs. This means that the effective SC concentration in the mixtures is lower. However, tie lines can be drawn properly if one considers the concentration of only soluble SC. The tie lines are approximately parallel to each other, except at high initial SC concentrations ($C_{SC} > 80$ g/L) which led to more horizontal tie lines. CLSM showed that in these cases phase separation was not complete after centrifugation. It is important to realize that only the caseinate that is not involved in large clusters contributes. This means that at higher KC concentrations up to twice as much caseinate is needed to induce phase separation than indicated by the binodal, because up to half of the caseinate is removed from the solution in the form of clusters.

In the absence of added salt similar features were observed by CLSM results not shown. However, the phase boundary shifted to higher SC concentrations, see Fig. 6b. A few tests were done in the

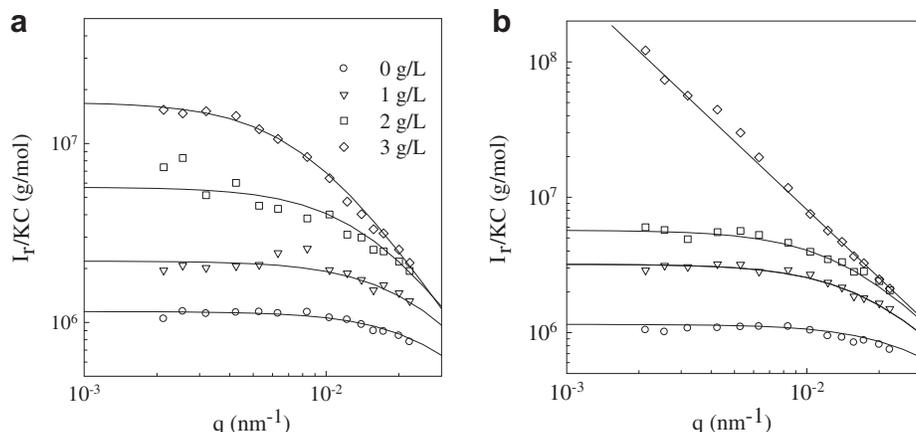


Fig. 5. Dependence of I_r/KC on the scattering wave vector for mixtures containing 1.5 g/L SC and varying amounts of KC indicated in the figure. Fig. 5a shows the results a few hours after preparation, while Fig. 5b shows the results after 24 h. The straight line in Fig. 5b has slope -2 .

presence of 0.1 M KCl, because K^+ is a widely used cation to induce the coil–helix of KC at low concentrations. Mixtures were prepared at 60 °C, i.e. above the transition temperature. No significant difference was observed between mixtures containing 0.1 M NaCl or 0.1 M KCl.

As far as we know phase separation in mixtures of KC and SC has not been reported earlier, but it has already been reported for mixtures of KC in the helical conformation and native casein micelles (Bourriot et al., 1999; Langendorff et al., 2000; Schorsch et al., 2000). For this system a few gram per litre of KC was needed to induce phase separation even at high casein concentrations, while the critical casein concentration at large C_{KC} was very small. Phase separation was attributed to depletion of free KC chains between the casein micelles, but thermodynamic incompatibility could very well be the main driving force. No precipitation was observed implying that KC did not bridge between casein micelles, which would lead to aggregation. It was not clear whether the absence of bridging is because KC does not adhere to casein micelles in the coil conformation or because KC completely covers the surface. Complete coverage of the casein micelles with KC would render them compatible with excess free KC and in this case only depletion would remain as a possible cause of the observed

phase separation. Incompatibility due to the different chemical structure of the two biopolymers is probably the main driving force of phase separation between KC and SC, but we do not exclude that depletion interaction also plays a role. The general features of the phase diagram are similar to those observed for other protein–polysaccharide mixtures. However, in view of the complexity of the system it is in our view not possible to give a quantitative analysis of the phase diagram in terms of existing theories on phase separation of macromolecules in solution.

4. Summary

Aggregation of sodium caseinate was observed in mixtures with κ -carrageenan at all concentrations. Most likely the strong bonds between SC were mediated by a small amount of κ -carrageenan. The aggregates were initially formed by a random aggregation process, but with increasing storage time dense clusters were formed with a diameter of a few μm . The clusters flocculated and precipitated. The fraction of SC involved in the clusters increased linearly with the KC concentration, but did not depend on the SC concentrations. It increased when electrostatic interactions were screened by adding salt up to 0.2 M NaCl, but

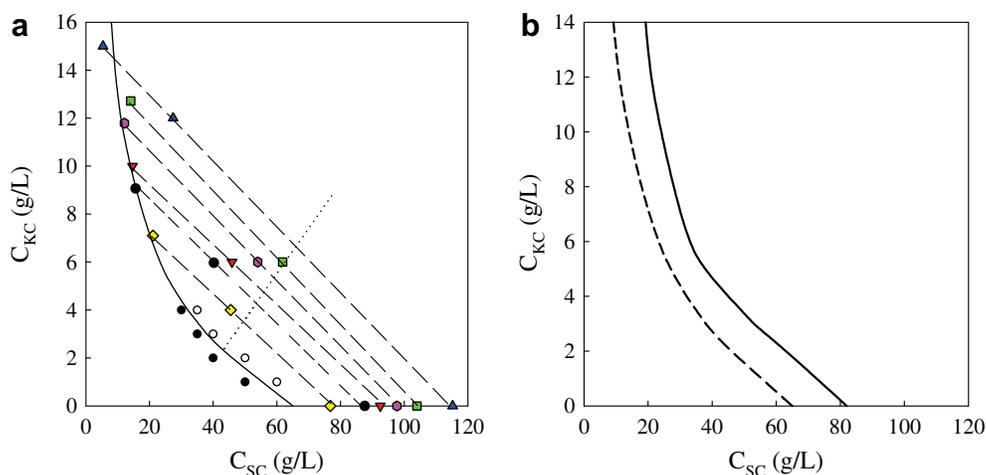


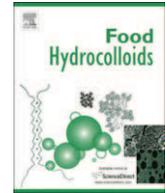
Fig. 6. (a) Phase diagram of SC–KC mixtures at 0.1 M NaCl. The solid line represents the binodal. Circles indicate systems close to the binodal where phase separation was observed (open) or not (filled). Coloured symbols indicated the composition of various mixtures with the corresponding composition of the equilibrium phases. Tie lines are shown as dashed lines. The dotted line indicates where the volume fraction of the two phases was equal. (b) Comparison of the binodal for SC–KC mixtures at 0.1 M NaCl (dashed) and without added salt (solid). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

decreased at higher salt concentrations. The fraction increased strongly when the charge density of SC was decreased by lowering the pH.

Mixtures showed segregative phase separation driven by thermodynamic incompatibility between the remaining soluble SC and KC. At 0.1 M NaCl the critical SC concentration was about 10 g/L at high KC concentrations, while at high SC concentrations less than 0.1 g/L KC was needed to induce phase separation. In salt free solutions the phase boundary was shifted to slightly higher SC concentrations.

References

- Artoft, D., Ipsen, R., Madsen, F., & De Vries, J. (2007). Interactions between carrageenans and milk proteins: a microstructural and rheological study. *Bio-macromolecules*, 8, 729–736.
- Bourriot, S., Garnier, C., & Doublier, J.-L. (1999). Micellar-casein-k-carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. *Carbohydrate Polymers*, 40, 145–157.
- Brown, W. (1996). *Light scattering: Principles and development*. Oxford: Clarendon Press.
- Croguennoc, P., Meunier, V., Durand, D., & Nicolai, T. (2000). Characterization of semidilute kappa-carrageenan solutions. *Macromolecules*, 33, 7471–7474.
- Dalgleish, D. G., & Morris, E. R. (1988). Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles. *Food Hydrocolloids*, 2, 311–320.
- Drohan, D. D., Tziboula, A., McNulty, D., & Horne, D. S. (1997). Milk protein–carrageenan interactions. *Food Hydrocolloids*, 11, 101–107.
- Fox, P. F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In K. A. P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Proteins* (3rd ed.), *Advanced dairy chemistry*, Vol. 1 (pp. 427–435), (42).
- Hadjsadok, A., Pitkowski, A., Benyahia, L., Nicolai, T., & Moulai-Mostefa, N. (2007). Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids*, 22, 1460–1466.
- Hemar, Y., Hall, C. E., Munro, P. A., & Singh, H. (2002). Small and large deformation rheology and microstructure of k-carrageenan gels containing commercial milkprotein products. *International Dairy Journal*, 12, 371–381.
- Ji, S., Corredig, M., & Goff, H. D. (2008). Aggregation of casein micelles and k-carrageenan in reconstituted skim milk. *Food Hydrocolloids*, 22, 56–64.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A., & De Kruif, C. G. (2000). Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, 14, 273–280.
- Lynch, M. G., & Mulvihill, D. M. (1994). The influence of caseins on the rheology of k-carrageenan gels. In G. O. Phillips, P. A. Williams, & D. J. Wedlock (Eds.), *Gums and stabilisers for the food industry* (pp. 323–332). Oxford IRL Press, (7).
- Martin, A. H., Goff, H. D., Smith, A., & Dalgleish, D. G. (2006). Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM). *Food Hydrocolloids*, 20, 817–824.
- Meunier, V. (1999). *Etude de l'agrégation et de la gélification du kappa-carraghénane*. PhD thesis, Université du Maine.
- Meunier, V., Nicolai, T., Durand, D., & Parker, A. (1999). Light scattering and viscoelasticity of aggregating and gelling κ-carrageenan. *Macromolecules*, 32, 2610–2616.
- Nicolai, T. (2007a). Food structure characterisation using scattering methods. In D. J. McClements (Ed.), *Understanding and controlling the microstructure of complex foods* (pp. 288–310). Cambridge: Woodhead.
- Nicolai, T. (2007b). Structure of self-assembled proteins. In E. Dickinson, & M. E. Leser (Eds.), *Food colloids, self-assembly and material science* (pp. 35–56). Cambridge: RSC Publishing.
- Nono, M., Nicolai, T., & Durand, D. (2011). Gel formation of mixtures of κ-carrageenan and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 25, 750–757.
- Oakenfull, D., Miyoshi, E., Nishinari, K., & Scott, A. (1999). Rheological and thermal properties of milk gels formed with k-carrageenan. I. Sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 13, 525–533.
- Panouillé, M., Durand, D., Nicolai, T., Larquet, E., & Boisset, N. (2005). Aggregation and gelation of micellar casein particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 287, 85–93.
- Payens, T. A. J. (1972). Light-scattering of protein reactivity of polysaccharides especially of carrageenans. *Journal of Dairy Science*, 55, 141–150.
- Piculell, L. (2006). Gelling carrageenans. In A. M. Stephen, G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Food polysaccharides and their applications* (pp. 239). Boca Raton: CRC Press.
- Pitkowski, A., Nicolai, T., & Durand, D. (2007). Dynamical mechanical characterization of gelling micellar casein particles. *Journal of Rheology*, 51, 971–986.
- Pitkowski, A., Nicolai, T., & Durand, D. (2009). Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. *Food Hydrocolloids*, 23, 1164–1168.
- Puvanenthiran, A., Goddard, S. J., McKinnon, I. R., & Augustin, M. A. (2003). Milk-based gels made with kappa-carrageenan. *Journal of Food Science*, 68, 137–141.
- Rochas, C., & Rinaudo, M. (1980). Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers*, 19, 1675–1687.
- Rodd, A. B., Davis, C. R., Dunstan, D. E., Forrest, B. A., & Boger, D. V. (2000). Rheological characterisation of 'weak gel' carrageenan stabilised milks. *Food Hydrocolloids*, 14, 445–454.
- Schorsch, C., Jones, M. G., & Norton, I. T. (2000). Phase behaviour of pure micellar casein/k-carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. *Food Hydrocolloids*, 14, 347–358.
- Semenova, M., & Dickinson, E. (2010). *Biopolymers in food colloids: Thermodynamics and molecular interactions*. Leiden: Brill.
- Snoeren, T. H. M., Both, P., & Schmidt, D. G. (1976). Electron-microscopic study of carrageenan and its interaction with upsilin-casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 30, 132–141.
- Snoeren, T. H. M., Payens, T. A. J., Jeunink, J., & Both, P. (1975). Electrostatic interaction between κ-carrageenan and κ-casein. *Milchwissenschaft*, 30, 393–396.
- Spagnuolo, P. A., Dalgleish, D. G., Goff, H. D., & Morris, E. R. (2005). Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 19, 371–377.
- Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulations. *Food Hydrocolloids*, 17, 1–23.
- Trckova, J., Stetina, J., & Kansky, J. (2004). Influence of protein concentration on rheological properties of carrageenan gels in milk. *International Dairy Journal*, 14, 337–343.



Gel formation of mixtures of κ -carrageenan and sodium caseinate

Merveille Nono, Taco Nicolai*, Dominique Durand

Polymères, Colloïdes, Interfaces, UMR CNRS, Université du Maine, 72085 le Mans Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 March 2010

Accepted 19 July 2010

Keywords:

Caseinate
Carrageenan
Rheology
Gel
Protein
Polysaccharide

ABSTRACT

Gelation of sodium κ -carrageenan (KC) in the presence of sodium caseinate (SC) was investigated by oscillating shear rheology. The effect of adding NaCl and KCl was investigated. Temperature ramps showed that SC had no influence on the critical gelation temperature, but increased the melting temperature when that of the pure gels was less than about 30 °C. The presence of SC also increased the gel strength of weak KC gels. Light scattering and confocal laser scanning microscopy showed that the proteins associated with the KC network. The rheology of the gels indicated that the mixed gels contained bonds involving both SC and KC in addition to pure KC bonds. At relatively high SC content the former type of bonds dominated.

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

In a previous publication (Nono, Lalouette, Durand, & Nicolai, 2011) we reported on the phase behaviour of aqueous solutions containing sodium caseinate (SC) and sodium κ -carrageenan (KC) at neutral pH. Here we present results on the rheology of these systems. Casein is the main protein component of milk and is composed of mainly four different kinds of amino acid chains (α_1 , α_2 , β and κ) each with a molar mass of approximately 2×10^4 g/mol (Fox, 2003). In milk, casein is present in the form of large complexes, often called casein micelles, containing so-called colloidal calcium phosphate (CCP). When CCP is removed the micelles fall apart and the different casein molecules regroup into small particles with a hydrodynamic radius (R_h) of about 11 nm and containing approximately 15 chains at 20 °C (HadjSadok, Pitkowski, Benyahia, Nicolai, & Moulai-Mostefa, 2007). KC is a sulphated polysaccharide extracted from seaweed. In aqueous solution κ -carrageenan has a random coil conformation at high temperatures, but a transition to a helix conformation occurs after cooling below a critical temperature (T_c) leading in most cases to aggregation and gelation (Piculell, 2006). T_c decreases with increasing salt concentration and is strongly dependent on the type of ions. Potassium ions are especially effective in inducing the transition, contrary to sodium ions. The transition can be reversed by heating, but often at a significantly higher temperature (T_h).

In a previous publication (Nono et al., 2011) we showed that SC/KC mixtures phase separate above a critical concentration of either

SC or KC and a phase diagram was established. Light scattering experiments showed that even at very low SC and KC concentrations (<1 g/L) aggregates were formed that had a self-similar structure. The aggregates contained both SC and KC, but the weight fraction of KC was small. The bonds between the proteins were strong as the aggregates did not break-up when dispersed in pure water. Covalent bonds are highly unlikely, but electrostatic interaction is important since ionic strength and pH play an important role in their formation.

The average size of the aggregates grew with increasing KC concentration, but was not very sensitive to the SC concentration. When more than about 3 g/L of KC was present, dense clusters with a radius of a few microns could be observed with CLSM. The clusters associated over a period of hours to days into even larger agglomerates that precipitated. However, the precipitate could be easily redispersed by shaking implying that the bonds between the clusters were weak, contrary to the bonds within the clusters.

In this earlier study we focused on mixtures containing KC in the coil conformation. Here we report on the gelation process of the mixtures initiated by the coil–helix transition of KC. A number of investigations have been done of the rheology of mixtures of KC and native casein micelles (Drohan, Tziboula, McNulty, & Horne, 1997; Ji, Corredig, & Goff, 2008; Langendorff et al., 2000; Puvanenthiran, Goddard, McKinnon, & Augustin, 2003; Rodd, Davis, Dunstan, Forrest, & Boger, 2000; Schorsch, Jones, & Norton, 2000; Trckova, Stetina, & Kansky, 2004). These experiments showed that in the helical conformation KC binds to casein micelles, which can lead to gelation even when pure KC does not gel. Addition of casein micelles was also found in most cases to increase the storage shear modulus (G').

* Corresponding author.

E-mail address: taco.nicolai@univ-lemans.fr (T. Nicolai).

Studies of the rheology of SC/KC mixtures are rare. Lynch and Mulvihill (1994) studied the gelation of mixtures of 10 g/L KC and 20 g/L of individual caseins or SC. 0.02 M CaCl₂ was added because pure α and β casein only interacted with KC in presence of Ca²⁺. In the absence of SC the gelation temperature was about 7 °C. They observed an increase of the gelation temperature of KC solutions after addition of 20 g/L SC. The gelation temperature was larger after addition of κ -casein (14 °C) than for α -casein (10 °C), β -casein (12 °C) or sodium caseinate (12 °C). Addition of pure κ -casein led to a larger elastic shear modulus, while adding pure α - or β -casein decreased the elastic modulus. Adding sodium caseinate had little effect.

Oakenfull, Miyoshi, Nishinari, and Scott (1999) studied mixtures of KC and SC using rheology and differential scanning calorimetry (DSC). They varied the SC concentration for a fixed KC concentration ($C_{KC} = 5$ g/L) and the KC concentration for a fixed SC concentration ($C_{SC} = 10$ g/L). T_c measured with rheology or with DSC was the same and increased with increasing KC concentration. The increase is expected, because the KC sample used for this study contained potassium so that the K⁺ concentration of the solutions increased together with the KC concentration. The addition of SC up till 50 g/L had almost no effect on T_c : a small decrease from 24 °C to 22 °C up to $C_{SC} = 10$ g/L and a small increase back to 24 °C at $C_{SC} = 50$ g/L. The enthalpy of the transition was also found to be almost independent of the SC concentration. As expected G' increased with increasing KC concentration at constant SC concentration. At fixed KC concentration, G' decreased initially with increasing SC concentration up to $C_{SC} = 5$ g/L and then increased again at higher concentrations. DSC during melting showed broad multiple peaks indicating that the break-up of the gel and the helix–coil transition was not cooperative. The decrease of G' was more progressive when SC was present and in one case ($C_{KC} = 5$ g/L, $C_{SC} = 1$ g/L) two steps could be distinguished. The melting temperature was about 45 °C independent of the SC concentration.

Based on these results Oakenfull et al. suggested that in mixtures a fraction of KC was bound to SC, while the rest remained free. Both free and bound KC were supposed to form helices at temperatures below T_c that aggregated and formed a gel. The presence of SC was supposed to cause an increase of the variety of bond energies leading to a more gradual decrease of G' and a less distinct DSC pattern during melting. In order to explain the dependence of G' on the SC concentration they assumed that free and bound KC aggregated and gelled independently. They proposed a model that could describe the experimental results semi-quantitatively, see discussion below.

Here we present an extension of these earlier studies with a systematic investigation of the effect of adding SC to KC in the sodium form. In potential applications of SC/KC mixtures, salt will most likely be present so that it is important to investigate the influence of SC on the salt induced aggregation and gelation of KC. We have studied the effect of 2 different types of salt: NaCl and KCl. NaCl can be added to screen electrostatic interactions without inducing gelation at room temperature. Here we have used 0.1 M NaCl which induces the transition at about 12 °C. As mentioned earlier, KC is much more sensitive to K⁺ and 10⁻² M KCl is enough to induce the coil–helix transition of KC at room temperature. We have varied the amounts of KCl between 10⁻³ M and 0.1 M.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The sodium caseinate powder, provided by DMV International (Veghel, Netherlands), was dissolved in deionised water (Millipore) containing 3 mM sodium azide as a bacteriostatic agent. The pH was adjusted by slow addition of 0.01 M HCl or 0.01 M NaOH under

continuous stirring and was set at 7 unless otherwise indicated. About 100 ml solution was dialysed against about 4 L solvent for a period of 24 h renewing the solvent several times. The solution was then centrifuged (Beckman Coulter, Allegra 64R Centrifuge) at 6×10^4 g for 2 h after which both a sediment and a turbid top layer appeared. After removal of the turbid layer the clear supernatant was collected and filtered through 0.45 μ m pore size filters. The SC concentration (C_{SC}) was determined after filtration using UV absorption with an extinction coefficient of 0.81 L g⁻¹ cm⁻¹. The amount of protein that was eliminated by this purification method is less than 5%. The sample contained 1500 mg/100 g Na, 56 mg/100 g Ca and 10 mg/100 g K.

The sodium κ -carrageenan used for this study is an alkali treated extract from *Eucheuma cottonii* and was a gift from SKW Biosystems (batch HMRXZ) (Baupre, France). Using NMR it was found that the sample contained less than 5% ι -carrageenan (Meunier, 1999). A freeze-dried sample of KC was dissolved while stirring a few hours in Mili-Q water (70 °C) with 3 mM sodium azide added as a bacteriostatic agent. The solution was extensively dialysed against Mili-Q water at pH 7 and subsequently filtered through 0.45 μ m pore size Anotop filters. The KC concentration (C_{KC}) was determined by measuring the refractive index using refractive index increment 0.145 g/ml. The weight average molar mass was determined by light scattering using the methodology described elsewhere (Meunier, Nicolai, Durand, & Parker, 1999): $M_w = 2.1 \times 10^5$ g/mol. The sample contained 5500 mg/100 g Na, 56 mg/100 g Ca and 300 mg/100 g K.

2.2. Rheology

Oscillatory shear measurements were done using a stress controlled rheometer (AR2000, TA Instruments). Both parallel plates and cone and plate geometries were used. The applied stress was varied and the results shown here were obtained with low enough stresses so that the response was linear. After loading the sample the geometry was covered with a thin layer of mineral oil in order to avoid evaporation. The system was presheared in the liquid state at 80 °C at a shear rate of 100 s⁻¹ for a few minutes. Subsequently, the system was cooled and reheated at a rate of 1 °C/min while the oscillatory shear moduli were measured at a frequency of 1 Hz.

In general, the shear moduli measured during cooling increased sharply at T_c followed by a weak increase at lower temperatures. However, sometimes the sharp increase was followed by a more or less important decrease before stabilising or weakly increasing again at lower temperature. This effect was never completely reproducible even when repeated at exactly the same conditions after reheating. It depended on the applied stress and the geometry and often lowering the stress or increasing the distance between parallel plates could strongly reduce or even eliminate the effect. This feature is a recurrent problem for oscillatory shear measurements of gelling KC solutions and is especially problematic in mixtures with proteins. In this paper we only discuss values of G' where such effects were not observed.

2.3. Confocal scanning laser microscopy

Confocal Scanning Laser Microscopy was used in the fluorescence mode. Observations were made with a Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems Heidelberg, Germany). A water immersion objective lens was used (HCx PL APO 63x NA = 1.2) with theoretical resolution 0.3 μ m in the x–y plane. SC was labelled with the fluorochrome rhodamine B isothiocyanate (Rho), by adding a small amount of a concentrated rhodamine solution 5 ppm to the SC solutions before heat treatment. Rho was excited using a helium–neon laser with wavelength 543 nm and the fluorescence was detected with

a photomultiplier. Care was taken not to saturate the fluorescence signal and it was verified that the amplitude of the signal was proportional to the polymer concentration in pure solutions. The protein density of the gel and the pores was determined by comparing the signal from these areas with the average signal.

2.4. Light scattering

Light scattering measurements were done at 20 °C using a so-called 3D cross-correlation instrument (LS Instruments, Fribourg, Switzerland). The light source was a diode laser with wavelength $\lambda = 680$ nm. The temperature was controlled by a thermostat bath to within ± 0.1 °C.

3. Results

3.1. Rheology

3.1.1. Without addition of salt

Mixtures of 2 g/L KC and various concentrations of SC up to 60 g/L were studied at pH 7 in the absence of added salt apart from the 3 mM NaN_3 used as a bacteriostatic agent. At higher SC concentrations the system phase separated as discussed by Nono et al. (2011). Fig. 1 shows the storage and loss moduli at 1 Hz as a function of the temperature during a cooling ramp at a rate of 1 °C/min. For $C_{\text{SC}} < 30$ g/L, the results are the same as for pure KC solutions, and no effect of SC was observed. G'' increased weakly with decreasing temperature, which is typical for solutions of KC in the coil conformation. At higher SC concentrations G'' showed the same weak increase during cooling, but at a critical temperature (T_c) the increase became much stronger. The strong increase was caused by the coil–helix transition leading to aggregation of KC chains and eventually to gelation. T_c increased from about 4 °C at 30 g/L to 8 °C at 60 g/L. G' was negligible over the whole temperature range for $C_{\text{SC}} < 35$ g/L, but at higher SC concentrations it increased steeply upon cooling below T_c .

The coil–helix transition of KC is induced by the addition salt that is present in the SC powder. Rochas and Rinaudo (1980) determined the coil–helix transition temperatures as a function of the mineral concentration for different types of ions. The amount of K and Ca in the SC powder is too small to explain the transition. However, the amount of Na counterions can explain the values of T_c .

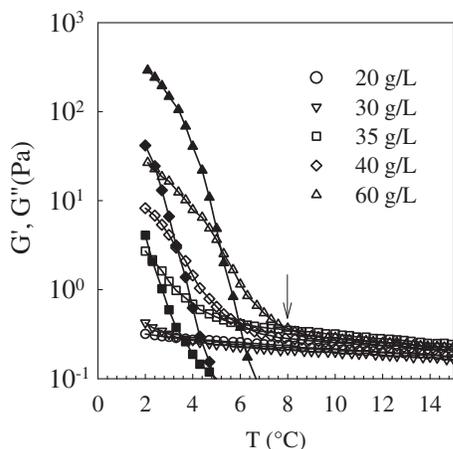


Fig. 1. The storage (filled symbols) and loss (open symbols) shear moduli at 1 Hz during a cooling ramp of KC solutions at 2 g/L with different amounts of SC as indicated in the figure. The arrow indicates T_c at $C_{\text{SC}} = 60$ g/L.

The value of the shear modulus reached after cooling to 2 °C increased with increasing SC concentration, but the systems continued to evolve after the temperature was stabilized at 2 °C see Fig. 2. G' reached approximately the same value for systems at SC concentrations between 35 and 60 g/L (10^3 Pa). The increase of G' with time became very weak for these systems after 10^3 s, but at $C_{\text{SC}} = 30$ and 20 g/L the systems were still far from their steady state values after 2500 s. As mentioned in Introduction, the increase of the shear moduli is caused by aggregation and gelation of KC chains in the helix conformation. The fraction of chains in the helix conformation obtained from optical rotation measurements starts to increase at the critical temperature, but is complete only several degrees lower. Meunier et al. (1999) determined the temperature dependence of the gelation rate of pure KC solutions with a given T_c set by the addition of KCl. They found that the gelation rate decreased strongly as T approached T_c within a few degrees. The steady state values of G' were found to be almost independent of the temperature except very close to T_c where they decreased. Notice that here, gelation is measured at a given temperature ($T = 2$ °C), but for different conditions and thus different T_c . The effect is, of course, the same because the aggregation process is controlled by the difference between T and T_c .

The divergence of the aggregation rate with decreasing temperature means that the critical temperature depends on the cooling rate as was already discussed in more detail by Tziboula and Horne (1998). However, the aggregation rate increased rapidly with decreasing temperature, so that the ambiguity is limited to a few degrees if the cooling ramp is 1 °C/min. As mentioned above, we defined T_c as the temperature where G'' deviated upward during a cooling ramp using a rate of 1 °C/min. It should be realized though that gels can be formed very slowly even at temperatures slightly above T_c as defined here.

The frequency dependence was determined at the end of the waiting time. At $C_{\text{SC}} > 30$ g/L where the systems had reached steady state, G' was independent of the frequency and about a factor of 10 larger than G'' , while G'' showed a very weak minimum between 0.1 and 1 Hz similar to the results shown by Lynch and Mulvihill (1994), data not shown. At $C_{\text{SC}} = 20$ and 30 g/L the systems were still visco-elastic and G' and G'' increased with increasing frequency.

The gels melted during the subsequent heating ramp of the systems. The critical melting temperature (T_h) was defined as the highest temperature where G'' no longer deviated upward from the weak dependence at high temperatures. We found $T_h = 31$ °C for $C_{\text{KC}} = 35$ g/L and higher, i.e. for all systems where the gel was fully developed. At $C_{\text{KC}} = 20$ g/L and $C_{\text{KC}} = 30$ g/L, T_h was a few degrees lower.

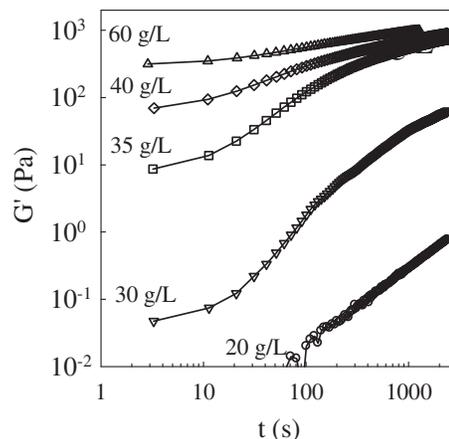


Fig. 2. Time dependence of G' at $T = 2$ °C for KC solutions at 2 g/L with different amounts of SC as indicated in the figure.

3.1.2. Addition of KCl

For comparison we studied gelation of pure KC solutions at 2 g/L with different amounts of KCl up to $[KCl] = 0.1$ M. The effect of the coil–helix transition on the rheology was observed above 2.5×10^{-3} M KCl. Fig. 3a shows that both T_c and T_h increased exponentially with $[KCl]$, but the increase of T_h was steeper entailing that the hysteresis between gel formation and melting increased. Similar results were reported for the coil–helix transition determined by optical rotation (Rochas & Rinaudo, 1980). The viscosity of the systems at 2 °C increased with increasing KCl concentration and waiting time. However, gels were only formed within 2000 s above 7×10^{-3} M. At higher KCl concentrations the shear modulus of the gels increased strongly, see Fig. 3b.

We repeated the measurements after adding 20 g/L SC, see Fig. 3. Without KCl this mixture does not show an effect of the coil–helix transition during the cooling ramp and the gel is formed very slowly, see Fig. 2. But, when only 1×10^{-3} M KCl was added the transition was observed at $T_c = 6$ °C and the gel was formed at 2 °C within 2000 s. As mentioned above, the minerals added together with the 20 g/L SC explains the increase of T_c . However, it does not explain the large shear modulus and the hysteresis between gelling and melting in the presence of SC. Whereas T_h is close to T_c in pure KC solutions if $T_c = 6$ °C, in the mixture T_h was about 30 °C, i.e. very close to that of mixtures without added salt. Clearly, the presence of SC renders the system more difficult to melt and causes hysteresis between gelation and melting.

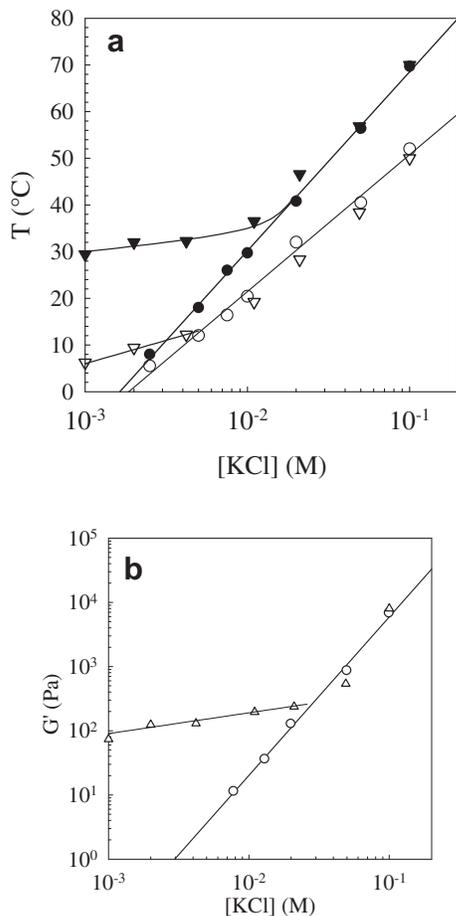


Fig. 3. a. Critical temperatures obtained during cooling (T_c , open symbols) and heating (T_h , closed symbols) ramps as a function of the KCl concentration for KC solutions at 2 g/L with (triangles) and without (circles) 20 g/L SC. Solid lines are guides to the eye. b. Storage shear moduli at 1 Hz of KC solutions at 2 g/L with (triangles) and without 20 g/L (circles) SC. Solid lines are guides to the eye.

Fig. 3 shows that the effect of adding SC decreased with increasing KCl concentration. When the effect of the co-ions added together with SC is negligible compared to the amount of added KCl, T_c is determined by the latter. Nevertheless, T_h was still influenced by the presence of SC up till much higher KCl concentrations. Only when T_h of the pure KC solutions became larger than 30 °C did the effect of SC on T_h disappear. Comparison of the shear moduli as a function of the KCl concentration with and without SC shows that at low KCl concentrations the effect of SC on the gel is strong while at higher KCl concentrations the effect becomes negligible. Thus SC has a reinforcing effect on the KC networks only when the pure KC gel is weak. We will discuss this point in more detail below.

3.1.3. Addition of NaCl

We have studied the effect of screening the electrostatic interactions by adding 0.1 M NaCl. As mentioned above, sodium ions can induce the coil–helix transition of KC, but only at high concentrations. Fig. 4 shows G' during a cooling and a heating cycle for KC solutions at 4 g/L in the presence of different SC concentrations. The effect of varying the KC concentration will be discussed below. After cooling, the systems were kept during 20 min at 2 °C before reheating, but the increase of G' with time at 2 °C was relatively weak for these systems, because $T - T_c$ was in all cases larger than 10 °C. In pure KC solutions, G' increased sharply upon cooling below 11 °C and decreased again when heated with almost no hysteresis. The frequency dependence of G' and G'' showed that the system was still a viscous liquid at 2 °C.

The shear moduli at 2 °C increased strongly with increasing SC concentration and measurements of the frequency dependence of G' and G'' showed that the systems were gels when the amount of added SC was 3 g/L or more. Adding SC had little influence on T_c , but led to a large increase of T_h . One can clearly observe a two step melting process in Fig. 4 at 3 g/L SC: an abrupt process at temperatures a little higher than T_c and a second more progressive process that was completed only at about 30 °C. Notice that when the network is broken up and G' has decreased below the noise level, the system can still contain aggregates that influence G'' . This is the reason why T_c and T_h are more accurately determined from G'' . The relative amplitude of the second melting process increased with increasing SC concentration.

Measurements were also done at two other concentrations of KC: 1.5 and 7 g/L, with similar results. At all 3 concentrations the systems were viscous liquids at 2 °C if 1 g/L or less SC was added and gels in the presence of 3 g/L SC or more. The values of T_c and T_h depended only weakly on C_{KC} and are plotted as a function of C_{SC} in Fig. 5. For each KC concentration T_c was close to T_h if less than 1 g/L SC was added. T_c increased only weakly with increasing C_{SC} from 12 °C up to at most 18 °C, while T_h increased strongly when as little as 3 g/L was added, but levelled off at approximately 30 °C for higher SC concentrations. Interestingly, the value of T_h was the same as for systems without added salt containing larger SC concentrations. The maximum SC concentration added to solutions containing 7 g/L KC was 30 g/L because this mixture phase separated at $C_{SC} = 40$ g/L.

The dependence of G' on the SC concentration of the systems at 2 °C is shown in Fig. 6. Initially G' increased sharply with increasing SC followed by a much weaker increase at higher concentrations. For a given SC concentration G' increased with increasing KC concentration, as might be expected. Meunier et al. (1999) showed earlier that $G' \propto C_{KC}^2$ for pure KC gels formed in the presence of KCl.

3.2. Gel structure

The structure of the gels was studied using CLSM and light scattering, see Nono et al. (2011) for experimental details.

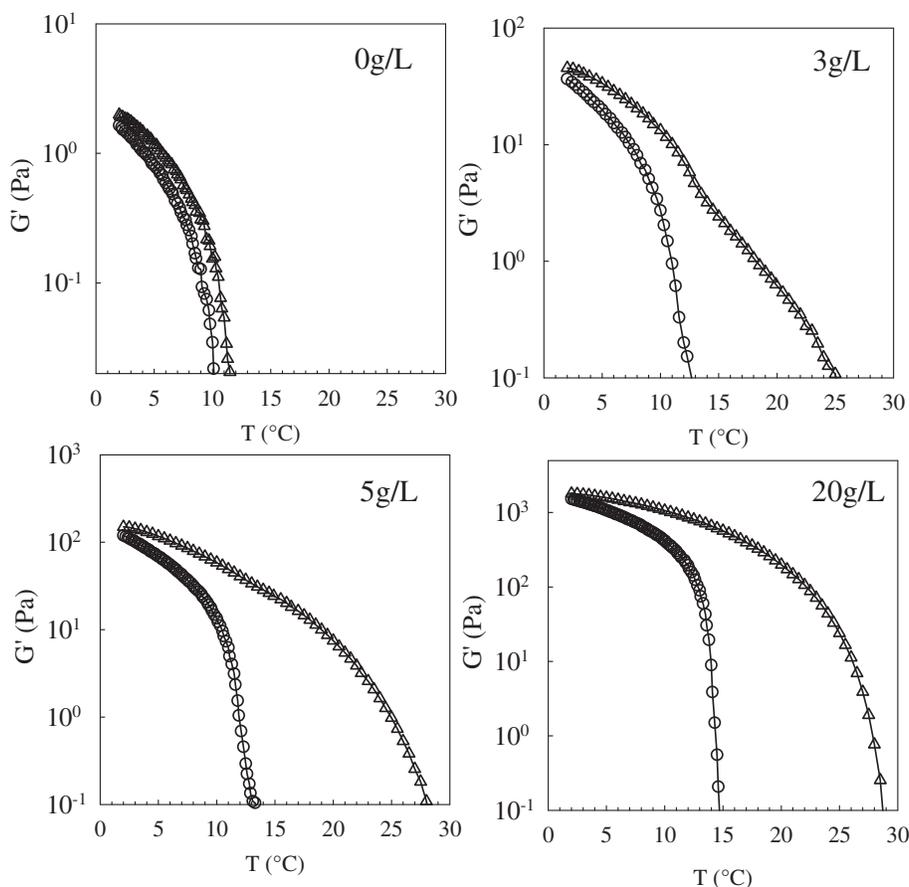


Fig. 4. G' at 1 Hz during a cooling (circles) and heating (triangles) cycle of KC solutions at 4 g/L in 0.1 M NaCl with different amounts of SC as indicated in the figure.

The CLSM images show the distribution of the labelled proteins. We showed elsewhere (Nono et al., 2011) that homogeneous mixtures in the liquid state were featureless at KC concentrations below 3 g/L, but contained protein rich clusters with diameters of a few microns at higher concentrations. CLSM experiments were done in a thermostated room at 20 °C. Therefore, we used mixtures containing 0.1 M NaCl that can be investigated at 20 °C both in the

gelled state and in the liquid state depending on whether this temperature was reached by cooling or heating ($T_c < 20\text{ °C} < T_h$).

Fig. 7 shows CLSM images of mixtures containing 3 g/L SC and various concentrations of KC. The systems were cooled overnight at 5 °C and images were taken at 20 °C in the gelled state. An inhomogeneous network of proteins can be clearly observed especially at lower KC concentrations. When the same samples were heated and subsequently studied at 20 °C in the liquid state the images were featureless. The structure of pure KC gels was studied by Loren

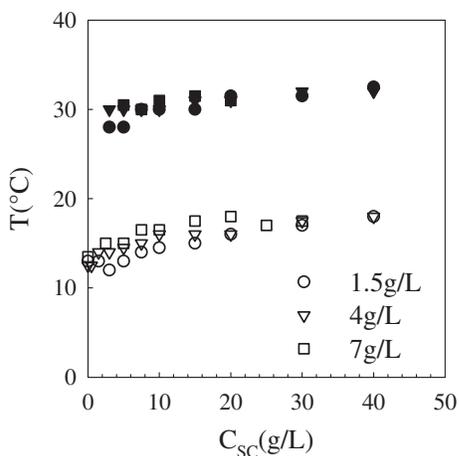


Fig. 5. Critical temperatures obtained during cooling (T_c , open symbols) and heating ramps (T_h , closed symbols) of KC solutions at different concentrations indicated in the figure as a function of the SC concentration in the presence of 0.1 M NaCl.

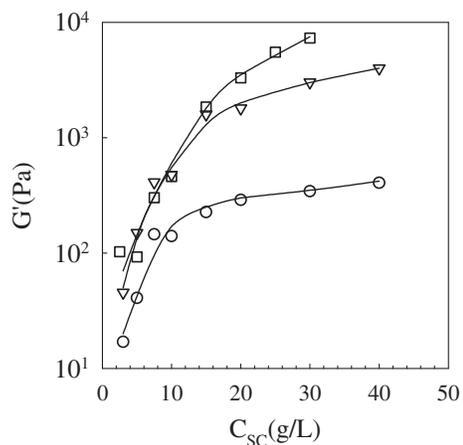


Fig. 6. Storage shear moduli of gels at 2 °C formed at different KC concentrations as a function of the SC concentration in the presence of 0.1 M NaCl. Symbols as in Fig. 5.

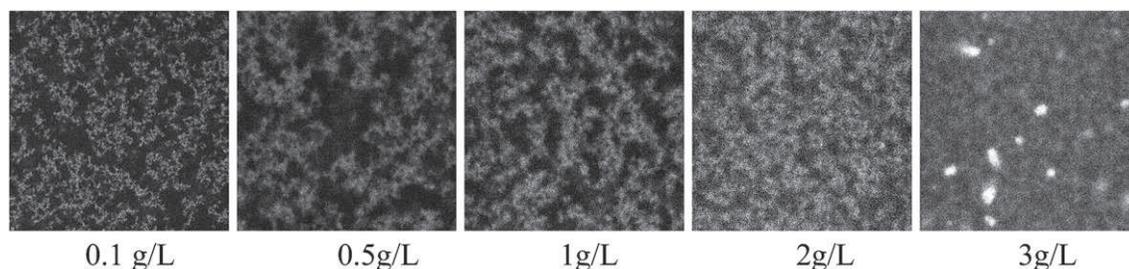


Fig. 7. CLSM images of gelled mixtures at 0.1 M NaCl containing 3 g/L SC and different concentrations of KC indicated in the figure. The light areas are rich in SC. The width of the images represents 40 μm .

et al. (2009) using electron microscopy. KC forms a network with pore sizes that decrease with increasing concentration. We believe that we visualize the KC network in CLSM because SC was bound to KC. With increasing KC concentration the network became denser and the contrast decreased. At $C_{\text{KC}} = 3 \text{ g/L}$ the image appeared homogeneous except for the protein clusters that are present at higher KC concentrations both in the liquid and the gelled state.

We determined the protein concentrations in the strands of the network and in the pores by measuring the fluorescence intensities. The SC concentration remained constant in the pores at 2.4 g/L, but decreased in the network from about 4.8 g/L at $C_{\text{KC}} = 0.1 \text{ g/L}$ to 3.4 g/L at $C_{\text{KC}} = 3 \text{ g/L}$. We also varied the SC concentration at a constant KC concentration of 1 g/L. When only 0.5 g/L SC was added, the system that was a gel at 2 °C became a homogeneous liquid at 20 °C. At $C_{\text{SC}} = 1.5 \text{ g/L}$ and higher the images showed a network that appeared more homogeneous with increasing protein concentration. Thus both an increase of the KC and of the SC concentration led to more homogeneous gels. More homogeneous gels with increasing casein concentration were also reported by Schorsch et al. (2000) for mixtures of KC and native casein micelles.

We also investigated the effect of gelation using light scattering. It was shown in Nono et al. (2011) that aggregates are formed in the single phase liquid state that increase in size with increasing KC concentration. At lower KC concentrations, gelation caused a dramatic increase of the scattering intensity. This is shown in Fig. 8 for a mixture of 1.5 g/L KC and 2 g/L SC. Similar results were obtained at other KC and SC concentrations. We note that the scattering intensity of pure KC gels is much smaller. In each case the gel showed a strong dependence of the intensity (I) on the

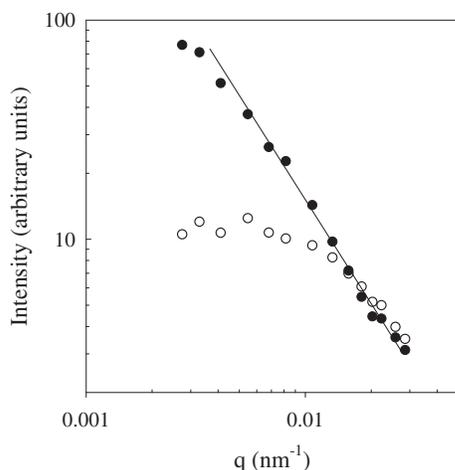


Fig. 8. Dependence of the scattered light intensity on the scattering wave vector (q) for a mixture of 1.5 g/L KC and 2 g/L SC at 0.1 M NaCl. The system was measured at 20 °C in the liquid (open symbols) and in the gel (closed symbols) state. The solid line has slope -1.7 .

scattering wave vector that could be described by a power law, which shows that the local structure of the gel is self-similar. The slope is determined by the so-called fractal dimension (df): $I \propto q^{-df}$. For the different systems that we investigated we found a fractal dimension between 1.5 and 2.

4. Discussion

Gelation of KC is induced by the coil–helix transition, which in turn is controlled by the amount and the type of salt present in the solution. The transition is not influenced by the presence of SC, but minerals are added together with SC in form of sodium counterions and trace amounts of calcium and potassium. For this reason addition of SC can induce the transition even if no salt is added. The effect of adding SC on T_c depends on the relative contribution of salt added together with SC to the total salt composition of the mixtures. This explains the different results reported by Lynch et al. (1994) and by Oakenfull et al. (1999). Lynch et al. found a small increase of T_c in the presence of 0.02 M CaCl_2 when 20 g/L SC was added to KC with sodium counterions. Thus the amount of salt added together with SC was not negligible in their case. However, Oakenfull et al. observed almost no variation of T_c up to $C_{\text{SC}} = 50 \text{ g/L}$, because in this case T_c was controlled by the potassium counterions of KC (about $1.4 \times 10^{-2} \text{ M}$).

Even if the coil–helix transition is not influenced much by adding SC, the ensuing aggregation process of KC in the helix configuration is strongly influenced. Relatively strong mixed gels were formed even at low salt concentrations where in the absence of SC only viscous solutions or weak gels were obtained. The CLSM images show that SC forms a network and the rheology shows that it contributes to the shear modulus. We believe that SC is bound to the KC network. The alternative would be that gelation of KC drives the formation of the observed SC structure by a process of segregative phase separation. We consider this unlikely, because 1) the concentrations are very low; 2) the heterogeneity decreases with increasing KC concentration and 3) it would not influence the melting temperature of the KC network. We reported elsewhere that SC also binds to KC in the coil conformation when no gels are formed (Nono et al., 2011).

We observed a very weak increase of T_c with increasing SC concentration at 0.1 M NaCl, but a strong increase of G' . The increase of the gel strength is probably caused by the fact that an increasing amount of SC is involved in the network. The effect appears to saturate at high SC/KC ratios, see Fig. 6.

Fig. 3b shows that adding a small amount of KCl had little effect on the shear modulus of the mixed gels and that G' was much larger than that of the pure KC solutions. At high KCl concentrations G' increased and became comparable with that of pure KC gels. The effect of incorporating SC in the KC network is thus dependent on the strength of the latter. If the pure KC network is weak, SC strengthens it, while if the pure network is strong adding SC has little effect. This

may explain the small effect of adding SC on G' reported by Lynch et al. (1994) and by Oakenfull et al. (1999).

The association between KC and SC in the network can have important consequences for the melting process as demonstrated for mixtures in the presence of 0.1 M NaCl in Fig. 4. In the absence of SC, the system melted at temperatures that were only slightly higher than T_c . In the presence of 3 g/L SC, G' still started to decrease at temperatures that were only slightly higher than T_c . However, this relatively well defined initial melting process was not enough to completely melt the system. It was followed by a second melting process over a broad range of temperatures. In the presence of 20 g/L SC, only a monotonous decrease of G' over a broad temperature range was observed and the well defined initial melting process was not seen. The relative amplitude of the first step of the melting process decreased with increasing ratio of C_{SC} to C_{KC} .

The relative amplitude of the two melting processes can also be varied by varying the KC concentration at fixed SC concentration. In Fig. 9 we plotted the values of G' during heating for mixtures containing 3 g/L SC and varying amounts of KC at 0.1 M NaCl. This figure complements the dependence on the SC concentration at fixed KC concentration shown in Fig. 4. At 2 °C, G' was approximately proportional to C_{KC}^2 as was already reported for pure KC solutions by Meunier et al. (1999). T_c increased very weakly from 12 to 14 °C in this range of KC concentrations. The temperature dependence of G'' showed that the melting process was complete at 28 °C for all KC concentrations. However, with increasing KC concentration an increasing part of the melting occurred during the first step just above T_c .

The results presented here support the basic tenets of the model proposed by Oakenfull et al. (1999), i.e. the formation of two types of crosslinks: one involving only KC helices and one involving both KC and SC. The suggestion is that the initial decrease of G' with increasing temperature is caused by break-up of junctions between KC chains, while the decrease at higher temperatures is due to break-up of bonds that involve both SC and KC. The latter process is characterized by a broad distribution of activation energies so that the melting process occurs progressively over a broad range of temperatures. In order to observe clearly the two step melting process, melting of the KC/SC bonds should occur at higher temperatures than melting of pure KC gels. In addition, the ratio of SC to KC should be less than unity, so that the second melting step does not completely dominate.

For a more quantitative description of the shear modulus of mixed KC/SC gels, Oakenfull et al. (1999) assumed that free KC and

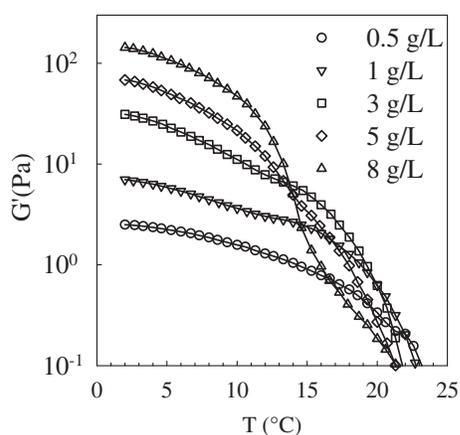


Fig. 9. Temperature dependence of the storage shear modulus at 1 Hz during melting for solutions at 0.1 M NaCl containing 3 g/L SC and varying amounts of KC indicated in the figure.

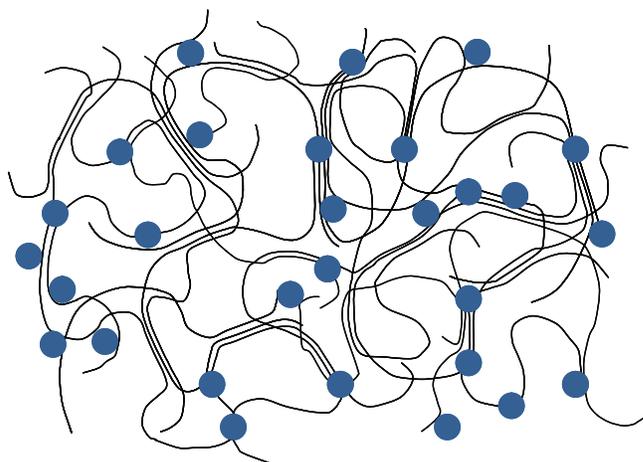


Fig. 10. Schematic drawing of the gel formed in mixtures of KC and SC. The circles represent the small SC aggregates, while the lines indicate the KC chains in the helix conformation. Junctions between KC chains are formed by parallel stacking of the KC helices. Bonds involving SC aggregates are also shown, but the molecular structure of these bonds is as yet unknown.

KC with bound SC form two independent interpenetrating networks with elastic moduli that have the same dependence on C_{KC} . In addition, they assumed that the interaction between SC and KC is controlled by a single association constant and that SC binds KC up to a maximum of 0.2 g/g. It is clear from the results of the present more extensive investigation that these assumptions are not justified. Most importantly, the model does not explain the continuous strong increase of G' with increasing C_{SC} when the corresponding pure KC gels are weak. Only when pure KC gels are strong does SC not have much influence on G' , which was the situation studied by Oakenfull et al. (1999). We have found no indication for the existence of two distinct interpenetrating networks, and we believe that it is more likely that a single network is formed with different types of crosslinks. A schematic drawing of the mixed gel is shown in Fig. 10. When drawing the cartoon we have assumed that the SC involved in the mixed network is in the form of the same small aggregates as it is in the absence of KC.

Hysteresis between gel formation and gel break-down is also observed for pure KC solutions in the presence of KCl. Adding KCl results in an increase both of T_c and of $(T_h - T_c)$. Thus the presence of more K^+ ions leads to more crosslinks and a greater difficulty to break them down. The effect of adding SC is different. While the increase of T_h with increasing KCl is progressive, adding SC causes a jump of T_h to about 30 °C independent of C_{SC} as soon as its effect can be measured. Approximately the same value on T_h was found in solutions without added salt, at 0.1 M NaCl and at less than 10 mM KCl. We may conclude that the crosslinks involving SC melt at about 30 °C. This means that if T_h of the pure KC gels is larger than about 30 °C the systems fully melt at the same T_h as pure KC gels. This explains why T_h is the same with and without SC at KCl concentrations above 20 mM.

5. Conclusion

Caseinate associates with κ -carrageenan leading to the formation of mixed gels. Bonds involving SC are formed that reinforce weak KC gels. At low SC content the gels contain pure KC bonds in addition to bonds involving SC, but at high SC content the latter type of bonds dominates. The gelation temperature of mixed systems is the same as that of pure KC solutions. However, the melting temperature is shifted to 30 °C if the pure KC gel melts at lower temperatures. In this case a two step melting process is

observed at low SC content: one of the pure KC bonds at lower temperatures and one of the mixed bonds at higher temperatures. If the melting temperature of the corresponding pure KC solution is higher than 30 °C it is not influenced by SC. Melting of bonds involving SC occurs over a broad range of temperatures.

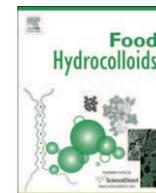
References

- Drohan, D. D., Tziboula, A., McNulty, D., & Horne, D. S. (1997). Milk protein-carrageenan interactions. *Food Hydrocolloids*, *11*, 101–107.
- Fox, P. F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In K. A. P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry* (3rd ed.). *Proteins*, Vol. 1 (pp. 427–435) New York: Kluwer Academic, (42).
- HadjSadok, A., Pitkowski, A., Benyahia, L., Nicolai, T., & Moulai-Mostefa, N. (2007). Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids*, *22*, 1460–1466.
- Ji, S., Corredig, M., & Goff, H. D. (2008). Aggregation of casein micelles and κ -carrageenan in reconstituted skim milk. *Food Hydrocolloids*, *22*, 56–64.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A., & De Kruif, C. G. (2000). Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, *14*, 273–280.
- Loren, N., Shtykova, L., Siw Kidman, S., Jarvoll, P., Nyden, M., & Hermansson, A. M. (2009). Dendrimer diffusion in κ -carrageenan gel structures. *Biomacromolecules*, *10*, 275–284.
- Lynch, M. G., & Mulvihill, D. M. (1994). Influence caseins on the rheology of κ -carrageenan gels. In G. O. Phillips, P. A. Williams, & D. J. Wedlock (Eds.), *Gums and stabilisers for the food industry*, 7 (pp. 323–332). Oxford IRL Press.
- Meunier, V. (1999). Etude de l'agrégation et de la gélification du kappa-carraghénane. PhD thesis, Université du Maine.
- Meunier, V., Nicolai, T., Durand, D., & Parker, A. (1999). Light scattering and viscoelasticity of aggregating and gelling κ -carrageenan. *Macromolecules*, *32*, 2610–2616.
- Nono, M., Lalouette, L., Durand, D., & Nicolai, T. (2011). Cluster formation and phase separation in mixtures of sodium κ -carrageenan and sodium caseinate, 25, 743–749.
- Oakenfull, D., Miyoshi, E., Nishinari, K., & Scott, A. (1999). Rheological and thermal properties of milk gels formed with κ -carrageenan. I. Sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, *13*, 525–533.
- Picullell, L. (2006). Gelling carrageenans. In A. M. Stephen, G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Food polysaccharides and their applications* (pp. 239). Boca Raton: CRC Press.
- Puvanenthiran, A., Goddard, S. J., McKinnon, I. R., & Augustin, M. A. (2003). Milk-based gels made with kappa-carrageenan. *Journal of Food Science*, *68*, 137–141.
- Rochas, C., & Rinaudo, M. (1980). Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers*, *19*, 1675–1687.
- Rodd, A. B., Davis, C. R., Dunstan, D. E., Forrest, B. A., & Boger, D. V. (2000). Rheological characterisation of 'weak gel' carrageenan stabilised milks. *Food Hydrocolloids*, *14*, 445–454.
- Schorsch, C., Jones, M. G., & Norton, I. T. (2000). Phase behaviour of pure micellar casein/ κ -carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. *Food Hydrocolloids*, *14*, 347–358.
- Trckova, J., Stetina, J., & Kinsky, J. (2004). Influence of protein concentration on rheological properties of carrageenan gels in milk. *International Dairy Journal*, *14*, 337–343.
- Tziboula, A., & Horne, D. S. (1998). Influence of milk proteins on the gel transition temperature and the mechanical properties of weak κ -carrageenan gels. In G. O. Phillips, P. A. Williams, & D. J. Wedlock (Eds.), *Gums and stabilisers for the food industry* (pp. 202–211). Oxford IRL Press.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd

Rheology and structure of mixtures of ι-carrageenan and sodium caseinate

Merveille Nono, Dominique Durand, Taco Nicolai*

Polymères, Colloïdes, Interfaces, UMR-CNRS, Université du Maine, 72085 le Mans Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2011

Accepted 5 July 2011

Keywords:

Carrageenan

Casein

Gel

Phase separation

ABSTRACT

Mixtures of ι-carrageenan (IC) and sodium caseinate (SC) were investigated and the results are compared with a similar study of mixtures of κ-carrageenan (KC) and SC. Segregative phase separation was observed at high biopolymer concentrations and the binodal was determined. At low IC concentrations, SC formed aggregates involving a very small amount of IC that were characterized with light scattering. The influence of adding SC on the gelation of IC during cooling and the shear modulus of the gels was studied in the presence of NaCl or KCl. The main conclusion of this work is that SC binds to both IC and KC, in the coil conformation as well as in the helix conformation, but that its effect on the rheology is much weaker for IC than for KC.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Carrageenan is a food grade polysaccharide derived from algae and is used as a texturing agent in processed food among which dairy products (Piculell, 2006; Therkelsen, 1993). For this reason the influence of adding carrageenan on the behavior of aqueous solutions of milk proteins has been widely investigated. There exists a variety of carrageenans with slightly different structures, the most common of which are κ- and ι-carrageenan. The difference between these variants is that κ-carrageenan (KC) contains one sulfate groups per sugar unit and ι-carrageenan (IC) two. Both variants show a coil–helix transition when the temperature is reduced below a critical temperature (T_c). T_c decreases with increasing ionic strength, and for KC also depends strongly on the type of salt (Rochas & Rinaudo, 1980). For pure IC, T_c depends on the valence, but little on the type of ion (Piculell, Nilsson, & Muhrbeck, 1992). In the helix conformation the carrageenan chains have a tendency to aggregate and gel. The elastic modulus of the gel increases with increasing polymer concentration. It depends on the salt concentration and, especially for KC, on the type of salt. The coil–helix transition can be reversed by heating and leads to melting of the gels. The temperature at which this happens (T_h) is most often larger than T_c for KC, but T_c and T_h are almost the same for IC.

Casein is the main protein component of milk and is a mixture of mainly four types of caseins (α_1 -, α_2 -, β - and κ -casein) (Fox, 2003). In milk it is present in the form of spherical complexes with a radius of approximately 100 nm that are called casein micelles. Casein micelles are stabilized by colloidal calcium phosphate (CCP), which

can be removed by precipitation and washing at pH 4. The precipitate can be redissolved in the form of sodium caseinate (SC) by adding NaOH (Mulvihill & Fox, 1989). SC associates into small particles with a hydrodynamic radius (R_h) that depends somewhat on the temperature, the ionic strength and the pH ($R_h = 11$ nm at 20 °C, 0.1 M NaCl and pH 7) (HadjSadok, Pitkowski, Benyahia, Nicolai, & Moulai-Mostefa, 2007).

The effect of adding KC or IC on skimmed milk or casein micelle solutions has been studied quite extensively (Artoft, Ipsen, Madsen, & De Vries, 2007; Bourriot, Garnier, & Doublier, 1999; Dalgleish & Morris, 1988; Drohan, Tziboula, McNulty, & Horne, 1997; Hemar, Hall, Munro, & Singh, 2002; Ji, Corredig, & Goff, 2008; Langendorff et al., 1999, 2000; Puvanenthiran, Goddard, McKinnon, & Augustin, 2003; Rodd, Davis, Dunstan, Forrest, & Boger, 2000; Schorsch, Jones, & Norton, 2000; Spagnuolo, Dalgleish, Goff, & Morris, 2005; Trckova, Stetina, & Kinsky, 2004; Tziboula & Horne, 1998). It appears that both carrageenans have a specific interaction with casein which leads to the formation of weak gels at low carrageenan concentrations at which pure carrageenan solutions remain liquid. On the basis of investigations of mixtures with individual caseins it was concluded that κ-casein binds specifically to the carrageenans (Lynch & Mulvihill, 1994a, 1994b, 1996; Snoeren, Both, & Schmidt, 1976; Snoeren, Payens, Jeunink, & Both, 1975). In comparison, mixtures with sodium caseinate have attracted relatively little attention in the past (Lynch & Mulvihill, 1994a, 1994b, 1996; Oakenfull, Miyoshi, Nishinari, & Scott, 1999).

Recently, we reported on a study of the structure and the rheology of mixtures of KC and SC at pH 7 (Nono, Lalouette, Durand, & Nicolai, 2011; Nono, Nicolai, & Durand, 2011). For KC in the coil conformation, macroscopic phase separation was observed at higher polymer concentrations between a phase rich in protein and a phase

* Corresponding author.

E-mail address: taco.nicolai@univ-lemans.fr (T. Nicolai).

rich in polysaccharides. In homogeneous mixtures caseinate aggregates were formed that contained a very small amount of KC. With increasing KC concentration an increasing fraction of these aggregates formed micron size particles. These particles could be observed with confocal laser scanning microscopy (CLSM) and had a tendency to associate into large flocs that precipitated. The fraction of proteins that precipitated increased with increasing KC concentration, but was independent of the SC concentration. It increased strongly with decreasing pH and at pH 5.0 almost all proteins precipitated in 6 g/L KC. Weak gels formed by KC in the helix conformation were strongly reinforced by the presence of SC. It was concluded that a mixed network was formed in the mixtures with both pure KC junctions and bonds that involved KC as well as SC.

Here we complement this investigation of KC/SC mixtures with a study of IC/SC mixtures and we compare the results obtained with the two types of carrageenan. We will show that even though SC binds to both KC and IC, the effect of SC on the rheology is much weaker for IC than for KC.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The sodium caseinate powder, provided by DMV International (Veghel, Netherlands), was dissolved in deionized water (Millipore) containing 3 mM sodium azide as a bacteriostatic agent. The sample contained 1.5 g/100 g Na, 56 mg/100 g Ca and 10 mg/100 g K. The pH was adjusted by slow addition of 0.01 M HCl or 0.01 M NaOH under continuous stirring and was set at 7 unless otherwise indicated. About 100 mL solution was dialyzed against about 4 L of solvent for a period of 24 h renewing the solvent several times. The solution was then centrifuged (Beckman Coulter, Allegra 64R Centrifuge) at 6×10^4 g for 2 h after which both a sediment and a turbid top layer appeared. After removal of the turbid layer, the clear supernatant was collected and filtered through 0.45 μ m pore size filters. The SC concentration (C_{SC}) was determined after filtration using UV absorption with an extinction coefficient of 0.81 L/g cm. The amount of protein that was eliminated by this purification method was less than 5%.

The sodium ι -carrageenan used for this study was an alkali treated extract from *Eucheuma cottonii* and was kindly provided by Cargill (Baupte, France). The sample contained 5.5 g/100 g Na, 56 mg/100 g Ca and 300 mg/100 g K. NMR showed that it contained about 5% KC. The IC powder was dissolved in Milli-Q water containing 3 mM sodium azide by stirring a few hours at 70 °C. The solution was extensively dialyzed against the solvent at pH7 and subsequently filtered through 0.45 μ m pore size Anatope filters. The concentration (C_{IC}) was determined by measuring the refractive index using refractive index increment 0.145 g/mL.

2.2. Rheology

Rheology oscillatory shear measurements were done using a stress controlled rheometer (AR2000, TA Instruments). Both parallel plates and cone and plate geometries were used. The applied stress was varied and the results shown here were obtained with low enough stresses so that the response was linear. After loading the sample the geometry was covered with a thin layer of mineral oil in order to avoid evaporation. The system was presheared in the liquid state at 80 °C at a shear rate of 100 s⁻¹ for a few minutes.

2.3. Confocal scanning laser microscopy

Confocal scanning laser microscopy was used in the fluorescence mode. Observations were made with a Leica TCS-SP2

(Leica Microsystems Heidelberg, Germany). A water immersion objective lens was used (HCx PL APO 63 \times NA = 1.2) with theoretical resolution 0.3 μ m in the x - y plane. SC was labeled with the fluorochrome rhodamine B isothiocyanate (Rho), by adding a small amount of a concentrated rhodamine solution to the SC solutions before heat treatment. Rho was excited using a helium–neon laser with wavelength 543 nm and the fluorescence was detected with a photomultiplier.

2.4. Light scattering

Light scattering measurements were done using commercial static and dynamic light scattering equipment (ALV-Langen, Germany) equipped with an He–Ne laser emitting vertically polarized light at $\lambda = 632$ nm. The temperature was set at 20 °C and controlled by a thermo-stat bath to within ± 0.1 °C. Measurements were made at angles of observation (θ) between 12 and 150 degrees. The relative excess scattering intensity (I_r) was calculated as the intensity minus the solvent scattering divided by the scattering intensity of toluene. In dilute solutions I_r is related to the weight average molar mass (M_w) and the structure factor ($S(q)$) of the solute (Brown, 1996; Nicolai, 2007):

$$I_r = KCM_w S(q) \quad (1)$$

with K a constant that depends on the refractive index increment of the solute. $S(q)$ is a function of the scattering wave vector: $q = 4\pi n \cdot \sin(\theta/2)/\lambda$, with n the refractive index of the solution.

3. Results

3.1. Pure IC solutions

The gelation of pure IC has already been investigated before (Hossain, Miyanaga, Maeda, & Nemoto, 2001; Piculell, 2006) and here we only show a few measurements that are pertinent for the present investigation on the effect of adding SC. It was shown elsewhere that gelation of KC can be very slow close to T_c (Meunier, Nicolai, Durand, & Parker, 1999) and it was found here that gelation of IC is even slower than that of KC at the same value of $T_c - T$. This is shown for a solution of 2 g/L IC at 0.1 M NaCl in Fig. 1a where G' at 1 Hz is plotted as a function of time after cooling the system to different temperatures starting from 80 °C. This system gelled between 40 and 35 °C, but it took considerable time to approach the steady state values of G' and G'' even at 20 °C. We note that true steady state was not observed at any temperature within a period of 1.5 h, but the evolution was very slow after this delay unless T was within a few degrees of T_c . Equilibration during heating was also slow. Fig. 1b shows the evolution of G' after heating the system in steps starting from 2 °C. The gel fully disintegrated between 35 and 40 °C.

The implication is that for IC cooling and heating ramps need to be done at prohibitively slow rates in order to be representative of the steady state. For KC, results obtained at a rate of 1 °C/min were the same as those obtained at even slower rates for $(T_c - T) > 3$ °C, but for IC this was not the case and therefore we opted for a different approach. We rapidly cooled the system from 80 °C to a given temperature or heated it from 2 °C. Subsequently, we let the sample evolve for 90 min as is illustrated in Fig. 1. For this particular system a slow increase of G' was observed during cooling at 35 °C, while a gel formed at 2 °C melted within a few minutes at 40 °C.

The frequency (f) dependence of G' and G'' was determined 90 min after heating or cooling. G' was independent of f and larger than G'' indicative of gels, except very close to T_c where the systems behaved like viscoelastic liquids. Thus, except close to T_c , G' obtained at 1 Hz may be taken as the elastic modulus of the gels.

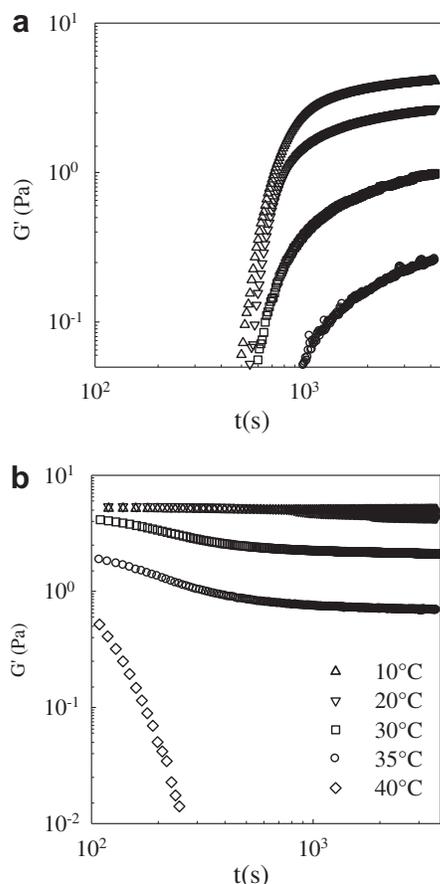


Fig. 1. Time dependence of the storage shear modulus at 1 Hz after reducing the temperature from 80 °C (a) or after increasing the temperature in steps starting from 2 °C (b). The final temperatures are indicated in Fig. 1b. It took about 300 s to cool the system from 80 °C to 40 °C, where gelation started and it took about 100 s to heat the system from 2 °C to the chosen temperatures.

The values of G' are plotted as a function of T in Fig. 2 for solutions containing 2 g/L IC in 0.1 M NaCl or 0.1 M KCl. These two types of cations were chosen because they lead to strongly different gelation of KC and are much used in applications. The values obtained during cooling were somewhat larger than those obtained during

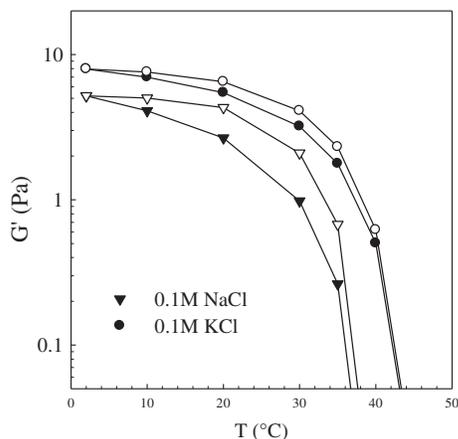


Fig. 2. Temperature dependence of the storage shear modulus of IC gels at $C_{IC} = 2$ g/L in 0.1 M NaCl or KCl. The open symbols represent results obtained after cooling from 80 °C and the filled symbols those obtained after heating from 2 °C, see text.

heating, which we attribute to the fact that steady state was not yet obtained after 90 min. The true values of G' are thus intermediate. The shear modulus in 0.1 M KCl was slightly larger than in 0.01 M NaCl and T_c was about 5 °C larger in KCl, which confirms results obtained by Piculell et al. on 10 g/L IC in 0.1 M NaCl and 0.1 M KCl (Piculell et al., 1992). There was no significant difference between the critical temperature to form a gel during cooling (T_c) and to melt a gel during heating (T_h), as was already noted in the literature (Michon, Cuvelier, Launay, & Parker, 1996; Piculell et al., 1992).

The effect of the ionic strength was studied in more detail by varying the NaCl concentration ($[NaCl]$). As for IC the dependence on the KCl concentration is very close to that on the NaCl concentration it was not investigated further. The contribution of counterions to the ionic strength was negligible at the polysaccharide concentration used for this study. T_c was within the experimental error equal to T_h and increased approximately linearly with $\log([NaCl])$, see Fig. 3. For comparison we show in the same figure the dependence of T_c and T_h on $[NaCl]$ and $[KCl]$ for KC. Over the whole range of ionic strengths investigated, the critical temperatures are larger for KC than for IC in the presence of KCl and smaller in the presence of NaCl. For IC the difference between T_c and T_h was negligible, while for KC it increased with increasing salt concentration.

The effect of the NaCl concentration on the elastic shear modulus of IC gels at 2 °C is shown in Fig. 4. At this temperature, gels are formed by IC at $C_{IC} = 2$ g/L for $[NaCl] \geq 0.06$ M. With increasing salt concentration G' increased from about 2 Pa at 0.06 M NaCl to a maximum of about 7 Pa at 0.25 M NaCl and then decreased. For comparison, KC does not form a gel yet at 0.1 M NaCl, but at 0.5 M NaCl the elastic modulus of the gel was about 150 Pa. As mentioned above, for IC gels the shear modulus in NaCl and KCl is close and a maximum of G' as a function of the KCl concentration was reported at about 0.2 M KCl by Hossain et al. (2001). However, KC forms much stronger gels in the presence of KCl with a strong salt concentration dependence (Nono, Nicolai, et al., 2011), see Fig. 4.

A few measurements were done for IC at $C_{IC} = 10$ g/L that showed larger values of G' (220 Pa and 110 Pa at 0.1 M and 0.25 M NaCl, respectively), but also higher critical temperatures (50 °C and 70 °C, respectively). The increase of G' with increasing polymer concentration was expected, but the increase of T_c was more surprising as for pure KC solutions we did not observe a significant effect of the polymer concentration on T_c . An increase of T_c with

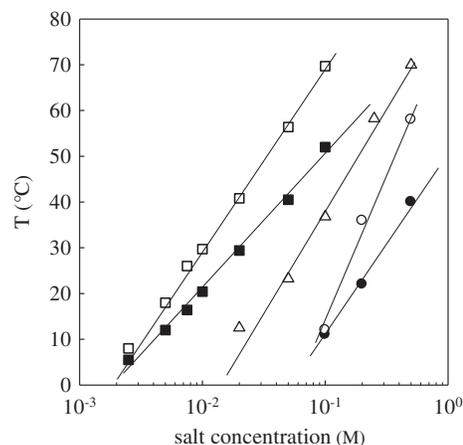


Fig. 3. Critical temperatures of gel formation of KC and IC at 2 g/L during cooling (open symbols) and melting during heating (filled symbols) as a function of the salt concentration. Squares and circles indicate the values for KC in KCl and NaCl, respectively. Triangles indicate the values for IC in NaCl. For IC the difference between T_c and T_h was negligible.

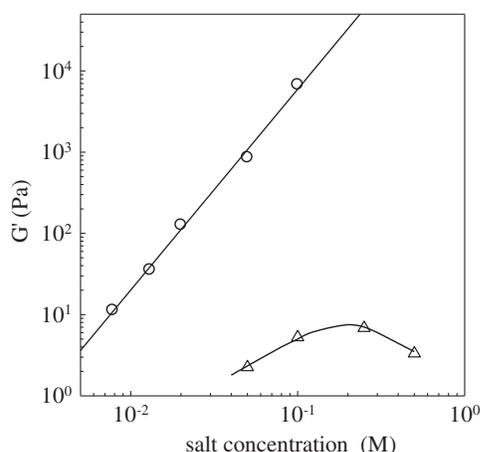


Fig. 4. Shear modulus of KC gels (circles) and IC gels (triangles) at 2 °C as a function of the KCl or NaCl concentration, respectively. The results for KC were taken from Nono, Nicolai, et al. (2011).

increasing IC concentration was earlier reported by Michon et al. (1996) and by Hossain et al. (2001).

In summary, IC forms gels with higher T_c than KC in NaCl, but forms much weaker gels with lower T_c than KC in KCl. Contrary to KC, gelation of IC occurs without hysteresis and is almost the same in NaCl and KCl.

3.2. Structure of mixed IC/SC solutions

Mixtures of IC and SC were prepared in 0.1 M NaCl and kept at temperatures above T_c . Phase separation was observed at high concentrations of IC or SC. The binodal was determined by a combination of direct observation using CLSM and analysis of the two phases after macroscopic phase separation as explained in detail by Nono, Lalouette, et al. (2011). Fig. 5 shows that compared to KC the binodal of IC is shifted to somewhat larger SC concentrations, which is probably caused by the higher charge density of IC. A similar shift to larger SC concentration was found for KC/SC mixtures in the absence of added salt (Nono, Lalouette, et al., 2011). For $T > T_c$ the effect of the temperature on the binodal was negligible. When the systems were mixed in the biphasic regime at $T > T_c$ and subsequently rapidly cooled below T_c , microphase separation was seen in CSLM.

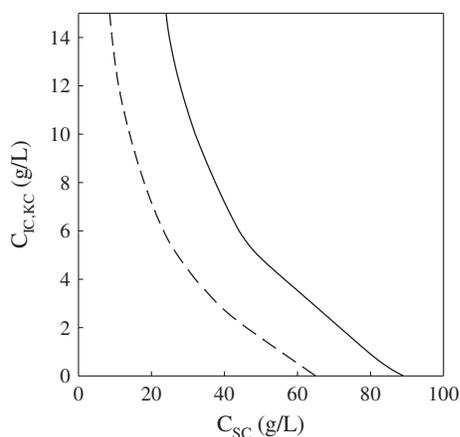


Fig. 5. Phase diagram of mixtures of carrageenan and sodium caseinate in 0.1 M NaCl at $T > T_c$. The solid and the dashed lines indicate the binodal for IC/SC and KC/SC mixtures, respectively.

As was mentioned in the introduction, a striking feature of KC/SC mixtures was the formation of rather dense protein clusters with a diameter of a few microns. Though such protein clusters could also be seen in CLSM images of IC/SC mixtures, see Fig. 6, the amount was much smaller and less than 5% proteins precipitated even at pH 5.0 where almost all proteins precipitated in KC/SC mixtures. Note, however, that the fact that almost no precipitation was observed for IC/SC mixtures does not imply that interaction between IC and SC is weaker than between KC and SC. It only means that the IC/SC co-aggregates have a much weaker tendency to form large dense clusters than the KI/SC co-aggregates.

At low KC concentrations ($C_{KC} < 3$ g/L) the fraction of the proteins that formed micron particles in KC/SC mixtures was small and their formation was very slow. However, light scattering showed that even in this case smaller aggregates were formed immediately after mixing. The size of these aggregates increased with increasing KC concentration, but varied little with the SC concentration. In IC/SC mixtures we also observed aggregates using light scattering. At a fixed SC concentration of 10 g/L, the size of the aggregates grew strongly with increasing IC concentration between 1 and 4 g/L, see Fig. 7a, and at $C_{IC} = 5$ g/L protein particles could be seen in CLSM images, see Fig. 6. Keeping the IC concentration fixed at 1 g/L, a much weaker increase of the aggregate size was found with increasing SC concentration between 1 and 10 g/L, see Fig. 7b. The structure factor of the aggregates formed in mixtures with KC could be described by the following simple equation:

$$S(q) = \left[1 + (q \cdot R_{gz})^2 / 3 \right]^{-1} \quad (2)$$

with R_{gz} the z-average radius of gyration. The same equation described approximately the structure factor of aggregates formed in mixtures with IC. The only difference is that the local structure of the aggregates is denser in mixtures with IC so that M_w of aggregates with the same R_{gz} are about 50% larger. Here we assume, as we did for KC/SC mixtures, that all proteins form aggregates in IC/SC mixtures and that the fraction of polysaccharide in the aggregates is very small.

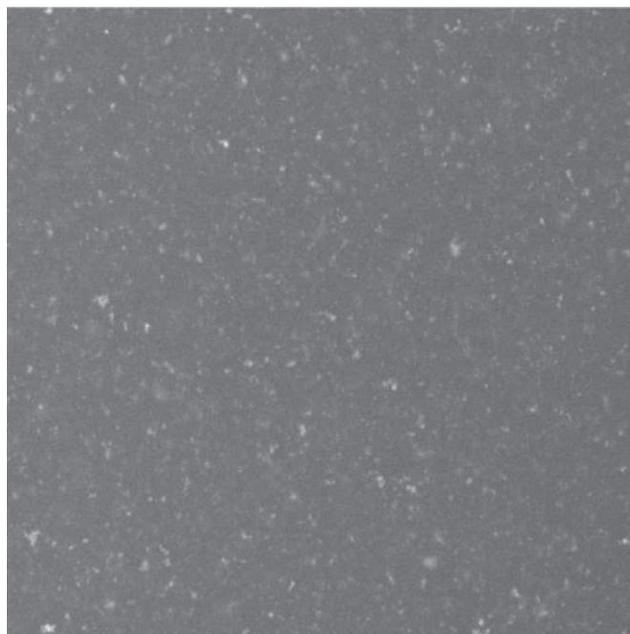


Fig. 6. CSLM image of a mixture of 5 g/L IC and 10 g/L SC in 0.1 M NaCl. The white spots indicate protein rich clusters. The image represents 160×160 μm.

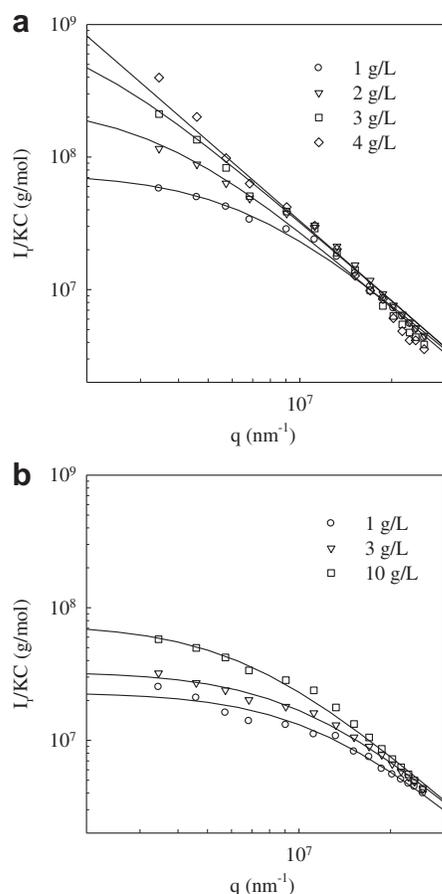


Fig. 7. Dependence of I_1/KC on the scattering wave vector for IC/SC mixtures with C_{SC} fixed at 10 g/L and varying C_{IC} (a) or with C_{IC} fixed at 1 g/L and varying C_{SC} (b). The solid lines represent fits to eq. (1) using eq. (2) for the structure factor.

3.3. Rheology of mixed IC/SC solutions

The effect of adding SC on the rheology of IC solutions was investigated at 0.1 M NaCl for homogeneous mixtures containing $C_{IC} = 2$ g/L and various concentrations of SC. Again G' was determined 90 min after cooling or heating to different temperatures. As for pure IC solutions, we observed a small difference between cooling and heating, which may be attributed to the slow kinetics, but the difference was smaller than for pure IC. In Fig. 8, we plotted average values of G' as a function of T for systems with different SC concentrations between 0 and 60 g/L. It is clear that adding SC has very little effect on the gelation of IC. This is strikingly different from the effect of SC on KC in the presence of 0.1 M NaCl. In the latter case, no gels are formed at 2 °C if $C_{SC} \leq 3$ g/L, but at higher SC concentrations G' increases strongly and becomes orders of magnitude larger than in the corresponding IC/SC mixtures, see Fig. 8. The highest SC concentration used in mixtures with KC was 40 g/L, because at higher concentrations the system phase separated. Replacing NaCl by KCl does not have a significant effect on IC/SC mixtures, but it makes a big difference for KC/SC mixture. In the presence of 0.1 M KCl, pure KC already forms a strong gel at 2 °C ($G' = 10^4$ Pa) and adding SC has almost no effect. If anything it slightly weakens the gels.

In the presence of 0.1 M NaCl, adding SC to IC has little effect on T_c and T_h which remain the same within the experimental error, see Fig. 9. The small effect on T_c of adding SC to IC is compared to the effect of adding SC to KC on T_c and T_h in Fig. 9. For KC/SC mixtures at the same conditions, T_c also increased only weakly with increasing

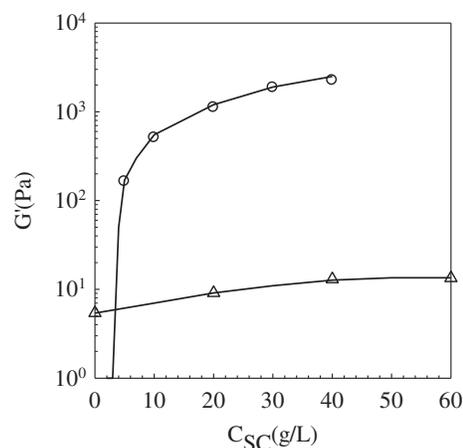


Fig. 8. Storage shear modulus of mixed KC/SC (spheres) or IC/SC (triangles) gels at 0.1 M NaCl and 2 °C containing 2 g/L carrageenan as a function of the SC concentration. KC does not form a gel for $C_{SC} < 3$ g/L. The solid lines are guides to the eye.

SC concentration, but was systematically smaller than for IC/SC mixtures. T_c was almost the same as T_h in the absence of SC, but adding 5 g/L SC to the KC solution led to an abrupt increase of T_h by more than 10 degrees. Adding more than 5 g/L SC did not further increase T_h significantly. A detailed study of the shear modulus of KC/SC mixtures during melting showed that mixed gels were formed with two types of crosslinks: pure KC crosslinks and crosslinks that involved both proteins and KC (Nono, Nicolai, et al., 2011). The latter melted at about 31 °C, which explains the jump of T_h when SC was added, see Fig. 9. For KC/SC mixtures in the presence of 0.1 M KCl, $T_c \approx 50$ °C and $T_h \approx 70$ °C were not influenced by adding SC.

It appears that at 0.1 M NaCl or KCl adding SC has very little influence on the rheology of IC solutions similarly to what was observed for KC at 0.1 KCl. However, in the latter case an effect of adding SC was observed at low KCl concentrations. It was concluded that if pure KC gels were strong with high T_c , the bonds formed between the KC helices dominated the rheology and that therefore the contribution of the crosslinks involving SC could only be observed for weaker gels with lower T_c . In order to see if the same was the case for IC/SC mixtures, we varied the NaCl concentration

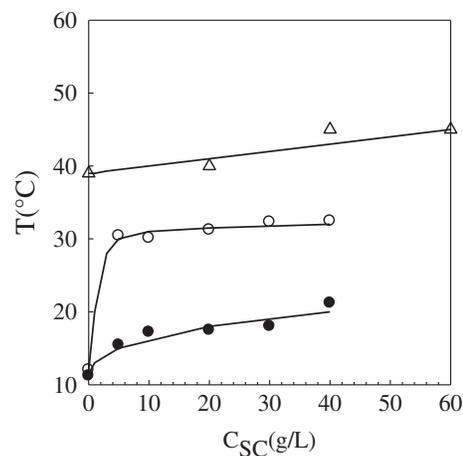


Fig. 9. Critical temperatures of gel formation during cooling (open symbols) and melting during heating (filled symbols) as a function of the SC concentration for mixtures with 2 g/L KC (circles) or IC (triangles) at 0.1 M NaCl. For IC/SC mixtures T_h is the same as T_c within the experimental error and is not indicated by separate symbols. The solid lines are guides to the eye.

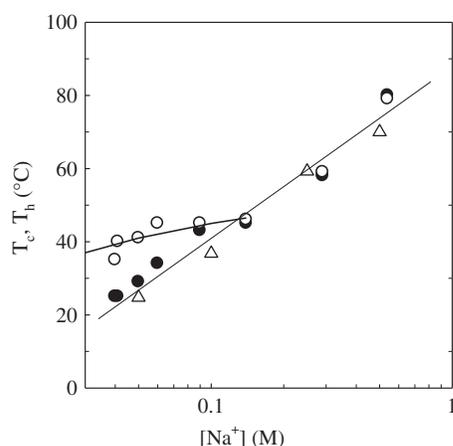


Fig. 10. Critical temperatures of gel formation during cooling (open symbols) and melting during heating (filled symbols) as a function of the total Na^+ concentration for pure IC solutions at $C_{IC} = 2 \text{ g/L}$ (triangles) and for mixtures with 60 g/L SC (circles). For pure IC solutions T_c and T_h were the same within the experimental error. The solid lines are guides to the eye.

for a mixture containing 2 g/L IC and 60 g/L SC. Fig. 10 shows the dependence of T_c and T_h on the total Na^+ concentration ($[\text{Na}^+]$) that includes the contribution of the SC counterions ($[\text{Na}^+] = 0.04 \text{ M}$). T_c is close to that of pure IC solutions, but T_h is significantly larger at lower ionic strengths. The effect is smaller than for KC/SC mixtures, see Fig. 3a in Nono, Nicolai, et al. (2011), but it nevertheless suggests that bonds involving SC are also formed in IC/SC mixtures.

The effect of SC on the elastic shear modulus was relatively small for IC compared to KC over the range of ionic strengths investigated. Fig. 11 compares the dependence of the shear moduli at 2 °C on the Na^+ concentration for IC in the presence and absence of 60 g/L SC. In the presence of SC, G' reached a maximum of 20 Pa at about 0.1 M Na^+ compared to 7 Pa at about 0.2 M Na^+ in the absence of SC. In comparison, pure KC at 2 g/L did not gel at 0.1 M Na^+ , but had a shear modulus of more than 10^3 Pa when 40 g/L SC was added, see Fig. 8. Clearly, the structure of the mixed IC/SC gel is different from that of the mixed KC/SC gel.

The only previous investigation of the rheology of IC/SC mixtures was reported by Lynch and Mulvihill (1994b, 1996). However, in most of the mixtures that they investigated, Ca^{2+} ions were present

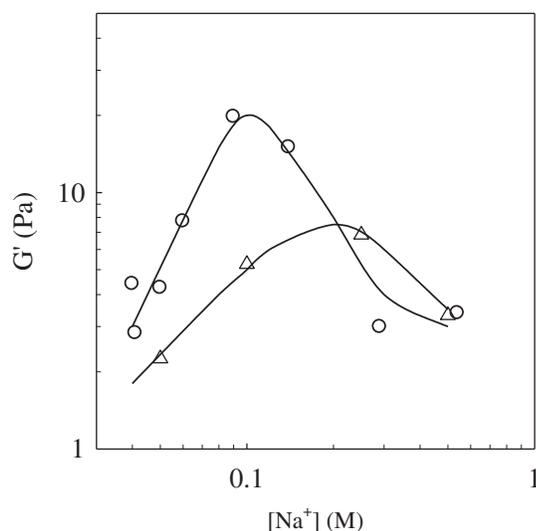


Fig. 11. Dependence of the storage shear modulus on the total Na^+ concentration for pure IC gels at 2 g/L (triangles) and in mixtures with 60 g/L SC (spheres) at 2 °C.

that are known to interact specifically with casein. A few measurements were done for a system containing about 10 g/L IC in 20 mM KCl and 10 mM imidazole–HCl buffer and different amounts of SC up to about 40 g/L. A moderate increase of the storage shear modulus was observed from about 40 Pa to about 150 Pa. The absolute values are, of course, larger than for the solutions at 2 g/L IC studied here, but the relative increase is comparable. Lynch et al. also studied the effect of adding pure casein fractions. Interestingly, they found a stronger effect on G' for pure κ -casein than for the other caseins and for SC. They concluded that only for κ -casein the reinforcement of the gel was caused by interactions between the casein and IC and that for the other caseins it was due to excluded volume effects. However, the light scattering results shown here suggest that in mixtures with SC all caseins interact with IC, but perhaps this happens because the mixed caseins form small aggregates that contain κ -casein together with the other proteins. It is possible that only κ -casein interacts directly with IC, and that the other caseins associate to IC via κ -casein.

4. Conclusion

The comparison between mixtures of sodium caseinate with either ι - or κ -carrageenan has shown that SC binds to both types of carrageenans, but with different consequences. Macroscopic phase separation occurs in mixtures of SC with either IC or KC in the coil conformation, but the binodal was shifted to higher SC concentrations for IC. In the one phase regime small aggregates are formed immediately after mixing that probably involve most of the proteins both for IC and for KC, but only a very small fraction of the carrageenan. At higher carrageenan concentrations a fraction of these aggregates assembles into denser micro particles which themselves slowly flocculate and precipitate. In KC/SC mixtures this fraction can be almost unity, but in IC/SC mixtures it was limited to less than 5%.

The effect of adding SC on the rheological properties of carrageenan in the helix conformation is much weaker for IC than for KC. The shear modulus of weak KC gels can be increased by orders of magnitude by adding a few percent SC, while the increase for IC was at best about a factor of 4. Adding SC did not influence the coil–helix transition temperature and thus the temperature below which the system gels, but it did increase the melting temperature if it is low for pure carrageenan solutions. The increase of the melting temperature is due to the formation of crosslinks that involve proteins and that melt at about 30 °C for KC/SC mixtures and about 40 °C for IC/SC mixtures.

References

- Arltoft, D., Ipsen, R., Madsen, F., & De Vries, J. (2007). Interactions between carrageenans and milk proteins: a microstructural and rheological study. *Biomacromolecules*, 8, 729–736.
- Bourriot, S., Garnier, C., & Doublier, J.-L. (1999). Micellar-casein– κ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. *Carbohydrate Polymers*, 40, 145–157.
- Brown, W. (1996). *Light scattering: Principles and development*. Oxford: Clarendon Press.
- Dagleish, D. G., & Morris, E. R. (1988). Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles. *Food Hydrocolloids*, 2, 311–320.
- Drohan, D. D., Tziboula, A., McNulty, D., & Horne, D. S. (1997). Milk protein–carrageenan interactions. *Food Hydrocolloids*, 11, 101–107.
- Fox, P. F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In K. A. P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Proteins* (3rd ed.). *Advanced dairy chemistry*, Vol. 1 (pp. 427–435). (42).
- Hadjisadok, A., Pitkowski, A., Benyahia, L., Nicolai, T., & Moulai-Mostefa, N. (2007). Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids*, 22, 1460–1466.
- Hemar, Y., Hall, C. E., Munro, P. A., & Singh, H. (2002). Small and large deformation rheology and microstructure of κ -carrageenan gels containing commercial milkprotein products. *International Dairy Journal*, 12, 371–381.

- Hossain, K. S., Miyanaga, K., Maeda, H., & Nemoto, N. (2001). Sol–gel transition behavior of pure-carrageenan in both salt-free and added salt states. *Biomacromolecules*, 2, 442–449.
- Ji, S., Corredig, M., & Goff, H. D. (2008). Aggregation of casein micelles and k-carrageenan in reconstituted skim milk. *Food Hydrocolloids*, 22, 56–64.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A., & De Kruif, C. G. (1999). Casein micelle/iota carrageenan interactions in milk: influence of temperature. *Food Hydrocolloids*, 13, 211–218.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A., & De Kruif, C. G. (2000). Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, 14, 273–280.
- Lynch, M. G., & Mulvihill, D. M. (1994a). The influence of caseins on the rheology of k-carrageenan gels. In G. O. Phillips, P. A. Williams, & D. J. Wedlock (Eds.), *Gums and stabilisers for the food industry*, Vol. 7 (pp. 323–332). Oxford IRL Press.
- Lynch, M. G., & Mulvihill, D. M. (1994b). The influence of caseins on the rheology of ι-carrageenan gels. *Food Hydrocolloids*, 8, 317–329.
- Lynch, M. G., & Mulvihill, D. M. (1996). Rheology of ι-carrageenan gels containing caseins. *Food Hydrocolloids*, 10, 151–157.
- Meunier, V., Nicolai, T., Durand, D., & Parker, A. (1999). Light scattering and viscoelasticity of aggregating and gelling κ-carrageenan. *Macromolecules*, 32, 2610–2616.
- Michon, C., Cuvelier, G., Launay, B., & Parker, A. (1996). Concentration dependence of the properties of gelatin and iota-carrageenan systems at the gel point. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 93, 819–827.
- Mulvihill, D. M., & Fox, P. F. (1989). Caseins and caseinate manufacture. In P. F. Fox (Ed.), *Developments in dairy chemistry*, Vol. 4 (pp. 97–130). London & New York: Elsevier Applied Science.
- Nicolai, T. (2007). Food structure characterisation using scattering methods. In D. J. McClements (Ed.), *Understanding and controlling the microstructure of complex foods* (pp. 288–310). Cambridge: Woodhead.
- Nono, M., Lalouette, L., Durand, D., & Nicolai, T. (2011). Cluster formation and phase separation in mixtures of sodium [kappa]-carrageenan and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 25, 743–749.
- Nono, M., Nicolai, T., & Durand, D. (2011). Gel formation of mixtures of [kappa]-carrageenan and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 25, 750–757.
- Oakenfull, D., Miyoshi, E., Nishinari, K., & Scott, A. (1999). Rheological and thermal properties of milk gels formed with k-carrageenan. I. Sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 13, 525–533.
- Piculell, L. (2006). Gelling carrageenans. In A. M. Stephen, G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Food polysaccharides and their applications* (pp. 239). Boca Raton: CRC Press.
- Piculell, L., Nilsson, S., & Muhrbeck, P. (1992). Effects of small amounts of kappa-carrageenan on the rheology of aqueous iota-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*, 18, 199–208.
- Puvanenthiran, A., Goddard, S. J., McKinnon, I. R., & Augustin, M. A. (2003). Milk-based gels made with kappa-carrageenan. *Journal of Food Science*, 68, 137–141.
- Rochas, C., & Rinaudo, M. (1980). Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers*, 19, 1675–1687.
- Rodd, A. B., Davis, C. R., Dunstan, D. E., Forrest, B. A., & Boger, D. V. (2000). Rheological characterisation of 'weak gel' carrageenan stabilised milks. *Food Hydrocolloids*, 14, 445–454.
- Schorsch, C., Jones, M. G., & Norton, I. T. (2000). Phase behaviour of pure micellar casein/k-carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. *Food Hydrocolloids*, 14, 347–358.
- Snoeren, T. H. M., Both, P., & Schmidt, D. G. (1976). Electron-microscopic study of carrageenan and its interaction with epsilon-casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 30, 132–141.
- Snoeren, T. H. M., Payens, T. A. J., Jeunink, J., & Both, P. (1975). Electrostatic interaction between κ-carrageenan and κ-casein. *Milchwissenschaft*, 30, 393–396.
- Spagnuolo, P. A., Dalgleish, D. G., Goff, H. D., & Morris, E. R. (2005). Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 19, 371–377.
- Therkelsen, G. H. (1993). Carrageenan. In R. L. Whistler, & J. N. BeMiller (Eds.), *Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives* (3rd ed.). (pp. 145–180) New York: Academic Press.
- Trckova, J., Stetina, J., & Kinsky, J. (2004). Influence of protein concentration on rheological properties of carrageenan gels in milk. *International Dairy Journal*, 14, 337–343.
- Tziboula, A., & Horne, D. S. (1998). Influence of milk proteins on the gel transition temperature and the mechanical properties of weak k-carrageenan gels. In G. O. Phillips, P. A. Williams, & D. J. Wedlock (Eds.), *Gums and stabilisers for the food industry* (pp. 202–211). Oxford IRL Press.