

Assemblages microniques de protéines sériques produits par étuvage à pH 9,5 : mécanisme de formation et propriétés physico-chimiques et fonctionnelles

Elise Schong

▶ **To cite this version:**

Elise Schong. Assemblages microniques de protéines sériques produits par étuvage à pH 9,5 : mécanisme de formation et propriétés physico-chimiques et fonctionnelles. Ingénierie des aliments. Agrocampus Ouest, 2017. Français. ⟨NNT : 2017NSARB302⟩. ⟨tel-02009721v2⟩

HAL Id: tel-02009721

https://theses.hal.science/tel-02009721v2

Submitted on 7 Mar 2019

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.



HAL Authorization

UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE

AGRO
CAMPUS
OUEST

Élise SCHONG • 23 novembre 2017

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université Bretagne Loire
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Science de l'aliment

ÉCOLE DOCTORALE • Écologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation (EGAAL)

LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR INRA-AO Science et technologie du lait et de l'oeuf (STLO)

Assemblages microniques de protéines sériques produits par étuvage à pH 9,5 : mécanisme de formation et propriétés physico-chimiques et fonctionnelles

Romain JEANTET
Professeur, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA-AO STLO / *président*

Joël SCHER
Professeur, Université de Lorraine / *rapporteur*

Gérard CUVELIER
Professeur, AgroParisTech / *rapporteur*

Camille LOUPIAC
Maître de conférences, AgroSup Dijon / *examinatrice*

Marie-Hélène FAMELART
Chargée de recherche, UMR INRA-AO STLO / *directrice de thèse*

Benoît GOLDSCHMIDT
Fromageries Bel, Vendôme / *membre invité*

« C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite.

Un plein effort est une pleine victoire. »

Gandhi

Remerciements

Je souhaite remercier en premier mes parents, c'est grâce à eux que j'ai pu arriver là où j'en suis. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté. Je vous en suis infiniment reconnaissante.

Un immense merci à ma directrice de thèse, Marie-Hélène Famelart, pour m'avoir guidée tout au long de ma thèse. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour toute l'aide que tu as pu m'apporter durant ces 3 années.

Je remercie les Régions Bretagne et Pays de la Loire d'avoir financé ce projet.

Je remercie Gérard Cuvelier et Joël Scher d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Romain Jeantet, Camille Loupiac et Benoît Goldschmidt de faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes qui travaillent au STLO. Je remercie Joëlle Léonil, ancienne Directrice de l'UMR STLO, de m'y avoir accueillie à mon arrivée. Merci à Yves Le Loir, le nouveau Directeur. Je remercie également tous les autres membres du ComDir.

Je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à cette thèse. Merci Pascaline Hamon, Maryvone Pasco, Pierre Schuck, Valérie Briard-Brion, Julien Jardin, Anne Dolivet, Jean Jacques Dubois, Stéphane Pezennec, Florence Rousseau, Thomas Croguennec, Valérie Gagnaire, Benoit Robert, Marie-Noëlle Madec, Pierre Schuck, Saïd Bouhallab, Céline Raguénès-Nicol, Taco Nicolai, Alain Riaublanc, Isabelle Capron, Anne Pitkowski, Morgane Raison, Stéphan Rouverand, ainsi que tous les autres membres de Bba. Merci Rachel Boutrou pour l'aide que tu apportes aux doctorants. Merci à toute l'équipe ISFPL.

Un grand merci à Paulette Amet et Jessica Musset. Merci pour les « pauses Paulette » qui sont toujours d'agréables moments de détente et de convivialité. Merci aussi aux membres du secrétariat Danielle Guilloux, Laurence Fauvel et Nathalie Le Marre. Merci Christophe Geneste, informaticien du laboratoire, de m'avoir sauvée la dernière semaine de ma thèse.

Merci à tous les autres doctorants, post-doctorants, stagiaires et autres que j'ai pu côtoyer tout le long de ma thèse et avec qui j'ai pu me lier d'amitié. Merci à mes collègues de bureau Samira et Song :

ce fut un réel plaisir de partager ce bureau « Frazina » avec vous. Merci Samira pour ton hospitalité, ton sourire et ta gentillesse. My Chinese bro', S(ch)ong, merci pour tes photos montages, en particulier celui de Mona Lisa. Merci à Laurena et Rayanatou, mes nouvelles collègues de bureau qui ont pris le relais. Merci Guilherme, je marche un peu sur tes pas (même équipe, même bureau, même sport). J'en profite pour remercier le Jeong Tong Taekwondo Dojang, mon club de taekwondo. Merci Lélia Lacou, ma plus belle rencontre à Rennes. Merci Carlito d'avoir été mon fournisseur officiel de jambon espagnol et de morcilla. Merci Jordane pour les homards, ce fut un plaisir de s'initier à la chasse sous-marine avec toi. Merci à la team karaoké du mardi soir, c'est-à-dire Alexia, Thomas (mon petit CDD), Manon G., Laurena, Stéphano et Aurélie. Merci Arlanus, Andreza, Mathieu, Federico, Fillipe, Domitille, Manon H., Floriane G., Fanny, Linda, Lucie, Natayme, Oumaima, Anne-Laure, Floriane D., Thiébaud, Guillaume, Lucile, Laure, Jonathan, Simon, etc. Merci aussi aux autres amis que j'ai pu rencontrer à Rennes. Merci à la fameuse coloc' Perrine, Andréas, Samira. Merci à Gaëtan, Anne-Cécile, Alice, Pierre, Adèle, Xavier T., Xavier L., et tous les Brésiliens.

Je remercie Florentin Michaux et Jordane Jasniewski, mes anciens maîtres de stage de Master 2, qui m'ont donné goût à la recherche.

Merci à tous mes amis rencontrés lors de mon cursus universitaire qui m'a amenée vers cette thèse. Un merci tout particulier à mes bonasses Livia, Léna (et Olivier), Sonia (et William) et Caroline et aussi à Paul, Frédéric, Alexandra, Lydie et Perrine. Vous avez rendu ces années super belles. Merci à mes plus vieux amis. Je pense particulièrement à Elodie.

Enfin, je remercie chaleureusement tous les membres de ma famille. Merci Théo, Marion, Noah, Raphaël, Selam, Vera, Emile, Jacqueline, Charles, Mathieu, Elise D., Louise, Alice, Caroline D., Stéphane, Eudoxie, Juliette, le « petit » Guillaume, Julien, Laure, Oscar, Hortense, Bérénice, Caroline G.& Olivier (merci pour l'accueil en Malaisie), Clara, Benoît, Marius, Catherine, Alain, Gisèle, José, Françoise, Pierre, Chantale, Dominique, Irène, Christian, Laurence, Christian C., Grégoire, Roméo, Edgard, Gaby, Martine. Merci à Felix pour la visite de l'Ile de la Réunion. Merci aussi à toute ma belle-famille Jean-Paul, Brigitte, Aurélie, Matthieu, Anne-Sophie, Julie, Paulette et les autres.

J'ai gardé le meilleur pour la fin, je remercie mon amour Guillaume D. pour tout ce qu'il m'apporte chaque jour, c'est lui ma plus grande force.

TABLE DES MATIERES

A. Introduction générale 23

B. Revue de la littérature 29

1. Les protéines du lait 30

1.1 Les caséines 31

1.2 Les protéines sériques 32

1.2.1 β-Lactoglobuline 32

1.2.2 α-Lactalbumine 34

1.2.3 Les protéines mineures 35

2. Le chauffage des protéines sériques 35

2.1 Chauffage en voie liquide 35

2.2 Chauffage en voie sèche 37

2.2.1 Revue bibliographique : « Dry heating of whey proteins » 37

2.3 Cas particulier de la réaction de Maillard 52

C. Objectifs et stratégie de la thèse 56

D. Matériel et méthodes 57

1. Poudres de protéines laitières 58

2. Préparation des poudres étuvées 59

3. Préparation et fractionnement des suspensions 61

3.1 Préparation des suspensions S0 61

3.2 Fractionnement de la suspension S0 61

3.2.1 Fractionnement sans lavage 61

3.2.2 Fractionnement avec lavage 62

4. Caractérisation des poudres 63

4.1 Extrait sec 63

4.2 Activité de l'eau 64

4.3 Indice de brunissement 64

4.4 Détermination de la taille des particules de poudre 65

4.5 Microstructure des particules de poudre 66

5. Caractérisation des suspensions d'AMI 67

5.1 Distribution des protéines dans les différentes fractions 67

5.1.1 Protéines natives résiduelles (NP) 67

5.1.2 Assemblages et protéines dénaturées solubles (SDAP) 69

5.1.3 Assemblages microniques (AMI) 70

5.2 Rendement humide, rendement sec et teneur en eau des AMI 70

5.3 Microstructure des AMI 71

5.3.1 Microscopie confocal à balayage laser 71

5.3.2 Microscopie électronique à balayage (SEM) et cryo-microscopie électronique à balayage (Cryo-SEM) 72

5.4 Détermination de la taille des AMI 73

5.5 Dosage du lactose libre 74

5.6 Dosage de la carboxyméthyllysine 75

5.7 Dosage des acides aminés totaux 75

5.8 Densité optique des suspensions S0 76

5.9 Analyse du gonflement des particules de poudre étuvée 76

5.10 Analyse SDS-PAGE 77

5.11 Effet du pH sur les AMI 77

5.12 Propriétés d'écoulement des suspensions concentrées en AMI 78

5.13 Analyses statistiques 79

E. Résultats et discussion 80

Chapitre 1 : Etuvage d'une poudre de protéines sériques lyophilisée : formation d'AMI à pH 9,5 .. 81

1. Introduction 84

2. Materials and methods 86

2.1 Materials 86

2.1.1 Preparation of samples 86

2.2 Methods 87

2.2.1 Moisture, protein and free lactose contents 87

2.2.2 Water activity (a_w) and powder colour 87

2.2.3 Analyses of microparticles 88

2.2.4 Carboxymethyllysine (CML) determinations 88

2.2.5 Phase contrast and confocal laser scanning microscopy (CLSM) 89

2.2.6 Residual native proteins 89

2.2.7 Statistical analyses 90

3. Results and discussion 90

3.1 Changes in the WPI powder after DH at different pH values 90

3.2 Characterization of the suspensions of dry-heated powders 91

3.3 Composition of whey protein microparticles 99

3.4 Effect of powder grinding 101

4. Conclusions 103

5. Acknowledgments 103

Chapitre 2 : Formation des AMI au cours du temps d'étuvage d'une poudre de protéines sériques séchée par pulvérisation 106

1. Introduction 109

2. Materials and methods 111

2.1 Materials 111

2.2 Preparation of dry heated powders 112

2.3 Color analyses of powders 112

2.4 Moisture content of powders 112

2.5 Marker of the MR 113

2.6 Free lactose content of powders 113

2.7 Amino acid analysis 113

2.8 Preparation and fractionation of powder suspensions 114

2.9 Size distribution of powder particles and microparticles 116

2.10 Optical density at 500 nm of suspensions S0 116

2.11 Composition of the suspensions, pellets and supernatants 116

2.12 Analysis of the microstructure of microparticles by confocal laser scanning microscopy 118

2.13 Microstructure of powder particles by scanning electron microscopy (SEM) and of microparticles by Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) 118

2.14 Effect of pH on microsphere suspensions 119

2.15 Flow properties of microparticle suspensions 119

2.16 Statistical analysis 119

3. Results and discussion 119

3.1 The effect of DH on powder morphology and size distribution 119

3.2 The effect of DH on powder browning and composition 121

3.3 Characterization of microparticle in S0 suspensions 124

3.4 Yield and water holding capacity of microspheres 126

3.5 Denaturation of proteins 129

3.6 Flow properties of whey protein microspheres 130

3.7 Acid-induced behavior of microspheres 133

4. Conclusion 135

5. Acknowledgments 135

6. Résultats et discussion complémentaires 136

6.1 Les AMI correspondent-ils bien aux particules de poudre rendues insolubles par le procédé d'étuvage d'une poudre d'IPS à pH 9,5 ? 136

6.2 Quels sont les différents types de liaisons impliquées dans les AMI ? 137

6.3 Effet de la concentration en NaCl dans les suspensions d'AMI sur leur morphologie ... 138

6.4 Quelle est la part des protéines solubles piégées par les AMI ? 140

6.5 Quel est l'effet du mode de séchage sur la formation et les propriétes physico-chimiques des AMI ? 142

6.6 Quelle hypothèse peut-on émettre concernant le mécanisme de formation des AMI ?145

6.7 Quelle hypothèse peut-on émettre concernant l'origine des liaisons réticulantes ? 146

Chapitre 3 : Rôle des constituants de la poudre d'isolat de protéines sériques sur la formation des AMI : rôle du lactose 152

1. Introduction 155

2. Materiel and methods 156

2.1 Materials 156

2.2 Preparation of dry heated powders 157

2.3 Preparation of WPM dispersions 157

2.4 Color analyses of powders 158

2.5 Marker of the MR 158

2.6 Determination of the powder granular size distribution 158

2.7 Optical density at 500 nm of WPM suspensions 159

2.8 Denaturation of whey proteins 159

2.9 Microstructure of WPM by confocal microscopy 159

2.10 Analysis of WPM clarification 160

2.11 Dry extract and moisture content of WPM 160

3. Results 160

3.1 Powder characterization 160

3.2 Contents in carboxymethyllysine 162

3.3 Level of whey protein denaturation 163

3.4 Characterization of WPM dispersion 165

3.5 Yield of formation of WPM and their water content (WC) 167

4. Discussion 169

5. Conclusions 172

6. Acknowledgments 173

7. Résultats et discussion complémentaires : étude de la cinétique de formation des AMI avec une poudre enrichie en lactose et séchée par pulvérisation 174

7.1 Introduction 174

7.2 Résultats 174

7.2.1 Microstructure des AMI en suspension et aspect des suspensions 174

7.2.2 Rendements de la formation des AMI et leur teneur en eau 177

7.2.3 Dénaturation des protéines sériques 179

7.2.4 Comparaison entre le séchage par pulvérisation et par lyophilisation avec et sans lactose ajouté 180

7.3 Discussion 180

7.4 Conclusion 183

Chapitre 4 : Rôle des constituants de la poudre d'isolat de protéines sériques sur la formation des AMI : rôle des caséines 186

1. Préparation des poudres étuvées 187

2. Résultats 187

2.1 Impact de l'étuvage sur les caractéristiques des poudres 187

2.2 Caractérisation des suspensions d'AMI 191

2.2.1 Aspect des suspensions après décantation naturelle 191

2.2.2 Microstructure des AMI 191

2.2.3 Taille des AMI 192

2.2.4 Rendements et teneur en eau des AMI 194

2.3 Effet du caséinate sur la dénaturation des protéines sériques 196

2.4 Gonflement des particules de poudre de caséinate étuvée 196

3. Discussion 197

4. Conclusion 202

Chapitre 5 : Compréhension du mécanisme de formation des AMI à partir d'une poudre de β-lactoglobuline pure 205

1. Préparation des poudres étuvées 206
2. Résultats 208
   - 2.1 Impact de l'étuvage sur les caractéristiques des poudres 208
   - 2.2 Contenu en carboxyméthyllysine 209
   - 2.3 Caractérisation des suspensions S0 210
     - 2.3.1 Densité optique à 500 nm des suspensions S0 210
   - 2.4 Aspect des culots P1 211
   - 2.5 Suspensions S0 observées par microscopie confocale 211
   - 2.6 Distribution de taille des AMI 212
   - 2.7 Rendements et teneur en eau des AMI 213
   - 2.8 Dénaturation de la βlg et formation de SDAP 215
3. Discussions 217
   - 3.1 Dénaturation de la βlg 217
   - 3.2 La réaction de Maillard 219
   - 3.3 Caractérisation des suspensions 220
   - 3.4 Différences entre les AMI formés avec la βlg pure et avec un isolat de protéines sériques 221
4. Conclusion 225

F. Conclusion générale et perspectives 227

1. Conclusion générale 228
2. Perspectives de recherche 229

G. Références 233

H. Valorisation des travaux 245

1. Brevet 245

2. Publications scientifiques 245

3. Communications orales 245

4. Affiches 245

I. Annexe 247

LISTE DES ABREVIATIONS

$A_{280\ nm}$: absorbance à 280 nm

AGE : advanced glycation end products ou produits terminaux de glycation

αlac : α-lactalbumine

AMI : assemblages microniques

a_w : water activity ou activité de l'eau

BI : browning index ou indice de brunissement

βlg : β-lactogobuline

$\mathbf{C}$: concentration

CasMic : caséine micellaire

CasNa : caséinate de sodium

CLSM : confocal laser scanning microscope ou microscope confocal à balayage laser

D[4,3] : mean diameter in volume ou diamètre moyen en volume

DH : dry heating

DHP : dry-heated powders

DSC : calorimétrie différentielle à balayage

DTT : dithiothréitol

DY : dry yield ou rendement sec

$\varepsilon_{280\ nm}$: coefficient d'extinction molaire à 280 nm

EQPC : diameter of a circle of equal projection area

EST : extrait sec total

IPS : isolat de protéines sériques

IR : indice de réfraction

IRTF : spectrométrie infrarouge à transformé de Fourier

ℓ : longueur de trajet optique

LC-MS/MS : liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry ou chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

L/P : ratio in weight of added lactose to protein ou ratio en poids de lactose ajouté aux protéines

MAT : matière azotée totale

MR : Maillard reaction

NFPA : acide nonafluoropentanoïque

NPN : azote non protéique

NP : native proteins ou protéines natives

OD_{500} : optical density at 500 nm ou densité optique à 500 nm

pI : point isoélectrique

PS : protéines sériques

RITC : rhodamine B isothiocyanate

RP-HPLC : chromatographie liquide à haute performance en phase inverse

SDAP : soluble denatured/aggregated proteins ou assemblages et protéines dénaturées solubles

SEM : scanning electron microscope ou microscopie électronique à balayage

SS : disulfure

TFA : acide trifluoroacétique

WC : water content ou teneur en eau

WPI : whey protein isolate

WPM : whey protein microparticle

WY : wet yield ou rendement humide

LISTES DES TABLEAUX ET DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : La consommation humaine par habitant des principaux produits laitiers dans le monde en 2015 (CNIEL, 2017). 25

Tableau 2 : Composition en protéine du lait bovin (Wong *et al.*, 1988) et quelques propriétés de ces protéines (Mathieu, 1998). 31

Tableau 3 : Carboxymethyllysine (CML) contains of powders in ng/mg protein. 123

Tableau 4 : Lysine contents in powders in g lysine residue/100 g protein. 123

Tableau 5: Free lactose concentrations in powders in mg/100 g powder. 124

Tableau 6 : Caractérisation de la réaction de Maillard et des propriétés physico-chimiques et morphologiques des AMI obtenus suite à l'étuvage à 100°C d'une poudre d'IPS à pH 9,5 lyophilisée et d'une poudre d'IPS à pH 9,5 pulvérisée. 142

Tableau 7: Carboxymethyllysine (CML) contains in ng/mg protein in powders dry heated (DH) at 100°C 163

Tableau 8 : Comparaison des rendements secs (DY) et de la quantité de protéines résiduelles natives (NP) en fonction du mode de séchage, de la présence de lactose ajouté à L/P = 0,21 g/10 g et du temps d'étuvage des poudres. 180

Tableau 9 : Différence entre le diamètre moyen en volume des AMI et celui des particules de poudre (ΔD[4,3]), en fonction de la composition de la poudre. 194

Tableau 10 : Composition des suspensions pour la préparation des poudres étuvées. 207

Tableau 11 : Carboxyméthyllysine (CML) dosée dans les poudres étuvées à 100 °C. 210

Tableau 12 : Rendement sec (DY), indice de brunissement (BI) et quantité de carboxyméthyllysine (CML) dans la poudre de βlg+lactose, et dans les poudres d'IPS lyophilisée un ratio lactose/protéine (L/P) = 0, 0,05 et 0,1 g/10 g de protéine. Les échantillons ayant les mêmes lettres sont statistiquement identique (P>0,05). 223

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Les quatre axes de recherche du projet PROFIL (https://www.pole-agro-ouest.eu/projet-profil/). 27

Figure 2 : Composition du lait bovin d'après Wong, Jenness et al. (1988). Les chiffres sont exprimés en g/100 g de lait..... 30

Figure 3 : Structure d'une micelle de caséine observée par microscopie électronique (Martin et al., 2006)..... 31

Figure 4 : Structure secondaire et tertiaire d'un monomère de β-lactoglobuline (Brownlow et al., 1997). Les hélices α sont colorées en bleu et les feuillets β en rouge. 33

Figure 5 : Structure secondaire et tertiaire de l'α-lactalbumine en présence de d'ion calcium (Bushmarina et al., 2005). Les hélices α sont colorées en bleu et les feuillets β en vert. Les quatre ponts disulfures sont représentés en jaune, l'ion calcium en rouge et les chaînes latérales impliquées dans la liaison du calcium en orange. 34

Figure 6 : Micrographies d'agrégats de βlg formés à pH 2,5 avec un traitement thermique à 90 °C pendant 300 min (A), à pH 5,8 avec un traitement thermique à 85 °C pendant 15 min (B) et à pH 7,0 avec un traitement thermique à 85 °C pendant 15 min (C), obtenues par microscopie électronique à transmission à coloration négative (Jung et al., 2008)..... 37

Figure 7 : Schéma simplifié de la réaction de Maillard (adapté de Hodge, 1953) 52

Figure 8 : Première étape de la réaction de Maillard..... 54

Figure 9 : Etapes de préparation des poudres étuvées à pH alcalin. 60

Figure 10 : Schéma de fractionnement des suspensions. NP = protéines sériques natives résiduelles ; SDAP = assemblages et protéines sériques dénaturées solubles et AMI = assemblages microniques. 62

Figure 11 : Lavages des culots P1 contenant les AMI ; SDAP = assemblages et protéines sériques dénaturées solubles et AMI = assemblages microniques. 63

Figure 12 : Ensemble pour matériaux granuleux (source de l'image : www.2i3d.fr). 65

Figure 13 : Schéma du principe du microscope confocal à balayage laser (CLSM). Z correspond à la hauteur de l'échantillon par rapport à la lamelle. 72

Figure 14 : Configuration expérimentale de la géométrie plan-plan. 79

Figure 15: Browning index for powders dry heated at pH 3.5 (○), pH 6.5 (□), pH 9.5 (△), as a function of time of dry heating (DH) at 100 °C, as measured with the colorimeter. Two replicate measurments were made for each experiment. Inset: photographs of the powders. 91

Figure 16: Absorbance at 500 nm as a function of time of DH for A: solution 1 and B: solution 2 reconstituted from powder dry-heated at pH 3.5 (○), 6.5 (□) and 9.5 (△). Two replicate measurments were made for each experiment. 82

Figure 17: Mean particle size as a function of the time of DH. A: in solution 1 reconstituted from powder dry-heated at pH 3.5 (○,●) or at pH 6.5 (□,■) and in solution 2 (supernatant of solution 1) obtained from the powder dry-heated at pH 9.5 (△,▲), as analysed with the Zetasizer Nano-ZS. B: in solution 1 reconstituted from the powder dry-heated at pH 9.5, as measured with the Mastersizer 2000 (△,▲). Two replicate measurments were made for each sample (open and closed symbols). C: size distribution of particles present in solution 1 prepared from the powder dry-heated at pH 9.5 for 24 h (2 repetitions each being a mean of 3 measurements on 2 different dry heated powders). 82

Figure 18: Yield of pellet 1 obtained by centrifugation of solution 1: A) in g of wet pellet obtained for 1 g powder; B) in g of dry pellet obtained for 1 g powder. Grey and white bars represent 2 repeated trials for powder dry-heated for 0 h or for 36 h (or for 24 h for the second trial at pH 9.5); C) pictures of pellet 1obtained from 10 g of solution 1 prepared from the powder conditioned at pH 9.5 and dry heated. 96

Figure 19: Particle micrographs as a function of DH time at pH 9.5. A: confocal laser scanning micrograph of solution 1 after addition of rhodamine isothiocyanate (taken using a 20X objective; bar=200 µm); B: light micrograph of dry-heated powders taken using a 4X objective (bar=50 µm). .. 98

Figure 20: Residual native proteins versus time of DH of powder. A: protein content measured by gel filtration chromatographie for powders at pH 3.5; B: at pH 6.5; C: at pH 9.5. Bovine serum albumin (□), β-lactoglobulin (○) and α-lactalbumin (◇). D: protein content measured by the Lowry method for powders dry-heated at pH 3.5 (○); pH 6.5 (□); pH 9.5 (△). Two replicate measurments were made for the powder DH at pH 9.5 (closed and open symbols)..... 100

Figure 21: Effect of grinding of the powder conditioned at pH 9.5 before DH. A: light micrographs as a function of the time of grinding of powders (4X objective; bar=30 µm); B: confocal laser scanning micrographs as a function of the time of grinding of powders dry-heated for 12 h and reconstitued to form solution 1 (x20; bar=200 µm). C: size distribution of particles in solution 1 made with powders ground for 0 s (——), 3.5 s (— —), 5 s (– – –) and 25 s (-----); D: D[4,3] of particles as a function of the time of grinding of the powder. 104

Figure 22 : Particules de poudre lyophilisée observées au microscope optique (A) et assemblages microniques (AMI) en suspension dans de l'eau observés au microscope confocal (B) obtenus après étuvage de la poudre d'isolat de PS à pH 9,5. 105

Figure 23: Preparation of samples. NP: native proteins, SDAP: soluble denatured/aggregated proteins. 115

Figure 24 : SEM micrographs of powder before (A) and after 36 h of dry heating (B) and of microparticles in dispersion in deionized water obtained after dry heating of the powder for 36 h (C, D). The red arrows point some microparticles, while large white arrows show the deposit of possibly frost or soluble protein and aggregates or both, and thin white arrows show the geometric deposit. 120

Figure 25: Size distribution of powder particles (in black) before (dotted line) and after 36 h of dry heating (solid line) and of microparticles in suspension (in grey) prepared from powders dry heated for 12 h (dashed line), 24 h (dotted line) and 36 h (solid line). Volume frequency (%) versus size measured with the Mastersizer. 121

Figure 26: Browning index (BI) of powders dry heated at pH 9.5 as a function of their time of dry heating at 100 °C, as measured with the colorimeter. Two different productions of DH powders each with open

and closed symbols. Photographs of powders during the time course of dry heating are shown (inset). 122

Figure 27: Optical density at 500 nm (OD500nm) (A) and confocal microscopy images (B) of suspensions of powders dry heated 0 h (a), 6 h (b), 12 h (c), 24 h (d) and 36 h (e). 125

Figure 28: Wet yield (A), dry yield (B) and water content (C) of microparticles obtained by centrifugation of S0 of microparticles; D) Pictures of microparticle pellets. 128

Figure 29: Partition of proteins of the suspension S0: residual native proteins or NP in percent of total whey proteins as determined by reverse-phase chromatography (A) and soluble denatured/aggregated proteins or SDAP in percent of total proteins as determined by the difference between optical density at 280 nm of supernatants S1+S2 and residual native proteins (B). 130

Figure 30: Apparent viscosity (ηapp) at pH 6.5 and 20 °C of 32 g.kg-1 (A), 23 g.kg-1 (B) and 18 g.kg-1 (C) of microparticle suspensions as a function of shear rate, prepared with powder dry heated for 12 h (star), 24 h (diamond), 36 h (triangle), 48 h (square) and 72 h (circle). 132

Figure 31: Volume-weighted average diameter (D[4,3]) of microspheres obtained after 36 h of dry heating (A) and optical density at 500 nm (OD500nm) of the suspensions (B) as a function of adjusted pH of suspensions (circle). Triangles show the values for suspensions readjusted to a pH value close to 7.5 after being acidified to the pH value in abscissa. C: a-f confocal microscopy images of suspensions at pH 7.67 (a), 6.46 (b), 5.76 (c), 4.75 (d), 3.42 (e) and the suspension pH 4.75 readjusted at pH ~ 7.5 (f). 134

Figure 32 : Micrographies des particules de poudres étuvées 36 h observées avec un objectif x4 (A) et étuvées 72 h observées avec un ojectif x 10 (B) avant et quelques secondes après addition d'eau, obtenues avec le microscope optique à contraste de phase. 136

Figure 33 : Gel SDS-PAGE des suspensions de poudres étuvées 0, 15 et 24 h sans (A) et avec (B) réduction au DTT. Mw correspond au kit de marqueurs de poids moléculaire. 138

Figure 34 : Micrographies des suspensions d'AMI réalisées à partir de la poudre étuvée 36 h reconstituée dans de l'eau et dans NaCl 0,1, 0,5 et 1 M, obtenues par CLSM, objectif x20, à 15 µm et 30 µm de la lamelle. Les micrographies sont représentatives de l'ensemble des échantillons observés. Les flèches rouges pointent des petits amas d'AMI. 139

Figure 35 : Rendements secs (DY) (A), teneurs en eau (WC) (B) et rendements humides (WY) (C) des AMI évalués sans (courbes bleues) et avec lavage (courbes rouges), en fonction du temps d'étuvage de la poudre d'IPS. *Les WC avec et sans lavage ont été calculés en utilisant le DY après lavage..... 141

Figure 36 : Hypothèse du mécanisme de formation des AMI ; DY = rendement sec et WC = teneur en eau. 146

Figure 37 : Schéma hypothétique de formation de liaisons réticulantes entre les protéines. 148

Figure 38 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus dans le chapitre 2..... 149

Figure 39: Water activity (aw) and browning index (BI) as a function of added lactose, L/P (g lactose/10 g protein) at 0 h (×), 1 h (◊), 3 h (○), 36 h (●) and 96 h (□) of dry heating at 100 °C. 161

Figure 40: Unheated powder granular size distribution in volume as measured by the QICPIC method as a function of added lactose, L/P (g lactose/10 g protein). Darkness of curves increases with the increase in L/P from 0 to 2.09 g/10 g. The arrow is to help the reader to see the distribution slightly shifting to the right. 162

Figure 41: Residual native whey proteins in powder suspensions, as the sum of βlg and αlac contents. A: contents after different times of dry heating as a function of the added lactose, L/P: 0h (×), 1 h (◊), 3 h (○), 36 h (●) and 96 h (□) of dry heating at 100 °C. B: Comparison of the elution profile of pH 4.6-soluble fractions of samples; 1: L/P = 0, dry heating (DH) = 0 h; 2: L/P = 2.09 g/10 g protein, DH = 0 h; 3: L/P = 0, DH = 3 h; 4: L/P = 2.09 g/10 g protein, DH = 3 h; 5: L/P=0, DH=36 h; 6: L/P=2.09 g/10 g protein, DH=36 h. 164

Figure 42: Optical density measured at 500 nm (OD500nm) of powder suspensions as a function of added lactose, L/P. After dry heating at 100 °C for 1 h (◊), 3 h (○), 36 h of dry heating (●) and 96 h of dry heating (□) 165

Figure 43: Micrographs of microparticles present in suspensions as observed by confocal laser scanning microscopy after dry heating (DH) at 100 °C for 3 and 36 h as a function of added lactose. The microparticles obtained by DH for 96 h without any added lactose or by DH for 1 h with the highest level of added lactose are also shown. The bar represented 100 µm. Only 2 representative micrographs are shown by condition. 166

Figure 44: Clarification of suspensions and sedimentation of whey protein microparticles produced by 36 h of dry heating at 100 °C as a function of the added lactose, L/P. A: Rate of clarification of the suspensions. B: Photographs of powder suspensions after 15 d of sedimentation at 20 °C. 167

Figure 45: Yield and moisture content of microparticles evaluated in the pellet obtained by centrifugation at 10000 g for 15 min at 20 °C as a function of added lactose, L/P. A: dry weight of pellet for 1 g of powder (in g/g); B: water content of microparticles in g per 1 g of microparticle; C: wet weight content of pellet for 1 g of powder (in g/g). After dry heating at 100 °C for 1 h (◊), 3 h (○), 36 h of dry heating (●) and 96 h of dry heating (□). 168

Figure 46 : Micrographies et aspect des suspensions préparées avec la poudre d'isolat de protéines sériques sans (A) et avec L/P= 0,21 g/10 g (B) en fonction du temps d'étuvage, obtenues par microscopie confocale. Les photos des suspensions ont été prises après 3 j de décantation naturelle des AMI à 20 °C. Les flèches rouges indiquent le niveau de décantation des AMI dans les tubes. Les accolades vertes montrent la présence de mousse en surface des suspensions. Les barres représentent 100 µm 175

Figure 47 : Micrographies obtenues par CLSM de la mousse prélevée en surface de la suspension de poudre étuvée 36 h avec L/P= 0,21 g/g, décantée naturellement pendant 24 j, avant (A) ou après (B) addition d'une solution de poudre d'IPS à ~25 g de protéine/100 g de poudre. 176

Figure 48 : Rendements secs (DY) (A), teneurs en eau (WC) (B) et rendements humides (WY) (C) des AMI en fonction du temps d'étuvage de la poudre d'isolat de protéines sériques sans ajout de lactose (-lactose ; symboles ouverts) et avec ajout de lactose à L/P= 0,21 g/10 g (+lactose ; symboles fermés). 178

Figure 49 : Protéines natives résiduelles (NP) dans les suspensions de poudre sans ajout de lactose (-lactose ; symboles ouverts) et avec ajout de lactose à L/P = 0,21 g/10 g de poudre (+ lactose ; symboles fermés) en fonction du temps d'étuvage. Les quantités de protéines natives résiduelles ont été

calculées comme la somme des quantités de βlg et αlac natives évaluées par RP-HPLC dans les surnageants S1A et sont exprimées pour 100 g de PS totale dans les poudres. 179

Figure 50 : Indices de brunissement (BI) des poudres étuvées 0 h (□) et 36 h (○), en fonction de la proportion en poudre de caséine. En rouge sont représentés les résultats obtenus avec la poudre enrichie en caséine micellaire et en bleu les résultats avec la poudre de caséinate de sodium. 188

Figure 51 : Distributions de taille des particules des différentes poudres à 0 h d'étuvage, obtenues au QIPIC (A) ; distributions de taille des AMI en suspension dans l'eau, formés suite à l'étuvage à 100 °C des poudres à pH 9,5 pendant 36 h, obtenues au Mastersizer (B). La noirceur des courbes augmente avec l'augmentation de la proportion en poudre de caséinate de sodium de 0 à 100 g/100 g de poudre. La courbe rouge correspond à la poudre enrichie en caséine micellaire. La flèche indique le sens de l'évolution suggéré lors de l'augmentation de la proportion en poudre de caséinate de sodium. Les inserts en A et B correspondent au diamètre moyen en volume des particules (D[4,3]). Les échantillons ayant une lettre différente sont statistiquement différents (P <0,05). 189

Figure 52 : Micrographies des particules de poudre de Cas0, Cas20, Cas25, Cas33, Cas50, Cas100 étuvées 36 h à 100 °C et de CasMic étuvée 0 et 36 h à 100 °C, obtenues par microscopie optique à contraste de phase (obj x 10). 190

Figure 53 : Aspect des suspensions de poudre étuvée 36 h à 100 °C et à pH 9,5, après 5 j de décantation naturelle à 20 °C. 191

Figure 54 : Micrographies des AMI obtenues par le microscope confocal à balayage laser avec un objectif x20 (barres = 100 µm) après 36 h d'étuvage à 100 °C en fonction de la proportion en poudre de caséine. Les micrographies ont été prises entre 0 et 5 µm et à 15 µm de la lamelle. Seulement 2 micrographies par condition sont montrées, mais elles sont représentatives de l'ensemble des AMI observés. 193

Figure 55 : Rendements sec (DY) (A), teneur en eau (WC) (B) et rendement humide (WY) (C) des AMI obtenus après 36 h d'étuvage à 100 °C de la poudre à pH 9,5, en fonction de la proportion en poudre de caséine. Le cercle rouge correspond à la poudre de caséine micellaire et les cercles bleus correspondent aux mélanges réalisés avec la poudre d'isolat de protéine sérique et de caséinate de sodium. L'insert en A montre la corrélation entre le DY et le WC, en fonction de la proportion en poudre de caséinate..... 195

Figure 56 : βlg (○) et αlac (Δ) natives résiduelles quantifiées par RP-HPLC à 0 h (traits en pointillés) et à 36 h d'étuvage à 100 °C de la poudre à pH 9,5 (traits pleins). Les résultats sont exprimés pour 100 g de PS totales présentes dans les poudres. 196

Figure 57 : Gonflement d'une particule de poudre de caséinate de sodium étuvée 36 h à 100 °C et à pH 9,5 dans de l'eau désionisée, observé pendant 20 secondes au microscope à contraste de phase (obj x 4)..... 197

Figure 58 : Activités de l'eau (aw) (A) et indices de brunissement (BI) (B) des poudres de βlg (●), de βlg+lac (●), de βlg+CasNa (●) et de βlg+CaCl2 (●) en fonction du temps d'étuvage. 208

Figure 59 : Distribution de taille des particules de poudre avant l'étuvage déterminées au QICPIC des poudres de βlg (●), de βlg+lac (●), de βlg+CasNa (●) et de βlg+CaCl2 (●) ; distributions de taille des AMI en suspensions issus de la poudre de βlg+lac étuvée à 100 °C pendant 3 (…), 12 (---) et 36 h (---) déterminées à l'aide du Mastersizer. Les inserts correspondent au diamètre moyen en volume ([D4,3])

des particules de poudre et des AMI en suspension. Les échantillons ayant une lettre différente sont statistiquement différents (P <0,05). 209

Figure 60 : Densités optiques des suspensions à 500 nm (0D500 nm) en fonction du temps d'étuvage des poudres de βlg (●), de βlg+lac (●), de βlg+CasNa (●) et de βlg+CaCl2 (●). 210

Figure 61 : Photographie des culots P1 obtenus après centrifugation de 2 g des suspensions S0 contenant 10 g de poudre/kg de suspension préparées à partir de la poudre βlg+lac étuvée à 100 °C pendant 0, 3, 12 et 36 h. 211

Figure 62 : Micrographies des suspensions d'AMI réalisées avec les poudre de βlg (A), de βlg+lac (B), de βlg+CasNa (C) et de βlg+CaCl2 (D) étuvées 0, 3, 12 et 36 h observées au CLSM avec un obj x20 (barres = 100 µm) entre 0 et 5 µm de la lamelle. Les photos sont représentatives de l'ensemble de l'échantillon observé. 212

Figure 63 : Rendement sec (DY) (A), teneur en eau (WC) (B) et rendement humide (WY) (C) en fonction du temps d'étuvage de la poudre de βlg+lac. 214

Figure 64 : Quantités de βlg native résiduelle (A) et d'assemblages et protéines dénaturées solubles (SDAP) (B) en fonction du temps d'étuvage des poudres de βlg (●), de βlg+lac (●), de βlg+CasNa (●) et de βlg+CaCl2 (●). 216

Figure 65 : Profils RP-HPLC de la β-lactoglobuline (variant A et B) présente dans les fractions solubles à pH 4,6, obtenues à partir des poudres de βlg (A), βlg+lac (B), βlg+CaCl2 (C) et βlg+CasNa (D) étuvées à 100 °C pendant 0, 3, 12 et 36 h. L'intensité des couleurs diminue avec l'augmentation du temps de l'étuvage. La courbe en pointillé correspond à un témoin de β-lactoglobuline initiale non traitée. . 217

Figure 66 : Teneur en eau (WC) des AMI produits avec la poudre βlg+lac (courbe rouge) et avec la poudre d'IPS (courbes noires) lyophilisée (trait plein) ou pulvérisée (trait en pointillé), en fonction du temps d'étuvage. 222

A. INTRODUCTION GENERALE

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des mammifères femelles pour la nutrition des nouveau-nés. C'est un aliment parfaitement adapté à leurs besoins. Depuis la naissance de l'agriculture et du développement de l'élevage des animaux, le lait et les produits dérivés du lait tels que les yaourts, les fromages et le beurre font partie du régime alimentaire humain, même à l'âge adulte. La consommation de produits laitiers est très importante à travers le monde. En France, la consommation humaine en 2015 par habitant est de 51,5 kg de lait, 26,8 kg de fromages et 8,0 kg de beurre (Tableau 1). En France, la filière du lait présente un chiffre d'affaires de 31,9 milliards € en 2014 (CNIEL, 2017), ce qui la classe au 2ème rang des industrie agro-alimentaire, juste après la viande.

Le lactosérum est un liquide jaune pâle issu du caillé lors de la fabrication du fromage au cours de l'opération d'égouttage. Il est constitué majoritairement d'eau mais contient aussi des protéines et du lactose. Il est très pauvre en matière grasse. Il a longtemps été mal valorisé, en étant soit utilisé pour la consommation animale, soit jeté ou déversé dans des cours d'eau, alors qu'il est très polluant, car il est riche en matières organiques. Depuis l'apparition des nouvelles technologies telles que la filtration tangentielle sur membranes, les principaux constituants du lait peuvent être fractionnés, permettant l'élaboration de produits d'intérêts, tels que les concentrés et les isolats de protéines sériques. Par exemple, le sérum du lait est séparé de la fraction de protéines appelées caséines par microfiltration sur des membranes et les protéines restantes, appelées protéines sériques, sont concentrées sur des membranes d'ultrafiltration. Ces protéines sont en effet reconnues pour avoir de bonnes propriétés nutritionnelles et fonctionnelles (Ha and Zemel, 2003; Kinsella and Whitehead, 1989; de Wit, 1998). On retrouve parmi les propriétés fonctionnelles des protéines sériques, les propriétés gélifiante, moussante et émulsifiante.

Une façon d'améliorer les propriétés fonctionnelles des protéines sériques est de produire des assemblages protéiques par le biais notamment de la dénaturation thermique. Les conditions de chauffage permettent de contrôler les propriétés structurales des assemblages thermo-induits qui vont leur conférer des propriétés fonctionnelles. De plus, les multi-fonctionnalités de ces assemblages protéiques semblent prometteuses pour développer de nouveaux produits, par la création de nouvelles textures par exemple, mais aussi pour substituer les additifs de nos produits laitiers, et ainsi, tendre vers des produits 100 % laitiers.

Tableau 1 : La consommation humaine par habitant des principaux produits laitiers dans le monde en 2015 (CNIEL, 2017).

2015				
	Millions d'habitants	Lait liquides (kg par habitant)	Beurre (kg par habitant)	Fromages (kg par habitant)
Chine	1 372	18,7	0,1	0,1
Inde (1)	1 314	45,5	3,8	…
Etats-Unis	322	69,7	2,6	16,0
Brésil	204	44,7	0,4	3,8
Russie	144	34,4	2,3	5,7
Mexique	127	28,8	0,8	3,8
Japon (1)	127	30,5	0,6	2,2
Egypte	92	18,5	0,8	4,3
Allemagne	81	54,2	6,0	24,6
Iran	79	27,2	1,0	4,7
Turquie	77	17,8	0,9	8,3
Royaume-Uni	65	102,3	3,2	12,1
France	64	51,5	8,0	26,8
Italie	63	47,8	2,4	21,5
Afrique du Sud	53	35,9	0,5	2,0
Corée du Sud	51	32,5	0,2	2,6
Colombie	48	37,7	0,2	1,3
Espagne	46	80,5	0,4	8,9
Ukraine	45	21,5	2,0	4,2
Argentine	42	47,0	0,9	12,9
Pologne	39	38,9	4,3	16,1
Canada	36	72,8	2,8	12,6
Australie (2)	24	106,9	3,9	13,4
Chili	18	24,4	1,4	9,1
Kazakhstan	18	27,8	1,3	2,6
Pays-Bas	17	45,3	3,0	18,1
Zimbabwe	15	2,6	0,0	0,6

(1) par campagnes laitières d'avril à mars de l'année suivante.
(2) par campagnes laitières de juillet à juin de l'année suivante.
N.B. : pour la plupart des pays, il s'agit d'un calcul de consommation apparente (production + imports – exports).

Les additifs alimentaires sont des substances qui sont ajoutées en petite quantité dans les denrées pour des raisons technologiques ou pour améliorer certaines caractéristiques. Ils sont souvent très mal perçus par les consommateurs. Ils permettent notamment :

- d'aider à la conservation en empêchant le développement des micro-organismes indésirables,
- de réduire les phénomènes d'oxydation qui peuvent mener notamment à des changements de couleur des produits alimentaires non désirables et au rancissement des matières grasses,
- d'améliorer la sapidité des denrées,
- d'améliorer ou de maintenir la texture des denrées.

Il existe un nombre très important d'additifs alimentaires, qui sont recensés par un code alimentaire (Exxx). Cependant, de plus en plus d'additifs sont reconnus pour être néfastes ou potentiellement néfastes pour la santé. Ajouté à cela, de nombreux scandales alimentaires viennent entacher la qualité nutritionnelle des produits alimentaires industriels. L'une des tendances alimentaires actuelles est de se nourrir plus sainement et avec des produits plus naturels, et donc de réduire l'emploi de ces additifs.

En 2014, un projet nommé PROFIL, « Assemblages PROtéiques multi-Fonctionnels pour l'Innovation en industrie Laitière » a été créé, dans le but de répondre aux enjeux de la transformation laitière française et d'améliorer la valorisation des protéines laitières. Ce projet regroupe des acteurs du secteur privé et du secteur public dans le domaine des produits laitiers, dans le but d'acquérir et de capitaliser des connaissances utilisables en entreprises. Il met en lien 10 partenaires industriels (Sodiaal, Lactalis, Savencia Fromage & Dairy, CF&R, Bel, Laïta, Laiterie de Montaigu, Sill, Eurial et Coopérative d'Isigny) et 5 partenaires académiques (Inra UMR STLO et UR BIA, Oniris, Université de Bretagne Occidentale, Université du Maine et Université de Rennes 1). Il est supporté financièrement par les Régions Bretagne et Pays de la Loire.

Les objectifs du projet PROFIL sont :

- de donner de la valeur ajoutée aux protéines laitières,
- d'exploiter les propriétés multi-fonctionnelles des protéines laitières pour remplacer les additifs alimentaires et créer des produits laitiers 100 % d'origine laitière, afin de répondre aux attentes des consommateurs,
- de mettre en évidence des pistes d'innovation en vue de créer de nouveaux produits laitiers.

La durée du projet est de 6 ans. Il regroupe 11 thèses réparties en quatre grands axes de travail (Figure 1).

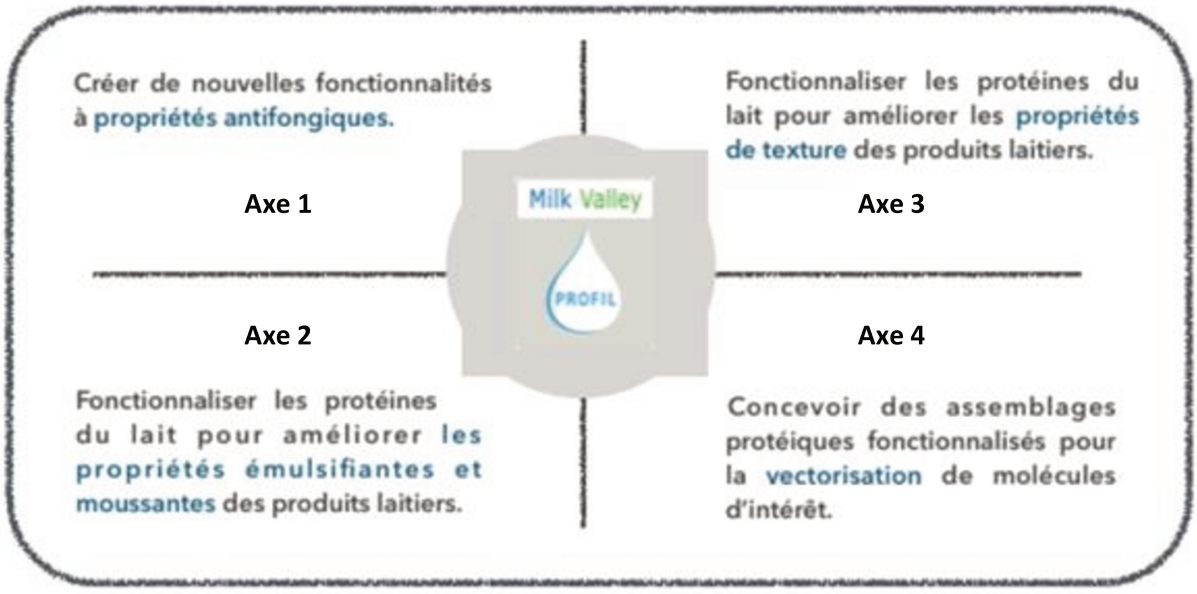


Figure 1 : Les quatre axes de recherche du projet PROFIL (https://www.pole-agro-ouest.eu/projet-profil/).

Cette thèse fait partie de l'axe 3, visant à l'amélioration les propriétés de texture des produits laitiers. Des assemblages thermo-induits de protéines sériques produits en chauffant ces protéines en voie liquide, ayant des propriétés fonctionnelles remarquables, telles que des propriétés texturantes, ont été très étudiés (Akkermans *et al.*, 2008; Famelart M.H. *et al.*, 2011; Nicolai *et al.*, 2011a; Vardhanabhuti and Foegeding, 1999). Beaucoup moins d'études ont été entreprises sur le chauffage des protéines en voie sèche, c'est-à-dire en chauffant directement la poudre de protéines. Pourtant, il a déjà été montré que l'étuvage de protéines alimentaires telles que les protéines de blanc d'œuf et

de soja améliore leurs propriétés fonctionnelles. Des poudres commerciales de blanc d'œuf chauffées en voie sèche, c'est-à-dire étuvées, qui possèdent de remarquables propriétés de gélification thermo-induite ou d'émulsification existent déjà.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de déterminer le mécanisme de formation d'un nouveau type d'assemblages de protéines sériques, produits par l'étuvage d'une poudre d'isolat de protéines sériques à pH 9,5 et d'étudier certaines des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de ces assemblages. Ces assemblages sont nommés « assemblages micronique » (AMI) ou en anglais « whey protein microparticles » (WPM).

Ce manuscrit est divisé en quatre grandes sections :

- La première section est consacrée à une revue de la littérature concernant les travaux sur l'étuvage des protéines sériques.
- La seconde section décrit le matériel et les méthodes utilisés lors de cette thèse.
- La troisième section décrit les résultats et discussions. Elle est composée de cinq grands chapitres :
    1) Le chapitre 1 présente la formation des assemblages de protéines sériques par l'étuvage d'une poudre lyophilisée d'isolat de protéines sériques à pH 3,5, 6,5 et 9,5.
    2) Le chapitre 2 étudie la formation des assemblages microniques au cours du temps d'étuvage d'une poudre pulvérisée d'isolat de protéines sériques à pH 9,5.
    3) La chapitre 3 étudie le rôle du lactose sur la formation des AMI.
    4) Le chapitre 4 étudie le rôle des caséines sur la formation des AMI.
    5) Le chapitre 5 vise à approfondir le mécanisme de formation des assemblages microniques à partir d'une poudre de β-lactoglobuline pure.
- Finalement, la quatrième section présente les conclusions générales ainsi que les perspectives de ce travail.

B. REVUE DE LA LITTERATURE

1. LES PROTEINES DU LAIT

Du point de vue physico-chimique, le lait est un mélange très complexe. Il contient notamment des protéines, les lipides, du lactose, les minéraux et des vitamines (Figure 2). Sa composition est aussi variable, entre autres selon les espèces animales productrices, selon la saison, selon l'état zootechnique des animaux et selon leur alimentation. Dans le lait bovin, les protéines représentent 3,2 % (p/p) du poids du lait. Dans ce travail, nous nous limiterons à décrire le lait bovin.

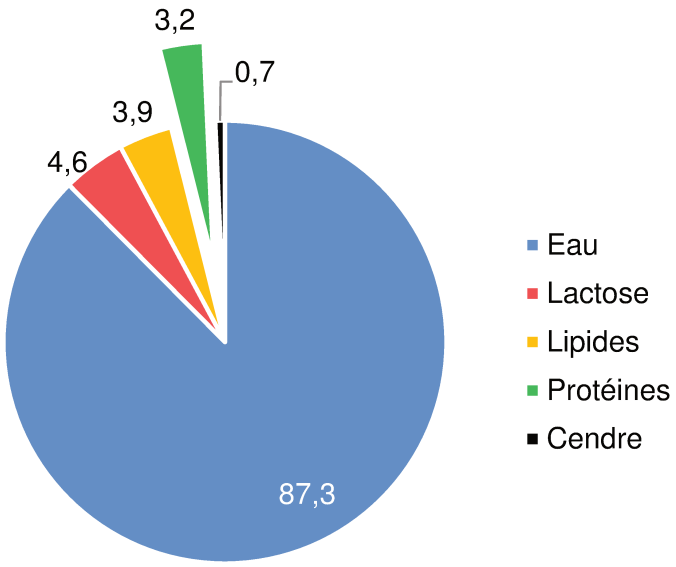


Figure 2 : Composition du lait bovin d'après Wong, Jenness *et al*. (1988). Les chiffres sont exprimés en g/100 g de lait.

Les protéines du lait sont divisées en deux principaux groupes : les caséines et les protéines sériques (Tableau 2). Les caséines se différencient des protéines sériques par le fait qu'elles précipitent à pH 4,6 à 20 °C. Les caséines représentent environ 80 % (p/p) des protéines du lait bovin, contre environ 20 % (p/p) pour les protéines sériques.

Tableau 2 : Composition en protéine du lait bovin (Wong *et al.*, 1988) et quelques propriétés de ces protéines (Mathieu, 1998).

	Caséines				Protéines sériques		
	α_{s1}-caséine	β-caséine	κ-caséine	α_{s2}-caséine	β-lactoglobuline	α-lactalbumine	L'albumine de sérum bovin
Concentration dans le lait (g/kg)	11,5	9,5	3,4	3,0	3,1	1,2	0,4
Poids moléculaire (kDa)	23,6	24,0	19,0	25,2	18,3	14,2	66,3
Nombre de résidus d'acide aminé	199	209	169	207	162	123	582
Nombre de résidus lysine (par mole)	13-14	11-12	9	24	15	11	58
Nombre de résidus cystéine (par mole)	0	0	2	2	5	8	35
Point isoélectrique (pI)	4,9 à 5,0	5,1 à 5,6	5,4 à 5,6	5,0 à 5,4	5,2	4,3	4,8

1.1 LES CASEINES

Les caséines sont les protéines les plus abondantes du lait. Il existe principalement quatre caséines : caséine α_{s1}, caséine α_{s2}, caséine β et caséine κ dans les proportions 4:1:3:1. Elles sont présentes dans le lait sous la forme de particules colloïdales, appelées « micelles de caséine » dont le diamètre varie d'environ 30 nm à plus de 600 nm, avec une valeur moyenne d'environ 200 nm. (McGann *et al.*, 1980) (Figure 3).

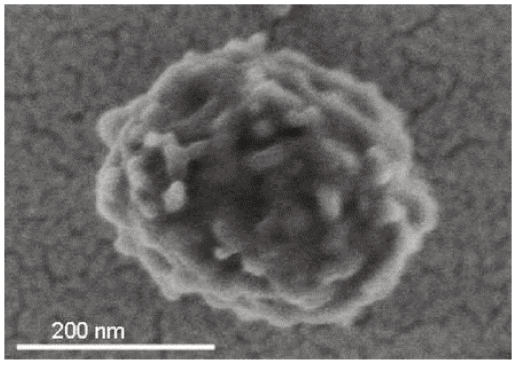


Figure 3 : Structure d'une micelle de caséine observée par microscopie électronique (Martin *et al.*, 2006).

Les caséines sont des phosphoprotéines. Elles possèdent des groupements phosphates liés à la chaîne latérale de résidus sérine. Ces résidus de phosphosérines permettent aux caséines de se lier avec des ions calcium ou d'autres métaux alcalino-terreux. Un assemblage de calcium et de phosphate sous forme de nanoclusters est aussi lié aux phosphosérines et serait impliqué dans la structure de la micelle de caséine. La teneur en proline des caséines est particulièrement élevée, ce qui limite la formation d'hélice α et de feuillets β (Mathieu, 1998). De plus, les caséines contiennent peu de résidus cystéines, limitant le nombre de ponts disulfures intramoléculaires. La structure des caséines est ouverte et flexible et rappellerait celle d'une protéine dénaturée (Holt and Sawyer, 1993; Mathieu, 1998).

1.2 LES PROTEINES SERIQUES

Contrairement à la caséine, les protéines sériques (PS) sont solubles à pH 4,6. Les deux protéines sériques les plus abondantes sont la β-lactoglobuline (βlg) et l'α-lactalbumine (αlac), deux protéines de structure globulaire synthétisées par la glande mammaire. D'autres protéines sériques sont issues du compartiment sanguin et sont présentes en quantités mineures dans le lait.

1.2.1 β-LACTOGLOBULINE

La βlg est la protéine majeure des PS du lait. Elle est présente dans le lait à une concentration de 3,1 g/kg. Sa masse moléculaire se situe autour de 18,3 kDa et elle est composée de 162 acides aminés. Il existe plusieurs variants génétiques de la βlg, mais les isoformes A et B sont les plus communes. Les βlg A et B se différencient seulement par la substitution de 2 acides aminés. La βlg présente un haut degré de structuration, du fait d'une présence importante de feuillets β (Figure 4). Elle possède 5 résidus cystéines, dont 4 sont impliqués dans des ponts disulfures (SS). Les ponts SS sont aux positions 66-160 et 106-121 ou 106-119 (Papiz *et al*., 1986). La fonction thiol de la cystine qui n'est pas impliquée dans un pont disulfure, se trouve près du corps hydrophobe de la protéine, et n'est pas accessible dans la βlg native.

Au pH du lait, la βlg se présente sous la forme de dimère. Les deux monomères sont maintenus entre eux par des interactions non-covalentes. En fonction du pH, elle est dans différents états d'oligomérisation. A pH 2, elle est sous la forme de monomère. Entre pH 2 et 3, elle se dimérise, entre

pH 3 et 5 elle se tétramérise et conduit à la formation d'octamères, et entre pH 5 et 7,5 la forme dimérique est prédominante (Casal *et al*., 1988a).

Au-delà de pH 7,5, la βlg se dissocie en monomères. A un pH proche de 7,5, la βlg native subit un changement de conformation réversible (Tanford *et al*., 1959). Cette transition est connue comme la « transition de Tanford ». Elle induit l'exposition et l'ionisation du groupement carboxyle du résidu glutamate en position 89, une augmentation anormale de la réactivité du groupement sulfhydryle du résidu cystéine en position 121 et un changement de l'environnement d'un résidu tyrosine (Brownlow *et al*., 1997; Dunnill and Green, 1966; Qin *et al*., 1998). Différents auteurs relatent un déplissement de la βlg pour des pH supérieurs ou égaux à 9. Monahan *et al*. (1995) relatent un déplissement extensif de la βlg à pH 9 et 11 à température ambiante. Taulier et Chalikian (2001) mentionnent un déplissement irréversible mais partiel de la βlg pour des pH supérieurs à 9, ainsi qu'une perte de la structure tertiaire de la βlg, augmentant la flexibilité de la chaîne carbonée.

A pH ≥ 9, la dissociation des dimères de βlg en monomères devient irréversible et des polymérisations sont probables du fait du caractère nucléophile du groupe sulfhydryle à ces pH (Cayot and Lorient, 1998).

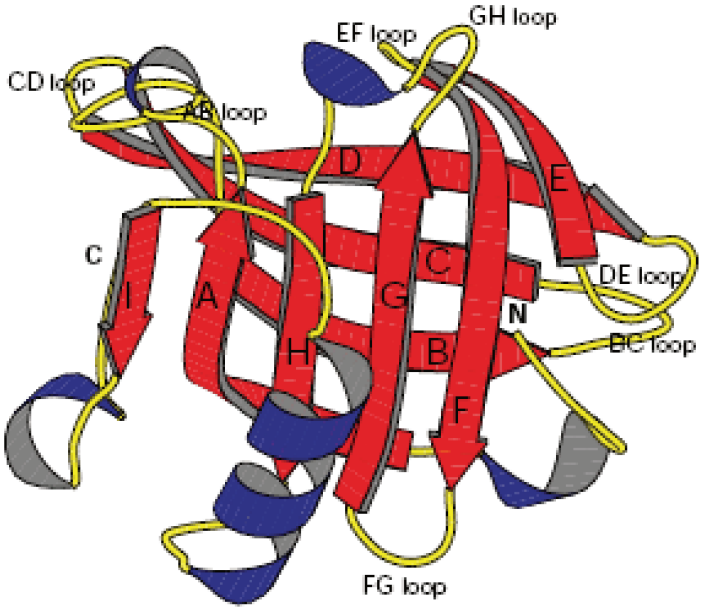


Figure 4 : Structure secondaire et tertiaire d'un monomère de β-lactoglobuline (Brownlow *et al*., 1997). Les hélices α sont colorées en bleu et les feuillets β en rouge.

1.2.2 α-LACTALBUMINE

L'αlac est la deuxième protéine majeure des PS. Elle est présente dans le lait à une concentration ~1,2 g/kg. C'est une protéine globulaire de 123 acides aminés, de masse molaire de 14,2 kDa et de pI ~4,3. C'est une protéine monomérique. Elle possède 8 résidus cystéine, tous impliqués dans 4 ponts SS et ne possède donc pas de groupement thiol libre. Les ponts SS se retrouvent aux positions 6-20, 28-111, 77-73 et 61-91. La structure de l'αlac est représentée dans la Figure 5. Elle est stabilisée par la présence des ponts SS, mais aussi par la présence d'un ion bivalent, l'ion calcium. L'αlac peut être présente sous deux formes, holo et apo, avec ou sans ion calcium, la forme holo étant la plus abondante dans le lait. A pH < 4, le résidu aspartate est protoné et perd son aptitude à lier le calcium (Boland, 2014; Cayot and Lorient, 1998).

La structure de l'αlac est très semblable à celle du lysozyme de blanc d'œuf. Le nombre d'acides aminés est quasiment identique et il est possible d'identifier 40 acides aminés communs et 27 autres qui sont similaires. Les 4 ponts disulfures qui structurent ces 2 protéines sont aussi dans des positions identiques (Brew *et al.*, 1967; Cayot and Lorient, 1998).

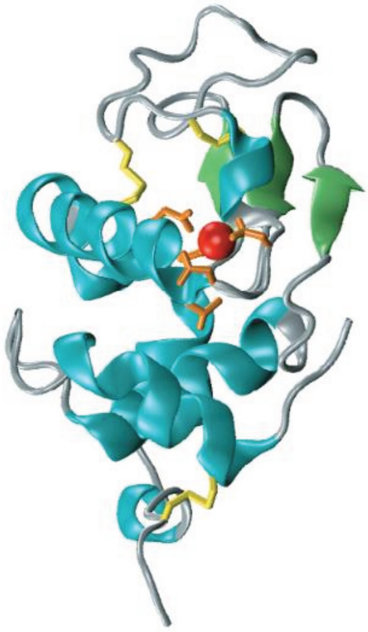


Figure 5 : Structure secondaire et tertiaire de l'α-lactalbumine en présence de d'ion calcium (Bushmarina *et al.*, 2005). Les hélices α sont colorées en bleu et les feuillets β en vert. Les quatre ponts disulfures sont représentés en jaune, l'ion calcium en rouge et les chaînes latérales impliquées dans la liaison du calcium en orange.

1.2.3 LES PROTEINES MINEURES

Ces protéines sont dites mineures car elles ne sont présentes qu'en faible quantité dans le sérum de lait. Il n'en reste pas moins qu'elles jouent des rôles importants. On y trouve parmi elles les immunoglobulines, la sérum albumine bovine, la lactoferrine et des enzymes telles que la lactoperoxydase, la phosphatase alcaline, la plasmine et la catalase. Les immunoglobulines sont des glycoprotéines avec des activités d'anticorps (Ribadeau-Dumas, 1981). La sérum albumine bovine est connue pour transporter les acides gras insolubles dans le sang (Morr and Ha, 1993). La lactoferrine est une glycoprotéine qui peut fixer deux ions Fe^{3+}. Elle permet le transport du fer, mais jouerait aussi un rôle bactériostatique dans le lait en privant certains micro-organismes du fer disponible (Cayot and Lorient, 1998).

2. LE CHAUFFAGE DES PROTEINES SERIQUES

L'application d'un traitement thermique à une température supérieure à la température de dénaturation de la protéine conduit à sa dénaturation. La dénaturation des protéines, au sens stricte, consiste en la rupture des liaisons de faible énergie, entrainant une modification des structures quaternaire, tertiaire et secondaire des protéines. Mais le terme « dénaturation » peut aussi s'étendre à d'autres types de modifications des protéines, comme l'établissement de liaisons intra- et inter-moléculaires donnant lieu à une réticulation ou la fixation d'éléments étrangers aux protéines. Dans ce cas, il y a modification des structures primaire et secondaire, mais la conformation des protéines n'est pas forcément modifiée.

Dans la suite de cette thèse, la dénaturation sera prise au sens large et concernera l'ensemble des modifications qui ont lieu sur les structures primaire, secondaire, tertiaire et/ou quaternaire.

2.1 CHAUFFAGE EN VOIE LIQUIDE

Les PS sont moins stables face au traitement thermique que les micelles de caséines. En effet, ces dernières n'ayant pas de structure à proprement parler, elles ne sont pas dénaturables. Par contre, le traitement du lait au-dessus de 60 °C provoque des changements conformationnels des PS, menant à la perte de leur structure native. La dénaturation de la βlg devient irréversible au-dessus de 65 °C à pH 7 (Boland, 2014). La température de dénaturation de l'αlac est de 65 °C à pH 6,7. Cependant, la

dénaturation de l'αlac est réversible jusqu'à 80 °C. De ce fait, l'αlac est la protéine sérique la plus résistante à la dénaturation thermique (Cayot and Lorient, 1998).

La première étape de la dénaturation de la βlg est la dissociation du dimère en monomère. Ensuite, les monomères se déploient partiellement, entrainant une exposition en surface de la molécule du groupement sulfhydrile (SH) et des groupements hydrophobes enfouis au cœur de la molécule native. Ces démasquages entrainent la formation de liaisons hydrophobes et des échanges de groupes SS/SH intermoléculaires conduisant à la formation d'agrégats (Sawyer, 1968).

La température et le taux de dénaturation de la βlg varient selon la vitesse de chauffage, la concentration en protéine, le pH et la force ionique (Croguennec *et al*., 2004; Law and Leaver, 1997, 2000; Nicolai *et al*., 2011a; Qi *et al*., 1995). A pH basique, la réactivité des groupements thiols est augmentée, facilitant les échanges SS/SH, du fait de la proximité du pK d'ionisation de la fonction SH, qui est de l'ordre de 11 (Kella and Kinsella, 1988). La force ionique joue aussi un rôle sur la stabilité thermique des PS. En effet, les sels peuvent diminuer les répulsions électrostatiques entre les protéines et ainsi favoriser leur agrégation par interactions entre les groupes hydrophobes démasqués (Cayot and Lorient, 1998).

En fonction des conditions de chauffage, il est possible d'obtenir une variété d'agrégats de structures, propriétés physico-chimiques et techno-fonctionnelles différentes (Nicolai *et al*., 2011a). La Figure 6 illustre différents types de structures d'agrégats de PS thermo-induits obtenus à différents pH : des agrégats de PS thermo-induits correspondant à des longs brins rigides à pH 2,5, des petits brins courbés à pH 5,8 et des sphères à pH 7,0. L'association des petits brins courbés peut mener à des agrégats de grandes tailles, de 50 à 200 nm, couramment nommés agrégats fractals (Donato *et al*., 2009).

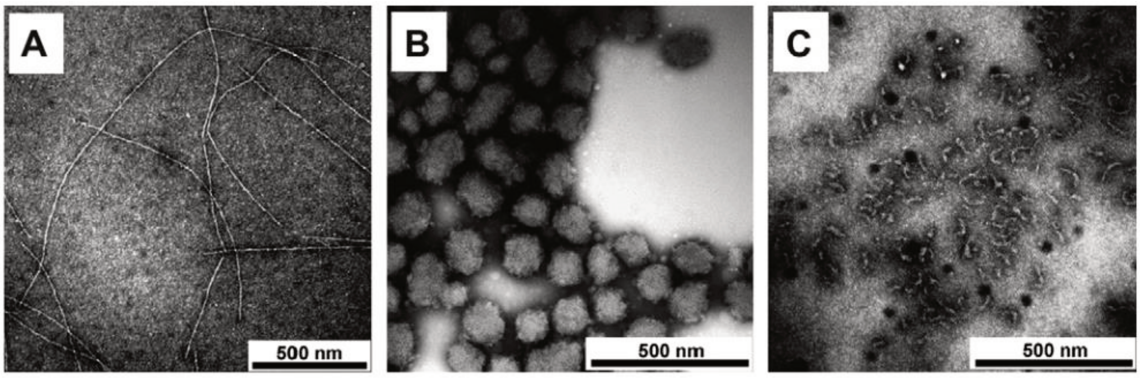


Figure 6 : Micrographies d'agrégats de βlg formés à pH 2,5 avec un traitement thermique à 90 °C pendant 300 min (A), à pH 5,8 avec un traitement thermique à 85 °C pendant 15 min (B) et à pH 7,0 avec un traitement thermique à 85 °C pendant 15 min (C), obtenues par microscopie électronique à transmission à coloration négative (Jung *et al.*, 2008).

2.2 CHAUFFAGE EN VOIE SECHE

Tandis que beaucoup d'études ont été dédiées au chauffage des protéines en solution, beaucoup moins d'études se sont intéressées au chauffage des protéines par étuvage. Pourtant, depuis que Kato *et al*. (1989) ont démontré que l'étuvage des protéines de blanc d'œuf permet l'amélioration des propriétés fonctionnelles de ces protéines, ce procédé est très commun dans l'industrie de l'œuf.

2.2.1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : « DRY HEATING OF WHEY PROTEINS »

Cette partie présente les études scientifiques qui ont été menées sur l'étuvage des PS, en mettant l'accent sur les propriétés fonctionnelles qui en résultent. Dans un premier lieu, nous nous sommes concentrés sur les conditions d'étuvage favorisant la glycation des PS avec de faible taux de dénaturation, puis dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur les conditions d'étuvage favorisant la dénaturation et l'agrégation des PS.

Cette revue a été publiée dans le journal « Food Research International » (article 1).

AUTHOR'S PERSONAL COPY

Food Research International 100 (2017) 31–44

Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Review

Dry heating of whey proteins

Elise Schong, Marie-Hélène Famelart
STLO, UMR 1253, INRA, Agrocampus Ouest, 35000 Rennes, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Dry heating
Whey protein
Functionality
Denaturation
Aggregation
Glycation

ABSTRACT

Whey protein products are of widespread use as food ingredients because of their high nutritional, biological and functional properties. Whey proteins are important structural components in many foods as used in their native form, for example for their heat-induced gelation abilities. Furthermore, they also offer reliable functionalities when modified by heating processes as denatured or aggregated proteins. Heat treatment of whey proteins in a liquid state has received much attention in recent years. While dry heating of whey proteins, say heating whey proteins in the dry state, is frequently cited in the literature as a potential and efficient means to improve the functional properties of proteins, it has received very little attention. We report first on the dry heating of whey products as applied to promote glycation of whey proteins with a low denaturation, and second, to promote their denaturation and aggregation and on their consequences on the functional properties of whey proteins.

1. Introduction

Dry heating of whey proteins or heating a whey protein powder has received very little attention, while dry heating of hen egg white is very commonplace in the egg industry. It was first applied on egg white at 55–65 °C for 3–5 days for its pasteurisation, because it allows reaching higher temperatures for egg white than in a liquid state without destabilization. But, since Kato, Ibrahim, Watanabe, Honma, and Kobayashi (1989) demonstrate that it improves the functional properties of egg white, the food-processing industry widely uses the dry heating of hen egg white at 65–85 °C for 7–14 d (Nau, Guérin-Dubiard, Baron, & Thapon, 2010). It is mostly applied in rooms at a regulated temperature and relative humidity (RH) to avoid an excessive decrease in the powder moisture.

The temperature and time of the dry heating are essential parameters, as the content in saccharides, the pH and the water activity (a_W) of the powder. While heating in solution is applied at relative high temperature for short time (60–95 °C less than one h), dry heating uses generally lower temperatures (50–80 °C) for longer time (h to days). However, some dry heating studies use higher temperatures (100–130 °C) for shorter time (O'Mahony, Drapala, Mulcahy, & Mulvihill, 2017). In research studies, pH and composition of the reactants are adjusted in the liquid state, the mixture is generally freeze-dried and the powder is usually adjusted at a known initial RH or a_W, by storage in selected saturated salts, for example. The power is then dry heated in an oven, in tightly sealed glass tubes. In that process, only the initial a_W is controlled and can evolve, due to the potential accumulation of water by the Maillard reaction. In some studies, the whole equipment controlling the a_W is introduced in the oven and the aw is controlled all along the process. We will report once on dry heating applied on mixtures of whey protein isolate and saccharide powders (Hiller & Lorenzen, 2010). Moreover, it has been said that dry heating produces a limited protein denaturation (Augustin & Udabage, 2007; Morgan et al., 1999) at a temperature lower than the glass transition temperature (Tg) range (~75 to 120 °C for whey protein isolate (WPI) or βlactoglobulin (βlg) at a_W from 0.64 to 0.23, respectively (Zhou & Labuza, 2007)) and this is why an increasing number of studies are devoted to the dry heating as a mean to increase the functional properties of milk proteins. According to Zhou and Labuza (2007), denaturation temperature (Td) at low water contents of WPI or βlg are from 96 to 180 °C at a_W 0.85 to 0.11, respectively, a much higher value than in the liquid state.

As the dry heating of whey proteins is an efficient way to produce glycated proteins, and as Maillard type-glycated proteins could carry biological and techno-functional benefits, we report on that technology as studied on whey proteins in scientific papers. To our knowledge, there are no recent reviews that deal with the dry heating of whey proteins and their consequences on functional properties of proteins.

We report first on studies on dry heating applied for glycation reaction. Moreover, we report on studies of dry heating as a process that induces aggregation of whey proteins, either as detrimental or desired. Although the processes of glycation and aggregation are intimately related, because glycation is generally the first step of both, the former studies are conducted with added reducing sugar with the aim to limit the structural modifications of whey

Corresponding author.
E-mail address: marie-helene.famelart@inra.fr (M.-H. Famelart).

http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.057
Received 10 May 2017; Received in revised form 24 August 2017; Accepted 26 August 2017
Available online 31 August 2017
0963-9969/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

AUTHOR'S PERSONAL COPY

proteins, such as their aggregation and the production of brown colour, while the latter are conducted in conditions promoting denaturation and aggregation of proteins, generally without adding sugar and at higher temperature and time of dry heating. We have divided these parts in a section presenting the conditions applied during the dry heating and a section on consequences of dry heating on the functional properties of proteins. To help the reader, the section on the conditions applied during glycation is also divided in treatments at temperatures lower and higher than 50 °C. Regardless of the a_W or RH value of the experiment, temperatures lower than 50 °C are lower than the Tg of the WPI powders, and protein mobility and reactions rates are significantly reduced and vice versa (Zhou & Labuza, 2007).

2. Dry heating in conditions promoting the glycation of whey proteins

2.1. Generalities

Heating proteins in the presence or with traces of a reducing sugar often leads to Maillard reactions (Augustin & Udabage, 2007). These reactions constitute a very complex network of reactions with diverse pathways. At the beginning, a reducing sugar such as lactose condenses with a compound possessing a free amino group, like the ε-group of lysine or the α-amino group of terminal amino acids, to form N-substitute glycosylamine. Then, glycosylamine undergoes the Amadori re-arrangement to form ketosamines known as early glycation products. Many further ways are then possible, leading either to reductones and dehydroreductones, which are powerful antioxidants or to the Strecker degradation or to the Schiff's base/furfural pathway with formation of water and brown nitrogenous polymers and copolymers called mela-noidins that constituted advanced glycation end-product or AGE (Martins, Jongen, & van Boekel, 2000). As one of the products of the reaction is water, a high content of water inhibits the reaction, and the reaction occurs most rapidly at intermediate value of a_W, $0.5 < a_W < 0.8$, say for dried and intermediate-moisture products (Ames, 1990).

An increasing number of studies reports on increased functional properties of glycated proteins. Some recent reviews (Liu, Ru, & Ding, 2012; O'Mahony et al., 2017) report on glycation of dairy proteins, by solid state or liquid heating processes, but none on dry heating whey proteins for other aims than protein glycation.

2.2. Conditions of dry heating and changes induced in the physicochemical properties of proteins

2.2.1. Glycation at low or medium temperatures (T ≤ 50 °C)

According to Martins et al. (2000), an increasing reactivity between sugar and the nucleophilic amino groups is obtained at high temperature and in an alkaline environment, as the amino groups are deprotonated and so, more nucleophilic. Maillard reactions take place in solution or in solid state, provided a little moisture is present, typically 60–80% RH (Kato, 2002). The number of condensed sugars, the size of the polymers, the nature of the intermolecular protein bonds and the properties of the protein polymer-sugar conjugates depend on the nature of the sugar (Chobert, Gaudin, Dalgalarrondo, & Haertle, 2006). Many temperatures, adjusted pH, sugars, protein mixture and time of dry heating have been tested, as shown in Table 1 and we will describe in more details some of the physicochemical changes induced by these dry heating experiments in the following.

Heat treatment of βlg B in the dry state at 50 °C in the presence of 100 mol lactose/mol βlg leads to a family of conjugates with different numbers of bound lactose. The mean number of bound lactose is dramatically higher in the dry treatment than in the liquid treatment, even with higher lactose to βlg ratios or longer heating times (French et al., 2002; Morgan et al., 1998; Morgan et al., 1999; Morgan et al., 1999; Morgan et al., 1999). Indeed, the mean numbers of

Table 1
Conditions of glycation at low or ≤medium temperature(50 °C).

Temperature (°C)	Time	pH adjustment before the dry heating	Protein powder	Saccharide	Ratio saccharide/protein	RH (%)	References
50	2–48 h	7.0 & 7.2	βlg	Lactose	50 & 100 (mol/mol)	65	Morgan et al., 1998; Morgan et al., 1999; Morgan et al., 1999; Morgan, Léonil, Mollé, & Bouhallab, 1999French,Harper,Kleinholz,Jones, & Green-Church, 2002
50	1–96 h	7.2	βlg	Lactose	100 (mol/mol)	65	Medrano, Abirached, Panizzolo, Moyna, & Añón, 2009
50	51 & 96 h	7	βlg or αlac	Lactose & glucose	10 & 100 (mol/mol)	65	Matsuda, Kato, & Nakamura, 1991
50	0–10 d	7.5	βlg	Lactose & lactulose	1:1 (w/w)	65	Corzo-Martinez, Moreno, Olano, & Villamiel, 2008
40 & 50	6 d	7	βlg	Galactose & tagatose	1:1 (w/w)	44	Yajima, Onodera, Takeda, Kato, & Shiomi, 2007
40 17 d		7.8	βlg	Xylobiose	1:1 (w/w)	30–40	Luz Sanz, Corzo-Martínez, Rastall, Olano, & Moreno, 2007
40	23 d	7	βlg	Prebiotic galactooligosaccharide (GOS)	1:1 & 1:3 (w/w)1	44	Enomoto et al., 2007 & 2009
50	3 d	8.0	βlg& αlac	Maltopentaose	0.3:1 & 0.5:1 (w/w)	65	Sun, Hayakawa, Puangmanee, & Izumori, 2006
50	12–48 h	9.0	αlac	Allose, fructose & glucose	13:1 (mol/mol)	55	Boland, Hill, Higgs, Haggarty, & Campanella, 1999
30–75	18 h–36 d	6-8	WPI, WPC & milkpowder	Lactose	0.02:1–0.6:1 (w/w)	30–80	

AUTHOR'S PERSONAL COPY

bound lactose are 7.7 mol/mol in 48 h and 2.2 mol/mol in 130 h, respectively (Morgan et al., 1999; Morgan et al., 1999). One group (French et al., 2002) has also tested an interesting way of glycation, first a dry heating step at 50 °C for 96 h, followed by a liquid state at 50 °C for up to 96 h that leads to very few changes of protein glycoforms during the second heat treatment.

While the liquid treatment leads to the formation of high molecular weight (Mw) species, the dry heating do not modify the polymerisation state of βlg. Only a slight increase in the sulfhydryl content and a modification of the conformation of the AB loop region of the protein are reported after dry heating (Morgan et al., 1998; Morgan et al., 1999; Morgan et al., 1999).

While by RP-HPLC/ESI-MS/MS 15 amino residues of βlg are found as glycated (the Nterm and all the 15 lysine residues, apart the Lys_{101} that is hard to analyse) (Morgan et al., 1999), by MALDI-TOFF, Leu_1 (NH_2 terminal) and the Arg_{124} are also found modified, and even the Arg_{40}, Arg_{154} and Arg_{148} and Lys_{47}, Lys_{75} that can be di-alkylated with galactose (Fenaille, Morgan, Parisod, Tabet, & Guy, 2004). Binding a sugar to lysine leads to a decrease in the pKa of βlg, but again very few structural modifications are observed as compared to the treatment in a liquid state (Fenaille, Morgan, Parisod, Tabet, & Guy, 2003).

Medrano et al. (2009) tested the glycation of βlg with lactose or glucose by dry heating at 50 °C. The degree of glycation increases with reaction time and sugar molar ratio, with glucose only. These 2 factors have no effect with lactose as sugar. Maximum surface hydrophobicity (SH) is lower for the glucose-βlg, while lactose-βlg and free βlg have close SH. The number of lactose bound on βlg is 7 and 8, for 51 and 96 h of dry heating, respectively, in accordance with the studies of Morgan et al. (1999) and Morgan et al. (1999), while they are 15 and 19 with glucose. Dry heating in the presence of lactose and glucose forms oligomers. βlg can also be conjugates with lactulose, but at a lower rate than with lactose (Matsuda et al., 1991) and with xylobiose (Yajima et al., 2007).

βlg was conjugated with aldose or ketose, i.e. galactose or tagatose, to study the role of the position of the CO group on the sugar on the conjugation, the property and the functionality of conjugates (Corzo-Martinez et al., 2008). The reactivity of galactose in the early stages of the reaction is higher than that of tagatose, as a larger number of galactose than tagatose bound to βlg, because probably the aldehyde group of galactose is more electrophilic than the keto group of tagatose. The conjugates are heterogeneous and have higher hydrophilic characteristics due to the sugar bonding. They also have a higher negative charge than native βlg, due to the blocking of the basic group. They also show a lower SH, but that can be due to the blocking of lysine and/or arginine residues by the saccharides and as ANS, the hydrophobic probe used to measure SH, has a slight affinity for these amino acids by electrostatic interactions. Some additional aggregates also form during the conjugation, that are more numerous and in higher amount with tagatose than galactose when the conjugation is conducted at 40 °C. At 50 °C, a similar number of different aggregates form with galactose than tagatose. A slight change in the conformation is seen between native and conjugated forms of βlg at 50 °C, while no changes are noticed at 40 °C, as observed by the intrinsic fluorescence spectra of βlg.

βlg was glycated with prebiotic galactooligosaccharide (GOS) (Luz Sanz et al., 2007). The level of free amino groups decreases to 20% in 12 d, while the furosine - i.e. a compound formed by the hydrolysis of Amadori compound (AC) used as an indicator of heat damage of dairy products - content increases to 2.5 mg/100 mg of βlg in 16 d and then remains constant and the browning begins to be significant after the 16th day. One trisaccharide, 2 tetrasaccharides and a pentasaccharide are suspected to bind to βlg. The mean Mw of βlg increases by 21% by glycation, and more dimers, and a trimeric form appear, due to either an incomplete reduction of proteins with dithiothreitol during the SDS-PAGE analysis or to polymerisation by bonds other than disulfide bridges. The isoelectric pH value (pI) of conjugates decreases from 5.2–5.3 to almost pH 4.5 after 23 d of dry heating, with a larger charge heterogeneity than before the dry heating and the hydrophilicity increases. Indeed, the pI ranges from pH 5.3 to 4.5.

When αlactalbumin (αlac) is dry heated at 50 °C in the presence of maltopentaose (MP), 4 additional αlac conjugates appear, with different numbers of conjugated MP (Enomoto et al., 2009). The secondary structure of αlac is not modified by glycation, and only a slight increase in the Td was reported. Glycation of αlac with D-allose, a rare sugar, is faster than with D-fructose or D-glucose (Sun et al., 2006). The main conjugates contain 2, 6 and 8 sugars for fructose, glucose and allose, respectively.

The patent from Boland et al. (1999) show results on the use of lactose as the reducing sugar in the glycation of whey proteins. The glycation of protein is not limited to whey protein concentrates or isolates as they also report on the production of furosine from the storage at a_W = 0.33 to 0.79 at 30–40 °C for 6 to 36 days of a milk protein concentrate, or of whole or skim milk powder.

In conclusion, we would say that dry heating at temperature < 50 °C induces the formation of a family of heterogeneous glycated conjugates of protein, and to very few structural changes, as compared to the treatment in a liquid state and that the level of glycation depends on the saccharide and the conditions used during the treatment. Main consequences of this glycation are the reduction in the pI of the proteins and their increased hydrophilicity.

2.2.2. Glycation at high temperatures (T ≥ 50 °C)

Conditions of dry heating are summed up in Table 2. Many poly-saccharides have been tested: mono, di, oligo, polysaccharides such as dextrans or maltodextrin (MD) and even more complex gums, like acacia or corn syrup gums.

The efficiency of sugars in βlg glycation is as follows: aldopentose > aldohexose > disaccharide, with galactose > glucose, and lactose being the less efficient sugar (Fenaille et al., 2003; Fenaille et al., 2003). While a significant difference of efficiency is observed between glucose and galactose in the dry state (Fenaille et al., 2003), it is not so different when the glycation is performed in solution. Moreover, this difference between glucose and galactose observed during solid-state glycation is rather hard to explain as the only difference between these 2 hexoses is the position of the hydroxyl on the C4 carbon. According to Fenaille et al. (2003) the reactivity of reducing sugars increases with the level of mutarotation and the decrease in the carbohydrate size. Increasing the a_W during the dry heating of whey protein concentrate (WPC) leads to an increase number of glycated lysine residues (Morgan et al., 2005).

Many studies aim at producing only partial glycation of proteins, or optimizing the content in AC with the minimum powder browning and protein polymerisation. Wang et al. (2013) characterize the modifications of protein structures in WPI as induced by a partial glycation say with 1.4% loss in free amine groups with 10 kDa dextran. Protein structures are characterized by high-sensitivity surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and principal component analyses. Spectra are significantly modified by this very low glycation: a new sharp band is found for the conjugate at 983 cm^{-1} assumed by the authors to be a marker of the early stages of the Maillard reaction, but further investigations are needed to attribute this band to any vibration. Moreover, glycation leads to many changes in the protein conformation, first disulfide band disappearance, second an increased exposure of tryptophan and tyrosine to the polar environment, a reduced ionisation of tyrosine and less hydrogen bonding between tyrosine and aspartic or glutamic acids, changes in the polar environment of hydrocarbon chains, and finally an increase in β-sheet-like structures. The disappearance of the protonated form of the carboxylic group in the conjugate suggests a higher net negative charge, a greater interaction with the aqueous environment and a higher structural stability. Another study aims at optimizing the maximum formation of furosine with the lowest browning by the dry heating βlg in the presence of high Mw

AUTHOR'S PERSONAL COPY

Table 2
Conditions of glycation at high temperature (≥ 50 °C).

Temperature (°C)	Time	pH adjust. before dry heating	Protein powder	Saccharide	Ratio sugar/protein	RH (%)	References
60	0–8.25 h	7.1	βlg	Lactose, galactose & glucose	200:1 (mol/mol)	44	Fenaille et al., 2003; Fenaille, Campos-Giménez, Guy, Schmitt, & Morgan, 2003; Fenaille et al., 2004
60	1–7.5 h	NS	Skim milk powder, WPC	Lactose	51:35 & 23:60 (w/w)	21–50	Morgan, Nouzille, Baechler, Vuataz, & Raemy, 2005
60	96 h	7	WPI	10 kDa dextran	4:1 (w/w)	49	Wang, He, Labuza, & Ismail, 2013
50 to 60	2–15 d	7	βlg, αlac & BSA	10, 20 & 43 kDa dextran	2:1–6:1 (w/w)	44–79	Jiménez-Castaño, Villamiel, Martín-Álvarez, Olano, & López-Fandiño, 2005; Jiménez-Castaño, López-Fandiño, Olano, & Villamiel, 2005; Jiménez-Castaño, Villamiel, & López-Fandiño, 2007
50–60	48–144 h	7	WPI	10 kDa dextran	4:1 (w/w)	49	Wang & Ismail, 2012
80	2 h	7	WPI	Glucose, lactose & 1 kDa maltodextrin (MD)	1:1 (w/w)	80	Liu & Zhong, 2013
60 & 65	1–96 h	7.2	βlg	Lactose	100:1 (mol/mol)	65	French et al., 2002
60 & 130	24 & 48 h for 60 °C; 20 & 30 min for 130 °C	7	WPC	Lactose[a]	64:35 (w/w)	79	Liu & Zhong, 2014
60	1–7 d	NS	WPI	Glucose	1:1 (w/w)	60	Liu, Kong, et al., 2014
50 & 60	24 & 48 h	NS	WPI	1.7 kDa MD	carbonyl to amino ratio 1:1 & 2:1 (mol/mol)	50 & 80	Martinez-Alvarenga et al., 2014
65	5–10 d	NS	WPI	6–42 kDa dextran	0.1:1–0.8:1 (mol/mol NH_2)	79	Wooster & Augustin, 2007
100	2 h	3.5	WPC	Lactose[a] & 35–45 and 100–200 kDa dextran	lactose 70:13 & dextran 1:2 (w/w)	NS	Lillard, Clare, & Daubert, 2009
60	14 d	4.2	βlg	Acacia gum	1:2 and 2:1 (w/w)	79	Schmitt, Bovay, & Frossard, 2005
75	2 d	NS	βlg & WPI	Corn fiber gum	3:1 (w/w)	79	Yadav, Strahan, Mukhopadhyay, Hotchkiss, & Hicks, 2012
60	1–5 h	5–8	βlg	Glucose & fructose	monosaccharide to primary amino group 6.5:1 (mol/mol)	65	Broersen, Voragen, Hamer, & Jongh, 2004
60	15 d	7	WPC	Pectin	1:1 (w/w)	NS	Mishra, Mann, & Joshi, 2001
80–100	1–2 h	NS	WPI	2 to 280 kDa MD	1:1–4:1 (w/w)	79	Akhtar & Dickinson, 2007
50	0–40 h	7.2	βlg	Lactose	100 (mol/mol)	65	Bouhallab, Morgan, Henry, Molle, & Leonil, 1999
50	3 d	8.1	WPI	Maltopentaose	0.3:1 (w/w)	65	Li, Enomoto, Ohki, Ohtomo, & Aoki, 2005
80	2 h	6.0	WPI	MD (dextrose equivalent = 18)	1:1 (w/w)	65	Wang & Zhong, 2014
50	51 & 96 h	7.0	βlg	Glucose & lactose	10 & 100 (mol/mol)	65	Medrano, Abirached, Moyna, Panizzolo, & Añón, 2012
50 & 75	1–7 d	NS	βlg	20 to 2000 kDa dextran	1:1 (mol/mol)	81	Dunlap & Côté, 2005
60	48–150 h	7.5	βlg	20 to 440 kDa dextran	1:1 (mol/mol NH_2)	76	Wooster & Augustin, 2006
80	2 h	NS	WPI	488 kDa dextran	3:1 (w/w) & 1:2.7–1:21.7 (mol/mol)	79	Akhtar & Dickinson, 2003
60	3 & 5 w	7	WPC	Carboxymethylcellulose	1:3 (w/w)	76	Kika, Korlos, & Kiosseoglou, 2007
60	2, 5 & 9 d	7.0	WPI	6–70 kDa dextran	0.3:1–0.9:1 (w/w)	63	Spotti et al., 2013a, 2013b, 2014a & 2014b
60	7 d	NS	WPI	150 kDa dextran	1:1 (w/w)	79	Sun et al., 2011

NS: not specified.
[a] The lactose contain naturally present in powder.

AUTHOR'S PERSONAL COPY

dextran (Jiménez-Castaño et al., 2005). The optimum is reached under high temperature, low a_W and low proportion of dextran (60 °C, a_W = 0.44 and R = 2:1) and corresponds to ~50% of βlg being bound to one dextran molecule. Dry heating for 4 d in this condition promotes a quick conjugation of dextran on βlg that then slowed down. A lower temperature, higher a_W and higher proportion of dextran promotes more βlg aggregation and a brown colour development, but polymerisation that is partly due to disulfide bonds is present in the 2 studied conditions (Jiménez-Castaño et al., 2005). A similar conformation of the protein around the tryptophan residues is observed for the conjugates and the native βlg, but the fluorescence intensity decreases for the conjugates. This decrease is explained by a shielding effect of the polysaccharide chain on the protein.

In conditions of high glycation and low browning, the glycation of whey proteins is higher with 10 kDa than with 20 kDa dextran and the highest level of glycation is reached faster for αlac than for the 2 other proteins Jiménez-Castaño et al., 2007 compared.

Wang and Ismail (2012) also conducted a study to optimize the maximal amount of AC with minimal browning from WPI and dextran. After heating at 60 °C for 96 h, a high amount of AC is seen, with only a slight browning. The authors identified one site of glycation for an oligosaccharide containing 5 glucose units at lysine 87 located in the EF loop of the β-barrel on βlg and one site for an oligosaccharide of 25 glucose units located at the very first loop of the first α-helix structure of αlac.

For authors not taking care of advanced Maillard products and brown colour, significant changes in protein structure and protein polymerisation are reported. Liu and Zhong (2013) prepared WPI conjugates with mono, di- and oligosaccharides (glucose, lactose and MD). In the SDS-PAGE, the band of αlac disappears, while βlg and BSA shift to a higher Mw after dry heating, due to the conjugation with the carbohydrate molecule and a new component at 40–50 kDa forms by covalent cross-linking of proteins as reported for the Maillard reaction. When the glycation is performed with MD, the shift for the protein Mw is larger and the Mw distribution is less uniform than for the other sugars. The smaller the sugar, the higher its reactivity, probably due to a higher access of the aldehyde group to the amino acids and the higher the number of bound sugars, the lower the number of residual lysine residues in the WPI and the lighter the yellowness of the suspension. Dry heating causes cross-linking of proteins. Secondary structure of proteins in the WPI is modified by the glycation, with a reduction in ordered structure contents and a concomitant increase in aperiodic structure contents.

According to Liu, Kong, Han, Sun, and Li (2014), dry heating of WPI in the presence of glucose leads to the formation of brown nitrogenous polymers and copolymers observed by the increase in the redness and yellowness of the powder. While dry heating without glucose leads to no change in the size of the WPI, dry heating with glucose leads to the formation of large polymers of Mw > 200 kDa and to the concomitant disappearance of the monomers of αlac, βlg and BSA. These proteins participate in the Maillard reaction and the formation of cross-linked polymers during the advanced stages of the Maillard reaction. Complicated cross-linking or aggregation of whey proteins occurs between proteins and glucose, leading to significant changes in the amide I, II and III bands. The absorption spectra of WPI during dry heating in the presence of glucose showed increasing absorption at 220 and 280 nm, explained by the formation of the Schiff base and a red shift of the peak at 280 nm concomitant to the appearance of the yellow colour in the powder. The intrinsic fluorescence emission increases with the glycation, due to exposure of tryptophan residues. The maximum fluorescence is obtained after 4 d of dry heating, because florescence is associated to early Maillard products and not to final brown pigments, as shown by Benjakul, Lertittikul, and Bauer (2005).

Glycation of WPC was conducted with the residual lactose content of the WPC at 60 °C for 24 and 48 h or at 130 °C for 20 and 30 min (Liu & Zhong, 2014). Brown colour development increases with the time of dry heating and was significantly lower at 130 °C than at 60 °C, while the time of dry heating and was significantly lower at 130 °C than at 60 °C, while the same amount of free amino groups was measured at the 2 temperatures of dry heating and the number of attached lactose was a little bit higher at 130 °C than at 60 °C. In another study on the glycation of WPI with 1.7 kDa MD, available amino groups are positively correlated with the colour development in powders (Martinez-Alvarenga et al., 2014). The maximum rate of glycation of WPI with 1.7 kDa MD is ~ 8 at the highest temperature, RH, time and amino to carbonyl ratio, R (60 °C, 80% RH, R = 1:2) and ~2.5 for their lowest levels (50 °C, 50% RH, and R = 1:1) (Martinez-Alvarenga et al., 2014). The studied factors are all significant and in decreasing order: temperature > RH > time > R.

Wooster and Augustin (2007) conjugated WPI with 6–42 kDa dextran. The number of attached dextrans are from 0 for the control to 5.7 mol/mol of WPI at the highest dextran to protein ratio after 10 d dry heating. The denaturation of WPI is larger when 5.7 mol dextran/mol protein attach than when heating the WPI alone in the same condition and proteins adopt mainly a random coil structure. As compared to heating without dextran, the presence of dextran vastly increases the protein unfolding, either by attachment or by changing the solvation environment.

Lillard et al. (2009) studied glycation of a modified WPC. Colour changes and loss in amino groups are found in decreasing order: lactose > dextran 100–200 kDa > dextran 35–45 kDa. As the reaction was more pronounced with the largest dextran than with the smallest, that is also present at a smaller molar concentration, the authors suspect that the highest concentration in polymer could cause diffusion limitation and prevent the Maillard reaction.

Some authors report on protein glycation in the presence of even more complex polysaccharides, acacia gum (AG) (Schmitt et al., 2005), pectin (Mishra et al., 2001) or corn fiber gum (CFG), mainly containing arabinoxylan (Yadav et al., 2012).

While some studies report large structural modifications of whey proteins by dry heating at temperatures > 50 °C, Broersen et al. (2004) dry heated βlg with glucose and fructose at 45 or 60 °C and report only some structural modifications such as an increase in Mw and SH content of βlg, without any other structural changes or advanced Maillard products. Even, glycated βlg retains its dimeric structure. The degree of glycation increases as pH, temperature and incubation time increase and with glucose as compared to fructose. The highest degree of glycation of 14 glucose moieties versus 6 moieties for fructose attached to βlg is reached after the dry heating treatment at ~60 °C for 5 h and pH 8.

In conclusion, some studies are conducted at temperatures > 50 °C, but as the temperature and the time of dry treatment increase and without cautiously limiting the formation of AGE, progressive changes in whey protein conformation and their cross-linking can occur, together with the colour development in the powder.

2.3. Consequences on the functional properties of proteins

Boland et al., 1999 claimed for an industrial process for producing a whey protein powder and even a dairy powder with a controlled level of glycation for its use as an ingredient of high functionality and nutritional content, and of particular interest for acid beverages. Many improvements of the functional properties of dry heated glycated proteins are reported.

2.3.1. Solubility

Glycation of whey proteins increases the protein solubility far from their pI, and even more worthwhile near their pI: for WPC conjugated with pectin (Mishra et al., 2001), for WPI conjugated with glucose, lactose and MD (Liu & Zhong, 2013), or with MD of 2–280 kDa (Akhtar & Dickinson, 2007) or 1.7 kDa (Martinez-Alvarenga et al., 2014) or with dextran (Wang & Ismail, 2012) or for βlg conjugated with dextran 10 and 20 kDa (Jiménez-Castaño et al., 2007). Glycation improves the solubility of αlac on the whole pH range (3–7),

AUTHOR'S PERSONAL COPY

or shifted the minimum solubility of βlg and BSA toward a more acidic pH value (Jiménez-Castaño et al., 2007). βlg and BSA are more soluble at pH 5 and less soluble at pH 4 after their glycation than before, as WPI glycated with 1.7 kDa MD (Martinez-Alvarenga et al., 2014). The solubility at pH 7 of βlg, αlac or WPI dry heated at 50 °C in the presence or ab-sence of MP is close to 99% (Enomoto et al., 2007, 2009; Li et al., 2005). The complexation of WPC with pectin allows to maintain a high solubility of WPC at acidic pH values as compared to native WPC and WPC dry heated without dextran (Mishra et al., 2001). Solubility of conjugates of βlg and AG shows a shift of pH for the minimum of the solubility toward 4 at the βlg/AG ratio 2:1 and even toward lower values in the presence of more AG. After 2 d of dry heating, the loss in solubility is lower in the presence of AG as compared to dry heating of βlg in the absence of AG (Schmitt et al., 2005). These results are explained by a shift of the pI of protein conjugates toward more acidic values as compared to the native form (Jiménez-Castaño et al., 2007; Liu & Zhong, 2013). This shift in pI of glycated proteins is due to the reduced content in lysine having a high pK value. The pI of WPI decreases with glycation with MD and glucose from 4.8 to 4.2 (Liu & Zhong, 2013), while that of WPI conjugated with dextran decreased from 4.86 to 4.28 (Wang & Ismail, 2012).

2.3.2. Heat stability

A very interesting fact is that glycation of whey proteins increases their stability toward heat-induced denaturation and aggregation (Boland et al., 1999; Bouhallab et al., 1999; Broersen et al., 2004; Enomoto et al., 2007; Jiménez-Castaño et al., 2007; Li et al., 2005; Liu et al., 2014; Liu & Zhong, 2013, 2014; Medrano et al., 2009; Mishra et al., 2001; Wang et al., 2013; Wang & Ismail, 2012; Wang & Zhong, 2014). Heat stability is usually studied by comparing the solubility of protein conjugates to native proteins after a preheating process, or comparing calorimetric data.

An increase in the Td of whey proteins has been first reported after glycation. The Td rises from 77.5 to 80.9 °C after glycation with lactose (Boland et al., 1999), from 73 to 78–80 °C by the binding of 15–19 glucose residues per βlg monomer and even to 80–85 °C by binding 7–8 lactose residues (Medrano et al., 2009), from 81 to 89 °C for WPI-MD conjugates (Wang & Zhong, 2014) and from 84.4 to 90.2, 90.7 and 90.6 °C after the glycation by dry heating of WPI in the presence of glucose at 60 °C for 1, 4 and 7 d, respectively (Liu et al., 2014). βlg and αlac have Td increased by 15.5 and 18.7 °C by dextran conjugation, respectively (Wang & Ismail, 2012). αlac dry heated with MP shows a slight increase in its Td (Enomoto et al., 2009). Glycation with glucose is more efficient to increase the Td of βlg than fructose (Broersen et al., 2004). In the same time, authors report a decrease in denaturation enthalpy, H. H decreased from 1.64 to 1.48, 1.38 and 1.33 $J \cdot g^{-1}$ after 1, 4 and 7 d of dry heating WPI in the presence of glucose, respectively (Liu et al., 2014), from 0.66 to 0.60 $J \cdot g^{-1}$ for WPI dry heated for 10 d with lactose (Boland et al., 1999) and from 21 to 15 $kcal \cdot g^{-1}$ for WPI-MD conjugates (Wang & Zhong, 2014).

Due to the increase in Td, the stability of conjugates was remarkably improved. The heat stability of βlg or WPI dry heated with MP is significantly increased (Enomoto et al., 2007; Li et al., 2005). A heat treatment at 100 °C for 10 min at pH 7 reduced the solubility of native WPI to 42%, while the solubility was 67% after dry heating with MP at 50 °C for 3 d. Results for βlg are even more promising, as native βlg is totally insoluble at pH 7 after a 95 °C-10 min treatment, while conjugation with MP increased the heat solubility to 43% (Enomoto et al., 2007).

Even more promising is the thermal stability of protein-saccharide conjugates at pH values close to the pI of whey proteins. For example, the solubility of βlg slightly increases after its conjugation with dextran 10 and 20 kDa after a 15 min heat treatment at T > 80 °C and pH 5, as compared to the native form and even increases more after a treatment at 60–95 °C-15 min, as compared to the protein dry heated without dextran (Jiménez-Castaño et al., 2007). No such effect of an increased solubility after conjugation are reported for αlac by these authors, while conjugates of BSA and dextran are slightly more soluble after a heat treatment at 70–95 °C for 15 min at pH 7, and dramatically more soluble at pH 7 for a heat treatment at 60–95 °C. The solubility of WPI conjugated with dextran after a treatment at 70–75 °C for 30 min at 40–100 $g \cdot L^{-1}$ protein concentration at pH 4.5 and 5.5 is maintained at its level before heating, say > 90%, while that of the native WPI decreases dramatically (Wang & Ismail, 2012). Even at 80 °C, a solution at 50 $g \cdot L^{-1}$ of WPI-dextran conjugates keeps soluble after a heat treatment at 80 °C for 30 min, while native WPI solubility is only 4%. Glycation of WPI with glucose, lactose and MD increases the solubility of proteins after a heat treatment near their pI (Liu & Zhong, 2013). While the glycation binds more glucose molecules on proteins than lactose or MD, the WPI glycated with lactose is less stable after heat treatment at pH 5 and 6. These authors suspected a stabilization of glycated proteins at their pI more by steric repulsions due to both the number and the length of the sucrose chain, than by their electrostatic repulsions. By dry heating WPC at 60 °C or 130 °C, protein conjugates with lactose are obtained that have close conjugation levels (Liu & Zhong, 2014). They are more stable than un-glycated WPC after a heat treatment at 88 °C for 2 min or 138 °C for 1 min, at pH 3–7 and with added NaCl from 0 to 150 mM, but the improvement was the same at the 2 temperatures of dry heating.

Wang et al. (2013) study the changes due to a heat treatment at 75 °C for 30 min in the conformation of WPI before and after a partial conjugation with 10 kDa dextran at pH 3.4–7.0 by SERS. They reported significant changes in the spectra of WPI at all pH values, while no difference are seen for the conjugate regardless of pH. The conjugated protein shows no unfolding, no exposure of buried groups and no change in the β-sheets or in disulfide groups. They explain these results by the alteration of the protein structure upon glycation, leading to an increased rigidity of the protein chain. Besides, the increase in heat stability of protein conjugates is explained by the cross-linking of proteins induced by the Maillard reaction, that increases the thermal stability of conjugates (Liu et al., 2014). Another explanation for improved heat stability of conjugates with high Mw polysaccharides arises from the repulsive steric repulsion provided by the grafted polysaccharide (Liu & Zhong, 2013). Liu and Zhong (2013) showed that conjugates of WPI with MD still have a pH dependant zeta-potential and are stable after heat treatment at pH 3–7 and with addition of NaCl, and thus suspected that the heat-stabilization of glycated proteins at their pI is more provided by steric repulsions, than by electrostatic repulsions. According to Wang and Ismail (2012), the remarkable increased stability of partially glycosylated conjugates toward heat treatment at pH values close to the pI of proteins arises from an increased net charge and overall hydrophilicity of proteins and from a reduced SH content and exposure of sulfhydryl groups that delay the denaturation and aggregation processes. When WPI is heat-treated at acidic pH values, turbidity and reduction of solubility occur, due to hydrophobic, electrostatic and hydrogen bonding (Wang & Ismail, 2012). As partially glycosylated WPI remain soluble, these authors concluded that partial glycosylation reduces the non-covalent intermolecular interactions of whey protein during their heat-treatment, thus maintaining them in a soluble state.

Regarding the reduction of enthalpy of conjugates, it means that less energy is needed for the denaturation of conjugate than for native proteins. Saccharides could reduce the steric distance between proteins and would promote their aggregation (Liu et al., 2014). These authors also suggest that disruption of intramolecular force of proteins due to dry heating could explain this reduction in H. Boland et al., 1999 suggest that lower H values could relate to the folding and aggregation state of βlg conjugates. It has also been suggested that aggregation and disruption of hydrophobic interactions that take place during dry heating are exothermic reactions that can reduce the observed endothermic peak (Liu et al., 2014).

AUTHOR'S PERSONAL COPY

Interesting results on the heat-induced denaturation of lactose-βlg conjugates were also reported (Bouhallab et al., 1999). Lactose-βlg conjugates with increasing amount of bound lactose were analysed for their thermal stability toward heat treatment at pH 7.4 at 65–90 °C for 10 min and compared to a control (βlg dry heated without lactose). While the control is insoluble after heat treatment, the conjugates with 9 bound lactose molecules keeps soluble. While after the heat treatment at 65 °C only a dimer of the conjugated βlg forms, at temperatures > 65 °C the dimer is progressively replaced by 2 new soluble species having apparent Mw > than the dimer. All these species are soluble at pH 4.6 and the higher the number of bound lactose, the higher their solubility in acidic conditions. The higher solubility of βlg conjugates at pH 4.6 is explained by the high amount of lactose that could stabilize an intermediate state of the denaturation process either by increasing the hydrophilic properties of these species or by steric hindrance. These species could be unfolded stable dimers of βlg.

2.3.3. Interfacial properties

Regarding the surface properties at the air-water interface, dry heated whey proteins show no impressive improvements as compared to native whey proteins. This could be the result of the size increase of proteins due to polymer conjugation that could hinder, first, their diffusion to the air-water interface and, second, their adsorption, due to steric hindrance or could be due to protein structure changes induced by the heat treatment that could alter their ability to undergo conformational changes and develop interactions to stabilize the interface. For instance, glycation of βlg with lactose or glucose does not really change the surface tension of the air-water interface, but samples glycated with both sugars for 96 h at a βlg/sugar molar ratio = 1:10 and for 51 and 96 h at the ratio 1:100 have lower rate constants of adsorption (Medrano et al., 2009). As these samples are shown to bind the highest number of bound sugars of the study, this decrease may be due to a lower diffusion rate for the largest conjugates. Increasing the size of the polysaccharides for the glycation of whey proteins leads to the same conclusion that protein-saccharide conjugates do not have improved surface-active properties at the air-water interface. Using surface shear and dilatational rheology, WPI conjugates with 6–42 kDa dextran were studied at the air/water interface (Wooster & Augustin, 2007). Attachment of 29 and 42 kDa dextran reduces the elastic modulus of films as compared to native proteins and the higher the level of attachment, the lower the modulus. Moreover, with a high number of grafted dextrans, the film turns to be "viscous-like", while it is "solid-like" for native WPI or with moderate grafting. Films with 6 kDa conjugates only show a moderate loss of film strength at medium level of conjugation. As results are similar for 29 or 42 kDa dextran, the authors concluded that film properties are more dependent on the number of attached dextran than on their Mw. The film dilatational modulus also decreases with the increase in size of the attached dextran and even more considerably with the number of attached dextran molecules. Reduction of film rigidity with dextran conjugates is assumed to be due to unfolding and to the loss of structural rigidity of protein chains.

It has been reported that, in some conditions, conjugates of βlg and AG could slightly decrease the surface tension (Schmitt et al., 2005). Conjugates formed at a βlg to AG weight ratio, R, of 1:2 and 2:1 were studied at air/water interfaces by using a dynamic pendant-drop Tracker tensiometer. The conjugates formed at R = 2:1 give a lower surface tension than βlg incubated alone. This difference could be interpreted by the fact that R = 2:1 favours the conjugation of AG and βlg, while incubation of βlg alone leads to βlg polymerisation. Polymerisation of βlg leads to fewer surface-active molecules. Increased interfacial properties could also be explained by charge neutralisation of βlg by glycation, and thus by lower repulsions between adsorbed conjugates and probably more favourable spreading conditions at the interface. Conjugation at R = 2:1 only slightly increases the solid-like properties of the films, while at R = 1:2, it even renders the film significantly more "liquid-like". Nevertheless, the fact that bulk mixtures still contain βlg monomers, oligomers and conjugates must be pointed out, so that the species adsorbed at the interfaces are unknown.

Regarding interfacial properties, Medrano et al., 2012 measured the interfacial protein concentration in emulsions prepared with native βlg, βlg dry heated without saccharide and βlg glycated with either glucose or lactose. Concentrations in glycated βlg are significantly higher for all glycated samples, apart for the sample glycated at the higher ratio of glucose to βlg (100 mol glucose per mol βlg) and at the longest duration of glycation (96 h). Moreover, the concentration of βlg-lactose conjugates are higher than that of βlg-glucose conjugates, and interfaces formed with lactose conjugate could be made of protein multilayers. Changes in the structure of βlg induced by dry heating, such as unfolding and packing properties, are suspected to lead to increased interactions between proteins and to this larger accumulation of material at the surface of oil droplets. These authors also reported higher interfacial tension and lower elastic modulus of the film for a given value of interfacial pressure for interfaces made with glycated βlg than for those with un-glycated βlg. Dunlap & Côté, 2005 also measure the interfacial protein concentrations in emulsions prepared with native βlg and βlg dry heated with 20–2000 kDa dextrans. The concentrations are constant for conjugates with dextrans from 20 to 87 kDa and equal to the value for an emulsion prepared with native βlg and then decreased for higher Mw. For an emulsion prepared with βlg-2000 kDa dextran conjugates, the concentration in protein is 6 fold lower than for native βlg, probably because of the significant size increase of conjugates.

βlg-dextran conjugates were adsorbed onto monodisperse polystyrene latex beads (Wooster & Augustin, 2006). The thickness of the adsorbed conjugate layer increases with the Mw of the attached dextran, from 18.5 to 440 kDa, probably due to the hydrodynamic diameter increase of the conjugate and the protein surface coverage also decreases, by a steric crowding of dextran molecules. Furthermore, one can also assume a mechanism of rearrangement of conjugates, through either reorientation of conjugates or protein unfolding inside the layer.

2.3.4. Foaming properties

Although the surface properties of whey proteins at the air-water interface are hardly improved by dry heating, foaming properties, capacity and stability are significantly improved after dry heating of whey proteins in the presence of saccharides. In foams made with βlg glycated with lactose and glucose, the maximal retained liquid volume and the initial rate of liquid to foam transfer were higher than in foams with untreated βlg, and mostly for the shorter time of treatment and with lactose (Medrano et al., 2009). βlg glycated by lactose and glucose form foams with increased stability against drainage, and mostly after lactose conjugation. The same is reported by Mishra et al., 2001 for WPC glycated with pectin. Foam overrun increases in the foam made with WPC at pH 4.6 and pH 7.0 at 10 and 30 °C, slightly with the mixture of WPC and pectin without dry heating and much more after 15 d of dry heating the mixture, as compared to WPC alone, either dry heated or not. Foam stability also increases after complexation, and even at 1 M ionic strength, due to a higher viscosity of the liquid phase. Improvement of foaming capability and stability are also reported for WPI glycated with 1.7 kDa MD (Martinez-Alvarenga et al., 2014). Moreover, the best foaming properties are obtained with the highest level of glycosylation, corresponding to ~8 bound MD per WPI molecule. While the dry heating of βlg alone at 60 °C decreases by 30% its foam capacity, the presence of AG during the dry heating allows maintaining the foaming capacity to its values before incubation (Schmitt et al., 2005). The presence of AG during the dry heating can reduce the drainage as compared to dry heated βlg without AG, but dry heating does not increase the foam stability as compared to native βlg. If the foam stabilization is needed, dry heating at βlg to AC at a weight ratio of 2:1 and pH 5.3 gives the more efficient complexes that also have the highest capacity to retain the liquid in the foam.

Authors relate these improved foaming properties to an increased adsorption of conjugate at the air-water interface, due to structural modifications

AUTHOR'S PERSONAL COPY

of βlg such as increased SH, molecular unfolding and the presence of more monomers or polymers of protein (Medrano et al., 2009) and to increased solubility and molecular flexibility of proteins, that can help form thicker and more viscous films (Mishra et al., 2001).

2.3.5. Emulsification properties

As proteins unfold by dry heating treatments in the presence of carbohydrates, it is very likely that such changes will affect the properties of emulsions formed from glycated proteins (Wooster & Augustin, 2007). Moreover, protein-carbohydrate conjugates can be considered as 2 blocks, a carbohydrate moiety being responsible of the solubility in the hydrophilic solvent, and a protein moiety, being the surface active part that adsorbs at the interface (O'Mahony et al., 2017). The carbohydrate moiety of the conjugate can stabilize O/W interface by protruding into the continuous phase, but conjugation of very large carbohydrate could impair the diffusion and adsorption of proteins, due to steric effects (Akhtar & Dickinson, 2003).

In fact, it has been widely reported that conjugation of proteins with carbohydrates increases the stability of emulsion prepared with whey proteins (Akhtar & Dickinson, 2003, 2007; Boland et al., 1999; Dunlap & Côté, 2005; Kika et al., 2007; Lillard et al., 2009; Medrano et al., 2012; Mishra et al., 2001; Yadav, Parris, Johnston, Onwulata, & Hicks, 2010).

Finer emulsions are reported after lactosylation of WPI as compared to non lactosylated WPI in emulsions made at pH 4 (Boland et al., 1999), after glycation of βlg by lactose or glucose (Medrano et al., 2012), for conjugates of WPI with dextran (Akhtar & Dickinson, 2003), for conjugates of WPI prepared by dry heating in the presence of MD (Akhtar & Dickinson, 2007) and for βlg and WPI conjugates with CFG. In the case of lactosylated WPI, a drastic reduction of fat droplet size is shown at pH 4 as compared to non lactosylated WPI, while only a small reduction is reported at pH 3.6 and no reduction at all at pH 6.8 (Boland et al., 1999).

However, in a study on dry heated βlg with dextran of size 20–2000 kDa, size reduction of fat droplets is not seen for emulsions prepared with conjugates as compared to emulsion prepared with native βlg (Dunlap & Côté, 2005). Even an increase is shown with increasing sizes of dextrans, due to the increase in the size of conjugates and in the thickness of interfacial layers.

Conjugates of whey protein and saccharides present increased emulsion stability: a) as shown by a reduction in the creaming process after glycation of βlg by lactose or glucose as compared to either untreated or heat treated βlg without sugar (Medrano et al., 2012); b) as shown by WPI conjugates prepared at a protein to dextran as compared to native WPI or to the gum Arabic, used as a reference for acidic emulsions (Akhtar & Dickinson, 2003); c) as shown in emulsions prepared at neutral pH values with WPI conjugated with 8.7 kDa MD as compared to emulsions prepared with either native WPI or gum arabic (Akhtar & Dickinson, 2007); d) as shown for emulsion prepared with βlg-dextran and WPC-carboxymethylcellulose conjugates (Dunlap & Côté, 2005); e) as shown for βlg and WPI conjugates with CFG as compared to emulsions made with the polymers separately (Yadav et al., 2010). Emulsions prepared with conjugates of WPI with dextran are stable for up to 2 months of storage, even at acidic pH values and high salt contents (Akhtar & Dickinson, 2003). βlg-dextran conjugates with dextrans of molecular sizes 20–2000 kDa were tested for stabilization of neutral emulsions (Dunlap & Côté, 2005). Stability of emulsions prepared with the 20 kDa-dextran conjugate are poor and close to that of emulsion prepared with native βlg, while it increases for emulsions prepared with the dextran 87 to 150 kDa and stay at very high levels for larger dextrans (Dunlap & Côté, 2005). Emulsions prepared with βlg dry heated in the presence of 150–2000 kDa dextrans did not show any droplet size increase during their storage for 90 d at 22 °C, while emulsions prepared with native βlg begin to cream shortly after emulsification. Stability of emulsion increased after the dry heating of WPC at 100 °C for 2 h in the following sequence: glycated with 35–45 kDa dextran > glycated with 100–200 kDa > glycated with the lactose present in the WPC powder > unheated WPC (Lillard et al., 2009). This sequence is inversely correlated to the glycation intensity and Maillard reaction as evaluated by the loss in amino groups and powder browning observed during dry heating.

The stability of emulsions made with conjugates of βlg and WPI with CFG dry heated for 1 or 2 days are higher after 14 d of storage than those made with the polymers separately. For 4 and 7 d of dry heating, although the stability of the emulsion made with the conjugates appears higher than the control after 1 d of storage, this stability is not maintained after 14 d of storage (Yadav et al., 2010).

Some authors also report increased stability of emulsion prepared with glycated whey proteins at either acidic condition, or after salt increase or even following a heat treatment of emulsion. While emulsions made with βlg are not stable after addition of 10 mM calcium, emulsions prepared with βlg-dextran conjugates are considerably more stable against flocculation by calcium addition (Wooster & Augustin, 2006).

Akhtar and Dickinson (2007) compared the emulsification properties of conjugates of WPI with 2–280 kDa MD obtained at different dry heating time/temperature (80–100 °C/1–2 h) and different WPI to MD weight ratios, R (1.1 to 1.4). Conjugation at 80 °C for 2 h or 90 °C for 1.5 h of the intermediate MD (8.7 kDa) at R = 1:1 or 1:2 gives emulsion with the smallest size of oil droplets. Emulsions prepared with conjugates of WPI with 8.7 kDa MD at acidic pH values are much more stable for 40 d than emulsions prepared with either native WPI or gum arabic. Glycation of whey proteins with MD at RH of 79% at 80 °C for up to 2 h with weight ratio 1:2 to 1:3 leads to stable emulsions at low pH and at high salt concentration using low emulsifier/oil ratio.

Regarding explanations for the increased emulsion stability with glycated proteins, authors mentioned the model of a bi-block polymer, each block having affinity for oil and water phase (O'Mahony et al., 2017). Medrano et al. (2012) assumed that the increased stability is mainly due to a reduction in the creaming process, as flocculation and coalescence are not influenced by the glycation of βlg. This increased stability has been related to the decrease in the droplet size and to the increased concentration of proteins at the fat droplet interface. The steric repulsive effect of large grafted polysaccharides has also been reported to stabilize emulsion, as the bulky hydrophilic polysaccharide moiety can prevent interactions between neighbouring fat droplets (Akhtar & Dickinson, 2007; Kika et al., 2007; Wooster & Augustin, 2006). Moreover, glycated proteins show a larger flexibility with consequences on the film reorganization, elasticity and on emulsion stability, but flocculation and coalescence of the emulsions are not influenced by the glycation.

2.3.6. Flow behaviour

Solutions of 50 $g{\cdot}L^{-1}$ of WPI glycated with 1.7 kDa MD at 20 °C behave as Bingham fluids (Martinez-Alvarenga et al., 2014). Thickening is observed for the highest glycation levels, with increased consistency coefficients and lower yield stress values. According to the authors, this could be due to a higher hydrodynamic volume of glycated proteins and to fewer interactions between proteins that makes the solution easier to shear. Lillard et al. (2009) performed a glycation of WPC at 100 °C for 2 h with either the lactose naturally present in the powder or added dextran of 35–45 kDa or 100–200 kDa. η_{app} increases only for the lactose conjugates. Regarding the behaviour in a low amplitude oscillation, the solutions at 70 $g{\cdot}L^{-1}$ of WPC glycated by lactose or dextran show a viscous semi-solid behaviour. Viscoelastic moduli increase for both conjugates, but the increase is much larger for the lactose one. The authors related the changes in rheological properties to the colour changes and the loss in amino groups that are also more pronounced during lactose conjugation than with dextrans. Curiously, the water holding capacity of powders decrease with dry heating following this sequence: nonheated WPC > glycated with 100–200 dextran > glycated with 30–35 dextran > glycated with lactose.

AUTHOR'S PERSONAL COPY

2.3.7. Heat-induced gelation

Contradictory results are reported on the ability to form heat-induced gels.

Some studies have reported improved heat-induced gelation of dry heated whey proteins. For instance, complexes between WPC and pectin have increased heat-induced gelation ability (Mishra et al., 2001). While the solution made of controls (WPC without pectin before and after dry heating) form gels only at 200 $g \cdot kg^{-1}$ protein at pH 6.5, solution of complexes are able to gel at 120 $g \cdot kg^{-1}$. Moreover, at pH 8.5, solutions of control WPC gel at 200 $g \cdot kg^{-1}$ and at 80 $g \cdot kg^{-1}$ after complexation. Besides, gels formed from solution of complexes at 80 $g \cdot kg^{-1}$ protein remain stable after a subsequent heat treatment at 90 °C/10 min. Also, WPI glycated with MP has higher gelling properties such as higher hardness, recovery and water-holding capacity than the control WPI (Li et al., 2005).

However, according to other authors, protein-carbohydrates conjugates are less prone to heat-induced gelation. First, the attachment of carbohydrate generally increases the Td of proteins as compared to untreated proteins and denaturation is observed at a higher temperature. Second, conjugation can modify the secondary structure of proteins, and that could hinder the formation of new interactions. Finally, grafting a hydrophilic and bulky moiety on protein can weaken hydrophobic interactions between protein chains that play a major role during the heat-induced gelation and bring some steric hindrance. For example, Spotti et al. (2013b) dry heated WPI with 15–25 kDa dextran at 60 °C. Intense Maillard reaction was observed at a higher dextran concentration and a long time of heating. The authors reported that heat induced gels obtained with conjugates (80 °C-30 min-pH 7) show a deep weakening and no more fracture during compression as compared to controls made of the same untreated mixtures. When the Mw of dextran varied from 6 to 70 kDa, the lowest the Mw, the highest the Maillard reaction and the lowest the gel firmness (Spotti et al., 2013a). Even with the dextran of 6 kDa, the gels were no more self-supporting after 5 d of dry heating in the presence of dextran above ≥72 $g \cdot kg^{-1}$. The gels form later and at a higher temperature and were less "rigid-like" when made from conjugates than for the control gels (Spotti et al., 2014b, Spotti et al., 2014a). The hypothesis was that conjugation modifies sulfhydryl group availability and SH of proteins that are both responsible for the aggregation and gelation of proteins. Similarly, WPI-dextran (mean Mw = 50 kDa) conjugates lead to final heat-induced gels with storage modulus being a tenth of the value for untreated WPI (Sun et al., 2011).

2.3.8. Protein digestibility

Dry heating of whey proteins and their glycation could alter their digestibility. No change in the in vitro gastric digestion is reported after the dry heating of βlg with prebiotic galactooligosaccharide (GOS), but the glycated βlg is slightly slower hydrolysed in the intestinal step than the native form (Luz Sanz et al., 2007). The βlg-GOS conjugates could form stable glycated peptides surviving the in vitro gastrointestinal digestion. Liu & Zhong, 2013 prepared WPI conjugates with glucose, lactose and MD. After glycation, WPI shows a reduced in vitro digestibility as studied during the gastric phase and an increased digestibility during the intestinal phase.

The enzymatic digestion of whey protein partially glycosylated with dextran has also been reported to be slightly greater than that of WPI, possibly due to the protein unfolding during the Maillard reaction, and to an increased number of available sites of enzyme binding (Wang & Ismail, 2012).

2.3.9. Biological activities

It has been suggested that Maillard reaction products exhibit a significant antioxidant activity (Boland et al., 1999; Manzocco, Calligaris, Mastrocola, Nicoli, & Lerici, 2000; Sun et al., 2006). Brown melanoidins are supposed to be the major contributors of this antioxidant activity, but heated mixtures of casein with lactose or glucose show no correlation between antioxidant properties and browning, suggesting that some colorless intermediates of the Maillard reaction could also contribute (McGookin & Augustin, 1991). An increased antioxidant activity has been reported for βlg glycated with xylobiose using a scavenging activity test based on a lower optical density of a DPPH after its scavenging with the antioxidant (DPPH for 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Yajima et al., 2007) and for WPI glycated with glucose as measured by the reducing power using potassium ferricyanide and ABTS radical scavenging (ABTS for 2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazo-line-6-sulfonic acid)) (Liu et al., 2014). Conjugation of βlg with xylobiose gives higher antioxidant activity than with lactose. However, surprisingly, these authors (Liu et al., 2014; Yajima et al., 2007) report no effect of glycation when using another method of characterization of their antioxidant properties, that needs further investigations.

αlac glycated with D-allose shows the highest antioxidant activity when compared with fructose and glucose, as tested by the reducing power and the ABTS scavenging method (Sun et al., 2006). As the nature of the sugar determines the amounts and types of Maillard reaction products, the antioxidant activity produced by conjugation depends on the used sugar. These authors did not find a correlation between the content in reactional amino groups and the scavenging activity, while a high positive correlation was found with the fluorescence intensity. These results evidence that the antioxidant activity is more related to the formation of high Mw fluorescent products formed at the late stages of the Maillard reaction than to the early stages of the reaction.

An increase in the anti-inflammatory activity, a reduction in the antigenicity and in the apoptotic activity were also noted after the glycation of αlac with MP as compared to the native αlac (Enomoto et al., 2009).

2.3.10. Conclusions

Maillard reactions have been considered as detrimental for the quality of food, say for their nutritional and functional properties, but if the reaction is well controlled and limited to the first steps of glycation, they can constitute a natural alternative to modification of proteins for the production of targeted ingredients, as compared to chemical modifications (Augustin & Udabage, 2007). The fact that protein unfold could favour rearrangements of proteins adsorbed at interfaces and stabilize them more efficiently then native proteins. Moreover, conjugating large polysaccharides on proteins can lead to a bi-block structure, with the protein and the carbohydrate having affinity for the hydrophobic and hydrophilic phase, respectively, like surface-active molecules.

3. Dry heating in conditions promoting the aggregation of whey proteins

3.1. Generalities

When the temperature of dry heating, or the water content of the powder increase, an increasing polymerisation of whey proteins appears. When the content in moisture increases at low moisture contents, like in powdered proteins, water molecules act as a plasticizers, the Tg decreased, and the amorphous glassy structure tends to the rubbery state, so that diffusion and reactions can proceed at a lower tempera-ture than with a high water content (Sherwin & Labuza, 2003; Zhou & Labuza, 2007). Moreover, some small molecules like sugars can also decrease substantially the Tg so that the product can easily become unstable at low temperatures, with consequences on the powder quality. The Td of proteins decreases with the increase in water content for high concentrated products such as powders or protein dough (Zhou & Labuza, 2007). Studies performed on such conditions are summed up in Table 3.

Most of these studies are conducted without added carbohydrate, mainly with WPI, but WPI usually contain residual lactose, but less than

AUTHOR'S PERSONAL COPY

Table 3 ;
Conditions promoting aggregation of whey proteins.

Temperature (°C)	Time	pH adjustment before the dry heating	Protein powder	Saccharide	Ratio sugar/ protein	RH (%)	References
4 & 37	2 & 24 h	7.3–9.0	BSA, βlg & ovalbumin	–	–	NS (addition of 1 to 20 μL of aqueous phase at 10 mg of protein powder)	Liu, Langer, & Klibanov, 1991
23 & 45	2 weeks	7–8	βlg, WPI & whey protein hydrolysate	–	–	0 to 85	Zhou & Labuza, 2007
4–45	0–3 mo	7	WPI	–	–	NS (addition of 4 g of aqueous phase at 6 g of protein powder)	Zhou, Liu, & Labuza, 2008a, 2008b
4–60	0.5–12 mo	NS	WPI	–	–	23 and 36	Norwood et al., 2016
20 & 40	0.5–15 mo	NS	WPI	–	–	23	Norwood et al., 2016
40 & 60	0.5–3 mo	NS	WPC & WPI	Lactose[a]	0.001:1–0.2:1 (w/w)	25 to 36	Norwood et al., 2017
50–100	25 min of extrusion	NS	WPI	–	–	50% moisture content	Qi & Onwulata, 2011
80	3–10 d	NS	βlg & αlac	–	–	7.5% moisture	Ibrahim et al., 1993
80, 100 & 120	1 h-6 d	2.5, 4.5 & 6.5	WPI, βlg & αlac	–	–	23, 32 & 52	Gulzar, Bouhallab, Jeantet, Schuck, & Croguennec, 2011; Gulzar, Bouhallab, & Croguennec, 2011; Gulzar, Lechevalier, Bouhallab, & Croguennec, 2012; Gulzar, Bouhallab, Jardin, Briard-Bion, & Croguennec, 2013
60	2–14 d	4.2	βlg	Acacia gum	2:1 & 1:2 (w/w)	79	Schmitt et al., 2005
70	4–240 h	NS	WPI, sodium caseinate & total milk protein	Glucose, lactose, pectin, 40 and 500 kDa dextran	2:1 (w/w)	65	Hiller & Lorenzen, 2010

NS: not specified.
[a] The lactose contain naturally present in powder.

AUTHOR'S PERSONAL COPY

~ 10%.

3.2. Storage of high concentrated whey protein mixtures at low or medium temperatures

Moisture-induced aggregation during storage at 37 °C of freeze dried powders of proteins was studied as a function of storage temperature and moisture content (Liu et al., 1991). Increasing the storage temperature from 4 to 37 °C and the time of storage from 2 to 24 h increases the content in aggregates during incubation of BSA and the lower the pH, the lower the content in aggregates. The dependence of the extent of aggregation on the moisture content is close to that observed for the Maillard reaction: a first increase with the moisture increase due to a mobility increase and then a decrease due to dilution. In the case of βlg and ovalbumin, non-covalent and disulfide bonds due to disulfide/sulfhydryl interchanges are responsible for aggregation, while only the later are involved for BSA. This is probably due to the presence of a higher content in thiolates. Adding salts like NaCl or sodium phosphate reduces the aggregating tendency.

Zhou & Labuza, 2007 compared the aggregation in WPI, whey protein hydrolysate (WPH) and βlg powders and correlated the aggregation of proteins with the Tg of powders. For WPI and βlg, contradictory to the study of Liu et al., 1991, no aggregation is observed in all storage conditions, while for WPH half of the proteins becomes insoluble at 23 °C and 85% RH or at 45 °C and RH > 73% in 2 weeks. The Td measured in WPI and βlg decreased with the increase in water contents, according to a linear Td versus log(water content) equation. Again, disulfide bonds are the major interactions in aggregates. Increased water contents in WPH powders leads to decreased Tg values, to increased mobility of proteins and to their aggregation.

Zhou et al. (2008a) tested the effect of moisture contents on protein aggregation in high concentrated whey protein matrix. At 45 °C for 3 months, 70% of insoluble particles of diameter 100–200 nm form. Proteins partially lose their tertiary structure. By FTIR, two main peaks increase: one attributed to the alpha helix at 1650 cm^{-1} and one for intermolecular aggregation at 1681 cm^{-1}. In 2008, the same authors (Zhou et al., 2008b) studied the effect of 3 factors, the water content, the pH and the NaCl contents on the storage of the same mixtures at 35 °C. The water content appears to be an important factor for the aggregate formation as no aggregate are formed below 30% of water ($a_w < 0.84$) and the maximum aggregation appears at 70–80% water. Aggregation increases slightly when pH values increase above 7, probably because of the increase in thiolate contents. At pH values > 7, non-covalent interactions increase, but disulfide bonds are the main interactions found in aggregates. Addition of NaCl decreases the amount of aggregates.

Norwood et al. (2016) studied lactosylation and denaturation/aggregation of proteins, free thiol contents, browning of powders and foaming properties of stored WPI powder at different a_w and temperatures. While, no structural or functional modifications are detected at 4 °C, lactosylation, denaturation/aggregation and powder browning increase in powders with the temperature and the a_w during storage. At 60 °C, changes are very rapid and lead to a significant aggregation of proteins. With powders stored at $a_w = 0.23$, very few changes are seen at 20 °C apart a regular increase in lactosylation of monomeric βlg from 10 to 27% (Norwood et al., 2016). At 40 °C, βlg lactosylation increases up to 30% in 15 d, remains at this level till 6 mo and then decreases, while denaturation/aggregation becomes detectable after 3 mo and increases to 32% at 9 mo. The intensity of powder browning and of protein modifications such as lactosylation, denaturation and aggregation increases during the storage with increased lactose contents (Norwood et al., 2017).

As just shown, glycation can progress significantly during the storage of powders, depending on the temperature-RH history and these changes have to be evaluated more carefully, because they could have outstanding issues on the functional behaviour of whey proteins. Contents in aggregates increase with pH and RH of powders, and decrease in the presence of sodium salt.

3.3. Dry heating at high temperatures: Conditions and physicochemical consequences

Very few studies are concerned by heating whey proteins in a screw extruder, say at high temperatures and low moisture contents, although it is a very widespread technology for dairy ingredients. Extrusion of WPI at 50% moisture content and temperatures between 50 and 100 °C shows that until 35 °C, no loss in protein solubility is seen, but that solubility decreases at temperatures > 50 °C (Qi & Onwulata, 2011). At 75 °C, heating during extrusion decreases more the protein solubility than heating in a 200 $g \cdot kg^{-1}$ WPI solution at the same temperature. βlg is more affected by this decrease in solubility than αlac. Extrusion leads to a loss in primary and secondary amines, while heating in a solution does not. Above 75 °C, extrusion leads to a higher loss in free sulfhydryl residues than heating the 200 $g \cdot kg^{-1}$ WPI solution and to large modifications in secondary and tertiary structure.

Ibrahim, Kobayashi, & Kato, 1993 dry heated βlg and αlac at 65–90 °C and reported best functional properties after dry heating at 80 °C. The solubility of both proteins is maintained after a heat treatment at 80 °C for 5 d, and only decreases to about 85% in 10 d. The SH content increases and decreases for αlac and βlg, respectively. Fluorescence of tryptophan residues shows an intensity increase and a red shift of the spectra. RP-HPLC shows a large amount of soluble aggregates during dry heating for 7 d of βlg, while αlac stays in the monomeric form. Dry heating induced a protein denaturation, may be the formation of an unfolded and more flexible "molten globule" structure, as compared to the native structure. Gulzar et al., 2011 studied the dry heating of WPI at pH 2.5–6.5. The turbidity of suspensions of dry-heated powders increases with the time of dry heating, the content in native proteins decreases, soluble and insoluble aggregates of protein form, the reactions being faster and larger at pH 6.5 than at pH 2.5. Aggregates are made of covalent bonds, identified as disulfide bonds at pH 2.5, while disulfide bonds and other types of bonds form at pH 4.5 and 6.5. The intermolecular disulfide bonds are formed both from oxidation of sulfhydryl groups and sulfhydryl/disulfide interchanges.

After 24 h of dry heating at 100 °C of pure βlg at pH 2.5 and 6.5, Gulzar et al., 2011 find: a- ~35–40% of aggregates, irrespective of the pH during dry heating; b- 35% at pH 2.5 and 50% at pH 6.5 of residual native βlg; c- 24% at pH 2.5 and 9% at pH 6.5 of a non-native βlg characterized by a Mw loss of 18 Da. Dry heating induces conformational modifications, such as an increase in exposed sulfhydryl and SH, and some secondary structure modifications of proteins leading to a more flexible structure. These modifications are more substantial at pH 2.5 than at pH 6.5. A residual monomeric non-native αlac also shows a loss of mass, that could be a loss of 1 or 2 water molecules per protein, due to the formation of either a pyroglutamic acid from glutamic acid or an intramolecular cyclic imide from an asparagine residue (Gulzar et al., 2013). In pure protein systems, only dimers or small oligomers form, while in WPI, large aggregates were formed (Guyomarc'h et al., 2014), due to the presence of < 0.4 $g \cdot kg^{-1}$ of residual lactose. Indeed, if lactose is added to a pure solution of αlac and βlac at pH 6.5 in the same proportion than in the WPI, large aggregates are obtained by dry heating. Results are different at pH 2.5, because addition of lactose to the pure solution of proteins does not lead to the formation of large aggregates by dry heating at pH 2.5. This is explained by the fact that the added lactose is free, while in the WPI, lactose is probably already bound to proteins, and by the fact that the condensation of lactose to protein is probably the limiting step for the formation of aggregates at pH 2.5. The authors suggest that condensation products could be decomposed by the dry heating at pH 2.5.

βlg solution was dry heated at 60 °C. A 20% loss of available NH_2 groups appears at ~ 10 d, followed by a plateau till 14 d, and βlg polymers

AUTHOR'S PERSONAL COPY

made of covalent bonds other than disulfide ones and hydrophobic bonds are evidenced (Schmitt et al., 2005). Soluble polymers larger than 94 kDa form and 50% of the monomeric βlg disappear. If the coacervates suspension is brought to pH 6.8 before freeze-drying, only a 10% increase in the fraction of soluble polymers is found.

Hiller and Lorenzen (2010) compared the oligomerisation of WPI, caseinate and total milk protein as obtained by a dry heating at 70 °C with various carbohydrates. The content in total free amino acids de-creases, the Mw of proteins increases to polymers of size > 2.10^5 $g{\cdot}mol^{-1}$ and the sulfhydryl content does not significantly change during the dry heating of WPI with glucose, lactose and pectin, while very few modifications are observed in the presence of dextran. Three amino acids decrease during the reaction with all the carbohydrate, lysine, leucine and methionine, the first due to the modification of the ε-amino groups upon initial steps of Maillard reaction, the others either to the reaction with N-terminal amino acids or to complex cascades in the advanced steps of Maillard reaction.

3.4. Consequences on the functional properties of aggregates

Ibrahim et al. (1993) tested the emulsifying properties of βlg and αlac dry heated at 65–90 °C. Best functional properties are found at 80 °C. Foaming power, foam stability and emulsifying activity increase with the time of dry heating. Emulsion stability increases for αla and decreases for βlg with time of dry heating. Increased flexibility of proteins by dry heating could explain these functional improvements.

Heat stability of oligomers and polymers of WPI obtained by dry heating in the presence of different carbohydrates was reported to widely decrease in the case of glucose, lactose or pectin, while it increases in the presence dextran up to 200%, probably because of steric hindrance brought by the branched carbohydrate (Hiller & Lorenzen, 2010). Foam overrun also increases, but only significantly for the reaction with pectin (up to 107% increase), and slightly (5–50% increase) with dextrans. No clear results are shown for the foam stability. Emulsification activity increases after the reaction with dextrans or pectin. Emulsion stability increases after the reaction with dextrans only. Large increases of viscosities are reported after 4 h of dry heating of WPI with glucose or after lactose 96 h with lactose. Dry heating with pectin for 5 or 24 h strikingly increases the viscosity to almost 500%. Large increases in antioxidant activity are reported with all the tested carbohydrates, and mainly for long-term dry heating. Apart for the foam stability measurements, the same results are observed if the dry heating is applied on mixtures of powders of WPI and carbohydrate or on powders obtained by freeze-drying the mixtures. It points out an easier way to apply dry heating processes on powder mixtures. In vitro digestibility with pancreatin significantly increases after Maillard reaction in the presence of dextran, for short-term (48 h, + 127%), and even more for long-term (240 h, + 546%) reaction.

Gulzar et al. (2012) have correlated the contents in soluble and insoluble aggregates formed by dry heating to the ability to give heat-induced whey protein gels. The best gelling properties are observed in the presence of soluble aggregates and for high pH values, temperature and a_w. Residual native proteins and 30–40% of soluble aggregates give the highest gel firmness, while excessive insoluble aggregates decrease it.

Norwood et al. (2016) study the foaming properties of WPI powders stored in different conditions. Only powders with large modifications, i.e. stored at T ≥ 40 °C, show improved foaming properties, probably because of the coexistence of both monomers and aggregates. The consequences of protein modifications induced during the storage of WPI powders at 20 and 40 °C for 15 mo on the heat-induced aggregation of whey proteins have also been studied (Norwood et al., 2016). The size of heat-induced aggregates formed after a heat treatment (80 °C for 1 h) at pH 5.8–6.6 in WPI solution reconstituted at 40 $g{\cdot}L^{-1}$ decreases with the time of storage only for powders stored at 40 °C and mostly at the lower pH value. The shape of aggregate is also modified by the storage of the powders at each pH value of the heat treatment. This could be due to a reduced availability of native monomers after storage at 40 °C, to the presence of AGE or to a decrease in the flexibility of proteins and a resulting lower reactivity.

In conclusion, it has been shown that dry heating at high temperature can cause aggregation of whey proteins. While most studies on dry heating aim at maintaining a relative solubility of proteins and have tried avoiding this polymerisation, dry heating could be a new way producing whey protein aggregates having potential functional properties. In order to further progress on that issue and on its comprehension, we can cite a study involved in the polymerisation of lysozyme, due to dry heating with glucose (Cho, Okitani, & Kato, 1984). These authors suggest that the Maillard reaction only produces functional sites on proteins and that the further cross-linking of proteins proceeds by interactions between these functional sites, without any needs of carbohydrates. Moreover, if native lysozyme is added to the functionalized proteins without any sugar and further dry heated, a large polymerisation of lysozyme is observed. This mechanism could have potential benefits for the production of controlled protein aggregates.

4. Conclusions and perspectives for research

Maillard reactions are very complex, and we need more work to elucidate the different compounds produced during dry heating. Although there are increasing works on safety risks brought by these compounds, they probably are less dangerous than chemically modified proteins. There is a widespread literature on increased functionality in many food systems of whey protein compounds modified by dry heating. Dry heated whey proteins are very promising for the food industry. Nevertheless, they are not very widespread in the food ingredient industry. In addition, very few studies examine the nutritional properties dry heated whey proteins.

Acknowledgements

This work was supported by the Regional councils of Brittany (grant No. 13008651) and Pays de la Loire (grant no. 2014-07081) for the financial support and by INRA for scientific coordination (J. Leonil) through the interregional project PROFIL, managed by BBA industrial association.

References

Akhtar, M., & Dickinson, E. (2003). Emulsifying properties of whey protein–dextran conjugates at low pH and different salt concentrations. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 31(1–4), 125–132.

Akhtar, M., & Dickinson, E. (2007). Whey protein–maltodextrin conjugates as emulsifying agents: An alternative to gum arabic. Food Hydrocolloids, 21(4), 607–616.

Ames, J. M. (1990). Control of the Maillard reaction in food systems. Trends in Food Science & Technology, 1, 150–154.

Augustin, M. A., & Udabage, P. (2007). Influence of processing on functionality of milk and dairy proteins. Advances in Food and Nutrition, 53, 1–38.

Benjakul, S., Lertittikul, W., & Bauer, F. (2005). Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–sugar model system. Food Chemistry, 93(2), 189–196.

Boland, M. J., Hill, J. P., Higgs, K. C., Haggarty, N. W., & Campanella, M. E. P. (1999). Process for controlling Maillard-type glycation of whey proteins and products with en-hanced functional properties. Patent WO/2000/018249.

Bouhallab, S., Morgan, F., Henry, G., Molle, D., & Leonil, J. (1999). Formation of stable covalent dimer explains the high solubility at pH 4.6 of lactose-β-lactoglobulin conjugates heated near neutral pH. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(4), 1489–1494.

Broersen, K., Voragen, A. G. J., Hamer, R. J., & Jongh, H. H. J.d. (2004). Glycoforms of β-Lactoglobulin with improved thermostability and preserved structural packing. Biotechnology and Bioengineering, 86(1), 78–87.

Cho, R. K., Okitani, A., & Kato, H. (1984). Chemical properties and polymerizing ability of the lysozyme monomer isolated after storage with glucose. Agricultural and Biological Chemistry, 48(12), 3081–3089.

Chobert, J. M., Gaudin, J. C., Dalgalarrondo, M., & Haertle, T. (2006). Impact of Maillard type glycation on properties of β-lactoglobulin. Biotechnology Advances, 24(6), 629–632.

AUTHOR'S PERSONAL COPY

Corzo-Martinez, M., Moreno, F. J., Olano, A., & Villamiel, M. (2008). Structural characterization of bovine β-lactoglobulin-galactose/tagatose Maillard complexes by electrophoretic, chromatographic, and spectroscopic methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(11), 4244–4252.

Dunlap, C. A., & Côté, G. L. (2005). β-Lactoglobulin-dextran conjugates: Effect of polysaccharide size on emulsion stability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 419–423.

Enomoto, H., Hayashi, Y., Li, C. P., Ohki, S., Ohtomo, H., Shiokawa, M., & Aoki, T. (2009). Glycation and phosphorylation of α-lactalbumin by dry heating: Effect on protein structure and physiological functions. Journal of Dairy Science, 92(7), 3057–3068. Enomoto, H., Li, C. P., Morizane, K., Ibrahim, H. R., Sugimoto, Y., Ohki, S., ... Aoki, T. (2007). Glycation and phosphorylation of β-Lactoglobulin by dry-heating: Effect on protein structure and some properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(6), 2392–2398.

Fenaille, F., Campos-Giménez, E., Guy, P. A., Schmitt, C., & Morgan, F. (2003). Monitoring of β-lactoglobulin dry-state glycation using various analytical techniques. Analytical Biochemistry, 320(1), 144–148.

Fenaille, F., Morgan, F., Parisod, V., Tabet, J.-C., & Guy, P. A. (2003). Solid-state glycation of β-lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry and gel electrophoresis techniques. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 17(13), 1483–1492.

Fenaille, F., Morgan, F., Parisod, V., Tabet, J.-C., & Guy, P. A. (2004). Solid-state glycation of β-lactoglobulin by lactose and galactose: Localization of the modified amino acids using mass spectrometric techniques. Journal of Mass Spectrometry, 39(1), 16–28.

French, S. J., Harper, W. J., Kleinholz, N. M., Jones, R. B., & Green-Church, K. B. (2002). Maillard reaction induced lactose attachment to bovine β-Lactoglobulin: Electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization examination. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(4), 820–823.

Gulzar, M., Bouhallab, S., & Croguennec, T. (2011). Structural consequences of dry heating on Beta-Lactoglobulin under controlled pH. Procedia Food Science, 1, 391–398.

Gulzar, M., Bouhallab, S., Jardin, J., Briard-Bion, V., & Croguennec, T. (2013). Structural consequences of dry heating on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin at pH 6.5. Food Research International, 51(2), 899–906.

Gulzar, M., Bouhallab, S., Jeantet, R., Schuck, P., & Croguennec, T. (2011). Influence of pH on the dry heat-induced denaturation/aggregation of whey proteins. Food Chemistry, 129(1), 110–116.

Gulzar, M., Lechevalier, V., Bouhallab, S., & Croguennec, T. (2012). The physicochemical parameters during dry heating strongly influence the gelling properties of whey proteins. Journal of Food Engineering, 112(4), 296–303.

Guyomarc'h, F., Famelart, M.-H., Henry, G., Gulzar, M., Leonil, J., Hamon, P., ... Croguennec, T. (2014). Current ways to modify the structure of whey proteins for specific functionalities—A review. Dairy Science & Technology, 1–20.

Hiller, B., & Lorenzen, P. C. (2010). Functional properties of milk proteins as affected by Maillard reaction induced oligomerisation. Food Research International, 43(4), 1155–1166.

Ibrahim, H. R., Kobayashi, K., & Kato, A. (1993). Improvement of the surface functional-properties of β-lactoglobulin and α-lactalbumin by heating in a dry state. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 57(9), 1549–1552.

Jiménez-Castaño, L., López-Fandiño, R., Olano, A., & Villamiel, M. (2005). Study on β-lactoglobulin glycosylation with dextran: Effect on solubility and heat stability. Food Chemistry, 93(4), 689–695.

Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., & López-Fandiño, R. (2007). Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. Food Hydrocolloids, 21(3), 433–443.

Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., Martín-Álvarez, P. J., Olano, A., & López-Fandiño, R. (2005). Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of β-lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. Food Hydrocolloids, 19(5), 831–837.

Kato, A. (2002). Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates. Food Science and Technology Research, 8(3), 193–199.

Kato, A., Ibrahim, H. R., Watanabe, H., Honma, K., & Kobayashi, K. (1989). New approach to improve the gelling and surface functional properties of dried egg white by heating in dry state. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(2), 433–437.

Kika, K., Korlos, F., & Kiosseoglou, V. (2007). Improvement, by dry-heating, of the emulsion-stabilizing properties of a whey protein concentrate obtained through carboxymethylcellulose complexation. Food Chemistry, 104(3), 1153–1159.

Li, C. P., Enomoto, H., Ohki, S., Ohtomo, H., & Aoki, T. (2005). Improvement of functional properties of whey protein isolate through glycation and phosphorylation by dry heating. Journal of Dairy Science, 88(12), 4137–4145.

Lillard, J. S., Clare, D. A., & Daubert, C. R. (2009). Glycosylation and expanded utility of a modified whey protein ingredient via carbohydrate conjugation at low pH. Journal of Dairy Science, 92(1), 35–48.

Liu, G., & Zhong, Q. (2013). Thermal aggregation properties of whey protein glycated with various saccharides. Food Hydrocolloids, 32(1), 87–96.

Liu, G., & Zhong, Q. (2014). Removal of milk fat globules from whey protein concentrate 34% to prepare clear and heat-stable protein dispersions. Journal of Dairy Science, 97(10), 6097–6106.

Liu, J., Ru, Q., & Ding, Y. (2012). Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review. Food Research International, 49(1), 170–183.

Liu, Q., Kong, B., Han, J., Sun, C., & Li, P. (2014). Structure and antioxidant activity of whey protein isolate conjugated with glucose via the Maillard reaction under dry-heating conditions. Food Structure, 1(2), 145–154.

Liu, W. R., Langer, R., & Klibanov, A. M. (1991). Moisture-induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state. Biotechnology and Bioengineering, 37(2), 177–184.

Luz Sanz, M., Corzo-Martínez, M., Rastall, R. A., Olano, A., & Moreno, F. J. (2007). Characterization and in vitro digestibility of bovine β-Lactoglobulin glycated with Galactooligosaccharides. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(19), 7916–7925.

Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M. C., & Lerici, C. R. (2000). Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. Trends in Food Science & Technology, 11(9), 340–346.

Martinez-Alvarenga, M. S., Martinez-Rodriguez, E. Y., Garcia-Amezquita, L. E., Olivas, G. I., Zamudio-Flores, P. B., Acosta-Muniz, C. H., & Sepulveda, D. R. (2014). Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate – Maltodextrin conjugates. Food Hydrocolloids, 38, 110–118.

Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., & van Boekel, M. A. J. S. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. Trends in Food Science & Technology, 11(9–10), 364–373.

Matsuda, T., Kato, Y., & Nakamura, R. (1991). Lysine loss and polymerization of bovine.beta.-lactoglobulin by amino carbonyl reaction with lactulose (4-O-.beta.-D-galactopyranosyl-D-fructose). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39(7), 1201–1204.

McGookin, B. J., & Augustin, M.-A. (1991). Antioxidant activity of casein and Maillard reaction products from casein-sugar mixtures. Journal of Dairy Research, 58(3), 313–320.

Medrano, A., Abirached, C., Moyna, P., Panizzolo, L., & Añón, M. C. (2012). The effect of glycation on oil–water emulsion properties of β-lactoglobulin. LWT - Food Science and Technology, 45(2), 253–260.

Medrano, A., Abirached, C., Panizzolo, L., Moyna, P., & Añón, M. C. (2009). The effect of glycation on foam and structural properties of β-lactoglobulin. Food Chemistry, 113(1), 127–133.

Mishra, S., Mann, B., & Joshi, V. K. (2001). Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. Food Hydrocolloids, 15(1), 9–15.

Morgan, F., Bouhallab, S., Mollé, D., Henry, G., Maubois, J.-L., & Léonil, J. (1998). Lactolation of β-lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry. International Dairy Journal, 8(2), 95–98.

Morgan, F., Léonil, J., Mollé, D., & Bouhallab, S. (1999). Modification of bovine β-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: Effect on as-sociation behavior and protein conformation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(1), 83–91.

Morgan, F., Mollé, D., Henry, G., Vénien, A., Léonil, J., Peltre, G., ... Bouhallab, S. (1999). Glycation of bovine β-lactoglobulin: Effect on the protein structure. International Journal of Food Science and Technology, 34(5–6), 429–435.

Morgan, F., Nouzille, C. A., Baechler, R., Vuataz, G., & Raemy, A. (2005). Lactose crystallisation and early Maillard reaction in skim milk powder and whey protein concentrates. Le Lait, 85(4–5), 315–323.

Morgan, F., Venien, A., Bouhallab, S., Molle, D., Leonil, J., Peltre, G., & Levieux, D. (1999). Modification of bovine β-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: Immunochemical characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(11), 4543–4548.

Nau, F., Guérin-Dubiard, C., Baron, F., & Thapon, J.-L. (2010). Science et technologie de l'œuf, volume 2: de l'œuf aux ovoproduits. Paris: TEC & DOC.

Norwood, E.-A., Chevallier, M., Le Floch-Fouéré, C., Schuck, P., Jeantet, R., & Croguennec, T. (2016). Heat-induced aggregation properties of whey proteins as affected by storage conditions of whey protein isolate powders. Food and Bioprocess Technology, 9(6), 993–1001.

Norwood, E.-A., Le Floch-Fouéré, C., Briard-Bion, V., Schuck, P., Croguennec, T., & Jeantet, R. (2016). Structural markers of the evolution of whey protein isolate powder during aging and effects on foaming properties. Journal of Dairy Science, 99(7), 5265–5272.

Norwood, E.-A., Pezennec, S., Burgain, J., Briard-Bion, V., Schuck, P., Croguennec, T., ... Le Floch-Fouéré, C. (2017). Crucial role of remaining lactose in whey protein isolate powders during storage. Journal of Food Engineering, 195, 206–216.

O'Mahony, J. A., Drapala, K. P., Mulcahy, E. M., & Mulvihill, D. M. (2017). Controlled glycation of milk proteins and peptides: Functional properties. International Dairy Journal, 67, 16–34.

Qi, P. X., & Onwulata, C. I. (2011). Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: Effect of extrusion temperature. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(9), 4668–4675.

Schmitt, C., Bovay, C., & Frossard, P. (2005). Kinetics of formation and functional properties of conjugates prepared by dry-state incubation of β-lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(23), 9089–9099.

Sherwin, C. P., & Labuza, T. P. (2003). Role of moisture in Maillard Browning reaction rate in intermediate moisture foods: Comparing solvent phase and matrix properties. Journal of Food Science, 68(2), 588–593.

Spotti, M. J., Martinez, M. J., Pilosof, A. M. R., Candioti, M., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2014a). Influence of Maillard conjugation on structural characteristics and rheological properties of whey protein/dextran systems. Food Hydrocolloids, 39, 223–230.

Spotti, M. J., Martinez, M. J., Pilosof, A. M. R., Candioti, M., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2014b). Rheological properties of whey protein and dextran conjugates at different reaction times. Food Hydrocolloids, 38, 76–84.

Spotti, M. J., Perduca, M. J., Piagentini, A., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2013a). Does dextran molecular weight affect the mechanical properties of whey protein/dextran conjugate gels? Food Hydrocolloids, 32(1), 204–210.

Spotti, M. J., Perduca, M. J., Piagentini, A., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2013b). Gel mechanical properties of milk whey protein-dextran conjugates obtained by Maillard reaction. Food Hydrocolloids, 31(1), 26–32.

Sun, W.-W., Yu, S.-J., Yang, X.-Q., Wang, J.-M., Zhang, J.-B., Zhang, Y., & Zheng, E.-L. (2011). Study on the rheological properties of heat-induced whey protein

AUTHOR'S PERSONAL COPY

isolate–dextran conjugate gel. Food Research International, 44(10), 3259–3263. Sun, Y., Hayakawa, S., Puangmanee, S., & Izumori, K. (2006). Chemical properties and antioxidative activity of glycated α-lactalbumin with a rare sugar, d-allose, by Maillard reaction. Food Chemistry, 95(3), 509–517.

Wang, Q., He, L., Labuza, T. P., & Ismail, B. (2013). Structural characterisation of partially glycosylated whey protein as influenced by pH and heat using surface-enhanced Raman spectroscopy. Food Chemistry, 139(1–4), 313–319.

Wang, Q., & Ismail, B. (2012). Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality, solubility, thermal stability and molecular configuration of whey proteinv. International Dairy Journal, 25(2), 112–122.

Wang, W., & Zhong, Q. (2014). Improved thermal stability of whey protein–maltodextrin conjugates at pH 5.0 by D-glucose, sucrose, D-cellobiose, and lactose. Food Hydrocolloids, 41, 257–264.

Wooster, T. J., & Augustin, M. A. (2006). β-Lactoglobulin–dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. Journal of Colloid and Interface Science, 303(2), 564–572.

Wooster, T. J., & Augustin, M. A. (2007). Rheology of whey protein–dextran conjugate films at the air/water interface. Food Hydrocolloids, 21(7), 1072–1080.

Yadav, M. P., Parris, N., Johnston, D. B., Onwulata, C. I., & Hicks, K. B. (2010). Corn fiber gum and milk protein conjugates with improved emulsion stability. Carbohydrate Polymers, 81(2), 476–483.

Yadav, M. P., Strahan, G. D., Mukhopadhyay, S., Hotchkiss, A. T., & Hicks, K. B. (2012). Formation of corn fiber gum–milk protein conjugates and their molecular char-acterization. Food Hydrocolloids, 26(2), 326–333.

Yajima, K., Onodera, S., Takeda, Y., Kato, I., & Shiomi, N. (2007). Improved radical scavenging activity of β-lactoglobulin-xylobiose modified by the Maillard reaction. Journal of Applied Glycoscience, 54(3), 165–168.

Zhou, P., & Labuza, T. P. (2007). Effect of water content on glass transition and protein aggregation of whey protein powders during short-term storage. Food Biophysics, 2(2–3), 108–116.

Zhou, P., Liu, X., & Labuza, T. P. (2008a). Effects of moisture-induced whey protein aggregation on protein conformation, the state of water molecules, and the microstructure and texture of high-protein-containing matrix. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(12), 4534–4540.

Zhou, P., Liu, X., & Labuza, T. P. (2008b). Moisture-induced aggregation of whey proteins in a protein/buffer model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 2048–2054.

2.3 CAS PARTICULIER DE LA REACTION DE MAILLARD

La réaction de Maillard, également connue sous le nom de brunissement non enzymatique, s'observe notamment lors de la cuisson des aliments, mais se retrouve aussi dans nos cellules. Elle est initiée par la réaction entre le groupement carbonyle d'un sucre réducteur et le groupement amine libre d'un acide aminé. De multiples réactions en cascade s'ensuivent, donnant lieu à un très grand nombre de produits de réactions, notamment les produits terminaux de glycation (AGE pour advenced glycation end products). Un schéma simplifié de la réaction de Maillard adapté de Hodge (1953) est représenté en Figure 7.

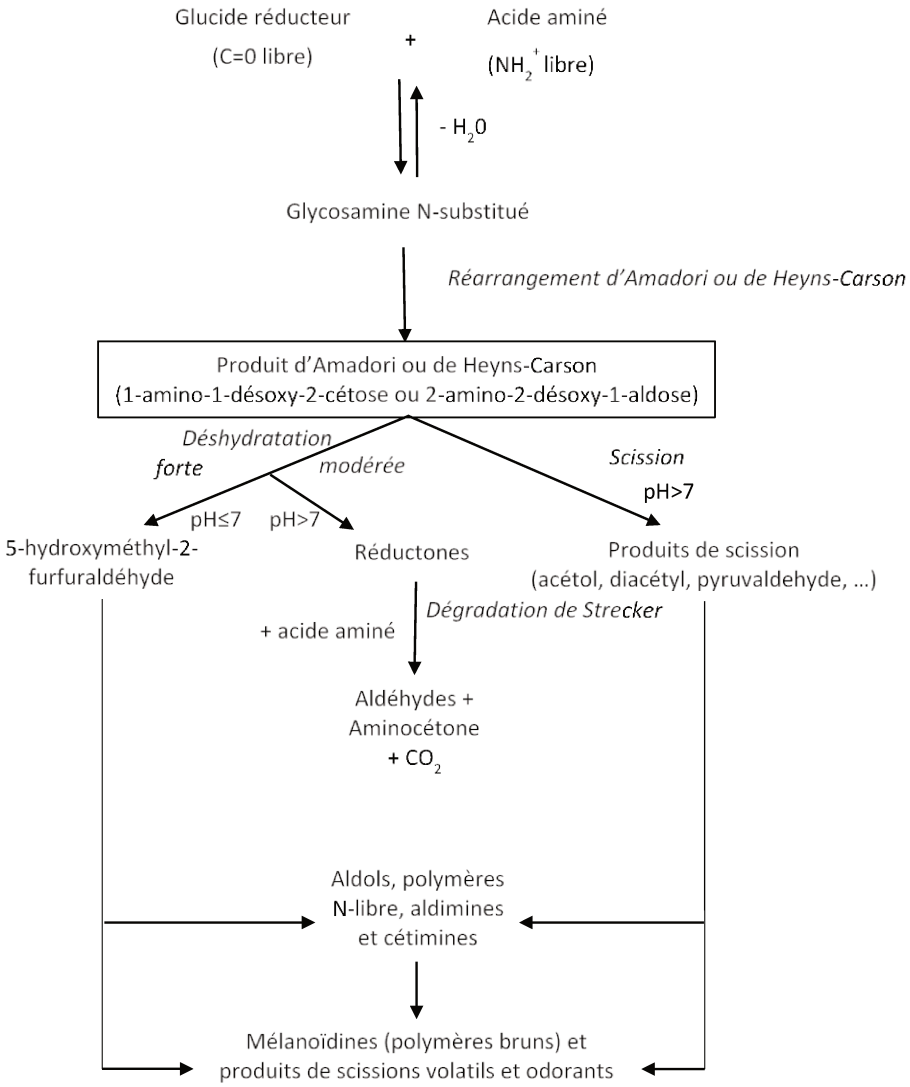


Figure 7 : Schéma simplifié de la réaction de Maillard (adapté de Hodge, 1953)

La réaction de Maillard se divise en 3 grandes étapes :

- La première étape de la réaction de Maillard commence par la glycation de la protéine (Figure 8). Elle consiste en l'attaque nucléophile d'un groupement aminé d'une protéine sur une fonction cétone ou aldéhyde d'un sucre réducteur. Il s'ensuit la perte d'une molécule d'eau, donnant lieu à une base de Schiff. Une isomérisation irréversible de cette base conduit à la formation du produit d'Amadori, si le sucre réducteur est un aldose, ou du produit de Heyns-Carson, si le sucre réducteur est un cétose.

- La deuxième étape de la réaction de Maillard donne lieu à de nombreuses réactions. On y retrouve des réactions d'énolysations et de déshydratations. Toutefois, trois voies se distinguent. Une première voie consiste en une déshydratation modérée. Favorisée aux pH alcalins, elle conduit à la formation de réductones. Les réductones ont des structures dicétonique (R-CO-CO-R'). Elles se décomposent via la dégradation de Strecker en réagissant avec un acide aminé, conduisant à la formation d'aldhéhydes, d'aminocétones et de CO_2. Une deuxième voie consiste en une déshydratation forte. Elle est favorisée par les pH acides. La perte de molécules d'eau conduit à des composés dicarbonylés insaturés qui, par cyclisations, donnent des furfuraldéhydes. La troisième voie est la scission des produits d'Amadori ou de Heyns-Carson. Elle est favorisée à pH alcalin et donne lieu à des petites molécules, comme des acétols, des diacétyles et des pyruvaldéhydes.

- L'étape finale de la réaction de Maillard consiste en la polymérisation d'intermédiaires réactionnels produits lors de la deuxième étape. Elle produit des mélanoïdines, qui sont des pigments bruns responsables du brunissement et des produits volatils et odorants.

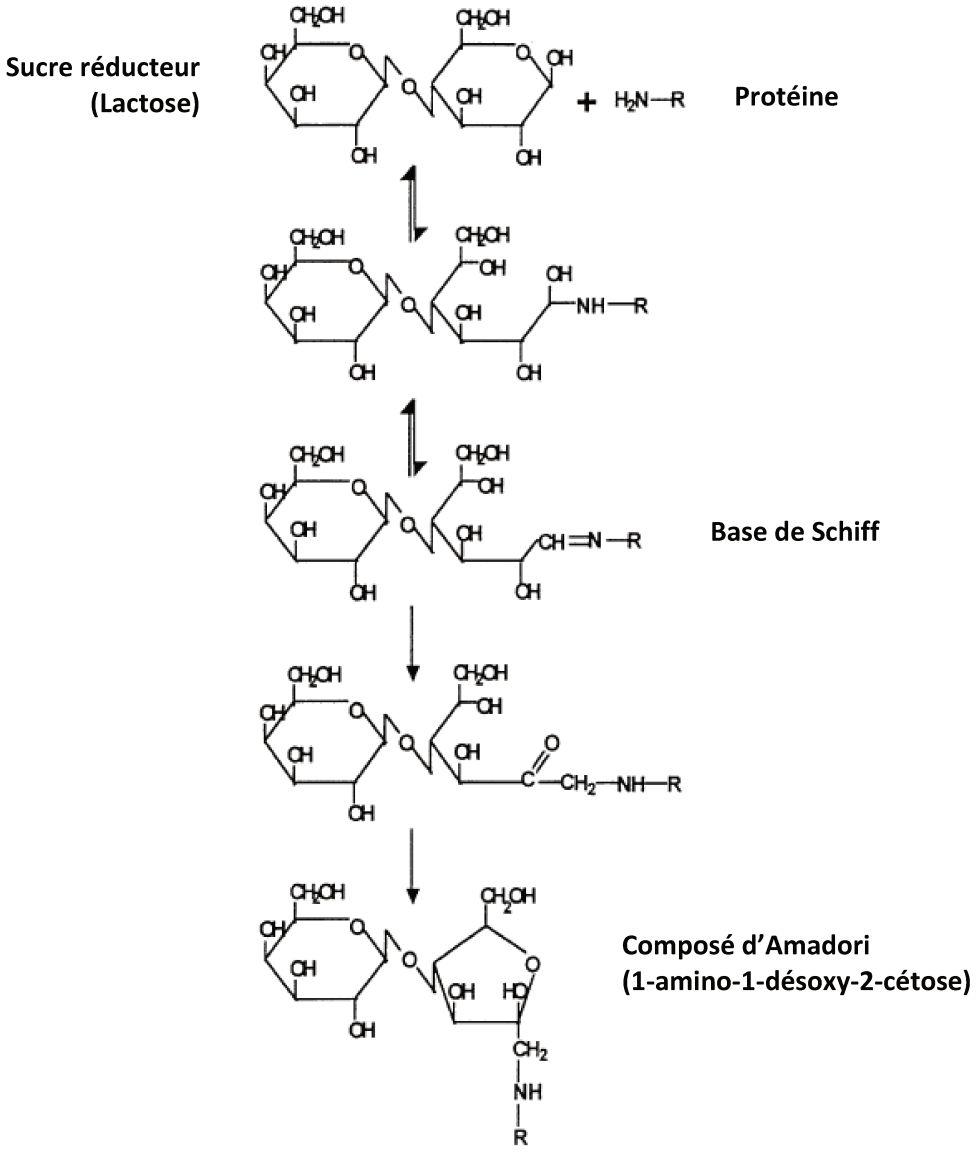


Figure 8 : Première étape de la réaction de Maillard.

Plusieurs facteurs influencent la vitesse et les différentes voies empruntées de la réaction de Maillard. Parmi ces facteurs, on retrouve la température, le pH, l'a_w. La réaction de Maillard a lieu aussi à 4 °C : c'est le couple temps/température qui est important. Puisque la première étape de la réaction libère une molécule d'eau, et que la réaction de Maillard présente de nombreuses autres réactions de déshydratation, la réaction de Maillard est favorisée par les faibles a_w et l'eau est même un inhibiteur de la réaction. De ce fait, la réaction de Maillard se fait plus facilement et rapidement dans les poudres qu'en solution. La réaction est favorisée par des a_w comprises entre 0,5 et 0,8 (Ames, 1990). Elle est

aussi favorisée à pH alcalin (Ajandouz and Puigserver, 1999). En effet, la protonation de la fonction amine à pH inférieur au pKa des résidus aminés (εNH_2 : pKa ~10,5), diminue le caractère nucléophile de cette fonction, ce qui a pour conséquence de réduire sa réactivité vis-à-vis du sucre. Le pH optimal de la réaction de Maillard se situe entre 8 et 10 (Van Boekel, 1998). A pH > 7, les voies des réductones et des produits de fission sont favorisées.

La réaction de Maillard a pour conséquence une altération de la qualité nutritionnelle et organoleptique des poudres. Elle mène à une réduction des valeurs nutritives du fait de la transformation des sucres et de certains acides aminés essentiels. De plus, la toxicité de certains produits de la réaction de Maillard tels que les céto-aldéhydes, le glyoxal, le méthylglyoxal, le 3-déoxyglucosone, les amines hétérocycles et les acrylamides a été dénoncée (Van Nguyen, 2006). Cependant, en agro-alimentaire, cette réaction de Maillard est parfois recherchée et contrôlée, dans le but d'améliorer les qualités organoleptiques de certains aliments, comme le pain grillé, le café torréfié ou la viande grillée. De plus, beaucoup d'études ont reporté des effets bénéfiques associés à la réaction de Maillard, dont des effets antioxydant (Rufián-Henares and Morales, 2007a; Sproston and Akoh, 2016; Sun *et al*., 2006), antihypertenseur (Rufián-Henares and Morales, 2007b), et antimutagénique (Kong *et al*., 1989; Yen *et al*., 1992).

La réaction de Maillard est aussi connue pour former des liaisons réticulantes entre les protéines (Chellan and Nagaraj, 1999; Gerrard *et al*., 2002, 2003a, 2003b; Nagaraj *et al*., 1996). Cependant, la structure chimique de ces liaisons est encore mal connue.

C. OBJECTIFS ET STRATEGIE DE LA THESE

Au travers cette thèse, nous avons mis en évidence que l'étuvage d'une poudre d'isolat de protéines sériques à pH 9,5 permet la formation d'assemblages singuliers. Ces assemblages, de la taille supérieure au micron ont été nommés « assemblages microniques » (AMI) ou en anglais « whey protein microparticles » (WPM).

L'objectif de cette thèse a été de comprendre les mécanismes de formation d'AMI produits par l'étuvage d'une poudre d'isolat de protéines sériques à pH 9,5 et de déterminer leurs propriétés physico-chimiques et fonctionnelles.

LES OBJECTIFS ET LA STRATEGIE DE LA THESE SONT :

- **De comprendre les mécanismes de formation des AMI.** La stratégie empruntée consiste à :

  - étudier l'effet du temps d'étuvage de la poudre d'isolat de protéines sériques ;

  - déterminer le rôle des constituants de la poudre, les PS, le lactose, les caséines et les sels résiduels, en faisant varier la composition de la poudre ;

  - déterminer les relations entre la taille et la forme des particules de poudre et celles des AMI, en caractérisant la taille et la forme des objets ;

  - étudier le rôle de la réaction de Maillard dans la formation des AMI, en déterminant son intensité et en la comparant avec la production des AMI ;

  - déterminer les propriétés physico-chimiques des AMI en suspension, en caractérisant la taille, la morphologie et la structure des AMI.

- **De déterminer l'effet de l'environnement physico-chimique sur la microstructure des AMI en suspension**, en faisant varier le pH et la concentration en NaCl du milieu avant de caractériser la microstructure des AMI.

- **De caractériser les propriétés fonctionnelles des AMI,** en évaluant leurs propriétés d'écoulement et de capacité de rétention d'eau.

et, en conclusion, **de comprendre les relations procédé/structure/fonctions des AMI** afin de concevoir des pistes d'innovation dans l'univers des produits laitiers.

D. MATERIEL ET METHODES

1. POUDRES DE PROTEINES LAITIERES

Quatre poudres laitières ont été utilisées pour ce projet. L'analyse de leur composition a été analysée en interne :

- Une poudre commerciale d'isolat de PS (IPS) a été obtenue à partir d'une source confidentielle. Elle contient :
  - 96,56 ± 0,03 g d'extrait sec total (EST) pour 100 g de poudre, déterminé par dessiccation,
  - 94,35 ± 0,74 g de protéines/100 g d'EST, déterminé par la méthode Kjeldahl (H/Gebriel, 2014) avec ~18 % de caséines et ~82 % de PS, déterminé par électrophorèse SDS-PAGE (Chevallier *et al*., 2018),
  - 0,613 ± 0,017 g de lactose libre/100 g d'EST, déterminé par chromatographie ionique,
  - Moins de 2 g de cendres pour 100 g de poudre, dont 0,31 g Ca^{2+}, 0,02 g Mg^{2+}, 0,09 g Na^{+} et 0,16 g K^{+}, déterminé par spectrométrie d'absorption atomique (Chevallier *et al*., 2018).

- Une poudre de β-lactoglobuline purifiée (βlg) a été obtenue à partir d'une source confidentielle. Elle contient :
  - 95,74 ± 0,23 g d'EST pour 100 g de poudre, déterminé par dessiccation,
  - 96,6 g de protéines/100 g d'EST, déterminé par la méthode Kjeldahl (Van Audenhaege, 2011), dont 96,4 ± 0,8 g de β-lactoglobuline/100 g de protéines et 3,6 ± 0,8 g d'α-lactalbumine/100 g de protéines, déterminé par chromatographie en phase inverse (Van Audenhaege, 2011),
  - 1,42 ± 0,02 mg de lactose libre/100 g d'EST, déterminé par chromatographie ionique.

- Une poudre commerciale de caséinate de sodium (CasNa) (Lactalis, Bourgbarré, France) contenant :
  - 93,69 ± 0,34 g d'EST pour 100 g de poudre, déterminé par dessiccation,
  - 93,72 ± 0,22 g de protéines/100 g d'EST dont 99 g de caséines/100 g de protéines, déterminé par la méthode Kjeldahl (H/Gebriel, 2014), avec une proportion de caséine αs, β et κ de 44,3 %, 43,0 %, 12,7 %, respectivement, déterminé par électrophorèse SDS-PAGE (Chevallier, 2017),
  - 0,319 ± 0,003 g de lactose libre/100 g d'EST, déterminé par chromatographie ionique.

- Une poudre enrichie en caséine micellaire (CasMic) (Promilk 852 B, International dairy ingredients, Arras, France) contenant :
  - 93,67 ± 0,05 g d'EST pour 100 g de poudre, déterminé par dessiccation,
  - 83,25 ± 0,02 g de protéines/100 g d'EST, dont 93 g de caséines/100 g de protéines, déterminé par la méthode Kjeldahl (H/Gebriel, 2014),
  - 3,141 ± 0,124 g de lactose libre/100 g d'EST, déterminé par chromatographie ionique,
  - 1,36 g de matière grasse totale/100 g d'EST, d'après l'analyse réalisée par Ingrediat group (Saint-Pol-sur-Ternoise).

Les poudres de CasNa sont obtenues par précipitation de la caséine à pH 4,6. La caséine est ensuite resolubilisée en ajustant le pH à 6-7 avec de la soude. Ainsi, la poudre est riche en sodium et la caséine se retrouve sous la forme déminéralisée, sous forme de petites particules de 10-20 nm de diamètre. Les poudres de caséine micellaire ou de phosphocaséinate natif CasMic sont obtenues par microfiltration membranaire du lait, suivie d'une diafiltration avec de l'eau et contiennent donc des traces de la phase aqueuse du lait, c'est-à-dire des PS, du lactose et des minéraux. Dans ces poudres, les caséines se retrouvent natives, c'est-à-dire sous forme de micelles d'environ 200 nm de diamètre.

2. PREPARATION DES POUDRES ETUVEES

Les 4 étapes de la préparation des poudres étuvées sont détaillées ci-dessous et schématisées dans la Figure 9 :

1) Les poudres de protéines ont été dissoutes dans de l'eau désionisée à 150 g de poudre/kg à température ambiante sous agitation. Les solutions ont été ensuite agitées pendant une nuit à 4 °C, puis ont été ajustées à pH 3,5, 6,5 ou 9,5 avec NaOH 5 à 1 M ou HCl 10 à 5 M.
2) Elles ont été ensuite séchées, soit par pulvérisation, soit par lyophilisation. Dans le cas du séchage par pulvérisation, le pilote Minor a été utilisé (GEA Niro, Danemark) avec un débit d'entrée de la solution fixée à ~2 $L.h^{-1}$. La température d'entrée et de sortie de l'air de séchage a été fixée à 250 °C et 90-100 °C, respectivement. Dans le cas du séchage par lyophilisation, la solution a été transférée dans une barquette en aluminium recouverte de papier essuie-tout, puis rapidement congelée dans une cellule de refroidissement à -26 °C. La solution congelée a

été ensuite lyophilisée pendant 51 h (lyophilisateur CS10, Serail, Coudray-Saint-Germer, France). Puis, le lyophilisat a été broyé pendant 1 minute au Stomacher®, puis 40 secondes dans le moulin à café (Prepline, SEB) pour obtenir une poudre la plus fine possible. Dans le chapitre 1, les poudres ont seulement été rapidement broyées.

3) Les poudres ont été ensuite conditionnées dans un dessiccateur contenant une solution de sels saturés de CH_3COOK, jusqu'à une activité d'eau (a_w) proche de 0,2. L'a_w des poudres a été contrôlée à l'aide d'un a_w-mètre (Novasina RTD-200, Lachen, Switzerland ou Aqualab 3TE, Decagon, Washington). Les poudres obtenues par pulvérisation et par lyophilisation sont restées respectivement ~1 mois et ~2 semaines dans le dessiccateur. Ces périodes correspondent au temps nécessaire pour que la poudre ait une a_w proche de 0,2. Les poudres ont été conservées à 4 °C dans des flacons fermés hermétiquement avant utilisation.

4) Les poudres ont été ensuite étuvées à 100 °C jusqu'à 96 h dans des tubes en verre Pyrex fermés hermétiquement. Il est en effet important que l'humidité relative de la poudre ne diminue pas suite à l'évaporation de l'eau à température élevée. A chaque fois, au moins deux tubes contenant la même poudre ont été placés dans l'étuve, de façon identique et en même temps. Certains tubes pouvant fuir, une mesure d'a_w a été effectuée sur chaque poudre avant et après étuvage. Les poudres ayant une a_w après étuvage inférieure à sa valeur avant étuvage ou inférieur à son doublon n'ont pas été utilisées pour la suite du travail. Dans le chapitre 1, la poudre à pH 9,5 a été broyée au moulin à café pendant 3,5, 5,0 ou 25,0 s juste avant d'être étuvée.

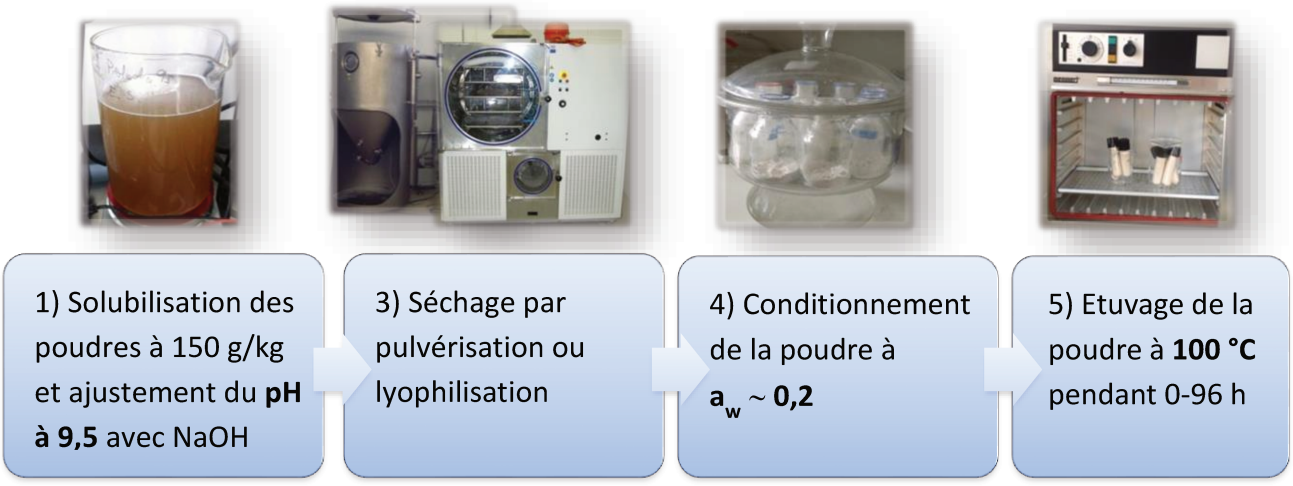


Figure 9 : Etapes de préparation des poudres étuvées à pH alcalin.

3. PREPARATION ET FRACTIONNEMENT DES SUSPENSIONS

3.1 PREPARATION DES SUSPENSIONS S0

Après l'étuvage, les poudres non étuvées ou étuvées ont été reconstituées dans de l'eau désionisée à une concentration finale de 10 g de poudre/kg. De l'azide de sodium a été ajouté à 0,2 $g.kg^{-1}$ comme agent bactériostatique (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Les suspensions ont été agitées à 300 tours/min à l'aide d'un barreau magnétique à température ambiante durant au moins 2 h et le pH a été ajusté à pH 6,50 $\pm$ 0,03 avec HCl. Ces suspensions sont appelées S0.

3.2 FRACTIONNEMENT DE LA SUSPENSION S0

3.2.1 FRACTIONNEMENT SANS LAVAGE

Un schéma du fractionnement des suspensions est représenté en Figure 10. Tous les échantillons ont été préparés et mesurés en double, au minimum.

Deux g de suspension S0 ont été centrifugés à 10 000 *g* à 20 °C pendant 15 min. Les surnageants S1 ainsi obtenus contiennent des protéines sériques natives résiduelles (NP), des caséines et des assemblages et des protéines sériques dénaturées solubles (SDAP). Ils sont appelés « soluble » dans ce cas, puisqu'ils se trouvent dans le surnageant de la suspension centrifugée dans ces conditions. Les culots obtenus par cette centrifugation sont appelés P1 et contiennent les AMI.

D'autre part, 1 mL de S0 a été acidifié à pH 4,6 en ajoutant 300 µL de tampon acétate-acide acétique, 0.5 M, pH 4,6, puis centrifugé comme ci-dessus. Les surnageants ainsi obtenus sont appelés S1A. Ils contiennent exclusivement les NP. Dans le chapitre 1, 10 mL de S0 ont été acidifiés à pH 4,6 avec 600 µL de tampon acétate-acide acétique, 0.5 M, pH 4,6.

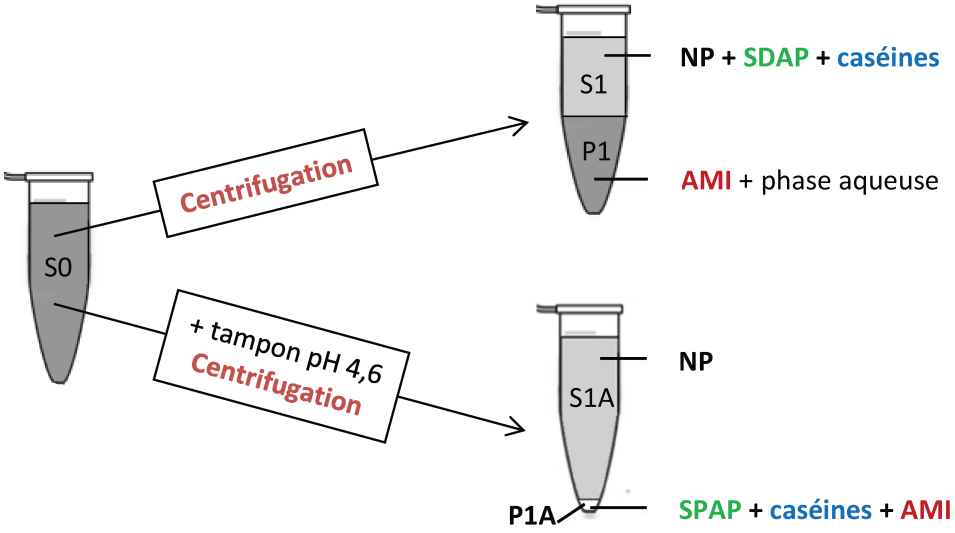


Figure 10 : Schéma de fractionnement des suspensions. NP = protéines sériques natives résiduelles ; SDAP = assemblages et protéines sériques dénaturées solubles et AMI = assemblages

3.2.2 FRACTIONNEMENT AVEC LAVAGE

Cette étape n'a été réalisée que dans l'article présenté dans le chapitre 2.

Les surnageants S1 et les culots P1 ont été obtenus comme précédemment. Les culots P1 contiennent une petite fraction de phase aqueuse retenue entre les AMI, qui contient des NP et des SDAP. Il est donc nécessaire de laver ces culots afin d'éliminer ces protéines, d'une part pour parfaitement évaluer les différentes fractions protéiques et, d'autre part, pour pouvoir analyser les propriétés fonctionnelles des AMI purifiés. Afin que les AMI restent dans le même environnement pour éviter toutes modifications de leur propriétés, le lavage des culots P1 a été effectué avec du tampon KH_2PO_4/NaOH, 10 mM, pH 6,5. Un schéma correspondant au lavage des culots P1 est représenté en Figure 11. Les surnageants S1 ont été remplacés par la même masse de tampon. Les culots dilués ont été ensuite homogénéisés, puis centrifugés à 10 000 *g* à 20 °C pendant 15 min. Les culots ainsi obtenus (P2) contiennent uniquement les AMI et les surnageants (S2) contiennent les NP et les SDAP piégés dans les culots P1.

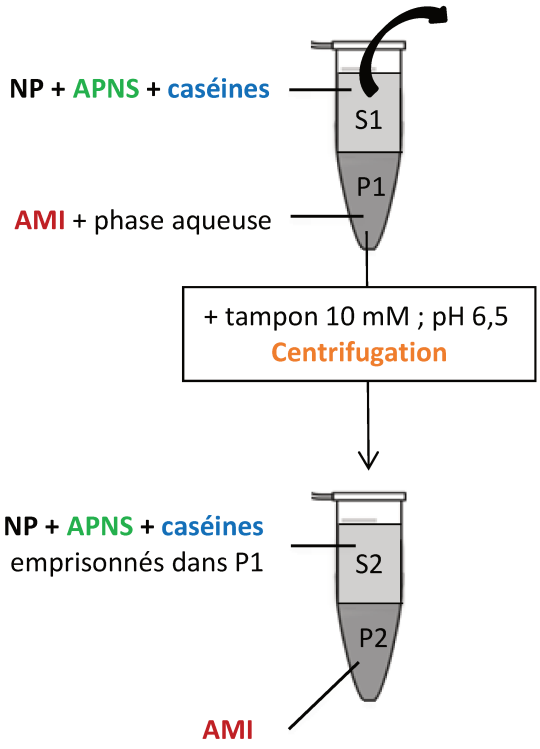


Figure 11 : Lavages des culots P1 contenant les AMI ; SDAP = assemblages et protéines sériques dénaturées solubles et AMI = assemblages microniques.

La méthode du fractionnement avec lavage est plus précise que la méthode sans lavage pour quantifier les AMI puisqu'elle évite la contamination par les autres protéines de la fraction soluble. Cependant elle est beaucoup plus longue à réaliser. De plus, la contamination en protéines de la fraction soluble était relativement faible. C'est pourquoi elle n'a pas été systématiquement utilisée.

4. CARACTERISATION DES POUDRES

4.1 EXTRAIT SEC

L'extrait sec des poudres permet d'obtenir la quantité de matière sèche par dessiccation des poudres. Il a été mesuré suivant la méthode standard (FIL-IDF, 1993). L'évaporation de l'eau présente dans les poudres a été réalisée par étuvage à 102 ± 2 °C d'environ 1 g de poudre pendant 5 h en présence de 25 g de sable. Deux essais ont été réalisés par mesure.

4.2 ACTIVITE DE L'EAU

L'a_w des poudres a été mesurée à 25 °C à l'aide d'un a_w-mètre (Novasina RTD-200, Lachen, Switzerland ou Aqualab 3TE, Decagon, Washington). La poudre à analyser a été placée dans des capsules en plastiques prévues à cet effet, de façon à recouvrir totalement le fond des capsules. Les mesures ont été relevées au bout d'1h30 dans le cas de l'appareil Novasina RTD-200, et lorsque l'appareil a émis un signal sonore, signalant la fin de la mesure, dans le cas de l'appareil Aqualab 3TE. La durée moyenne de la mesure était d'environ 6 min avec l'appareil Aqualab 3TE. Les mesures ont été réalisées 2 fois au minimum sur des prélèvements différents.

4.3 INDICE DE BRUNISSEMENT

La couleur des poudres a été mesurée avant et après l'étuvage des poudres, à l'aide du chromamètre CR-300 (Minolta, Roissy, France). Cet appareil mesure la couleur à l'aide de 3 paramètres : L* = indice de clarté ou luminance, a* = indice de coloration variant du vert au rouge, b* = indice de coloration variant du bleu au jaune. L'indice de brunissement (BI) des poudres a été calculé selon la formule suivante décrite par Maskan (2001):

$$BI = \frac{[100(x-0{,}31)]}{0{,}17} \quad (1)$$

$$\text{avec } x = \frac{(\boldsymbol{a}* + 1{,}75\boldsymbol{L}*)}{(5{,}645\boldsymbol{L}* + \boldsymbol{a}* - 3{,}012\boldsymbol{b}*)} \quad (2)$$

Un cône de mesure avec une embase de 40 mm a été utilisé. L'appareil a été calibré à l'aide d'une plaque d'étalonnage blanche. De la poudre a été placée dans un ensemble pour matériaux granuleux CR-A50 (Minolta) (Figure 12). Le système a effectué 3 mesures sans que la tête de mesure ne soit déplacée. Deux autres répétitions ont été réalisées en déplaçant la tête de mesure à la fin des 3 mesures.



Figure 12 : Ensemble pour matériaux granuleux (source de l'image : www.2i3d.fr).

4.4 DETERMINATION DE LA TAILLE DES PARTICULES DE POUDRE

Les distributions de taille des particules de poudres ont été déterminées à l'aide du granulomètre laser Mastersizer 2000 (Malver Instruments, UK) et du granulo-morphomètre QICPIC (Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Allemagne). Les mesures ont été répétées 3 fois dans les 2 cas. Les distributions granulométriques ont été exprimées en volume, et les particules ont été caractérisées par leur diamètre moyen en volume (D[4,3]), selon la formule suivante :

$$D[4,3] = \frac{\Sigma n_i {D_i}^4}{\Sigma n_i {D_i}^3} \quad (3)$$

où n_i est le nombre de particules de diamètre D_i.

Le Mastersizer 2000 utilise la diffraction de la lumière afin de mesurer la taille de particules en voie sèche allant de 0,02 à 2000 µm. L'appareil est équipé d'un laser He/Ne qui émet une lumière rouge à une longueur d'onde de 633 nm. Son principe de mesure repose sur la théorie de Mie. Cette théorie mathématique interprète la lumière diffusée par une particule et la modélise pour des sphères. Les particules sont donc assimilées à des sphères équivalentes. La lumière est diffusée par une particule avec un angle inversement proportionnel à sa taille. Plus une particule est grosse et plus elle dévie une

quantité importante de lumière avec un angle faible. L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisées à l'aide du logiciel de traitement Malvern (Mastersizer 2000 version 5.60). Pour l'analyse des poudres, le Mastersizer 2000 a été équipé d'un module Scirocco 2000. Ce module comprend une trémie d'alimentation vibrante et un système de venturi qui permet de disperser la poudre avec l'air injecté. L'indice de réfraction (IR) de la poudre a été fixé à 1,45. Cette valeur correspond à l'IR d'une poudre laitière donnée par l'appareil. La pression de dispersion a été réglée à 1 bar, la vitesse de vibration a été réglée sur 50 % et la durée de la mesure était de 12 sec.

Le QICPIC équipé du module Rodos/L spécifique pour la dispersion de particules sèches et d'une lentille M6, permet de mesurer la taille des particules allant de 5 à 1 705 µm. L'appareil utilise l'analyse d'images dynamiques pour déterminer la taille et la forme des particules. Les images sont obtenues à l'aide d'une source de lumière pulsée et d'une caméra à haute vitesse de 1024x1024 pixels^2. La taille des particules a été évaluée par le diamètre EQPC (pour « Diameter of a Circle of Equal Projection Area ») des particules qui représente le diamètre d'un cercle ayant la même aire de celle projetée par la particule. L'analyse et l'acquisition données ont été réalisées à l'aide du logiciel WINDOX 5 version 5.8.2.1 (Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Allemagne). La fréquence d'acquisition des images était de 450 Hz et la durée de l'analyse était de 30 sec.

Les avantages du QICPIC par rapport au Mastersizer 2000, est qu'il nécessite beaucoup moins de poudre pour l'analyse des tailles des particules et qu'il permet de mesurer les particules une à une, permettant d'obtenir une distribution de taille beaucoup plus précise. Cependant, l'analyse des tailles des particules en voie liquide a été réalisée à l'aide du Mastersizer, il est donc préférable pour pouvoir comparer les tailles des particules de poudre et des particules en phase liquide, d'utiliser le même appareil. Le Mastersizer 2000 a donc été utilisé pour les poudres obtenues par pulvérisation et le QICPIC a été utilisé pour l'analyse des poudres obtenues par lyophilisation, car ces dernières ont été obtenues en trop faible quantité pour être analysée au Mastersizer 2000.

4.5 MICROSTRUCTURE DES PARTICULES DE POUDRE

Les poudres ont été en déposées sur une lamelle en verre et observées au microscope optique (Olympus BX51, Rungis, France) à l'aide d'un objectif x4, d'une caméra Qiclick et du logiciel Archimed (Microvision Instruments, Evry, France).

5. CARACTERISATION DES SUSPENSIONS D'AMI

5.1 DISTRIBUTION DES PROTEINES DANS LES DIFFERENTES FRACTIONS

5.1.1 PROTEINES NATIVES RESIDUELLES (NP)

La quantité de protéines présentes dans les surnageants S1A correspond à la quantité des NP totales présentes dans les suspensions S0 :

$$NP\ totales = [\mathrm{S1A}] \quad (4)$$

Dans le chapitre 1, la quantité de protéines dans les surnageants S1A a été quantifiée par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) en utilisant une courbe de calibration réalisée avec de la βlg ou par chromatographie d'exclusion de taille.

La méthode de Lowry est une méthode de dosage colorimétrique. Les protéines réagissent avec le cuivre en milieu alcalin ce qui leur permet par la suite de réduire le réactif de Folin qui prend une coloration bleue détectable par spectrométrie à 750 nm.

La chromatographie d'exclusion de taille permet la séparation des composés selon leur poids moléculaire. Son principe est d'éluer les molécules à l'aide un tampon d'élution (phase mobile) à un débit fixé, dans une colonne remplie d'un matériau poreux (phase stationnaire). Les petites molécules pénètrent dans les pores et vont être temporairement retenues, contrairement aux grosses molécules qui ne pénétrent dans les pores et vont donc être éluées plus rapidement. Les surnageant S1A ont été analysés à l'aide d'une colonne TSKG3000SWXL (300x7,8 mm id., Phenomenex, Le Pecq , France) et d'un tampon phosphate (phosphate 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7) comme éluant, avec un débit fixé à 0,8 $mL.min^{-1}$. Des standards de BSA, αlac, βlg et caséinate de sodium ont été utilisés pour la calibration. Les surnageant S1A ont été dilués 5 fois dans l'éluant et filtrés sur une membrane Acrodisc 0,2 µm (Sigma Aldrich Chimie, Lyon, France) pour éliminer les particules insolubles résiduelles. Le volume d'échantillon ou de standard injecté était de 50 µL. L'aire des protéines a été quantifiée et comparée avec l'aire de chaque standard pour obtenir la concentration de chaque protéine.

Dans les autres parties de la thèse, la quantité de protéines dans les surnageants S1A a été quantifiée par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

La RP-HPLC permet d'isoler, d'identifier et de quantifier les différentes molécules d'un mélange. Elle comprend une colonne en phase inverse, constituée d'une phase stationnaire apolaire. Le principe est de mesurer le temps de rétention des molécules, entrainées par une phase mobile polaire, sur cette phase stationnaire apolaire. Plus la molécule est apolaire, plus elle sera retenue dans la colonne. Les NP, c'est-à-dire la βlg et l'αlac, ont été quantifiées à l'aide d'une colonne C4 VYDAC (214 TP 5215, 150x2,1 mm). Les surnageants S1A ont été dilués 10 fois dans un tampon d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,106 % (tampon A). Ensuite, 100 µL de l'échantillon dilué ont été injectés sur la colonne avec un débit de 0,2 $mL.min^{-1}$. Un gradient de tampon A et 0,1 % de TFA dans de l'acétonitrile (tampon B) a été appliqué de la manière suivante: équilibration avec 28 % de tampon B, gradient linéaire de 28 à 49,6 % de tampon B en 40 minutes, augmentation à 80 % en 1 minute, puis 3 min à 80%, diminution à 28 % en 1 min, 5 min à 28 %. Les protéines ont été détectées à 214 nm. Les concentrations en βlg et l'αlac ont été calculées à l'aide du logiciel Empower, en comparant l'air des courbes avec celles des solutions témoins de βlg et d'αlac. Les solutions témoins ont été réalisées séparément avec de la poudre de βlg et d'αlac reconstituées à 1,5 g de poudre/kg. La concentration en protéines de ces témoins a été mesurée par absorbance UV à 280 nm à l'aide du spectromètre Uvmc2 (SAFAS, Monaco) en utilisant la loi de Beer-Lambert :

$$A_{280\ nm} = \varepsilon_{280nm}.\ell.\mathbf{C} \qquad (5)$$

où ε_{280nm} est le coefficient d'extinction molaire de la protéine dosée à 280 nm ($L.g^{-1}.cm^{-1}$), **C** est la concentration ($g.L^{-1}$) de l'espèce absorbante, ℓ est le chemin optique parcouru par le rayon lumineux dans le milieu absorbant (cm) et $A_{280\ nm}$ est l'absorbance de l'échantillon à 280 nm. Les ε_{280nm} utilisés pour la quantification de la βlg et de l'αlac sont de 0,96 $L.g^{-1}.cm^{-1}$ et 2,01 $L.g^{-1}.cm^{-1}$ (Habeeb, 1973; Tavares *et al.*, 2017). Des cuves en quartz avec un chemin optique de 1 cm ont été utilisées pour les mesures. Un blanc a été réalisé avec de l'eau désionisée. Les solutions témoins ont ensuite été diluées pour avoir une concentration en protéine d'1 g/L avant d'être injectées dans la colonne.

Compte tenu que les concentrations en protéines dans les surnageants S1A sont inférieures à 10 g/kg, les quantités de protéines ont été calculées en supposant que le volume des surnageants est égal à leur masse :

$$\text{Quantité de protéines} = \mathbf{C} \,.\, \text{masse du surnageant} \quad (6)$$

où $\mathbf{C}$ est la concentration ($g.L^{-1}$) en protéines dans le surnageant.

Les masses des culots de centrifugation à pH 4,6 P1A étaient très faibles et négligeables.

Dans le cas de la poudre d'IPS, les résultats ont été exprimés en pourcentage de NP, en admettant qu'il y ait 0,911 g de protéines/g de poudre dans la poudre d'IPS, et que 82 % des protéines sont des PS, soit 0,747 g de PS/g de poudre. Avec la poudre de βlg, les résultats ont été exprimés en pourcentage de βlg native, en admettant qu'il y ait 0,925 g de protéines/g de poudre dans la poudre de βlg.

5.1.2 ASSEMBLAGES ET PROTEINES DENATUREES SOLUBLES (SDAP)

Les protéines contenues dans les surnageants S1 et S2 correspondent aux SDAP additionnés aux NP. Elles ont été dosées par absorption UV à 280 nm à l'aide du spectromètre Uvmc2 (SAFAS, Monaco) en utilisant la loi de Beer-Lambert (5).

Les ε_{280nm} utilisés pour la quantification des SDAP sont de 1,046 $L.g^{-1}.cm^{-1}$ et 0,96 $L.g^{-1}.cm^{-1}$ pour l'IPS et la βlg, respectivement (Morand *et al.*, 2011; Tavares *et al.,* 2017). Des cuves en quartz avec un chemin optique de 0,2 cm ont été utilisées pour les mesures. Un blanc a été réalisé avec de l'eau désionisée. Lorsqu'il a été nécessaire de diluer l'échantillon, les mesures ont été réalisées sur 2 dilutions différentes au minimum, le plus souvent 4, et lorsque l'échantillon n'a pas eu besoin d'être dilué, les mesures ont été réalisées sur 2 prélèvements différents minimum, et le plus souvent 4.

Les surnageants S1 et S2 contiennent aussi les caséines mais leur quantité a été négligée. Avec l'addition des quantités de protéines présentes dans S1 et S2, on obtient la quantité totale de NP et des SDAP dans les suspensions S0. En soustrayant la quantité de protéines obtenue dans les surnageants S1A aux quantités de protéines dans les surnageants S1 et S2, on obtient la quantité totale de protéines incluses dans des SDAP des suspensions S0 :

$$APDS\ totale = S1 + S2 - S1A \quad (7)$$

Les valeurs ont été calculées pour 100 g de suspension, soit un gramme de poudre étuvée. Toutes les mesures ont été réalisées au minimum en double.

Avec le fractionnement de S0 sans lavage, la quantité de protéines présentes dans S2 a été négligée. De ce fait, la quantité en SDAP est un peu sous-estimée. Il faut aussi noter que les quantités de protéines contenues dans les surnageants S1 et S2 sont légèrement surestimées par la petite quantité de caséines présente dans la poudre de d'IPS. En effet, la caséine se retrouve dans les surnageants S1 et S2, mais pas dans les surnageants S1A, puisqu'elle est soluble à pH 6,5 et précipite à pH 4,6.

5.1.3 ASSEMBLAGES MICRONIQUES (AMI)

Les AMI ont été quantifiés en séchant le culot P1 sous vide avec le Speed Vac Concentrator SVC-100H (Savant Instrument Inc., Farmingdale, NY, USA) durant 13 h à 45 °C. Les échantillons ont été préparés en quadruple. Puisque 1 g de poudre contient ~0.9 g de protéine, la masse calculée correspond approximativement à la masse de protéines intégrées dans les AMI. Les protéines de la phase aqueuse piégées par les AMI ont été négligées dans le cas où l'on réalise le fractionnement sans lavage, car elles ne sont présentes qu'en petite quantité.

Dans le chapitre 2, les quantités d'AMI ont été calculées de la même façon qu'énoncé ci-dessus sur les culots P2 afin de calculer la quantité exacte en AMI.

5.2 RENDEMENT HUMIDE, RENDEMENT SEC ET TENEUR EN EAU DES AMI

Les culots P1 contenant les AMI ont été pesés avant et après séchage en g pour un équivalent de 100 g de suspension S0. Comme 100 g de suspension S0 contiennent 1 g de poudre étuvée, les masses calculées correspondent aux rendements humide et sec de la formation des AMI en g/g de poudre étuvée. Ils sont appelés respectivement WY (wet yield) et DY (dry yield). Le WY et le DY permettent de calculer la teneur en eau des AMI par g d'AMI sec, appelé WC (water content) :

$$\text{WY (g/g de poudre étuvée)} = \text{masse de culot humide (g/g de poudre étuvée)} \quad (8)$$

$$\text{DY (g/g de poudre étuvée)} = \text{masse de culot sec (g/g de poudre étuvée)} \quad (9)$$

$$\text{WC (g/g d'AMI secs)} = \frac{\text{WY}-\text{DY}}{\text{DY}} \quad (10)$$

Dans le chapitre 2, les WC des AMI sont calculés de la même façon qu'énoncé ci-dessus sur les culots P2.

5.3 MICROSTRUCTURE DES AMI

5.3.1 MICROSCOPIE CONFOCAL A BALAYAGE LASER

Le principe du microscope confocal à balayage laser (CLSM) est d'obtenir des coupes virtuelles dans l'échantillon observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans ce plan focal. Comme représenté sur la Figure 13, le rayon laser excitateur pénètre dans l'échantillon de hauteur Z marqué au préalable avec une sonde fluorescente. Les différents plans de l'échantillon émettent alors des rayons lumineux. Le diaphragme en « pinhole », sélectionne les rayons émis par un seul plan de l'échantillon et élimine les signaux provenant des autres plans. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueur d'onde, puis détectés par des photomultiplicateurs. Le signal reçu est ensuite converti en signal numérique.

Dans le chapitre 1, les protéines ont été marquées avec de la rhodamine B isothiocyanate (RITC). La RITC (0,8 mg) a été dissoute dans 95 µL de diméthylsulfoxide. Cinq µL de cette solution ont été mélangés à 0,5 mL de la suspension S0. Cinq µL du mélange ont été déposés sur la lamelle de verre. Le laser He/Ne a été utilisé avec une longueur d'onde de 543 nm et la lumière émise par la sonde a été enregistrée à 590 nm.

Dans les autres chapitres, les suspensions S0 ont été diluées 10 fois dans de l'eau désionisée ou utilisées sans dilution préalable. Les protéines ont ensuite été marquées avec la sonde fluorescente Nile Blue : 30, 50 ou 100 µL de suspension S0 (diluée ou non) ont été mélangés avec 5 ou 10 µL de Nile Blue à 1 % (p/p) préparé dans de l'eau désionisée. Une goutte de 30 à 55 µL a été déposée sur une lamelle de verre. Le laser He/Ne a été utilisé avec une longueur d'onde de 632 nm et la lumière émise par la sonde a été enregistrée à 650 nm.

Les échantillons marqués ont été observés avec un microscope inversé Eclipse TE2000-E (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) équipé d'un système d'imagerie Nikon C1Si et d'un laser He/Ne et un

objectif x10 ou x20 à immersion à huile (Nikon). Les images ont été acquises avec le logiciel EZ-C1 version 3.40 (Nikon). Chaque image a été numérisée sous la forme d'une matrice de 512 pixels x 512 pixel^2, représentant 636 x 636 µm^2.

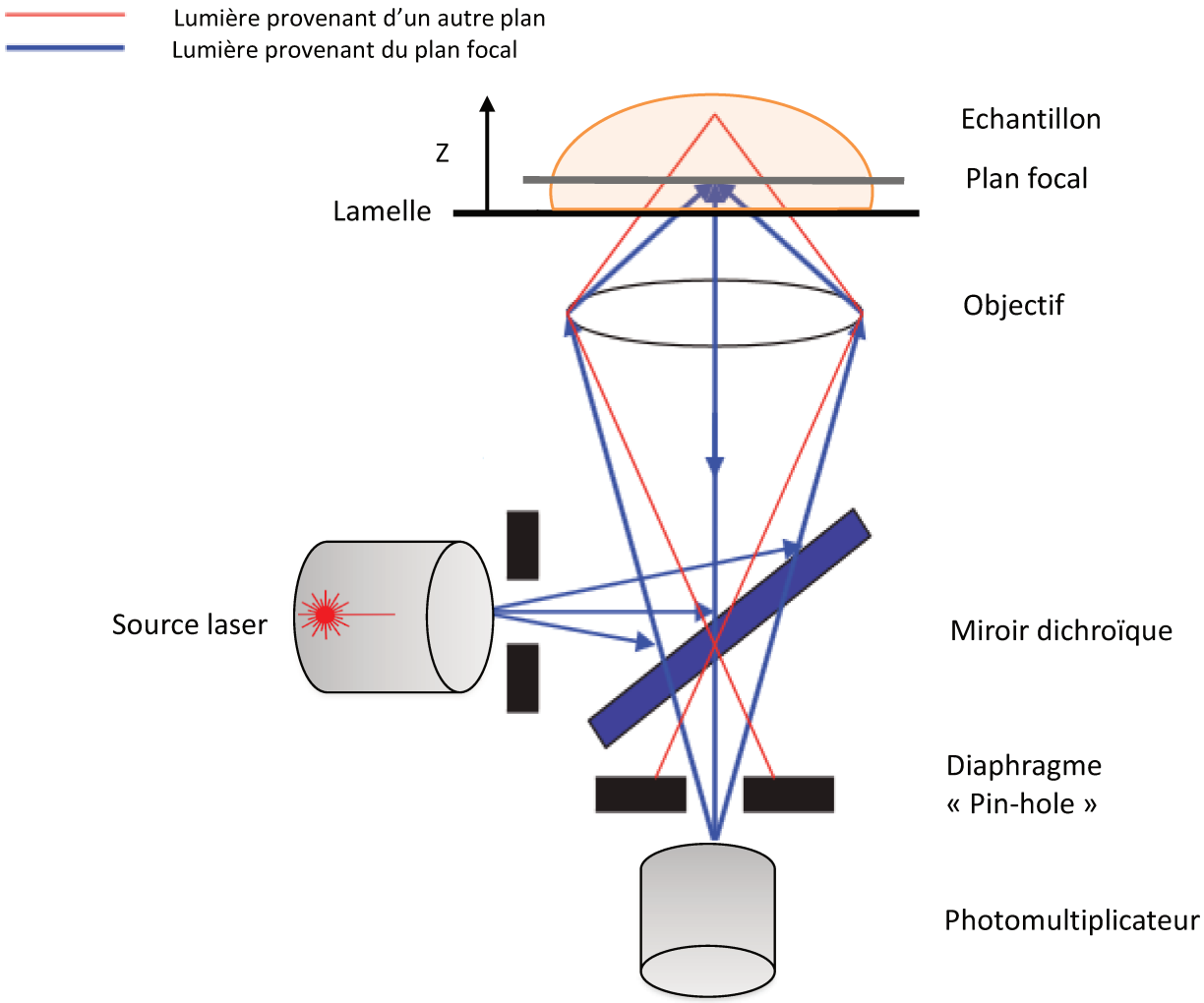


Figure 13 : Schéma du principe du microscope confocal à balayage laser (CLSM). Z correspond à la hauteur de l'échantillon par rapport à la lamelle.

5.3.2 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (SEM) ET CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (CRYO-SEM)

Cette étape n'a été réalisée que dans le chapitre 2.

La microscopie électronique à balayage (SEM pour Scanning Electron Microscopy) utilise un canon à électrons pour émettre un faisceau d'électrons qui balaye l'échantillon. L'interaction entre les électrons du faisceau et les atomes de l'échantillon entraîne la formation d'électrons secondaires,

d'électrons primaires rétrodiffusés et de photons X. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image de haute résolution de la surface des échantillons en relief. Avant l'analyse, les échantillons doivent être fixés, déshydratés et subir un traitement de métallisation pour devenir conducteur.

La cryo-microscopie électronique à balayage (cryo-SEM) consiste en une technique particulière de préparation des échantillons. Lors de l'étape de fixation, l'échantillon est congelé le plus rapidement possible sur le support d'observation, puis la glace est sublimée dans le microscope. Cette technique permet de réduire les dommages d'irradiation causés par la déshydratation, la coloration et l'exposition au faisceau d'électron. Cette technique a donc été utilisée pour l'analyse des AMI en suspension, mais pas pour la poudre puisqu'elle est déjà déshydratée.

Les particules de poudre ont été montées sur un support et ensuite recouvertes par pulvérisation de platine. Les échantillons ont été examinés avec un microscope électronique à balayage à effet de champ Quanta 250 FEG FEI à une tension d'accélération de 5 kV.

Des gouttes de suspensions préparées à 20 g de poudre/kg ont été déposées sur les supports, puis l'ensemble est plongé dans de l'azote pâteux pour la cryofixation. Après le transfert rapide sous vide dans la chambre de préparation Quorum PP3000T, les échantillons ont été fracturés à -140 °C, sublimés à -95 °C pendant 30 min, puis pulvérisés de platine. Ils ont finalement été transférés dans la chambre cryo-SEM Quanta 250 FEG et maintenus à -140 °C pour l'observation avec un microscope électronique à balayage Quanta 250 FEG FEI à une tension d'accélération de 5 kV.

5.4 DETERMINATION DE LA TAILLE DES AMI

Les distributions de taille des AMI en suspension dans de l'eau ont été évaluées au Mastersizer 2000 (Malver Instruments, UK) équipé du module HydroSM. Le principe de mesure est le même que dans le paragraphe 4.4 « Détermination de la taille des particules de poudre ». Pour les mesures, quelques gouttes de la suspension S0 ont été dispersées dans ~60 mL d'eau MilliQ. L'IR a été fixé à 1,330 et 1,545 pour l'eau et les AMI, respectivement. L'IR utilisé pour les AMI correspond à celui d'agrégats de PS (Walkenstrom *et al.*, 1999). Les distributions granulométriques ont été exprimées en

volume, et les particules ont été caractérisées par leur D[4,3]. Les mesures ont été réalisées 3 fois sur 2 prélèvements différents.

L'inconvénient de cette méthode est qu'il est nécessaire de connaitre l'IR des particules. Or, l'IR des AMI est inconnu et peut varier en fonction de la composition des particules, notamment de leur teneur en eau. J'ai utilisé l'IR connu d'agrégat de PS sans être certaine que cette valeur s'applique correctement, mais je n'avais pas accès à la valeur exacte de l'IR des AMI. Par ailleurs, les AMI étant dans certaines conditions transparents, la caméra du QICPIC ne les voit pas toujours car ils n'offrent que peu de contraste et interprète mal leur morphologie à cause de ce manque de contraste. L'utilisation du Mastersizer a donc été jugée plus fiable. Toutefois, aucune des 2 méthodes de caractérisation des tailles des particules n'est totalement satisfaisante et c'est la mesure de tailles au Mastersizer confrontée aux observations microscopiques des particules qui permettront d'évaluer leur taille.

Dans le chapitre 1, la distribution de taille des particules de taille allant de 10 à 6000 nm a été mesurée à 20 °C en utilisant le Nanosizer ZS (Malvern Instrument, Worcestershire, UK) sur les suspensions S0 et les surnageants S1. Les mesures ont été réalisées 3 fois. L'IR et la viscosité de l'eau à 20 °C ont été utilisés, i.e. 1,33 et 1,00 mPa.s, respectivement.

5.5 DOSAGE DU LACTOSE LIBRE

Les poudres ont été reconstituées dans de l'eau désionisée à 1 g de poudre/kg, sauf dans le cas de la poudre de βlg pure qui a été reconstituée à 20 g de poudre/kg. Les suspensions ont ensuite été ultrafiltrées par centrifugation à 10 000 *g* pendant 30 min à 20 °C dans des tubes Vivaspin® 20 (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany) équipés de membrane d'ultrafiltration de seuil de coupure à 10 kDa, dans le but de recueillir leur filtrat. Le lactose contenu dans les filtrats a été quantifié par chromatographie ionique (Dionex ICS3000, Jouy en Josas, France). Son principe est de séparer les ions d'une phase mobile selon leur interaction électrostatique plus ou moins forte avec une phase stationnaire constituée par une colonne remplie de résine chargée positivement. A pH élevé, le lactose est ionisé et peut donc être séparés par cette méthode. Le dosage du lactose a été réalisé sur une colonne cationique CarboPac PA1 (Dionex) (250 mm x 4 mm), combinée à une détection ampérométrique pulsée. L'élution a été réalisée avec un gradient de NaOH conçu à partir de solutions

de NaOH 200 mM et 0,2 mM et d'eau 18-MΩ selon Gaucheron, *et al*. (1996) à 20 °C avec un débit d'éluant de 1 $mL.min^{-1}$. La quantification a été réalisée grâce à un étalonnage avec des solutions de lactose de 2 à 40 ppm. Toutes les expériences ont été réalisées en double.

5.6 DOSAGE DE LA CARBOXYMETHYLLYSINE

Cette étape n'a été réalisée que dans les chapitres 1, 2, 3 et 5.

La carboxyméthyllysine (CML) est couramment utilisée comme marqueur d'un état avancé de la réaction de Maillard, puisqu'elle est l'un des AGE. Elle a été quantifiée dans nos échantillons selon la méthode de Niquet-Léridon et Tessier (2011). Les analyses ont été réalisées en double. Brièvement, des quantités de poudre équivalentes à 10 mg de protéines ont été réduites avec 1,5 mL de tampon borate (200 mM, pH 9,5) et 1 mL de borohydrure de sodium (1 M dans NaOH 0,1 M) à température ambiante pendant 4 h. L'hydrolyse a été effectuée dans de l'acide chlorhydrique 6 N à 110 ° C pendant 20 h. Les hydrolysats ont été séchés sous vide et les résidus secs ont été reconstitués avec 20 mM de l'acide nonafluoropentanoïque (NFPA) contenant les étalons internes (D2)-CML. Après filtration sur une membrane de taille de pores de 0,45 µm, les échantillons ont été analysés à l'aide d'un dispositif de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). La quantification de la CML a été obtenue en mesurant le rapport entre l'aire du pic de la CML et celui de l'étalon interne correspondant et par comparaison avec une courbe d'étalonnage. La gamme linéaire de CML était de 1 à 200 $ng.mL^{-1}$. Les mesures ont été réalisées par Mr Tessier à l'UMR 955 LIRIC de la faculté de médecine de l'Université de Lille.

5.7 DOSAGE DES ACIDES AMINES TOTAUX

Cette étape n'a été réalisée que dans le chapitre 2.

Environ 2 mg de poudre ont été hydrolysés dans 2 mL de HCL 6 N pendant 24 h à 110 ° C dans un tube en verre scellé sous vide à la flamme. Après refroidissement à température ambiante, le tube en verre a été ouvert et l'hydrolysat a été évaporé à sec puis stocké pendant une nuit dans un dessiccateur. L'échantillon séché a été ensuite dissous dans 5 mL de tampon de chargement au lithium pH 2,20 et filtré à travers un filtre avec des pores de 0,45 µm de diamètre. L'analyse des acides aminés a été effectuée avec un analyseur d'acides aminés Biochrom 30 (Cambridge, Royaume-Uni), en

utilisant une colonne de 200 x 4,6 mm remplie d'une résine échangeuse d'ions et une dérivation post-colonne à la ninhydrine. L'acquisition de données a été effectuée à 570 et 440 nm et l'intégration de pics a été effectué à l'aide du logiciel "EZChrom Elite" (logiciel scientifique, Pleasanton, États-Unis). Tous les résultats sont des valeurs moyennes résultant de deux mesures indépendantes.

5.8 DENSITE OPTIQUE DES SUSPENSIONS S0

La densité optique à 500 nm (OD_{500}) met en évidence la présence de particules en suspension qui diffusent la lumière. La OD_{500} des suspensions S0 a été mesurée avec le même spectromètre que celui utilisé lors du dosage des protéines par absorbance à 280 nm. Les mesures ont été réalisées avec des cuvettes en plastique de trajet optique 1 cm. Les échantillons ont été préalablement dilués dans de l'eau lorsque l'absorbance à 500 nm était ≥ 0,8. Les AMI ont la particularité de décanter, ce qui fait que la valeur de l'absorbance des suspensions était très instable. La première valeur visualisée sur spectrophotomètre a donc été relevée, avant toute décantation des objets. Les mesures ont été effectuées sur 4 prélèvements différents au minimum.

5.9 ANALYSE DU GONFLEMENT DES PARTICULES DE POUDRE ETUVEE

Cette étape n'a été réalisée que dans les chapitres 2 et 4.

Nous avons essayé de suivre la solubilisation des particules de poudre étuvées dans l'eau. Cependant, il est difficile d'observer les AMI par une technique optique sans marquage au préalable, car les AMI sont transparents et qu'il est impossible de marquer la poudre sans la dissoudre dans un solvant. Toutefois, pour des temps d'étuvage long de la poudre (≥ 36 h), on est parvenu à les observer à l'aide du microscope à contraste de phase, en manipulant les filtres afin d'obtenir le maximum de contraste au cours de l'observation. La poudre étuvée 36 ou 72 h a été déposée entre lame et lamelle et une goutte d'eau désionisée a été introduite par capillarité entre lame et lamelle pour qu'elle puisse aller lentement au contact de la poudre. La lame est alors observée au cours du temps (temps total = 20 s) et des photos sont réalisées.

5.10 ANALYSE SDS-PAGE

Cette étape n'a été réalisée que dans le chapitre 2.

La séparation des protéines par SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) permet la séparation des protéines selon leur masse. Le SDS est une molécule chargée négativement capable de se fixer sur les chaînes polypeptidiques par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes. Les protéines se retrouvent alors déployées, possédant une charge nette négative équivalente qui les entraîne à migrer vers l'anode sous l'action d'un champ électrique. La séparation se fait alors selon leur masse au travers du gel de polyacrylamide faisant office de tamis moléculaire. Les protéines ayant un faible poids moléculaire seront moins retenues par les pores du gel et migreront donc plus loin que les protéines de haut poids moléculaires.

L'analyse SDS-PAGE a été réalisée à l'aide de gels polyacrylamides pré-coulés Mini-Protean 4-20 % Tris-HCl (Bio-rad Laboratories, Californie, Etats-Unis) selon la méthode décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). La solution de protéine a été diluée 5 fois dans un tampon dénaturant (77,975 % de 0,08 M Tris-HCl, pH 6,8 ; 2 % de glycérol ; 2 % de SDS ; 0,025 % de bleu de bromophénol) en condition dénaturante (avec ajout de dithiothréitol (DTT)) et non dénaturante (sans ajout de DTT), puis chauffée 3 min à 100 °C au bain-marie. Vingt µL d'échantillon ont été introduits dans chacun des puits du gel et les molécules ont été séparées à 200 V pendant 30 à 40 min. Les gels ont été colorés avec la solution de coloration Bio-Safe™ Coomassie Stain G250 (Bio-rad) pendant 1 à 2 h. Les gels ont été ensuite trempés une nuit dans une solution de décoloration (Ethanol 20 %). Le kit Precision Plus Protein™ unstained standards (Bio-rad) a été utilisé pour l'étalonnage du poids moléculaire.

5.11 EFFET DU PH SUR LES AMI

Cette étape n'a été réalisée que dans le chapitre 2.

Les suspensions S0 préparées à partir des poudres étuvées 36 h ont été divisées en 8 fractions. Sept de ces fractions ont été acidifiées à température ambiante avec quelques gouttes de HCl à 32 % (p/p) pour réaliser une gamme de pH allant de pH 2,22 à 7,67. La dilution des suspensions a été très limitée, et sera négligée. Les valeurs de pH ont été mesurées après agitation à température ambiante pendant 1 h. Les suspensions ont été diluées avec de l'eau désionisée ayant le même pH pour les

mesures de taille au Mastersizer, de OD_{500} et pour les observations de particules par CLSM. De l'acide chlorhydrique à 32 % (p/p) et une solution de NaOH 5 M ont été utilisés pour ajuster le pH de l'eau.

Après leur caractérisation, les suspensions à pH 2,22, 4,11, 4,75 et 5,25 ont été ensuite réajustées à pH ~7,6 avec NaOH 5 M et re-analysées de la même manière.

5.12 PROPRIETES D'ECOULEMENT DES SUSPENSIONS CONCENTREES EN AMI

Cette étape n'a été réalisée que dans le chapitre 2.

L'étude des propriétés d'écoulement des suspensions concentrées en AMI a été réalisée sur les culots P2, qui contiennent exclusivement les AMI. Afin de déterminer la concentration exacte en AMI dans ces culots, un gramme des culots P2 a été séché au Speed Vac Concentrator durant 13 h à 45 °C, puis pesé. La mesure a été réalisée en double. La masse sèche du culot P2 correspond alors à la masse d'AMI secs. Les concentrations en matière sèche dans les culots P2 pour les poudres étuvées 36 h, 24 h et 12 h étaient respectivement 32, 23 et 18 g/kg. Les culots P2 obtenus à partir des poudres étuvées de 24 à 72 h ont été alors dilués avec un tampon phosphate pH 6,5 pour ajuster leur concentration à 32, 23 et 18 g d'AMI sec/kg.

La viscosité apparente des suspensions en fonction de la vitesse de cisaillement a été mesurée avec un rhéomètre à contrainte imposée (Discovery HR-2, TA Instruments France, France) avec un système de couvercle scellé, pour éviter l'évaporation de l'eau au cours de la mesure. Une géométrie plan de 5 cm de diamètre réglée à une distance d'1 millimètre avec le plan du rhéomètre, régulé à la température de 20 °C, a été utilisée (Figure 14). Dans un premier temps, l'échantillon a été maintenu à 20 °C pendant 1 min pour l'équilibrage de sa température et pour permettre sa relaxation. Dans un deuxième temps, des mesures à 20 °C avec des vitesses de cisaillement allant de 1000 à 0,01 s^{-1} ont été appliquées. Deux répétitions ont été effectuées sur chaque échantillon.

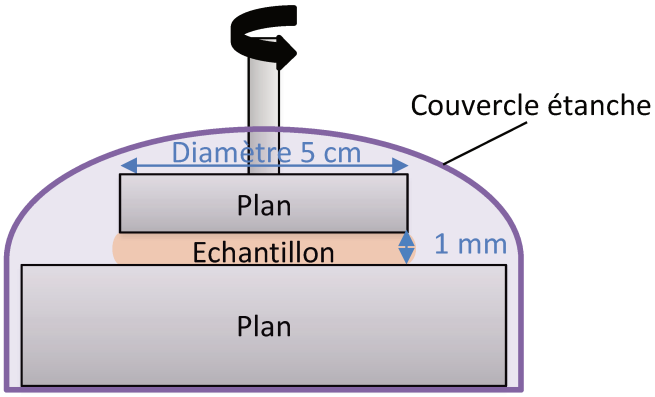


Figure 14 : Configuration expérimentale de la géométrie plan-plan.

La viscosité des suspensions concentrées en AMI ne peut pas être étudiée avec les AMI produits avec un séchage par lyophilisation, car les AMI sont très gros et décantent au cours de la mesure.

5.13 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Excel.

Un test ANOVA d'analyse de variance à un facteur permet d'étudier l'effet d'un facteur. Si $P>0,05$, le facteur étudié n'a pas d'effet significatif. Si $P<0,05$, le facteur a un effet significatif et un test de Student a été utilisé pour déterminer quels échantillons sont significativement différents deux par deux au seuil $P=0,05$.

La probabilité que deux variables soient corrélées entre elles a été déterminé selon la table de Pearson, en utilisant le coefficient de corrélation linéaire et le seuil $P=0,05$.

E. RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1 : ETUVAGE D'UNE POUDRE DE PROTEINES SERIQUES LYOPHILISEE : FORMATION D'AMI A PH 9,5

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article qui a été publié dans le journal « Journal of Food Engineering » (article 2). Les manipulations ont été réalisées avant mon arrivée par Elise Saleh, lors de son stage de Master 2 en 2014. Durant ma thèse, j'ai effectué les manipulations figurant dans le « Supporting Materials » concernant la partie S2 « Denaturation of whey proteins » figurant en annexe de la thèse. J'ai aussi participé à la réaction de l'article.

INTRODUCTION :

Gulzar *et al*. (2011b) ont étudié l'effet du pH sur la dénaturation et l'agrégation des PS induites par l'étuvage à 100 °C d'une poudre de protéines sériques à une a_w de 0,23. En effet, l'agrégation des PS peut être recherchée, car elle améliore les propriétés fonctionnelles des PS. Trois pH ont été étudiés : 2,5, 4,5 et 6,5. Plus le pH est élevé et plus il y a d'agrégats qui se forment. A pH 2,5 il y a formation d'agrégats solubles constitués de liaisons covalentes de type de ponts SS. A pH 4,5 et 6,5, des agrégats insolubles et des agrégats solubles se forment. Les agrégats solubles sont constitués de liaisons covalentes de type pont SS et aussi d'autre(s) type(s) de liaisons covalentes non identifié(s). Le lactose résiduel présent est responsable de la formation d'agrégats, puisque sans lactose, seul des petits oligomères se forment.

Notre objectif était de confirmer les résultats obtenus par Gulzar *et al*. (2011b) à pH 3,5 et 6,5. Très peu de travaux présentent l'effet du pH alcalin durant l'étuvage des PS. Cette étude a donc aussi été conduite à pH 9,5. A pH ≥ 9 la réactivité des groupements SH est augmentée du fait de leur caractère nucléophile. Cette réactivité accrue pourrait permettre la formation de ponts SS qui participe à la polymérisation des PS. De plus, il est connu que les pH alcalins ont un effet dénaturant sur la βlg (Cayot and Lorient, 1998).

Stratégie :

Notre stratégie a été de comparer la dénaturation et la formation d'agrégats de PS à différents pH, en reprenant les mêmes conditions d'étuvage que Gulzar *et al*. (2011b). Les poudres ont été étuvées à 100 °C avec une a_w proche de 0,23 à 3 valeurs de pH : 3,5, 6,5 et 9,5. L'a_w de 0,23 correspond à l'a_w

des poudres laitières industrielles séchées par pulvérisation. La dénaturation et l'agrégation des PS ont été étudiées au cours de l'étuvage des poudres. La réaction de Maillard a été quantifiée en mesurant l'indice de brunissement des poudres et la formation de CML.

Dans cet article, les suspensions S0 et les surnageants S1 et S1A ont été appelés respectivement solution 1, solution 2 et solution 3.

Dry heating a freeze-dried whey protein powder: formation of microparticles at pH 9.5

Marie-Hélène Famelart, Elise Schong, Thomas Croguennec

Abstract

We investigated the effect of dry heating (DH) a whey protein powder (water activity 0.23) at pH 3.5, 6.5 and 9.5 for up to 36 h at 100°C on the structural properties of proteins. Powder browning, particle structures in suspensions reconstituted from the dry-heated powders (DHP), residual native protein content and Maillard reaction markers were studied. The browning index of the DHP rapidly increased after 6-10 h of DH and then levelled off at all pH values. β-Lactoglobulin, α-lactalbumin and bovine serum albumin were denatured by DH at all pH values. In contrast to pH 3.5 and 6.5, DH at pH 9.5 led to abundant production of microparticles. The highly heterogeneous size of these particles was related to the initial powder particle size. One g of DHP in suspension led to 20 g of hydrated microparticles made from 0.5 g of dry material. Maillard reactions at pH 9.5 were probably involved in microparticle formation.

Keywords: Whey protein; Microparticle; Dry heating; Aggregation; Maillard reaction

1. INTRODUCTION

Whey proteins are well-characterised proteins purified from milk that are widely used in the food industry because of their high nutritional value and functional properties (de Wit, 1998; Krissansen, 2007; Madureira *et al*., 2007; Patel, 2015a, 2015b; Yadav *et al*., 2015). Many research groups have investigated increasing the functional properties of these proteins (El-Salam *et al*., 2009; Foegeding *et al*., 2002; Guyomarc'h *et al*., 2014; Nicolai, 2016), mainly by applying denaturation and aggregation processes, such as heat treatments.

Whereas many studies have been dedicated to heat treatment of whey proteins in solution, few studies have been conducted on dry heating (DH) of these proteins i.e. by applying the DH process to a powder or slurry. Protein modification is useful for the production of targeted ingredients, and DH can provide a natural and practical alternative to obtain protein modifications such as the grafting of hydrophilic carbohydrate residues onto proteins and their polymerisation (Augustin and Udabage, 2007). DH of whey proteins in the presence of lactose, even in trace amounts, leads to a series of very complex reactions known as the Maillard reactions. These reactions occur via multiple pathways: firstly, lactose condenses on the free amino groups (mainly lysine residues) of the whey proteins, these lactosylated proteins then undergo the Amadori rearrangement, leading to the formation of ketoamides. Reductones or dehydroreductones then form, and finally brown melanoidins and protein polymers appear as advanced glycation end-products (AGE), together with water (Schong and Famelart, 2017). These reactions are more intense in the dry state than in the liquid state (Morgan *et al*., 1999b, 1999a).

Most studies on whey protein DH have been conducted at a neutral pH or under acidic conditions, but a few studies have been carried out at alkaline pH values (Schong and Famelart, 2017). Liu *et al.* (1991) observed that DH bovine serum albumin (BSA) in the solid state at 37°C led to a dramatic aggregation of proteins and that this aggregation was pH-dependent. DH for 24 h at pH 7.3 led to 97% of the BSA becoming insoluble. This percentage changed to 31% at pH 5, whereas 100% aggregation was observed after 2 h of DH at pH 9. These authors also found that the thiolate ion content was a limiting factor for this aggregation, explaining this pH effect. Broersen *et al.* (2004) studied the glycation of β-lactoglobulin (βlg) with glucose or fructose in the dry state at 45 and 60°C for up to 5 h,

with a relative humidity of 65% and at pHs of between 5 and 8. They found that increasing the pH led to a linear increase in the degree of glycation. The effect of alkaline pH values may be associated firstly with a shift from the α- and β monosaccharide conformation to a more reactive one (i.e. the acyclic conformation), and secondly with a reduction in the activation energy of the Maillard reaction (Broersen *et al*., 2004; O'Mahony *et al*., 2017). Lysine residues are more nucleophilic and reactive at alkaline pH values than they are under other conditions (Martins *et al*., 2000; O'Mahony *et al*., 2017). Gulzar *et al*. (2012) studied the changes induced in a whey protein isolate (WPI) powder by a DH process at different pH values (2.5, 4.5 and 6.5), temperatures and levels of water activity (a_w). Increasing the time of DH, the a_w and the pH led to a decrease in the residual native whey protein content. However, at pH 2.5, soluble aggregates were formed with only intermolecular disulphide bonds, whereas at pH 4.5 and 6.5, soluble and insoluble whey protein aggregates were formed with disulphide bonds and other covalent crosslinks. The formation of these aggregates was due to the presence of less than 0.4 $g.kg^{-1}$ of residual lactose: DH of pure α-lactalbumine (αlac) and βlg at pH 6.5 only leads to dimers or small oligomers. If lactose was added to the αlac and βlg solution in the same proportion as that present in the WPI before DH, large aggregates formed (Guyomarc'h *et al*., 2014). Zhou *et al.* (2008) also studied DH (37°C for 2 weeks) of WPI in a dough mixture in different buffer systems with increasing pH values. Between pH 4 and 8, they reported a slight increase in insoluble protein aggregate formation, from 10 to about 11.5% of the total protein. These aggregates were formed through intermolecular disulphide bonds and non-covalent bonds, irrespective of the pH value during DH.

The aim of this study was to test the effect of alkaline pH values, as compared to the non-alkaline pH values tested by Gulzar *et al*. (2012, 2011b), on the behaviour of whey proteins during DH. Very few groups have reported the effect of DH at pH values above pH 7.5. We also performed preliminary characterizations of the particles formed during DH to determine if they displayed any potentially useful properties that could be exploited for use as food ingredients.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 MATERIALS

WPI powder was used as the source of purified whey proteins. This powder was obtained by spray drying a whey protein concentrate isolated from milk microfiltrate by ultrafiltration and diafiltration as described by Chevallier *et al*. (2018). One hundred g of this powder contained 5.37±0.10 g moisture, 5.92±0.16 g free lactose, <2 g of minerals (0.31 g Ca^{2+}, 0.02 g Mg^{2+}, 0.09 g Na^{+}, 0.16 g K^{+} as determined by atomic absorption spectroscopy (Chevallier *et al*., 2018)), <0.4 g of fat and 88.79±1.30 g of protein (as determined by the Kjeldahl method), among which 17% were caseins and 83% were whey proteins (as determined by SDS-PAGE electrophoresis (Chevallier *et al*., 2018)).

BSA, αlac, βlg standards were obtained from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) and Na-caseinate was obtained from Armor Protein (Saint-Brice-en-Coglès, France).

Nonafluoropentanoic acid (NFPA), hydrochloric acid 37%, sodium hydroxide, sodium borohydride, rhodamine isothiocyanate (RITC) and boric acid were obtained from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Carboxymethyllysine (CML) and (D2)-CML were provided by PolyPeptide Laboratories France SAS (Strasbourg, France).

2.1.1 PREPARATION OF SAMPLES

Samples were prepared using a protocol similar to that described by Gulzar *et al.* (2012) and the sample preparation procedure was repeated twice for each powder.

The isolate was dissolved in water (150 g/kg) and the pH adjusted to 3.5, 6.5 and 9.5 with either 10 to 5 M HCl or 5 to 1 M NaOH. Solutions were then immediately freeze-dried to a final a_w of 0.079 ± 0.006. Freeze-dried powders were rapidly crushed, and then conditioned to a_w ~0.23 at 20°C in a saturated CH_3COOH solution for 2 weeks. Powders were then dry-heated at 100°C in closed tubes.

Three DH trials were performed. In the first trial, powders were analysed after DH for 0, 12, 24 and 36 h. In the second trial, the powders at pH 3.5 and 6.5 were analysed after DH for 0, 12, 24 and 36 h, whereas the powder at pH 9.5 was analysed after DH for 0, 6, 12 and 24 h. In the third trial, the freeze-

dried powder at pH 9.5 and a_w ~0.23 was ground in a coffee grinder for 3.5, 5.0 or 25.0 s immediately before DH, and analysed after DH for 12 h.

Solution 1 was prepared by dissolution of each dry-heated powder into water with addition of NaN_3 (0.2 g/kg). Adjustment of the pH to 6.5 was performed by adding HCl or NaOH, and the final concentration was adjusted to 10 g powder per kg of suspension. Solution 1 was stirred for 4 h to ensure maximal solubilisation.

Solution 1 was centrifuged at 10000 *g* for 15 min at 20°C and the pellet (pellet 1) and supernatant (solution 2) were collected separately. Six hundred µL of a 0.5 M, pH 4.6, acetate-acetic acid buffer were added to 10 mL of solution 1. The suspension was then stirred until the pH reached 4.6, and was then centrifuged as described above. The resulting supernatant (solution 3) was then collected and stored.

2.2 METHODS

2.2.1 MOISTURE, PROTEIN AND FREE LACTOSE CONTENTS

Moisture and protein contents were determined according to international standard guidelines (International Dairy Federation, 2016, 2014, 2010, 2004). Free lactose content was determined by anion-exchange chromatography (Dionex ICS3000, Jouy en Josas, France) using a CarboPac PA1 column (250 mm x 4 mm) with pulsed amperometric detection, as described by Gaucheron *et al*. (1996). The powder was reconstituted in water and filtered by centrifugation at 10000 *g* for 30 min through a 10000 molecular weight cut-off membrane in a Vivaspin 20 centrifugal concentrator (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany). Lactose in the filtrate was quantified using lactose standards.

2.2.2 WATER ACTIVITY (a_W) AND POWDER COLOUR

Measurements of the a_w of powders were performed on a Novasina aw-centre RTD-200 instrument (Lachen, Switzerland), as previously described by Schuck *et al.* (2012).

Powder colour was determined using a microcolour tristimulus colorimeter (Chromameter, CR-300; Minolta, Carrières-sur-Seine, France) with the CR-A50 cell for granular material attachment. The total plane of the cell was covered with powder and two replicate measurements were carried out on

each powder sample. The colour L*a*b* values were measured according to the CIE-LAB (Commission Internationale de l'Eclairage, 1971) system, where L* is the whiteness or brightness/darkness, a* is the redness/greenness and b* is the yellowness/blueness. The browning index (BI) was calculated as described by Maskan (2001) using the following equations:

$$\mathrm{BI} = \left[\frac{100(x-0.31)}{0.17}\right] \qquad \text{equation 1}$$

$$\text{with } x = \frac{(a^{*}+1.75L^{*})}{(5.645L^{*}+a^{*}-3.012b^{*})} \qquad \text{equation 2}$$

2.2.3 ANALYSES OF MICROPARTICLES

The presence of light scattering particles was determined as described by Gulzar *et al*. (2011b) by measuring absorbance at 500 nm. Absorbance at 500 nm was measured for solutions 1 and 2, without dilution, using a UVIKON spectrometer (Serlabo Technology, Entraigues-sur-la-Sorgue, France).

The size distribution of particles with sizes of 0.02-2000 µm was measured in solution 1 at 20°C using a Mastersizer 2000 (Malvern Instrument, Worcestershire, UK), as described by Nyemb *et al.* (2014).

The sample (~0.5 mL) was dispersed into the fluid flowing through the measurement cell to reach an obscuration of 7-8%. Measurements were made in triplicate and expressed as the mean diameter in volume (D[4,3]) of the population using the refractive index of water and whey proteins at 20°C, *i.e.* 1.33 and 1.52, respectively (Chapeau *et al*., 2017; Hodgman, 1962).

The pellet (pellet 1) was weighed, dried under vacuum with a SpeedVac SVC 100H (Savant Instrument Inc., Farmingdale, NY, USA) and weighed in the dry state. The weights of the wet and dried pellets were then calculated for an equivalent of 100 g of solution 1. As 100 g of solution 1 contained 1 g of dry-heated powder, the weights represent the yield of microparticles formed by DH and are expressed in g/g of dry-heated powder.

2.2.4 CARBOXYMETHYLLYSINE (CML) DETERMINATIONS

CML was used as a marker for the levels of AGE produced during the Maillard reactions. CML levels were determined using the method described by Niquet-Léridon and Tessier (2011). Briefly, powders (equivalent to 10 mg of protein) were reduced with 1.5 mL of borate buffer (200 mM, pH 9.5) and 1

mL of sodium borohydride (1 M in 0.1 M NaOH) at room temperature for 4 h. Hydrolysis was then carried out in 6 N hydrochloric acid at 110 °C for 20 h. Hydrolysates were vacuum-dried and the dry residues were reconstituted with 20 mM NFPA containing the internal standard (D2)-CML. After filtration through a 0.45 µm filter (ref : 2105033 - Sodipro, Echirolles, France), samples were analysed on a TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) liquid chromatograph coupled to a tandem mass spectrometer (MS/MS). Quantification of CML was achieved by measuring its peak ratio relative to the corresponding internal standard and by comparison with a calibration curve. The linear range of CML was 1 to 200 ng/mL. Analyses were done in duplicate.

2.2.5 PHASE CONTRAST AND CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY (CLSM)

Microscopy was used to compare the morphology of powders and microparticles present in solution 1.

For light microscopy, powder samples were simply deposited on a glass lamella and observed in transmitted light using a 4X objective on a light microscope (Olympus BX51, Rungis, France) equipped with a Qiclick camera and the Archimed software (Microvision Instruments, Evry France).

For CLSM, RITC (0.8 mg) was dissolved in 95 µL dimethyl sulfoxide. Five µL of this solution were added to 0.5 mL of solution 1 to reach a final concentration of 0.084 mg/mL. Five µL of this sample were deposited on a glass lamellae and observed with a TE2000-E Nikon C1Si inverted confocal laser scanning microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) using a X10 objective, a 543 nm wavelength helium-neon laser and a detection wavelength of 590 ± 25 nm. Each image was digitized on a grey scale as a 512 x 512 pixel matrix, representing 1273 x 1273 μm^2.

2.2.6 RESIDUAL NATIVE PROTEINS

Protein content in solution 3, i.e. proteins that were soluble at pH 4.6, represents the content in residual native proteins. They were first evaluated by the Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951), using a calibration curve made with βlg.

Solution 3 was also analysed by size-exclusion chromatography using a TSK G3000SWXL column (300x7.8 mm id., Phenomenex, LE PECQ, France) and a phosphate buffer eluent (0.05 M phosphate, 0.1 M NaCl, pH 7) at a flow rate of 0.8 $mL.min^{-1}$. BSA, αlac, βlg and Na-caseinate standards were used

for calibration. Solution 3 was diluted 1/5 in the eluent and filtered through an Acrodisc 0.2 µm membrane (Sigma Aldrich Chimie, Lyon, France) to remove residual insoluble particles. Fifty µL of sample or standard were injected. Protein concentrations in the samples were quantified by comparison of peak areas with those of each standard.

2.2.7 STATISTICAL ANALYSES

Data are expressed as the means (± the standard deviations), as shown on the graphs. Sample comparisons were performed using the Student's t-test and the Excel software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 CHANGES IN THE WPI POWDER AFTER DH AT DIFFERENT PH VALUES

The BI of dry-heated powders increased with the time of DH, most rapidly between 0 and 12h and then levelled off until 36 h. The BI at the end of DH was higher at pH 3.5 than at pH 6.5 and 9.5 ($P<0.02$), with no significant differences in BI between the latter two powders ($P>0.5$) (Figure 15). Gulzar (2011b) also studied the browning of dry-heated WPI powders with a_w=0.23 at 100°C, but compared BI at pH 2.5 and 6.5, reporting that the BI was higher for the powder at pH 2.5 after 24 h of DH. In our second trial, we made our first measurement of BI for the powder at pH 9.5 after a shorter time interval of only 6 h of DH. We found that at pH 9.5, the BI reached its peak value after 6 h, and then levelled off until 24 h. We have no data for the 6 h time point for the two other pH values, but it seems that heating of the powder conditioned at pH 3.5 led to a browning that continued after 12 h, but at a slower rate, whereas for the higher pH values, browning was complete by 12 h or even 6h at 9.5. This is also evidenced on the photographs of the powders (Figure 15: inset) were the brown colour continued to increase over time for the powder at pH 3.5, whereas it did not continue to change over time for the other pH values. Gulzar (2011b) reported that the browning reaction started faster at pH 6.5 than at the lower pH, but then levelled off more rapidly at pH 6.5 than at pH 2.5. Such changes in the rate of browning over time have also been reported by others during the DH of WPI powders at 60°C (Norwood *et al.*, 2016b), and are mainly due to the residual lactose content of the powders (Norwood *et al.*, 2017). Indeed, differences in lactose content could explain why WPI dry-heated at 60°C in 79% relative humidity for up to 7 days without addition of any saccharides do not present colour changes,

whereas the a* dramatically increases after addition of glucose (Liu *et al.*, 2014). In addition, BI values have been reported to increase from ~5 to ~30 after DH a WPI for 48 h with maltodextrin at 60°C in 80% relative humidity (Martinez-Alvarenga *et al.*, 2014), and from 15 to 100 for a whey protein powder and from 15 to 60 for a WPI after 3-month storage at 60°C (Norwood *et al.*, 2017). These changes occur because BI is an indirect measurement of the development of the Maillard reaction, and correlates with the content of available amino groups (Martinez-Alvarenga *et al.*, 2014).

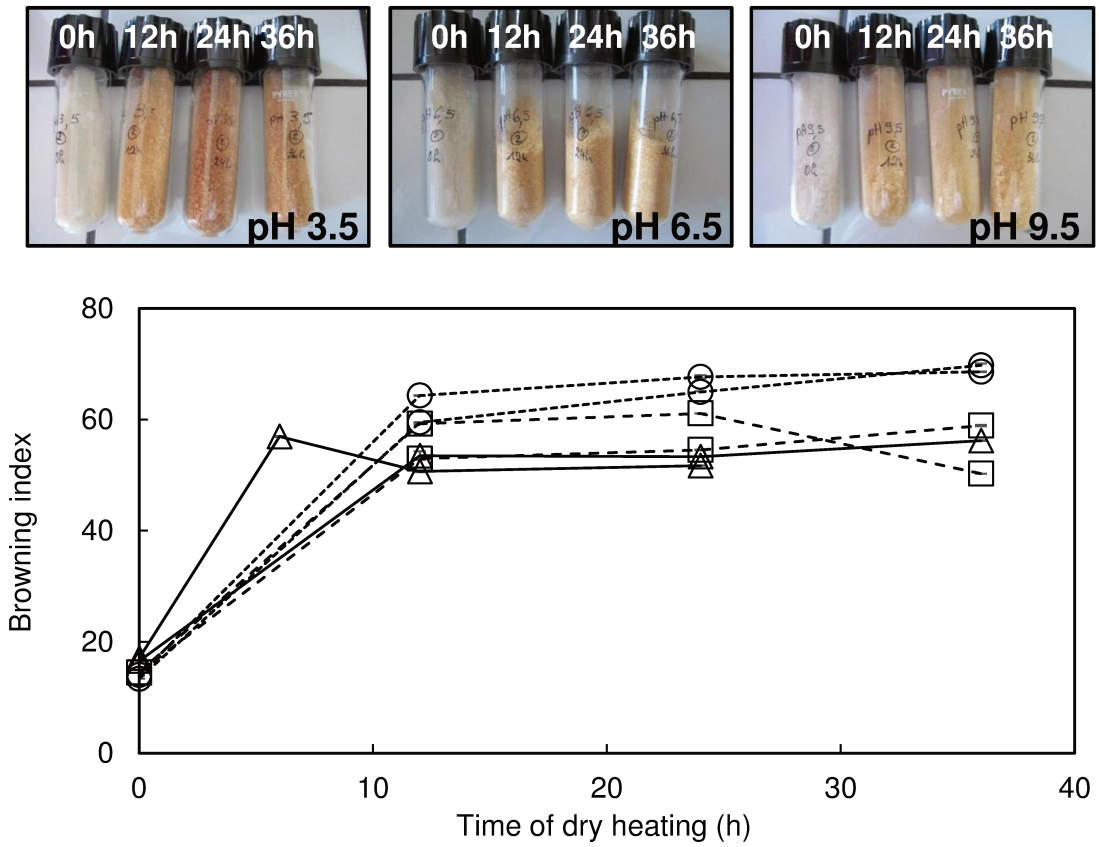


Figure 15: Browning index for powders dry-heated at pH 3.5 (○), pH 6.5 (□), pH 9.5 (△), as a function of time of dry heating (DH) at 100 °C, as measured with the colorimeter. Two replicate measurments were made for each experiment. In the inset: photographs of the powders.

3.2 CHARACTERIZATION OF THE SUSPENSIONS OF DRY-HEATED POWDERS

Solution 1 obtained from the powder dry-heated at pH 9.5 was cloudy, with the presence of spangles that looked iridescent, whereas the solution 1s made from powders dry-heated at pH 3.5 and 6.5 were only mildly cloudy. This cloudy appearance at pH 9.5 was probably due to the presence of microparticles. Such microparticles have never been reported to appear after DH of a WPI powder. However, to our knowledge, this is the first time that DH of a whey protein at pH 9.5 has been reported.

The presence of particles after DH was confirmed by absorbance measurements of powder solutions 1 and 2 (Figure 16). When the powder was conditioned at pH 3.5, absorbance for solution 1 increased rapidly with the DH time up to 24 h but then decreased at 36 h, whereas at pH 6.5, the increase was less pronounced and more progressive until 36 h of treatment. At pH 9.5, the increase in absorbance was much larger, beginning at 6 h and then levelling off until 36 h of treatment. Absorbance, indicating the presence of residual aggregates, was detected in solution 2 from powders DH at pH 6.5 and 3.5, whereas no significant levels of absorbance were detected in solution 2 from the powder DH at pH 9.5. We assumed that the soluble aggregates had been transferred into larger particles after DH at pH 9.5. Our absorbance values correlate well with those obtained by Gulzar *et al.* (2011b). These authors reported that increasing the pH from 2.5 to 6.5 increases the turbidity of the suspensions prepared with dry-heated whey protein powder.

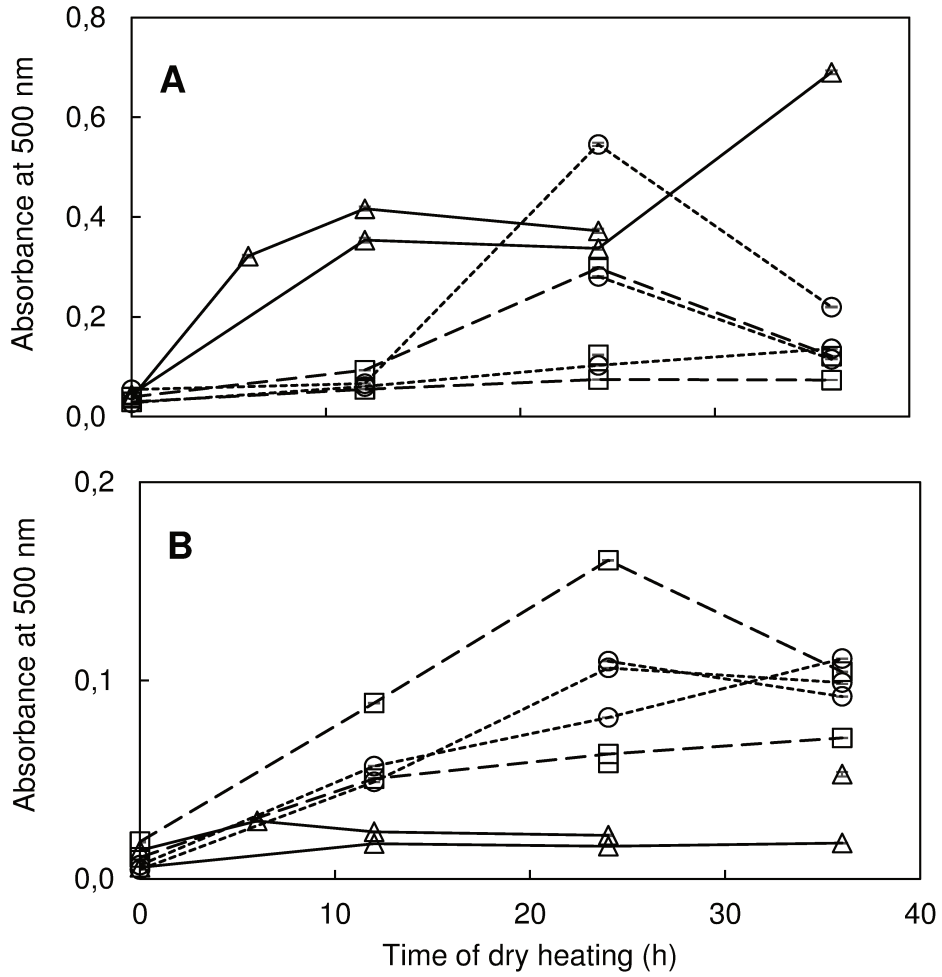


Figure 16: Absorbance at 500 nm as a function of time of DH for A: solution 1 and B: solution 2 reconstituted from powder dry-heated at pH 3.5 (○), 6.5 (□) and 9.5 (△). Two replicate measurements were made for each experiment.

We then characterized the sizes of the particles obtained by dissolution of the dry-heated powders (Figure 17). The mean size of particles in solution 1 made from powders before DH (i.e. at 0 h DH) was 75 ± 9 nm. These particles are likely to be made of insoluble matter, formed as a result of denaturation/aggregation events occurring during the spray drying of the initial WPI powder and/or during the exposure to the different pH values followed by the freeze drying process. As these solutions were not diluted before analyses, as compared to solution 1s obtained after 24 and 36 h of DH that were diluted ten times, these aggregates were present only in small amounts and did not lead to opalescence of the solution. After DH for 36 h at pH 3.5, the mean size of the particles slightly increased to 97 ± 7 nm (Figure 17A). A larger increase in particle size (153 ± 8 nm) was observed after 36 h of DH at pH 6.5 (Figure 17A). Gulzar *et al.* (2011b) also found that the increase in size after DH was larger at pH 6.5 than at pH 2.5 or 4.5, although the size increases reported in their study (220±86 nm after DH) were larger than those described here. The mean size of the particles or D[4,3] in the suspensions prepared from the powder dry-heated at pH 9.5 showed a dramatic increase to 700 µm (Figure 17B), whereas the mean size of the soluble particles present in solution 2 showed a small decrease (Figure 17A; triangles). This result agrees with the hypothesis that the soluble aggregate material disappears to form the large particles as the time of DH increases at pH 9.5. The size distribution of microparticles in solution 1 prepared with the powder dry-heated at pH 9.5 for 24 h is shown in Figure 17C. Particles of 50-2000 µm in size were present. The presence of these particles, termed whey protein microparticles (WPM), explains why solution 1 obtained from powders dry-heated at pH 9.5 appeared as more of a suspension than a real solution. Gulzar *et al.* (2011b) also found that some insoluble material formed after DH at pH 4.5, but not at pH 2.5. They found that the insoluble material was even more abundant pH 6.5, with the insoluble aggregates accounting for 52% of the total protein in their study. Also, as reported by Liu *et al*. (1991), the solubility of BSA decreases during the time course of DH at 37°C for up to 24 h: this decrease being much larger at pH 9 than at pH 7.3, and much smaller at pH 5.

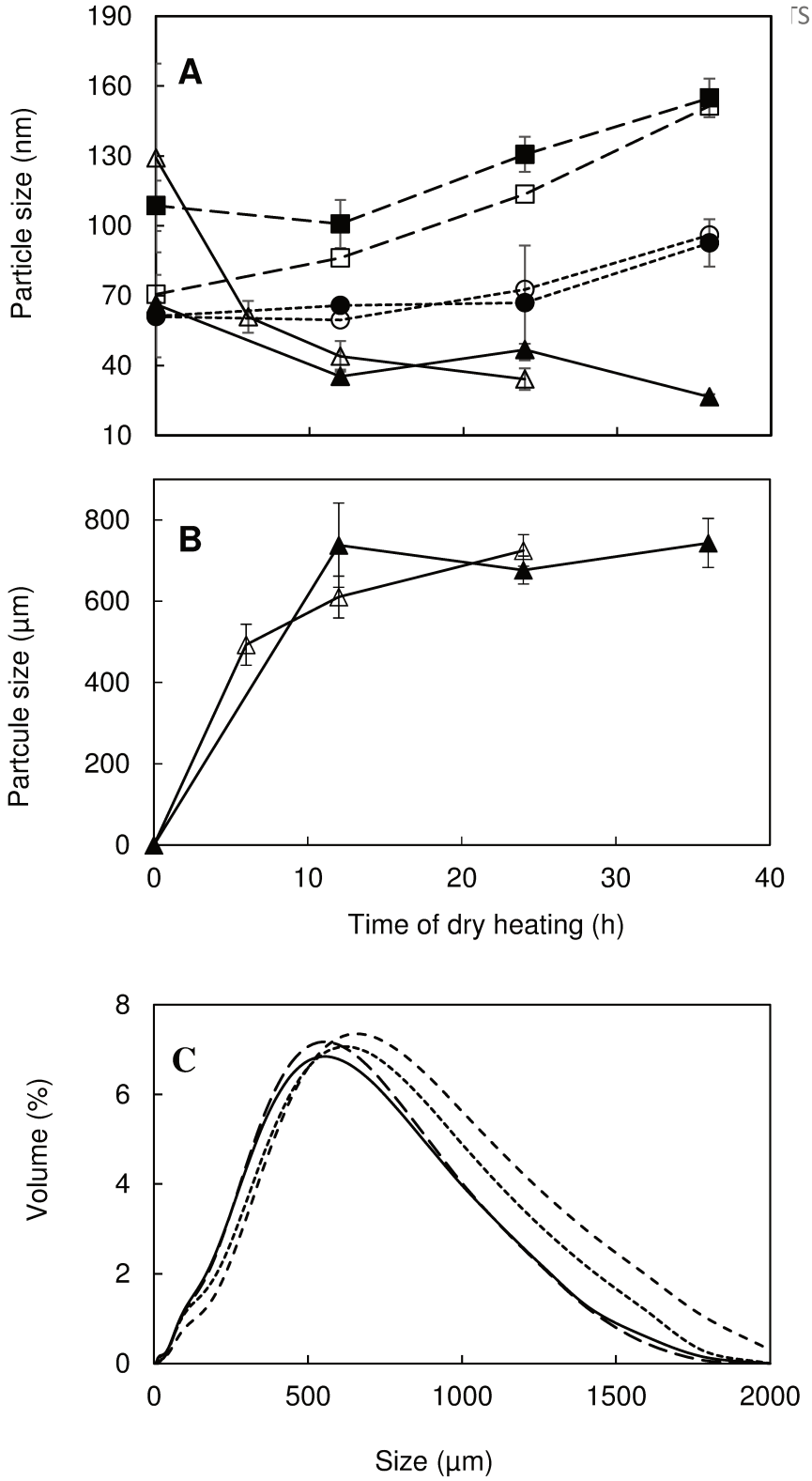
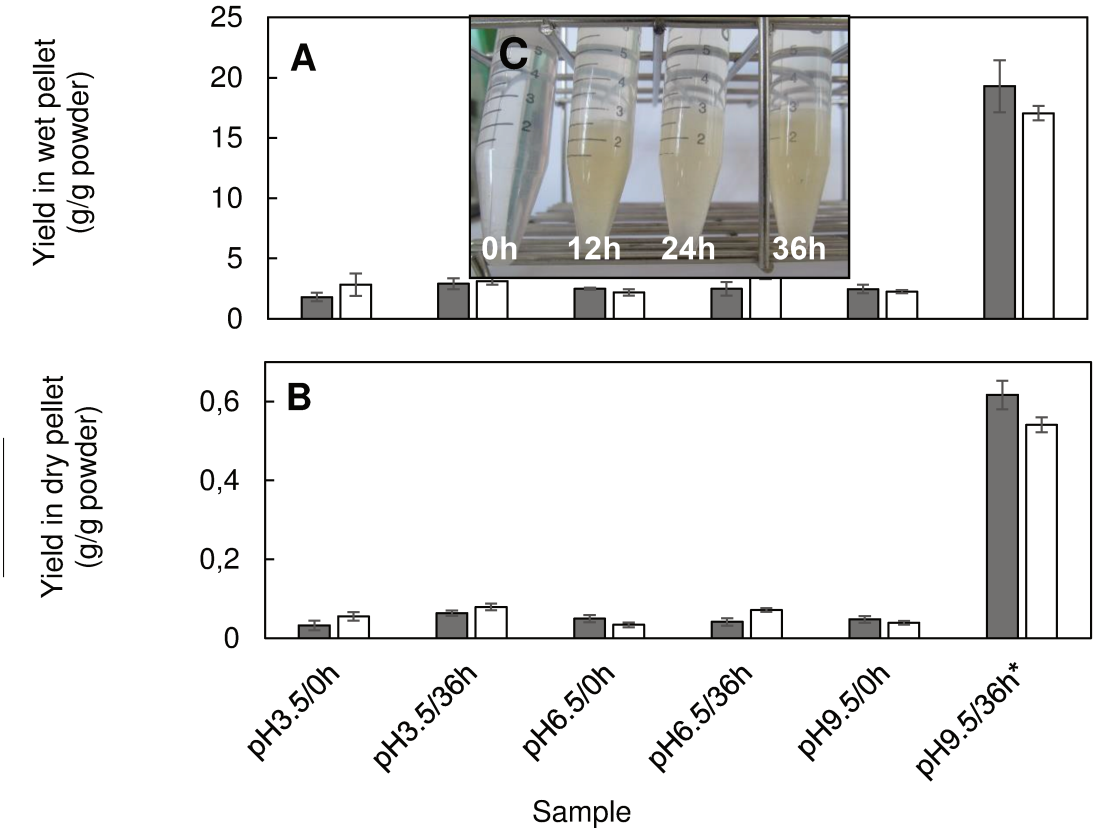


Figure 17: Mean particle size as a function of the time of DH. A: in solution 1 reconstituted from powder dry-heated at pH 3.5 (○,●) or at pH 6.5 (□,■) and in solution 2 (supernatant of solution 1) obtained from the powder dry-heated at pH 9.5 (△,▲), as analysed with the Zetasizer Nano-ZS. B: in solution 1 reconstituted from the powder dry-heated at pH 9.5, as measured with the Mastersizer 2000 (△,▲). Two replicate measurments were made for each sample (open and closed symbols). C: size distribution of particles present in solution 1 prepared from the powder dry-heated at pH 9.5 for 24 h (experiments were conducted in duplicate, with each value presented as the mean of three measurements on two different dry-heated powders)

The wet and dry weights of the pellet were used to evaluate the quantity of microparticles formed during DH and assess their ability to immobilize water (Figure 18). At pH 9.5, 100 g of solution 1 containing 1 g of powder material yielded about 20 g of wet pellet at the end of DH (19.28 ± 2.15 g and 17.04 ± 0.60 in the two trials, Figure 18A). At the other pH values, DH led to the formation of less than 3 g of wet pellet. Samples prepared from powders before DH also led to a pellet of less than 3 g. These results lead us to conclude that DH had only a minimal effect on the weight of the pellet at pH 3.5 and 6.5. Conversely, at pH 9.5, the weight of the pellet was very large compared to the initial 1 g of suspended powder material used in the trial. The yield of dry material was less than 0.07 g/g powder for samples prepared from powders before DH and for those from powders after DH at pH 3.5 or 6.5 (Figure 18B). Dry yield reached more than 0.5g/g powder at pH 9.5 (0.62 ± 0.04 g/g powder after 36h and 0.54 ± 0.02 g/g powder after 24h of DH; Figure 18B). This means that more than half of the powder was transformed into WPM by DH and that WPM were able to incorporate large amounts of the aqueous phase. Gulzar *et al.* (2011b) also found that 52 % of the proteins were present as insoluble aggregates after DH a WPI at 100°C for 24 h, but there was no mention of the pellets accounting for the large volumes in their study.

CML contents of the initial whey protein powder and in the sample dry-heated at pH 9.5 for 36 h were found to be 178±12 and 1759±152 ng/mg protein, respectively. As compared to liquid products, such as condensed milk that contains 400 ng CML/mg protein (Hartkopf et al., 1994), the initial powder was already rich in CML and these levels were expected to increase further after DH. It is well known that heating in the dry state enhances glycation and formation of Maillard products more than heating in the liquid state (Liu et al., 2012; Morgan et al., 1999b, 1999a, 1998). Following other markers of the Maillard reaction by fluorescence measurements confirmed that the Maillard reaction occurred during DH of the powders at the three pH values (see Figure S1; Supplementary Material).



*The grey bar is for 36 h and the white bar is for 24 h of dry heating

Figure 18: Yield of pellet 1 obtained by centrifugation of solution 1: A) in g of wet pellet obtained for 1 g powder; B) in g of dry pellet obtained for 1 g powder. Grey and white bars represent 2 repeated trials for powder dry-heated for 0 h or for 36 h (or for 24 h for the second trial ay pH 9.5); C) pictures of pellet 1 obtained from 10 g of solution 1 prepared from the powder conditioned at pH 9.5 and dry heated.

We used CLSM to visualise the WPM (Figure 19A) and optical microscopy to visualise powder particles (Figure 19B) and compare the size distribution and morphology of these two kinds of particle. We found that the powder particles had an irregular, sharp, flake-like structure (Figure 19B), as described elsewhere for freeze-dried particles (Haque and Roos, 2006; Miao and Roos, 2004). The sizes were very heterogeneous, ranging from 20-200 µm. There was no difference in powder particle size before and after DH, regardless of the pH value. The presence of WPM in solution 1 obtained from the powders dry-heated at pH 9.5 was confirmed by the CLSM observation of the solution. While no aggregates larger than the resolution of the microscope were visible in solution 1s prepared with powders dry-heated at pH 3.5 and 6.5 (not shown), large microparticles of over 200 µm in size were evident in solution 1 prepared from the powder dry-heated at pH 9.5, even after only 12h of DH (Figure 19A). Although evaluation of the size distribution of the powder particles from the photographs was

difficult, due to the small total size of the photographs and the limited number (2-20) of particles/micrograph, it appears that there are no large differences between the size of the microparticles in solution 1 and the size of the powder particles. Both the CLSM and Mastersizer (Figure 17C) estimates of the size of the WPM in the powder dry-heated at pH 9.5 indicate the presence of a particle population with a size range of 50-2000 µm. This leads us to hypothesise that the WPM observed in solution 1 prepared from the powder dry-heated at pH 9.5 are powder particles partially insolubilized by the DH process in reticulated microparticles. The freeze-dried powder has a very low density due to the presence of occluded air; this may explain the huge content of aqueous phase retained by the WPM. We calculated that 0.58 ± 0.05 g of WPM were obtained from 1 g of protein powder during the course of the DH at pH 9.5. This resulted in 18.16 ± 1.59 g of hydrated WPM, meaning that 96.8 ± 0.1 % of the hydrated WPM are made of water. Of course, this water content includes the interstitial water (*i.e.* the water trapped between WPM in the pellet) but can still be considered as a very high moisture content. Moreover, these microparticles appeared to remain stable over time for more than 2 weeks after their rehydration: absorbance of solution 1 at 500 nm remained constant during the storage time. This is the first time that this type of behaviour after DH has been reported in the literature.

Using pH values of between 7.0 and 11.5 during the DH of WPI (See part S2. in the Supplementary Materials) led to the formation of WPM, with small changes in the yields. Two particular ranges of pH gave interesting results: pH 8-8.5, where the powder browning and the water retention in WPM were maximal and the dry yield was minimal and pH 11-11.5, where WPM content was the highest. Production of ammonia was also evidenced above pH 10.5, probably due to deamination of proteins. To our knowledge, the testing of such alkaline pH values during the DH of whey proteins has never been reported in the literature. These results highlight the fact that it is possible to form WPM over a large range of pH values, from pH 7.0 to 10.5, without extensive protein deamination.

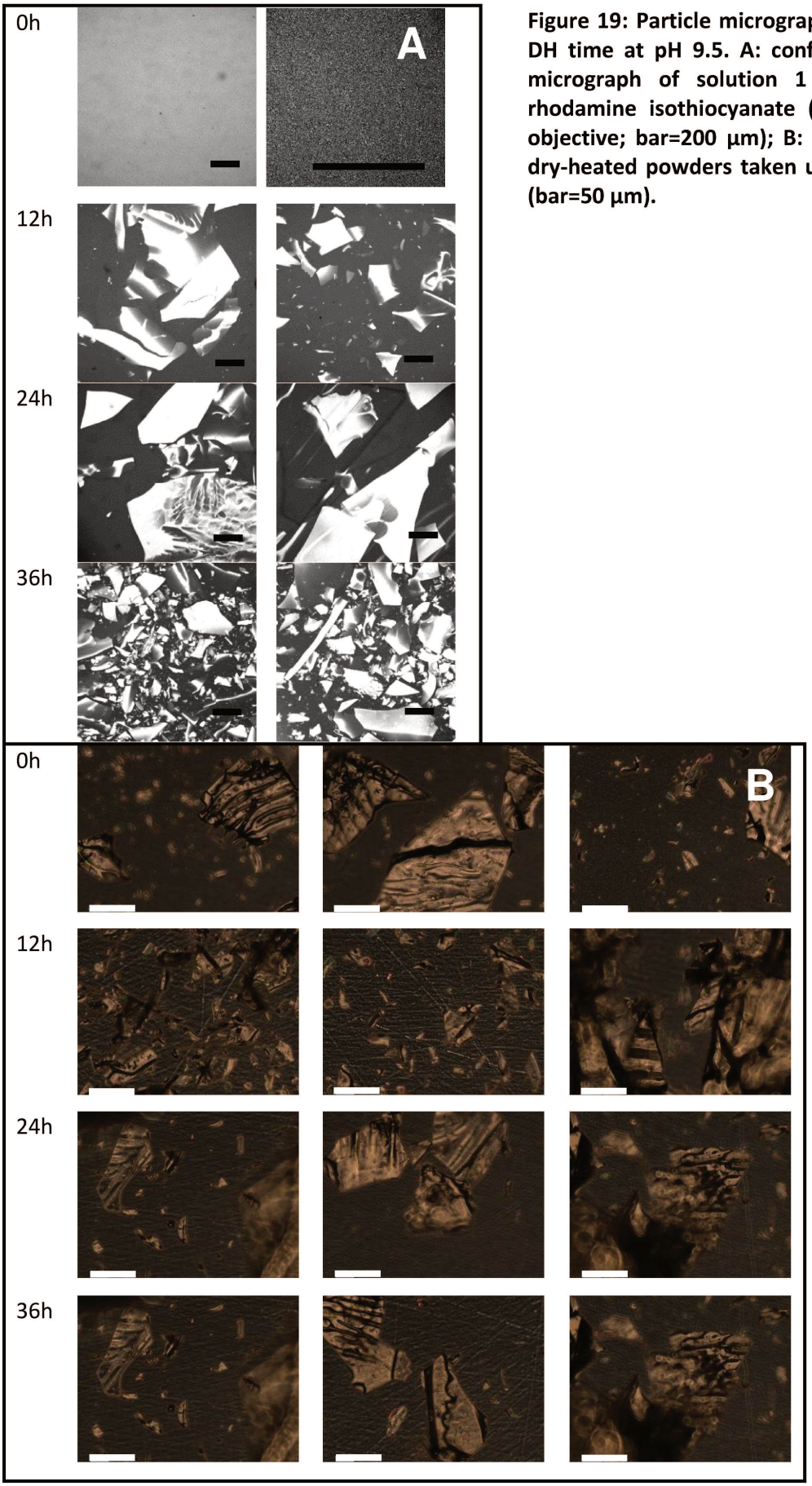


Figure 19: Particle micrographs as a function of DH time at pH 9.5. A: confocal laser scanning micrograph of solution 1 after addition of rhodamine isothiocyanate (taken using a 20X objective; bar=200 µm); B: light micrograph of dry-heated powders taken using a 4X objective (bar=50 µm).

3.3 COMPOSITION OF WHEY PROTEIN MICROPARTICLES

We determined the concentrations of residual soluble proteins (BSA, αlac, βlg) in solution 3 by chromatography (Figure 20A to C) and by the Lowry method (Figure 20D). Proteins were progressively denatured/aggregated during the course of DH. Protein contents are expressed as a % of their total contents in the WPI solution before pH adjustment and drying of the initial WPI. At pH 3.5 and 6.5, the soluble protein contents at 0 h of DH were 100 %. At pH 9.5 and 0 h of DH, the soluble protein content was only 50 % for βlg and 90 % for BSA and αlac. This shows that the pH adjustment to 9.5 followed by the freeze-drying induced denaturation/aggregation of the proteins, mainly of βlg. The denaturation of βlg at alkaline pH values is well known: the alkaline denaturation of βlg observed at pH 7.5 consists of a reversible local unfolding and loosening of the conformation, called the Tanford transition (Boye *et al.*, 1996; Roels *et al.*, 1971; Tanford *et al.*, 1959; Tanford and Taggart, 1961), and a partial unfolding and polymerization above pH 9 (Monahan *et al.*, 1995; Partanen *et al.*, 2011; Taulier and Chalikian, 2001). BSA also partially unfolds and forms a molten globule-like structure between pH 7 and 11, and becomes totally unfolded at pH 13 (Qu *et al.*, 2010; Sen *et al.*, 2008). We found that DH of the powder at all pH values led to further denaturation of the proteins. At 12 h of DH, almost 50 % of the proteins were no longer soluble (Figure 20C). At pHs 6.5 and 9.5, around 20 % of the native proteins remained after 36 h of DH, however, the levels of native αlac and βlg reached 0% after 12 h of DH at pH 3.5. We suspect that the exposure of these proteins to acidic pHs, together with heating, may have induced acid hydrolysis of αlac and βlg, whereas BSA could be more resistant to this heat/acid treatment. Finally, the three proteins were denatured and probably incorporated into soluble aggregates of 100-150 nm in size at pH 3.5 and 6.5, and into insoluble WPM of 50-2000 µm in size at pH 9.5. We confirmed the denaturation of the whey proteins by measuring the heat flow during DH in a differential scanning calorimeter. The peaks observed during heating were dramatically modified by the DH treatment, indicating severe denaturation during the DH at all the studied pH values (Figure S3; Supplementary Material). Denaturation of whey proteins during DH, though limited as compared to heating in a liquid state, has been reported previously at high temperatures, during long heating times and at high a_w values (Schong and Famelart, 2017). The intensity of this denaturation correlates with the residual lactose content (Norwood *et al.*, 2017), but has been reported to be less intense at pH 2.5 than at pH 4.5 and 6.5 (Gulzar *et al.*, 2011b). The results obtained in our current study are thus consistent with the literature.

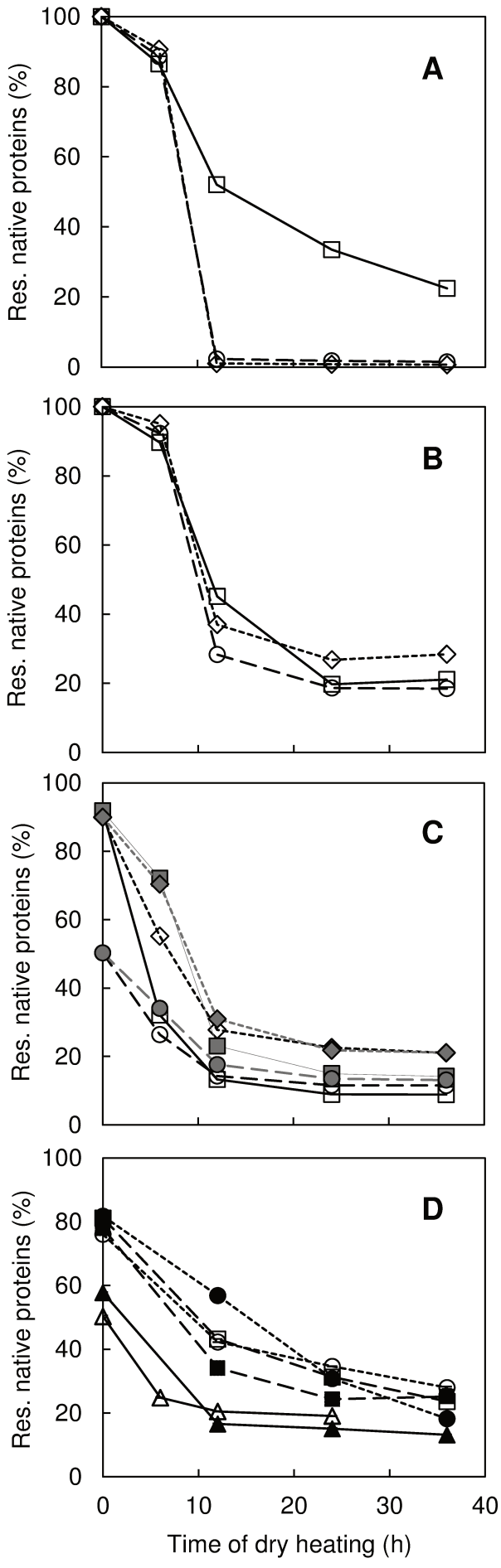


Figure 20: Residual native proteins versus time of DH of powder. A: protein content measured by gel filtration chromatography for powders at pH 3.5; B: at pH 6.5; C: at pH 9.5. Bovine serum albumin (□), β-lactoglobulin (○) and α-lactalbumin (◇). D: protein content measured by the Lowry method for powders dry-heated at pH 3.5 (○); pH 6.5 (□); pH 9.5 (△). Two replicate measurments were made for the powder DH at pH 9.5 (closed and open symbols).

3.4 EFFECT OF POWDER GRINDING

To test the hypothesis that the size of WPM formed by DH powders at pH 9.5 were related to the size of the powder particles, powders were ground more severely before DH for 12 h the same way as above. The size of powder particles and of microparticles decreased (Figure 21). This proves that the size of WPM observed after a DH at pH 9.5 was related to the powder particle size and that reducing the size of the powder particles produced WPM of smaller size.

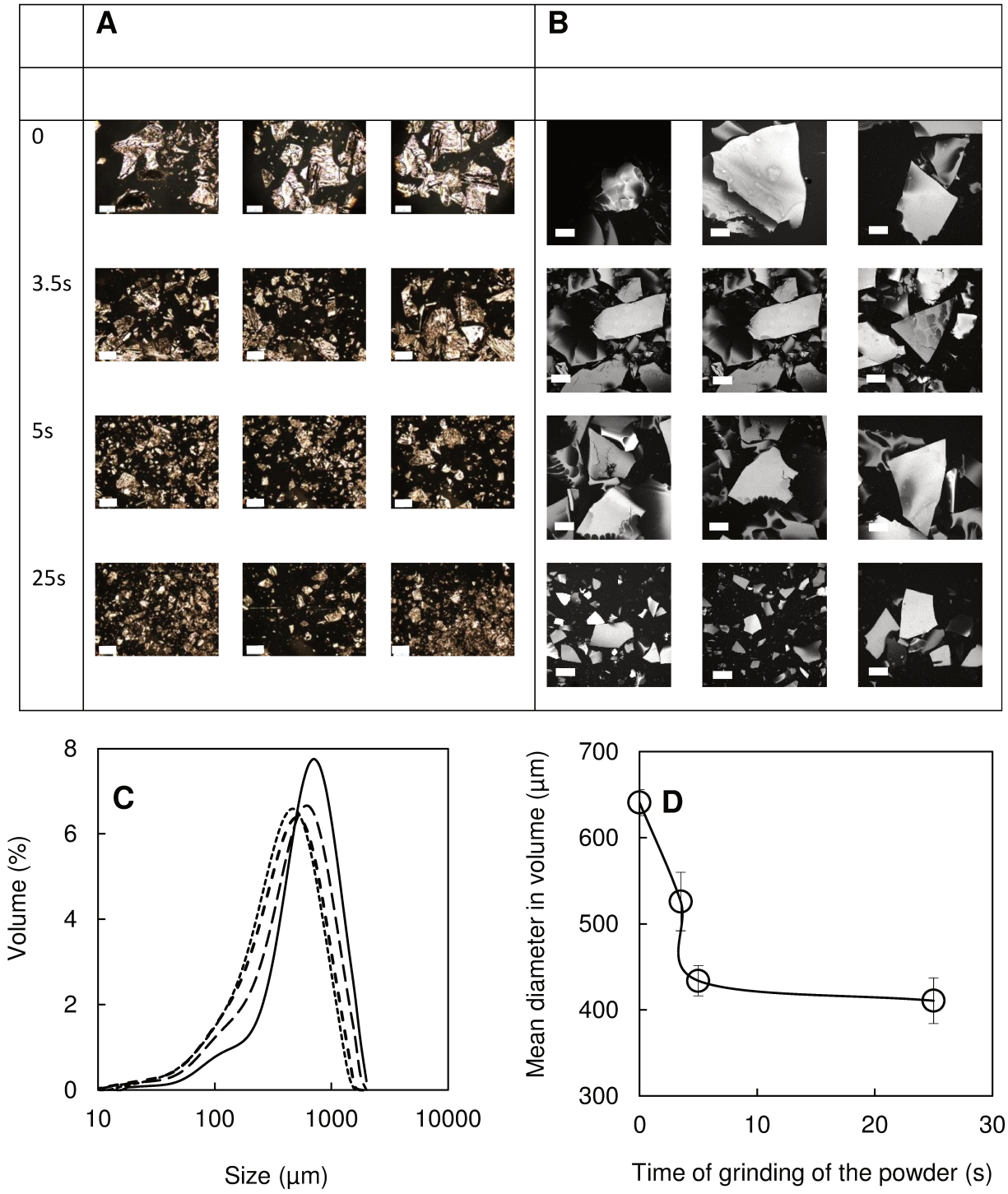


Figure 21: Effect of grinding of the powder conditioned at pH 9.5 before DH. A: light micrographs as a function of the time of grinding of powders (4X objective; bar=30 µm); B: confocal laser scanning micrographs as a function of the time of grinding of powders dry-heated for 12 h and reconstituted to form solution 1 (x20; bar=200 µm). C: size distribution of particles in solution 1 made with powders ground for 0 s (——), 3.5 s (— —), 5 s (- - -) and 25 s (-----); D: D[4,3] of particles as a function of the time of grinding of the powder.

4. CONCLUSIONS

DH at pH 9.5 of a WPI powder at 100°C for 36 h at a_w ~0.23 produced stable WPM of a size related to the powder particle size, whereas no WPM where formed by DH at pH 3.5 and 6.5. The DH at pH 9.5 resulted in the three proteins, βlg, αlac and BSA, being polymerised into the WPM. These WPM were highly hydrated and could result in high viscosities if added into liquids. Maillard reactions may play a role in the reticulation, as traces of lactose were present at the beginning of the process and AGE were detected in the dry-heated powders. However, the formation of AGE alone was not sufficient to account for the formation of WPM, as DH at pH 3.5 and 6.5 also led to AGE formation without formation of any WPM. Cho *et al.* (1984) published a study on the mechanisms of polymerisation of lysozyme by DH in the presence of glucose at 50°C in model mixtures. They evidenced that when the lysozyme, which had been dry-heated with glucose for 10 days, is further dry-heated without glucose, the lysozyme polymerisation proceeds. Moreover, when the lysozyme, which had been dry-heated with glucose for 10 days, is further dry-heated with intact lysozyme but without glucose, polymerisation also proceeds, incorporating 40% of intact lysozyme molecules. This led the authors to hypothesise that bifunctional groups form during the first step of DH, such as highly reactive dialhehydes (*i.e.* α-dicarbonyls), that are able to link together two amino groups. These bifunctional groups are bound firstly to the Lys, Arg or Trp residues of lysozyme through the first functional group and then bound secondly, with the remaining functional group, to Arg and Lys residues of another lysozyme molecule, the former amino acid being more reactive. They also evidenced that sugar can be an inhibitor of the polymerisation. However, this mechanism does not explain why polymerisation occurred at much higher levels at pH>7. We propose that the pH effect is related to the alkaline-induced unfolding of βlg, which may expose amino acids and promote the glycation reaction. Further work is needed to study the mechanisms of whey protein reticulation at alkaline pH values, such as the role of unfolding and of glycation, and to demonstrate the potential functionalities of the microparticles.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Regional councils of Brittany (grant N°13008651) and Pays de la Loire (grant n°2014-07081) for the financial support and INRA for scientific coordination (J. Leonil) through

the interregional project PROFIL, managed by Bba industrial association. The authors would also like to thank P. Hamon and F. Rousseau for their technical helps with the HPLC and particle size analyses and F. Tessier for the determination of carboxymethyl lysine contents in powders. Language editing services were provided by Dr Emma Pilling.

BILAN DU CHAPITRE 1

L'étuvage des poudres à pH 3,5, 6,5 et 9,5 induit le brunissement des poudres et la dénaturation des PS. Cependant, seul l'étuvage à pH 9,5 induit la formation d'AMI.

Les AMI obtenus sont des particules stables avec des tailles hautement hétérogènes liées à la taille et à la forme des particules de poudre (Figure 22). La taille des AMI obtenus avec la poudre étuvée 24 h est comprise entre 50 et 2 000 µm. Les AMI ont la particularité de piéger une quantité d'eau importante. En effet, l'étuvage d'1 g de poudre étuvée conduit à la formation d'environ 20 g d'AMI hydratés, constitués de 0,5 g de matière sèche. Le brunissement de la poudre d'IPS et la formation de CML après l'étuvage indiquent que la réaction de Maillard a bien lieu. Cette réaction est probablement impliquée dans la formation des AMI. A pH 3,5 et 6,5, le brunissement des poudres a également lieu, sans la formation d'AMI. La réaction de Maillard ne suffit donc pas pour produire des AMI. A pH 3,5 et 6,5 il n'y a pas de dénaturation des PS avant l'étuvage. A pH 9,5, la dénaturation des PS a déjà lieu avant l'étuvage de la poudre. Cette dénaturation induite par le pH 9,5 pourrait aussi être impliquée dans la formation des AMI.

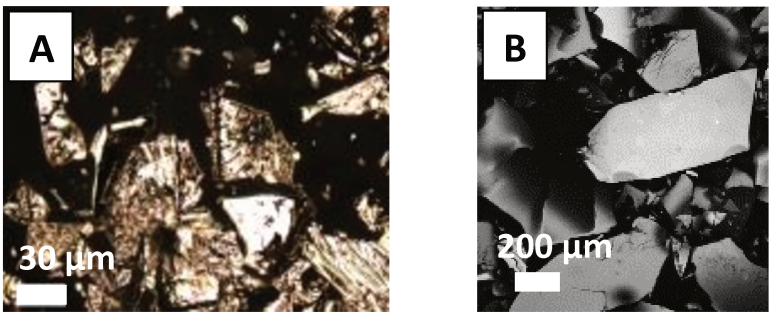


Figure 22 : Particules de poudre lyophilisée observées au microscope optique (A) et assemblages microniques (AMI) en suspension dans de l'eau observés au microscope confocal (B) obtenus après étuvage de la poudre d'isolat de PS à pH 9,5.

L'hypothèse a été émise d'une réticulation des protéines dans la poudre au cours de l'étuvage qui conduit à la formation des AMI.

CHAPITRE 2 : FORMATION DES AMI AU COURS DU TEMPS D'ETUVAGE D'UNE POUDRE DE PROTEINES SERIQUES SECHEE PAR PULVERISATION

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article qui a été soumis dans le journal « Food Research International » (article 3).

INTRODUCTION :

Dans le chapitre 1, nous avons émis l'hypothèse que les AMI pourraient être issus des particules de poudre rendus insolubles par la réticulation des protéines. Cette réticulation serait provoquée par l'étuvage à 100 °C et à pH 9,5 des poudres. Les AMI obtenus sont des particules de grande taille qui décantent au cours du temps de stockage des suspensions. Ils ont aussi la particularité d'être très hydratés. Du fait de leur forte capacité de rétention d'eau, nous pouvons suspecter qu'ils pourraient apporter une forte viscosité en suspension dans des produits laitiers liquides comme des crèmes, des sauces ou des fromages fondus.

Pour approfondir l'étude des relations entre la taille et la forme des particules de poudre et celles des AMI, et étudier le mécanisme de formation des AMI, nous avons poursuivi cette étude, en remplaçant l'étape de séchage par lyophilisation par un séchage par pulvérisation. En effet, la lyophilisation nécessite une étape de broyage qui génère des particules de tailles hétérogènes et de formes irrégulières, alors que le séchage par pulvérisation permet d'avoir des particules sphériques plus petites, et par conséquent de taille et de forme plus homogènes. Puisque la taille et la forme des AMI seraient fonction de la taille et de la forme des particules de poudre d'après les résultats obtenus dans le chapitre 1, un séchage par pulvérisation pourraient permettre d'avoir des AMI sphériques de tailles inférieures à celle des AMI obtenus avec un séchage par lyophilisation suivit d'un broyage au moulin à café. La distribution de taille des AMI serait alors plus facile à analyser, le granulomètre laser assimile les particules à des sphères. Des AMI plus petits pourraient aussi décanter moins vite. Ainsi, les suspensions d'AMI seraient stables plus longtemps, ce qui pourrait faciliter leur étude. Par exemple, l'étude de leurs propriétés d'écoulement pourrait être facilitée. De plus, pour cette étude, nous avons appliqué une gamme de temps d'étuvage plus large, allant de 3 à 72 h d'étuvage, dans le but de suivre finement la cinétique de formation des AMI.

Principaux objectifs :

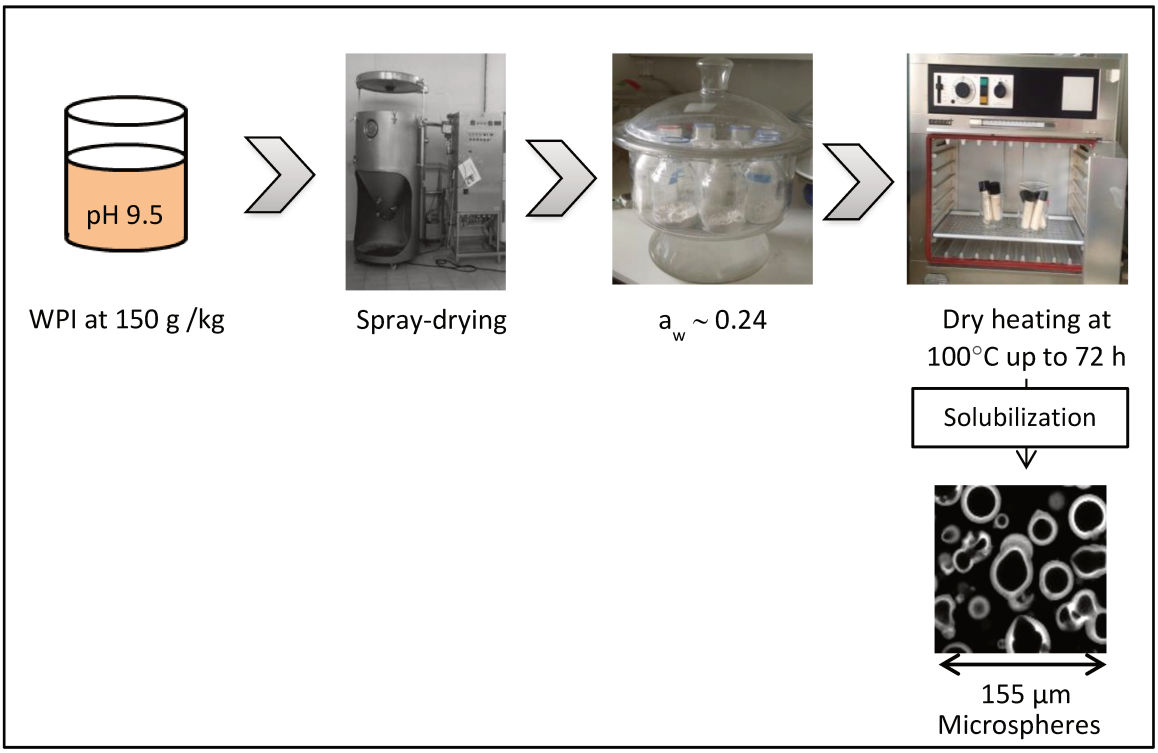
- **Déterminer si un séchage de la poudre par pulvérisation permet de former des AMI par le même procédé que celui utilisé par Famelart *et al*. (2018).**
- **Déterminer l'implication de la réaction de Maillard.**
- **Déterminer les relations entre la taille et la forme des particules de poudre et celles des AMI.**
- **Etudier la cinétique de formation des AMI et l'effet du temps d'étuvage sur les caractéristiques physico-chimiques des AMI en suspension.**
- **Déterminer si les caractéristiques physico-chimiques des AMI sont les mêmes avec un séchage par pulvérisation qu'avec un séchage par lyophilisation.**
- **Etudier la microstructure des AMI en suspension en fonction du pH et de la concentration en NaCl dans le milieu environnant.**
- **Etudier les propriétés rhéologiques des AMI en suspension.**

Stratégie :

Une poudre d'IPS à pH 9,5 produite par pulvérisation et conditionnée à un a_w de 0,24 a été étuvée à 100 °C, de 0 à 72 h. Au cours du temps d'étuvage, la réaction de Maillard a été étudiée en suivant le brunissement de la poudre et la formation de CML. La formation des AMI a été suivie durant l'étuvage, en observant les suspensions par microscopie confocale et en évaluant la OD_{500nm} des suspensions, les rendements de formation en AMI et les taux de dénaturation et d'agrégation des protéines. Les propriétés de rétention d'eau et d'écoulement des AMI ont été aussi étudiées en fonction du temps d'étuvage. La taille et la morphologie des particules de poudre et celles des AMI ont été comparées. Les effets du pH et de la présence de NaCl sur la microstructure des AMI en suspension ont également été étudiés dans les suspensions de poudre étuvée 36 h.

Dry heating of whey proteins leads to formation of microspheres with useful functional properties

Elise Schong, Marie-Hélène Famelart



Graphical abstract: Production process of AMI.

Highlights:

- A spray dried WPI powder at pH 9.5 is dry heated at 100 °C up to 72 h
- Microspheres of size > 50µm with high water retention form after 12 h of dry heating
- Reticulation of the powder particles during dry heating is a possible mechanism
- Maillard reaction and lactose are involved in the formation of microspheres
- Microsphere suspensions at concentration >18 g/kg are highly viscous

Abstract

Modification of whey protein isolate (WPI) powders is used in the food industry to enhance the functional properties of WPI proteins. We investigated the impact of severe dry heating (DH) on an alkaline-treated (pH 9.5), spray dried (water activity of ~0.24) WPI powder. We analysed progression of the Maillard reaction, protein denaturation and aggregation during the course of DH at 100°C for up to 72 h and then examined the morphological, physicochemical and flow properties of the particles formed after DH. We also analysed the changes in particle properties that occurred with alterations in the pH of the aqueous phase. DH for 0-6 h led to loss of native proteins, increases in the levels of soluble aggregates and of advanced glycation end-products of the Maillard reaction, and to powder browning with a decrease in free lactose content. DH for at least 12 h led to a decrease in soluble aggregates with concomitant formation of large, stable and insoluble microparticles. These microparticles had a microsphere structure and were made of insoluble powder particles resulting from protein reticulation during DH. Microparticle size and swelling could be altered by varying the pH of the suspension: at pH 6.5 microsphere size was 3-5 times larger than powder particle size, however, microsphere size decreased as the suspension pH neared the isoelectric point. DH could be a useful method for enhancing the properties of WPI powders as these microparticles had very high water retention properties and high viscosity values, and could therefore be used as functional protein ingredients in dairy mixes.

Keywords: Whey proteins; Microparticle; Dry heating; Aggregation; Maillard reaction; Rheology

1. INTRODUCTION

Whey protein isolate (WPI) powders are widely used in the food industry because of their nutritional and functional properties (de Wit, 1998). These powders contain at least 90% protein and small quantities of residual lactose, minerals and fat. Modification of the protein structures in WPI, such as denaturation or aggregation, may enhance their ability to form and stabilise emulsions, foams and gels (Foegeding and Davis, 2011).

Studies on WPI denaturation or aggregation have mainly been conducted on solutions of WPI heated under controlled physicochemical conditions (Croguennec *et a*l., 2004; Donato *et al*., 2009; Guyomarc'h *et al*., 2014; Nicolai *et al.*, 2011). Only a few studies have investigated heating of WPI powders in a solid state, such as by dry heating (DH) (Enomoto et al., 2009; Gulzar et al., 2011b; Ibrahim *et al.*, 1993). Schong and Famelart (2017) recently reported that DH at temperatures above 50 °C leads to progressive changes in whey protein conformation and to cross-linking. In addition, DH has already been shown to be an efficient tool for enhancing the functional properties of egg white powders (Desfougères *et al.*, 2008; Kato *et al*., 1989; Mine, 1997; Talansier *et al.*, 2009; Van der Plancken *et al*., 2007).

DH of whey proteins in the presence of sugar gives rise to highly glycated proteins (Morgan *et al*., 1999a), and to powder browning (Jiménez-Castaño *et al*., 2007; Wang and Ismail, 2012) through the Maillard reaction (MR). The first step of the MR involves the carbonyl group of the sugar and the amino group of an amino acid and leads to the formation of Amadori or Heyns rearrangement products. The second step, is a complex chain of reactions leading to the formation of advanced glycation end products (AGE), including melanoidins, which are the polymers responsible for browning (Martins *et al*., 2000).

Very few studies on DH have investigated the effect of very alkaline pH values on protein powder properties. Gulzar *et al.* (2011b) studied DH at 100 °C of a freeze-dried WPI powder (water activity (a_w) of 0.23) at pHs 2.5, 4.5 and 6.5. They found that protein aggregates formed during the time course of DH, and that the size of these aggregates increased with the pH applied during heating. Only non-native monomers and soluble aggregates with intermolecular disulphide bonds were formed at pH 2.5, whereas both soluble and insoluble aggregates with covalent cross-links other than disulphide bonds formed at pH 4.5 and 6.5. Liu *et al*. (1991) reported that increasing the pH from 5 to 9 during DH of BSA powder led to an increase in aggregate formation. They suggested that this increase was due to the involvement of thiolate ions - the reactive species in thiol-disulphide interchange reactions - in the formation of aggregates. In addition, Broersen *et al*. (2004) highlighted that increasing the pH from 5 to 8 before DH induces a rise in the degree of glycosylation of β-lactoglobulin (βlg). Alkaline conditions promote the MR because unprotonated lysine residues are more reactive at high pH values. Denaturation of βlg and an increase in its polymerization state have also been observed after exposure

to alkaline environments alone, without any heat treatment (Casal *et al.* 1988; Monahan *et al*., 1995; Roels *et al.*, 1971; Taulier and Chalikian, 2001).

In this study, we investigated the effect of severe DH (100°C for up to 72 h) on a WPI powder that had been exposed to an alkaline environment (pH 9.5) and spray dried. We studied the progress of the MR along the time course of the DH, together with the aggregation state of the whey proteins. We then analysed the size and morphology of the particles formed after DH and examined their functional properties (such as water retention and flow behaviour), with the aim of gaining an insight into their formation mechanism.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 MATERIALS

WPI powder was used as the source of purified whey proteins. This powder was obtained by spray drying a whey protein concentrate isolated from milk microfiltrate by ultrafiltration and diafiltration as described in Chevalier *et al.* (2016). One hundred g of this powder contained 3.44 ± 0.04 g moisture (determined by air drying), less than 2 g of ashes (0.31g Ca^{2+}, 0.02 g Mg^{2+}, 0.09 g Na^{+}, 0.16 g K^{+} as determined by atomic absorption spectroscopy (Chevallier *et al*., 2018), 0.59 ± 0.02 g of free lactose as determined by ion chromatography, less than 0.4 g fat and 91.1 ± 0.7 g protein (as determined by the Kjeldahl method), among which 18% were caseins and 82% were whey proteins (as determined by SDS-PAGE electrophoresis (Chevallier *et al.*, 2018). Both carboxymethyllysine (CML) and (D2)-CML were provided by PolyPeptide Laboratories France SAS (Strasbourg, France). Lithium buffers pH 2.20, pH 2.80, pH 3.00, pH 3.15, pH 3.50 and pH 3.55 and ninhydrin reagent (EZ Nin reagent) was obtained from Biochrom Ltd (Cambridge, UK). Alpha-lactose monohydrate (4-O-β-D-Galactopyranosyl-α-D-glucose), potassium acetate, amino acid standard, nonafluoropentanoic acid (NFPA) 97%, hydrochloric acid 32%, sodium hydroxide, sodium borohydride, βlg, αlactalbumine (αlac) and boric acid were obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.2 PREPARATION OF DRY HEATED POWDERS

The WPI powder was dissolved in distilled water at 150 g/kg and stirred overnight at 4°C. The solution was adjusted to pH 9.5 by slowly adding a solution of 5 M NaOH and then 1 M NaOH while stirring, and then immediately spray-dried on a pilot spray dryer (Minor, GEA Niro, Denmark) with a flow rate of ~2 L/h. Approximately 12 kg of solution were spray-dried, and the maximum time that the suspension remained at pH 9.5 was 6 h.

The inlet and outlet temperatures of drying air were set at 250°C and 90-100°C, respectively. The powder was then stored for approximately 1 month at 20°C in a desiccator containing a saturated solution of CH3CO2K until the water activity (aw) of the powder reached ~0.24 ± 0.02. The a_w of the powder was monitored using an aw meter (Novasina RTD-200, Lachen, Switzerland). The powder was then heated at 100°C for 3 to 72 h in sealed Pyrex tubes. Two different spray dryings were performed from the same batch of WPI and each powder was dry heated in duplicate in 2 different tubes at each dry heating time.

2.3 COLOR ANALYSES OF POWDERS

Powder colour was measured in triplicate before and after DH on each powder using the CR-300 Chroma meter (Minolta, Roissy, France). The colour values were expressed as *L** (whiteness), *a** (redness/greenness) and *b** (yellowness/blueness) and the browning index (BI) according to Maskan (2001) as follows:

$$BI = \frac{[100(x-0.31)]}{0.17} \qquad \text{equation 1}$$

$$x = \frac{(a^* + 1.75L^*)}{(5.645L^* + a^* - 3.012b^*)} \qquad \text{equation 2}$$

2.4 MOISTURE CONTENT OF POWDERS

The moisture content of dry powder extracts was measured according to the standard guidelines of the Fédération Internationale du Lait - International Dairy Federation (FIL-IDF, 1993). The evaporation of water present in the powders was carried out by heating in an oven at 102 ± 2°C for 5 h. Two measurements were carried out on the first spray-dried powder dry-heated for 0 and 36 h.

2.5 MARKER OF THE MR

CML content was determined using the method of Niquet-Léridon and Tessier (2011). Analyses were done in duplicate on the first preparation of powder samples. Briefly, powder (equivalent to 10 mg of protein) was reduced with 1.5 mL of borate buffer (200 mM, pH 9.5) and 1 mL of sodium borohydride (1 M in 0.1 M NaOH) at room temperature for 4 h. Hydrolysis was then carried out in 6 N hydrochloric acid at 110°C for 20 h. Hydrolysates were vacuum-dried and the dry residues were reconstituted with 20 mM NFPA containing the internal standard (D2)-CML. After filtration through a 0.45 µm filter (Nylon membrane filter, Sodipro, Echirolles, France), samples were analysed on a TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) liquid chromatograph (LC) coupled to a tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). Quantification of CML was achieved by measuring its peak ratio relative to the corresponding internal standard and by comparison with a calibration curve. The linear range of CML was 1 to 200 ng/mL.

2.6 FREE LACTOSE CONTENT OF POWDERS

Dry-heated powders were reconstituted in distilled water at 1 g/kg with stirring for 3 h and then filtered by centrifugation at 10000 *g* for 30 min at 20°C using a Vivaspin 20 centrifugal concentrator with a 10000 Da molecular weight cut-off membrane (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany). Lactose in the filtrate was quantified by anion-exchange chromatography (Dionex ICS-3000, Jouy en Josas, France) using a CarboPac PA1 column (250 mm x 4 mm) with pulsed amperometric detection. Elution was performed with a gradient of 0.2 M NaOH in MilliQ water as described by Gaucheron *et al*. (1996) at 20°C and at a flow rate of 1 mL/min. Quantification was based on calibration with standard lactose solutions. The linear range of lactose was 2 to 40 ppm. Measurements were performed in duplicate on the first preparation of powder samples.

2.7 AMINO ACID ANALYSIS

Approximately 2 mg of powder were hydrolysed in 2 mL of 6 N HCl for 24 h at 110 °C inside a glass tube flame-sealed under vacuum. After cooling at room temperature, the glass tube was opened and the hydrolysate was evaporated to dryness and stored overnight in a desiccator. The dried sample was dissolved in 5 mL of lithium loading buffer (pH 2.2) and filtered through a 0.45 µm filter. Amino acid

analysis was performed with a Biochrom 30 amino acid analyser (Cambridge, UK), using a 200 x 4.6 mm PEEK column filled with ion-exchange resin and post-column derivatization with ninhydrin reagent. Data acquisition at 570 and 440 nm and subsequent peak integration were evaluated using "EZChrom Elite" software (Scientific software, Pleasanton, US). Measurements are mean values resulting from two independent measurements on the first preparation of powder samples.

2.8 PREPARATION AND FRACTIONATION OF POWDER SUSPENSIONS

Powder samples were reconstituted in distilled water with 0.2 g/kg sodium azide to prevent microbial growth. This suspension was stirred at 300 rpm at room temperature during approximately 2 h. The pH was adjusted to 6.50 $\pm$ 0.03 with 10.17 N HCl, followed by 5 and then 1 N HCl, and total weight was adjusted to reach a final concentration of 10 g of powder per kg of suspension. These suspensions were called S0. Reconstitution was repeated at least twice at each dry heating time on the 2 spray-drying preparations.

The fractionation of samples is shown in Figure 23. Aliquots of suspension S0 (2 g) were centrifuged at 20°C in 2 mL Eppendorf microcentrifuge tubes at 10000 *g* for 15 min. The resulting pellets (P1) contained microparticles, and an aqueous phase containing native proteins (NP) and soluble denatured/aggregated proteins (SDAP). The resulting supernatants (S1) contained NP and SDAP. Aliquots of suspension S0 (1 mL) were also acidified by addition of 300 µL of 0.5 M acetate-acetic acid pH 4.6 buffer in order to precipitate non-native whey proteins. These acidified S0 suspensions were then centrifuged as described above in this section, resulting in supernatant S1A. Supernatant S1A contained only the NP that were present in suspension S0. NP and SDAP in pellet P1 were removed by washing as follows: supernatant S1 was replaced by the same weight of 10 mM KH_2PO_4/NaOH buffer (pH 6.5) and then stirred and centrifuged as described above in this section. The resulting pellet (P2) contained only microparticles and the supernatant (S2) contained the NP and SDAP released from the pellet P1.

The quantity of NP and SDAP in the suspensions was calculated as follow:

NP (g/g 100 g of total whey protein) = g of proteins in S1A/g of total whey proteins equation 3

SDAP (g/g of total protein) = g of proteins in [S1+S2 – S1A]/g of total proteins equation 4

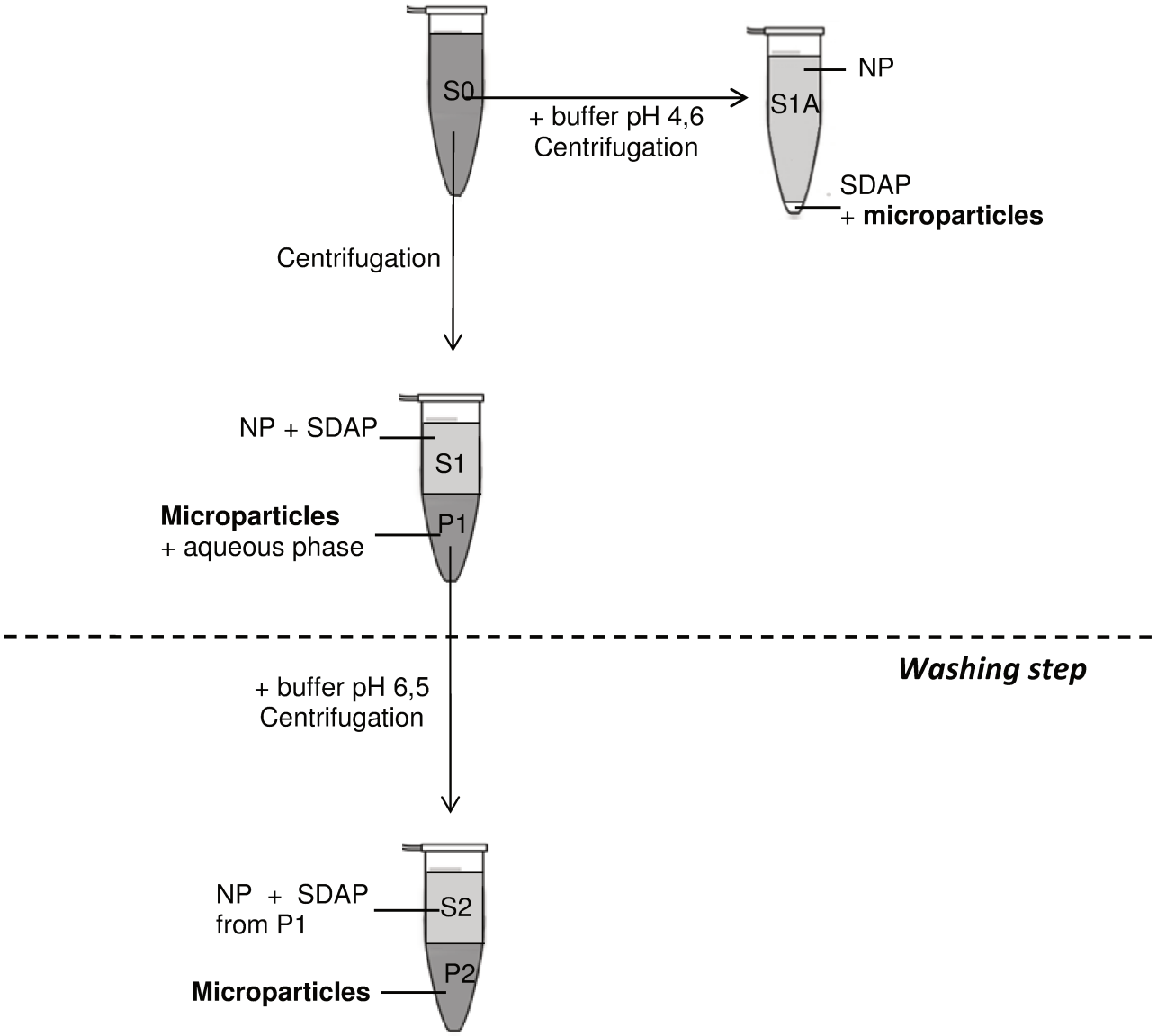


Figure 23: Preparation of samples. NP: native proteins, SDAP: soluble denatured/aggregated proteins.

2.9 SIZE DISTRIBUTION OF POWDER PARTICLES AND MICROPARTICLES

The volume-based size distribution of powder particles was measured before and after 36 h of DH using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments SARL, Orsay, France) equipped with a Scirocco dry powder feeder (Malvern Instruments). Measurements were taken in triplicate on the first spray-drying preparation.

The volume-based size distribution of microparticles in suspension S0 was measured using a Mastersizer 2000 equipped with a hydro wet dispersion unit (Malvern Instruments). Drops of suspension were dispersed into 60 mL of ultra-pure water in the unit until a level of 8% obscuration was reached. The refractive index was fixed at 1.545 for whey protein microparticles and at 1.33 for water as the continuous phase (Purwanti *et al*., 2012). Measurements were taken in triplicate on 2 different samples on the first spray-drying preparation.

Particles were characterised by volume-weighted average diameter [D4,3], defined as $\Sigma n_i D_i^4 / \Sigma n_i D_i^3$, where n_i is the number of particles of diameter D_i.

2.10 OPTICAL DENSITY AT 500 NM OF SUSPENSIONS S0

Optical density at 500 nm (OD_{500}) of S0 suspensions was measured using a UVmc2 spectrophotometer (SAFAS, Monaco). Samples were diluted with distilled water until the absorbance value at 500 nm was ≥ 0.8. Measurements were repeated at least 4 times on the first spray-drying preparation.

2.11 COMPOSITION OF THE SUSPENSIONS, PELLETS AND SUPERNATANTS

Proteins in supernatants S1 and S2 were quantified by measuring UV absorption at 280 nm using ε_{280nm} = 1.046 $L.g^{-1}.cm^{-1}$ as described by Morand *et al*. (2011).

The NP in supernatant S1A were quantified by reversed-phase chromatography using a chromatographic system e2695 (Waters SAS, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and a Vydac C4 column (214 TP 5215, 150x2.1 mm, AIT France, Houilles, France) and. The S1A supernatants were diluted 10-fold in 0.106% trifluoroacetic acid (TFA) (buffer A). Subsequently, 100 µL of the diluted

sample was injected onto the column with a flow rate of 0.2 mL/min. A gradient of buffer A and 0.1% TFA in acetonitrile (buffer B) was applied as follows: equilibration with 28% buffer B, a linear gradient from 28 to 49.6% of buffer B over 40 min, an increase to 80% buffer B over 1 min, then 3 min at 80% buffer B, followed by a decrease to 28% buffer B over 1 min, and then 5 min at 28% buffer B. Proteins were detected at 214 nm with the 2489 detector (Waters SAS). The concentrations of βlg and αlac were calculated using the Empower software (Waters SAS) by comparison of the area of curve for proteins from S1A with those of internal control βlg and αlac protein solutions.

Due to the low protein concentrations in the supernatants, protein quantities were calculated assuming that the volumes of the supernatants are equal to their mass as follows:

Quantity of proteins = concentration in proteins x mass of the supernatant equation 5

The wet pellet P1 containing microparticles and some occluded aqueous phase with NP and SDAP was weighed. This measurement was performed on the 2 spray-drying preparations. The weight was calculated in g for an equivalent of 100 g of suspension (WY). One gram of P2 pellets was dried using a Savant Speed Vac Concentrator SVC-100H (Savant Instrument, Hicksville, USA) over 13 h at 45°C. The pellets were then weighed and the dry weight was calculated in g for an equivalent of 100 g of suspension (DY). This dry weight was then used to determine the concentration of microparticles in the wet pellets P2. As 100 g of suspension contained 1 g of dry-heated powder, WY and DY represented the dry and wet yields of microparticles formed per 1 g of dry-heated powder. We determined the WY of particles and their water content (WC) without washing. This washing step was unnecessary as dry matter accounted for <5% of the pellet, with 95% of the pellet weight being made up of water. Moreover, washing would introduce a change in the ionic environment, leading to a dramatic change in swelling of particles and, thus, an erroneous water content measurement.

The water content (WC) of the pellet was calculated as g of water per 1 g of dried particles as follows:

WC (g/g of dry whey protein microparticles) = [WY – DY] / DY equation 6

P2 pellets obtained from powders dry heated for 36 h, 24 h and 12 h were then diluted with pH 6.5 phosphate buffer at 20°C to adjust their protein concentration to 32, 23 and 18 g/kg. These concentrations corresponded to concentrations of proteins of P2 obtained with powders dry heated for 36 h, 24 h and 12 h, respectively.

All these measurements were performed at least 2 times on the first spray-drying preparation.

2.12 ANALYSIS OF THE MICROSTRUCTURE OF MICROPARTICLES BY CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY

Fifty µl of S0 suspension were deposited on a glass lamella with 5 µl of 1% (w/w) Nile Blue. Samples were observed with a TE2000-E inverted confocal laser scanning microscope (CLSM) equipped with a Nikon x20 oil-immersion objective and a Nikon C1Si imaging system (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). A He–Ne laser with an excitation wavelength of 632 nm was used at 51% power. Emitted light was recorded at 650 nm. Images were acquired using the EZ-C1 software, version 3.40 (Nikon), at a pixel resolution of 512 x 512, representing a spatial resolution of 636 x 636 μm^2.

2.13 MICROSTRUCTURE OF POWDER PARTICLES BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM) AND OF MICROPARTICLES BY CRYO-SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (CRYO-SEM)

Powder particles were mounted on microscope stubs and then coated by platinum sputtering. Specimens were examined on a FEI Quanta 250 FEG scanning electron microscope (FEI Europe, Eindhoven, Netherlands) at an accelerating voltage of 5 kV.

Drops of powder suspension prepared as described in the section 2.8, but at 20 g powder/kg suspension, were mounted on freezing rivets inserted onto cryo stubs and placed onto the Quorum PP3000T specimen shuttle (Quorum, Laughton, East Sussex, United Kingdom). The samples and the specimen shuttle were then plunged into slush nitrogen paste for cryofixation. After rapid transfer under vacuum to the preparation chamber, the samples were fractured at -140°C, sublimed at -95°C for 30 min and then sputter coated with platinum. They were then transferred to the cryo-SEM Quanta 250 FEG chamber and kept at -140°C during analysis with a FEI Quanta 250 FEG scanning electron microscope at an accelerating voltage of 5 kV.

2.14 EFFECT OF PH ON MICROSPHERE SUSPENSIONS

The suspension S0 of the powder dry-heated for 36 h before its pH adjustment was divided into 8 fractions. Seven of these fractions were acidified at room temperature with a few drops of 10.17 N HCl, thus limiting dilution of the suspensions. The pH values were measured after stirring at room temperature for 1 h: the pH of the fractions ranged from 7.67 to 2.22. Suspensions were then diluted with water, the pH of which had been adjusted to that of the fraction. Measurements of particle size distribution and OD at 500 nm were carried out as described in sections 2.9 and 2.10. CLSM observations of the particles were carried out as described above in section 2.12. The pH of the suspensions at pH 4.11, 4.75 and 5.25 was then re-adjusted to pH ~ 7.6 with 5 N NaOH and the fractions were re-analysed as described above in this section.

2.15 FLOW PROPERTIES OF MICROPARTICLE SUSPENSIONS

P2 pellets were adjusted with 10 mM KH_2PO_4/NaOH buffer (pH 6.5) to 32, 23 and 18 g of dry matter per 1 kg suspension and their flow properties were measured with a stress-controlled rheometer (Discovery HR-2, TA Instruments France, France) under a sealed cover system, with a plate-plate geometry of 5 cm in diameter and a 1 mm gap. Samples were kept at 20°C for 1 min for temperature equilibration and then measurements were performed at 20°C at shear rates ranging from 1000 to 0.01 s^{-1}. Two replicate measurements were performed on one sample from the first spray-drying preparation.

2.16 STATISTICAL ANALYSIS

The Student's t-test was performed for sample comparisons using the Excel software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 THE EFFECT OF DH ON POWDER MORPHOLOGY AND SIZE DISTRIBUTION

SEM micrographs of the powder before and after 36 h of DH revealed that DH had no effect on the morphology of the powder particles (Figure 24A and 24B). The powder particles were smooth and spherical, and some particles presented a cavity or depression on their surface. Previous studies of the

morphology of WPI powders reported that the powder particles have a smooth, spherical shape with an internal open vacuole (Sadek *et al*., 2014). This open hollow structure may be directly linked to the stresses induced by the drying rate and the formation of a hard skin of proteins on the surface of the powder particles during drying (Sadek *et al.,* 2013). The depressions observed on the surface of the powder in our study may also be due to this open hollow structure.

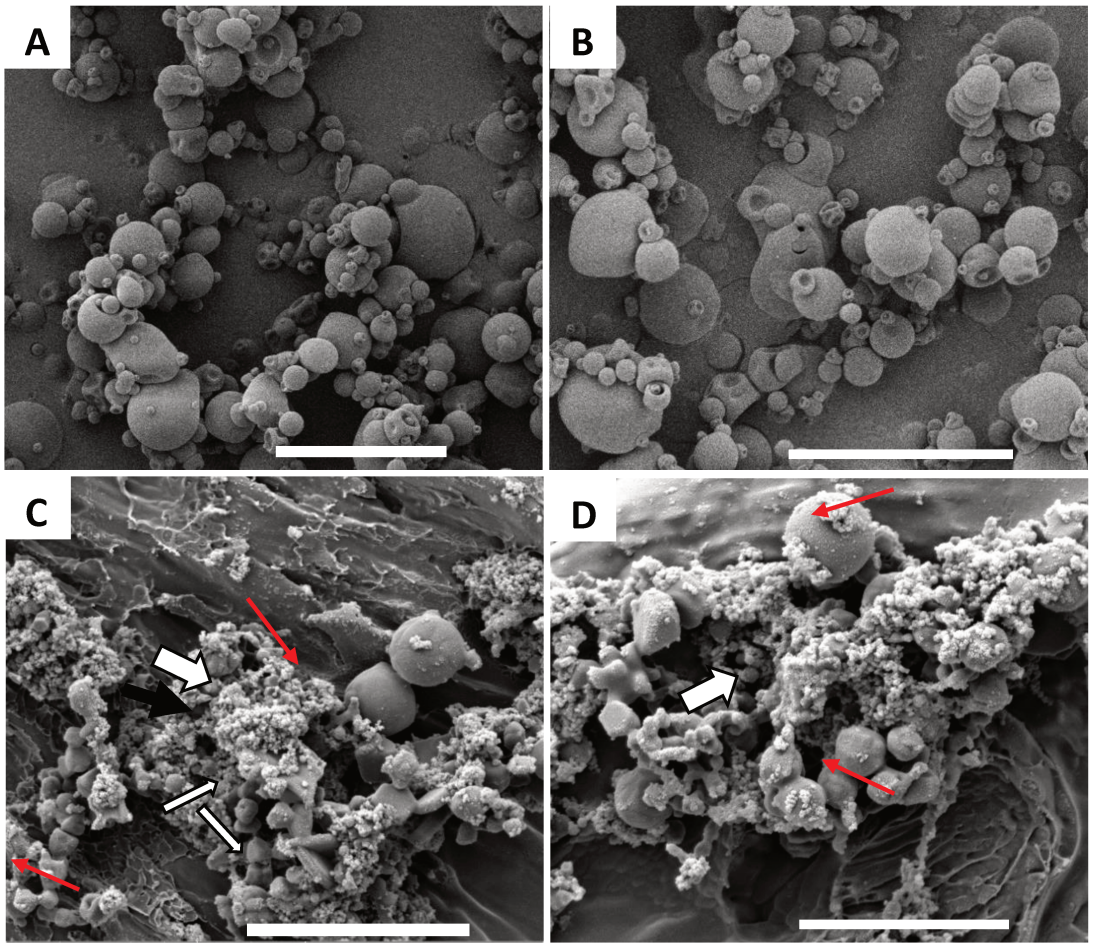


Figure 24: SEM micrographs of powder before (A) and after 36 h of dry heating (B) and of microparticles in dispersion in deionized water obtained after dry heating of the powder for 36 h (C, D). The red arrows point some microparticles, while large white arrows show the deposit of possibly frost or soluble protein and aggregates or both, and thin white arrows show the geometric deposit.

Powder particle size was relatively polydisperse. The size distributions of powder particles before and after DH are shown in Figure 25. The size distribution of powder particles before DH was [0.6-60 µm], with a D[4,3] of 16.62 ± 0,33 µm. The size distribution of powder particles after 36 h of DH was

very similar to that of the untreated powder, but the D[4,3] increased to 18.61 ± 0,81 µm ($P<0.01$). This shows that the DH process led to small changes in the size of the powder particles, but did not change their morphology. The mean size of the powder particles before and after DH was also estimated at 15-20 µm (based on micrograph measurements of about 30 particles each; Figure 24A and 24B).

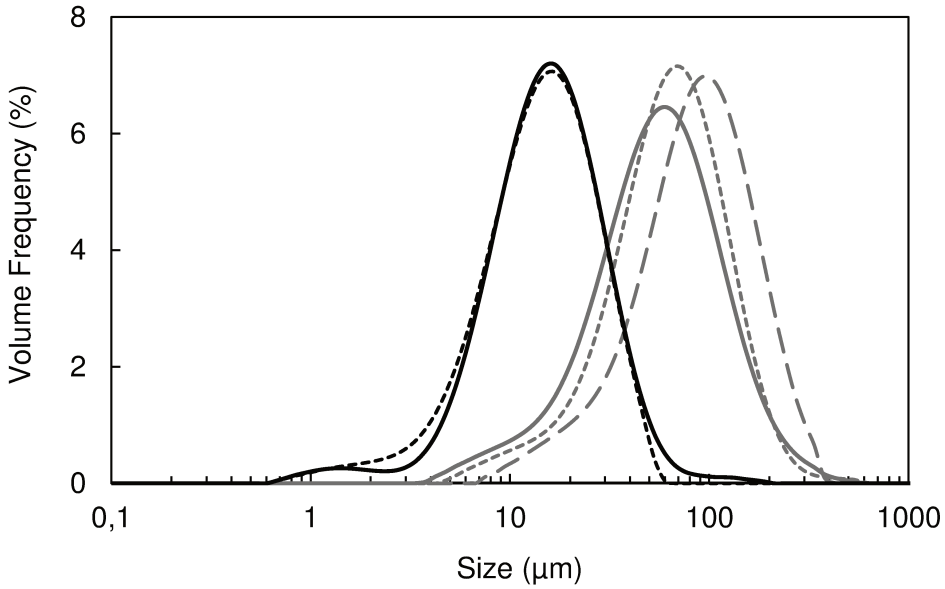


Figure 25: Size distribution of powder particles (in black) before (dotted line) and after 36 h of dry heating (solid line) and of microparticles in suspension (in grey) prepared from powders dry heated for 12 h (dashed line), 24 h (dotted line) and 36 h (solid line). Volume frequency (%) versus size measured with the Mastersizer.

3.2 THE EFFECT OF DH ON POWDER BROWNING AND COMPOSITION

The BI of the powders increased over the time course of the DH (Figure 26). The most rapid increase in browning was observed between 0 and 6 h of DH, with the BI then levelling off until 72 h. Several studies have reported browning of WPI or βlg powders during DH in the presence of sugar as a result of the MR (Jiménez-Castaño *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2014). We also noted that the a_w of the dry heated powders increased over the time course of DH, from 0.223 ± 0.005 at 0 h of DH to 0.314 ± 0.006 after 72 h of DH (data not shown). This increase in a_w is likely to be due to the fact that water is one of the products of the MR. In addition, we found no significant differences ($P<0.05$) in the moisture content of the WPI powders before (3.29 ± 0.07 g/100 g) and after 36 h of DH (3.18 ± 0.05 g/100 g) (data not shown).

CML is an advanced glycation end product (AGE) of the MR that is often measured in powders or food to evaluate the intensity of the MR. We found that CML levels in powders increased after adjustment of the pH of the initial WPI solution to 9.5, after spray drying and after the storage at 20°C for 1 month required for the a_w adjustment. The largest increase in CML levels was observed between 0 and 3h of DH (Tableau 3), however, CML levels did not increase significantly from 3 to 36 h of DH.

Amino acid analysis showed that only lysine residues were significantly affected by DH (data not shown). The lysine content of protein in the powders is shown in

Tableau 4. Significant differences in lysine content were only observed between powders after 0 and 36 h of DH ($P<0.05$). Only 6 % of the lysine residues disappeared after 36 h of DH.

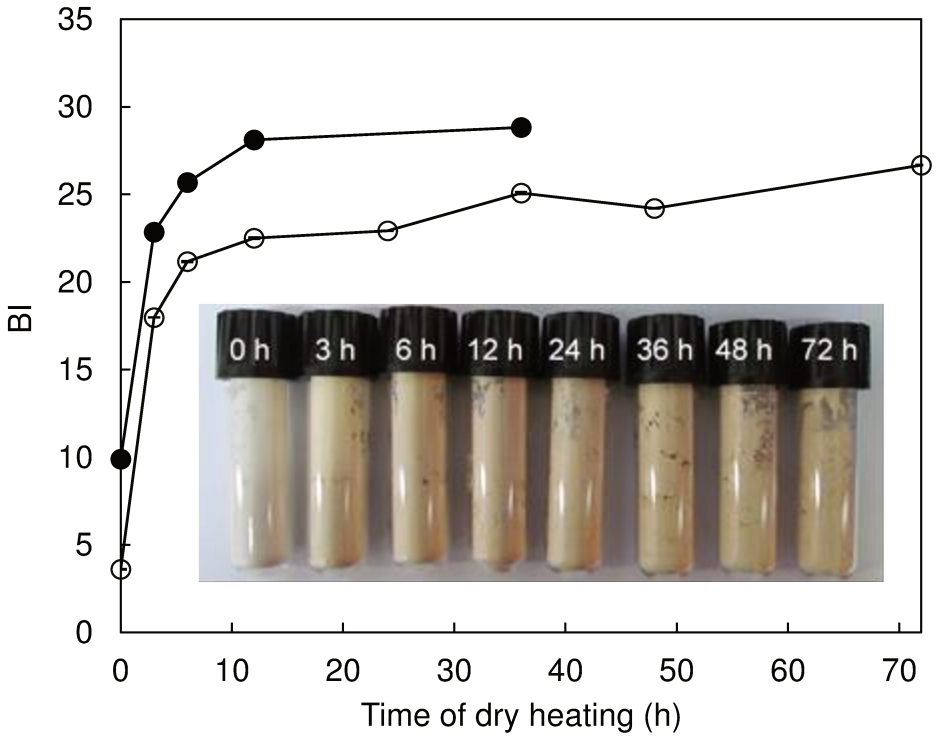


Figure 26: Browning index (BI) of powders dry heated at pH 9.5 as a function of their time of dry heating at 100 °C, as measured with the colorimeter. Two different productions of DH powders each with open and closed symbols. Photographs of powders during the time course of dry heating are shown (inset).

Tableau 3 : Carboxymethyllysine (CML) contains of powders in ng/mg protein.

	CML
WPI starting powder	162 ± 11[a]
Powder dry heated for 0 h at 100 °C*	431 ± 24[b]
Powder dry heated for 3 h at 100 °C	1161 ± 90[c]
Powder dry heated for 36 h at 100 °C	1412 ± 201[c]

*This powder was adjusted at a_w~0.24.
Samples having different letter are statistically different (P < 0.05).

Tableau 4 : Lysine contents in powders in g lysine residue/100 g protein.

Time of dry heating at 100 °C	Lysine
0 h *	9.00 ± 0.1[a]
3 h	8.55 ± 0.02[ab]
12 h	8.66 ± 0.04[ab]
36 h	8.43 ± 0.09[b]

*This powder was adjusted at a_w~0.24.
Samples having different letter are statistically different (P < 0.05).

Concentrations of free lactose in powders are shown in Tableau 5. The WPI starting powder contained ~0.6 g of free lactose/100 g powder, representing approximately 1 mol of free lactose for 3 mol of protein. However, it should be noted that protein-bound lactose molecules may have been present in the powder before treatment but were not measured in this study. Two thirds of the free lactose molecules became bound to proteins after alkalization at pH 9.5, spray drying and aw adjustment. Free lactose levels continued to decrease during DH. After 3 h of DH, only 2% of the initial free lactose molecules remained.

These results show that lactosylation and the MR had already taken place before the DH step, either before or during spray drying or during the storage of powder for a_w adjustment to ~0.24. Similar observations have already been reported for storage of WPI powder at 20°C, and a more rapid impact has been noted for a storage at 40°C (Norwood *et al.*, 2016a). We found that DH at 100°C for 3 h resulted in binding of almost the totality of the residual free lactose. Glycation of whey proteins has also been found to be enhanced by heating in the dry state at a high relative humidity (65%), as compared to heating in the liquid state (Morgan *et al.*, 1999a). Furthermore, the MR is promoted in alkaline conditions because the free amino group needs to be in its unprotonated form to react with the sugar (Martins *et al.*, 2000). The presence of only low residual levels of free lactose in the powder

after 3 h of DH led to significant slowing of the MR after 3 h of DH, as shown by the plateauing of powder browning (Figure 26) and low levels of CML formation from 3-36 h of DH (Table 3). However, the content in free lactose molecules in the WPI starting powder was very low, that explained the very small loses in lysine residues.). However, the free lactose molecule content in the WPI starting powder was very low, explaining the very small loss of lysine residues observed. One hundred of the WPI powder contained 91.1 g of proteins that we assumed to be approximately equivalent to 16.4, 56 and 18.7 g of caseins, βlg and αlac, respectively. According to Walstra and Jenness (1984), the content in lysine is about 0.56, 0.82 and 0.85 moles per kg protein for caseins, βlg and αlac. This leads to about 70 mmol of lysine in 100 g of powder, and about 2 mmol per 100g powder of lactose. If one lactose bound to each lysine, the total content in lysine that will bind to lactose was about 2 mmol. It represented ~3% of the total lysine content, so that it is not surprising to find a loss of only 6 % lysine.

Tableau 5: Free lactose concentrations in powders in mg/100 g powder.

	Free lactose
WPI starting powder	591.57 ± 16.40
Powder at pH 9.5 before dry heating*	219.08 ± 2.00
Powder dry heated for 3 h at 100 °C	11.22 ± 0.23
Powder dry heated for 6 h at 100 °C	9.63 ± 4.75
Powder dry heated for 12 h at 100 °C	4.72 ± 1.48
Powder dry heated for 36 h at 100 °C	2.77 ± 0.04

*This powder was adjusted at a_w~0.24.

3.3 CHARACTERIZATION OF MICROPARTICLE IN S0 SUSPENSIONS

The S0 suspensions were slightly opalescent. $OD_{500\ nm}$ increased slowly over the first 12 h of DH, and then increased more rapidly after 12-36 h of DH (Figure 27A). This increase may be due to increases in either particle number or particle size during DH, or to a change in optical properties, such as a change in the refractive index of the particles.

The Cryo-SEM micrographs of suspensions prepared at 20 g powder/kg suspension (as described in the section 2.13.) shown in Figure 24C and 24D show that the microparticles obtained after DH had the same morphology as the powder particles. We assumed that the microparticles were in fact powder particles that had been reticulated during the DH step, rendering them insoluble when suspended in water. In addition to the microspheres, two other kinds of deposit were observed on the

cryo-SEM micrographs: a geometric deposit with sharp polyhedral edges reminiscent of ice crystals and a second structure likely to be either a frost deposit or a deposit of soluble protein and aggregate, or a mixture of both.

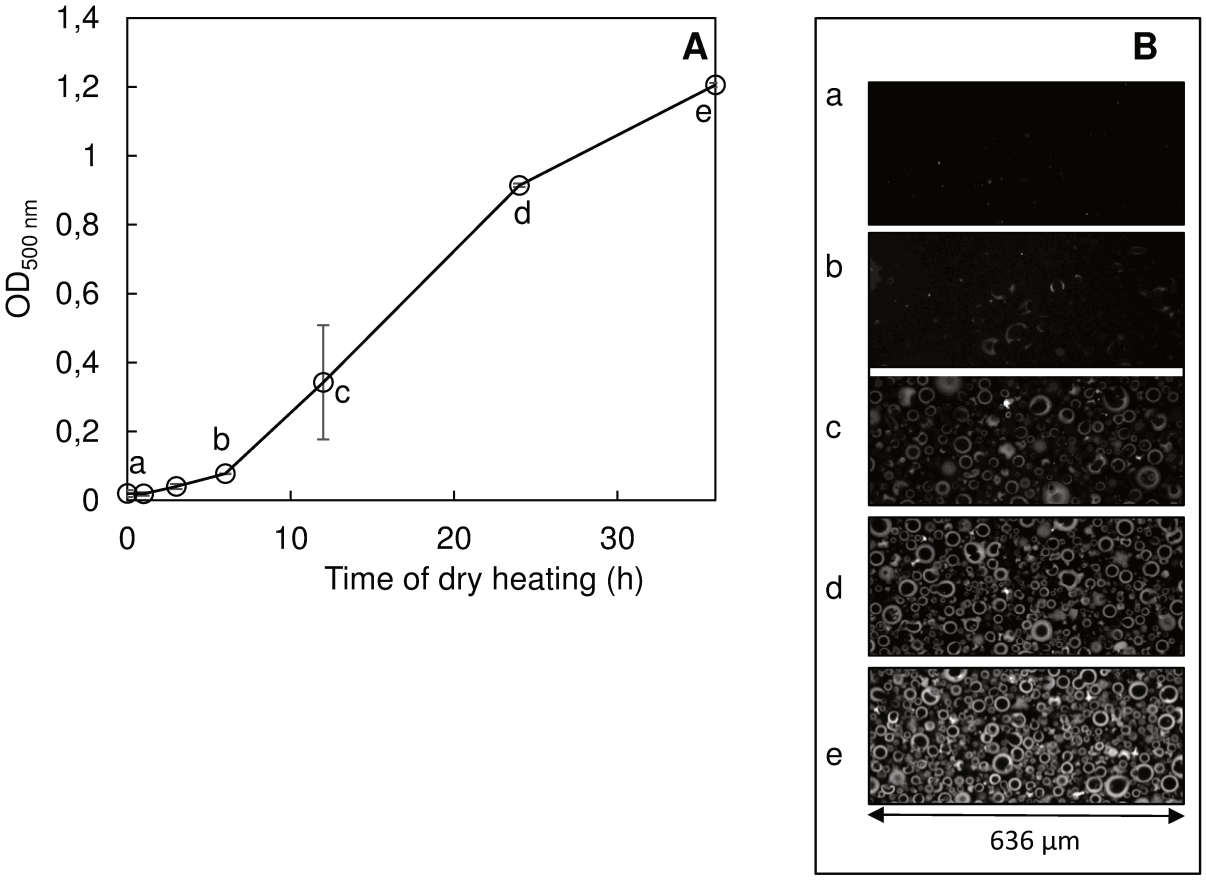


Figure 27: Optical density at 500 nm (OD_{500nm}) (A) and confocal microscopy images (B) of suspensions of powders dry heated 0 h (a), 6 h (b), 12 h (c), 24 h (d) and 36 h (e).

The size of particles in suspension S0 was much larger than that of the particles in the powder, however, the D[4,3] of the microparticles decreased between 12 h and 36 h of DH, from D[4,3] = 79.35 ± 2.35 µm at 12 h to 58.68 ± 3.65 µm at 36 h (Figure 25). The size of these microparticles was stable for more than 2 weeks. The size estimates for the microspheres made from the cryo-SEM micrographs (5-10 µm; Figure 24C and 24D) were much lower than the D[4,3] values. This is surprising as freezing is generally associated with increases rather decreases in object size. Although the D[4,3] values for powder particle size showed only a small increase before and after DH, it was surprising to find particles in the suspensions that were much larger than the powder particles and which decreased in

size with increasing times of DH. These differences in size may be associated with swelling of the DH powder particles when placed in the aqueous phase, leading to larger sizes in suspension than in the powder. Particles exposed to longer DH times may then swell less when placed in water, due to higher degrees of cross-linking induced by the DH.

Analysis of the S0 suspensions by CLSM revealed that while no particles in suspension were visible at 0 h of DH, spherical microparticles or microspheres appeared as the DH time increased (Figure 27B). At 6 h of heating, microparticles were visible, but no complete spheres were observed. In contrast, complete spheres were present at 12h, and the number increased until 36 h of DH. The appearance of these spheres correlates with the increase in OD of the suspensions shown in Figure 27A. The spherical shape of the microparticles observed by SEM was also visible by CLSM, however, CLSM also allowed the open hollow structure and channels of the microparticles to be observed, particularly when the cut plane of the microscope was located exactly in the plane of the channel (Figure 27B). By CLSM, the size of the microspheres after 36 h of DH was estimated to be between 5 and 60 µm (Figure 27B), with a mean size ≈ 20 ± 7 µm (based on measurements of ~50 particles directly on the micrographs). This value is similar to that obtained by the Mastersizer (D[4,3] of microspheres = 58.68 ± 3.65 µm). In addition, the microspheres on the CLSM micrographs appear brighter after 36 h of DH than after 12 h of DH, indicating that particle density increases with longer DH. This increase in density may be due to higher protein content inside the microspheres after more prolonged DH.

We conclude that DH at 100°C for 12-72 h of a WPI powder that had been pre-conditioned to a pH of 9.5 led to production of insoluble spherical microparticles formed by reticulation of the proteins inside the powder particles. These microparticles had a morphology similar to that of the initial powder particles, but were significantly larger in size. This formation of large particles was not observed in Gulzar et al. (2011b) that used a freeze-dried powder adjusted at pH 2.5, 4.5 and 6.5.

3.4 YIELD AND WATER HOLDING CAPACITY OF MICROSPHERES

The WY of microspheres strongly increased with the time of DH (Figure 28A). No significant pellets were found until 6 h of DH, whereas translucent yellow pellets were obtained from 12 h of DH onwards (see insert Figure 28A). At 12 h of DH, the volume of the pellet was very small. The pellets were mobile and flowed when the tubes were tilted: the longer the DH time, the less mobile the pellets became

and the less they flowed. The DY also increased with the time of DH (Figure 28B). Approximately 68% of proteins were occluded within the microspheres after 72 h of DH. Nevertheless, the WC decreased as the DH time increased (Figure 28C). At DH times of less than 24 h, the WY and the DY were too low to enable correct estimation of their WC. Furthermore, the mobility and flow of these pellets as the tubes were tilted made it difficult to discard all of the supernatant without removing the pellet. The microspheres obtained after 24 h of DH contained ~34% protein and entrapped ~66 times their weight in water. It appears as though the vacuolated open porous structure in the spray-dried powder led to microspheres capable of containing a very large quantity of water. Increasing the time of DH led to an increase in the yield of proteins occluded within the microspheres, but to a decrease in the amount of entrapped water: after 72 h of DH, the microspheres only entrapped ~42 times their weight in water. This decrease in water entrapment as DH times increased correlates with the decrease in microsphere size observed after longer periods of DH (Figure 25) and with our assumption that the extent to which the particles swelled decreased after longer times of DH.

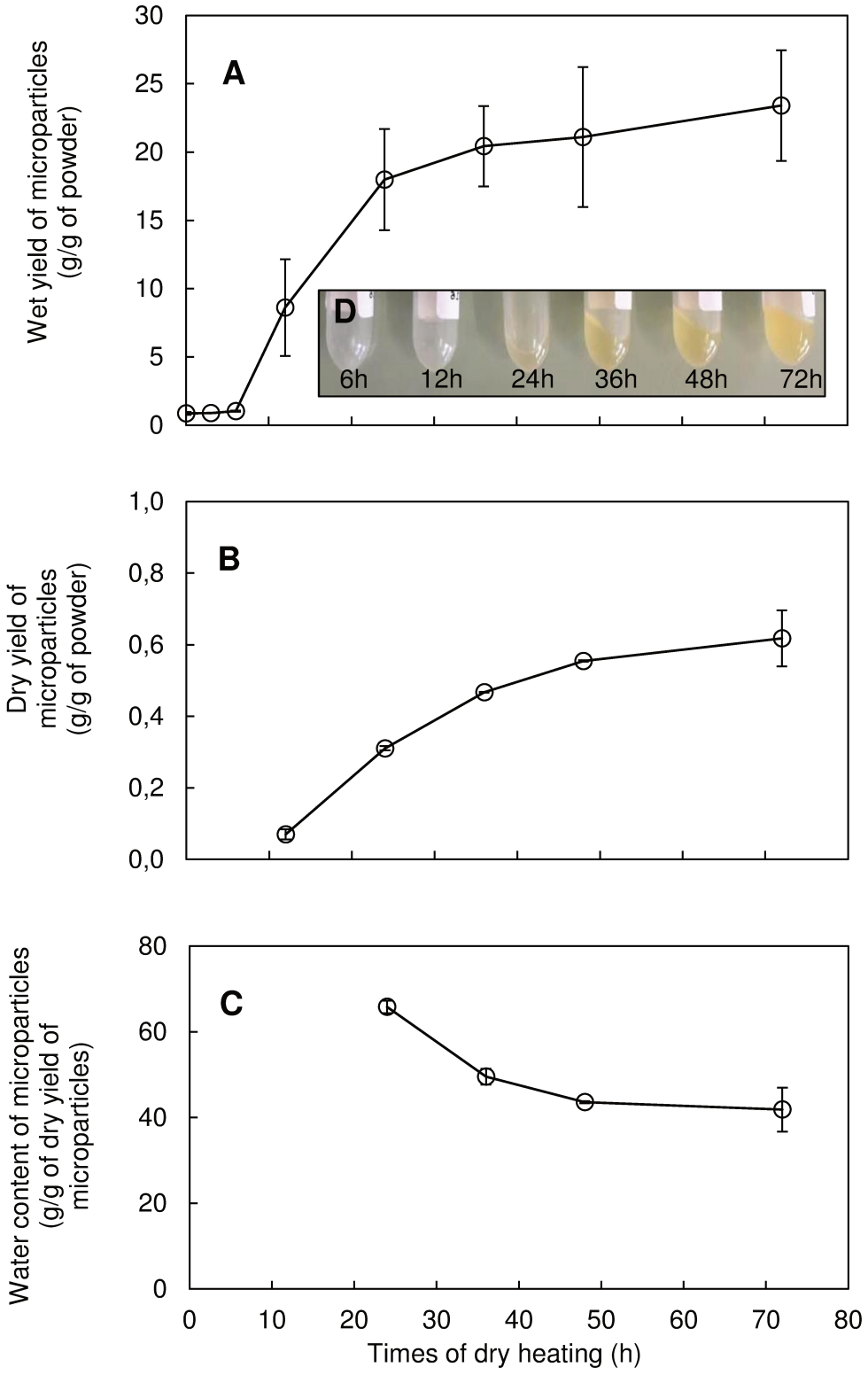


Figure 28: Wet yield (A), dry yield (B) and water content (C) of microparticles obtained by centrifugation of S0 of microparticles; D) Pictures of microparticle pellets.

3.5 DENATURATION OF PROTEINS

Before DH, ~40% of the proteins present in the powder were already SDAP, whilst only ~75% of the whey proteins were still in their native form (Figure 29). The presence of SDAP in the powder before DH was likely to be associated with the alkaline pre-treatment of the powder before DH. Many pH-induced transitions of whey proteins have been reported at alkaline pH values, ranging from the Tanford transition at around pH 7 (Tanford *et al.*, 1959; Tanford and Taggart, 1961), to general irreversible unfolding and polymerization of proteins at pH > 9 (Monahan *et al.*, 1995; Partanen *et al.*, 2011; Taulier and Chalikian, 2001). However, in our study the SDAP content was likely to have been overestimated because: a) about 18% of proteins in the WPI were caseins, which precipitate at pH 4.6; b) MR products absorb at wavelengths close to 280 nm, leading to an increase in OD_{280nm} values (Jiang and Brodkorb, 2012; Liu *et al*., 2014); c) soluble aggregates in supernatants may have induced light scattering that increased the OD_{280nm}.

Native βlg and αlactalbumin (αlac) levels decreased at similar rates during DH (data not shown). The denaturation of these proteins occurred at a faster rate between 0 and 12 h of DH than between 12 and 72 h of DH. After 72 h of DH, the level of NP still present in the suspensions was ~15% (Figure 29). SDAP levels increased until 6 h of DH and then decreased to a level of ~ 14% of total protein (Figure 29). This decrease occurred concomitantly with the formation of insoluble microspheres. Thus, during the course of the DH, whey proteins were denatured to form the SDAP fraction and then these SDAP became occluded within the microspheres.

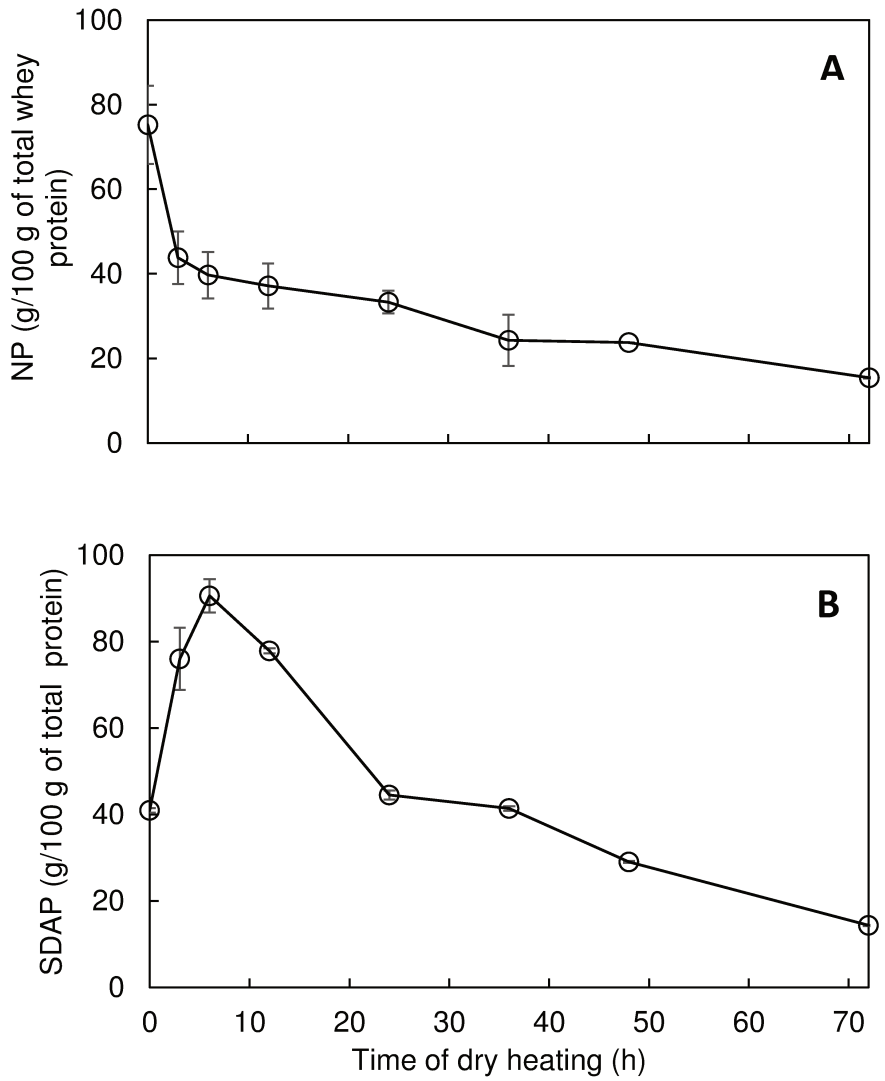


Figure 29: Partition of proteins of the suspension S0: residual native proteins or NP in percent of total whey proteins as determined by reverse-phase chromatography (A) and soluble denatured/aggregated proteins or SDAP in percent of total proteins as determined by the difference between optical density at 280 nm of supernatants S1+S2 and residual native proteins (B).

3.6 FLOW PROPERTIES OF WHEY PROTEIN MICROSPHERES

The maximum concentration of microspheres in the pellet P2 prepared from powder dry-heated for 36 h was 32 g/kg. As the pellet was incompressible, increasing the centrifugation rates to 200000 *g* did not lead to an increase in the DY or WY of the pellet. As the WC of microspheres prepared from powders with DH times of less than 36 h was much higher than that of those with longer DH times, the maximum concentration of microspheres formed in the powders that underwent DH for 12 and 24 h was < 32 g/kg (23 g/kg for 24 h of DH and 18 g/kg for 12 h of DH). A rough estimation of the maximal concentration of powder after 36 h of DH that could be suspended in 1 kg of suspension would be

1000/WY (*i.e.* 48 g of powder for 1000 g of suspension), however, as the close packing of polydispersed spheres is <1, the actual maximum concentration is probably lower than this value; closer to the value of 32 g/kg that we obtained for the wet weight of the microparticles

The viscosity of microsphere suspensions was very high at low shear rates, particularly for suspensions of 32 g/kg of the powder dry-heated for 36 h (Figure 30). These high viscosities were due to the presence of a yield stress at around 10 Pa. This resulted in this suspension displaying largely solid behaviour at rest. We assume that in the 32 g/kg suspensions of microspheres formed after 36 h of DH, the microspheres would be in close contact. This would explain the "solid-like" behaviour at low shear. The suspensions displayed decreasing viscosities at lower microsphere concentrations and showed shear-thinning behaviour. The suspensions of microspheres produced after 24 h of DH at 18 or 23 g.kg were the most viscous and the longer the time of DH, the lower their viscosity (Figure 30). These results also correlate with our assumptions that both the amount of water entrapped in microspheres (Figure 28C) and their size (Figure 25) decreases with increases in DH time.

We compared our viscosity recordings at 20°C and 1 s^{-1} with viscosities observed in previous studies for other whey protein particles obtained in the liquid state at 20°C and 1 s^{-1}. In our study, the microspheres produced by DH for 24-36 h had apparent viscosity values at 1 s^{-1} of ~17.1, 2.3-3.3, and 0.4-0.6 Pa.s at 32, 23 and 18 g/kg, respectively. Microparticulated whey particles with an average size of ~100 nm were found to have a viscosity of ~0.3 Pa.s at 120 g/kg and 1 s^{-1}(Dissanayake *et al.*, 2012). Curly fibrils and straight fibrils of WPI at 40 g/kg have been reported to have viscosities of ~2 and 0.1 Pa.s at 1 s^{-1}, respectively (Loveday *et al.*, 2012). Compact and globular whey protein particles with a size of ~5 µm were found to have viscosities of 0.01 Pa.s at 60 g/kg, whereas fibrillar particles with size of 17 µm reportedly have viscosities of ~0.02 Pa.s at 60 g/kg (Zhang *et al.*, 2016). Fractal whey protein aggregates have been found to have a viscosity of < 1 Pa.s at 96 g/L (Inthavong *et al.*, 2016). All these previously reported viscosities are much lower than the viscosities of the microspheres described in our current study.

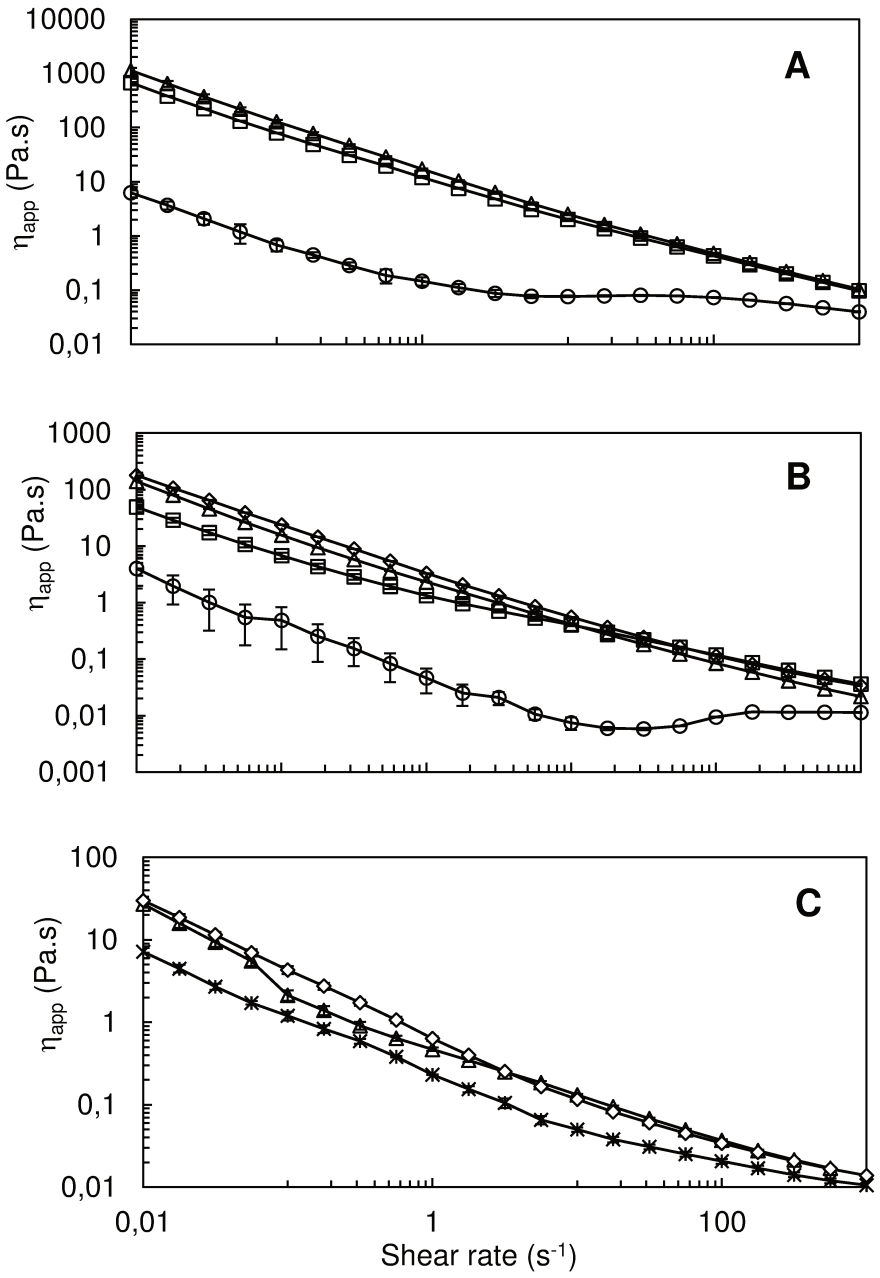


Figure 30: Apparent viscosity (η_{app}) at pH 6.5 and 20 °C of 32 g.kg^{-1} (A), 23 g.kg^{-1} (B) and 18 g.kg^{-1} (C) of microparticle suspensions as a function of shear rate, prepared with powder dry heated for 12 h (star), 24 h (diamond), 36 h (triangle), 48 h (square) and 72 h (circle).

3.7 ACID-INDUCED BEHAVIOR OF MICROSPHERES

Modification of the pH of the microsphere suspensions had a significant effect on the size of the microspheres (Figure 31), with the smallest microspheres being detected at around pH 4-6 and larger microspheres appearing at lower and higher pH values. Similar results were observed by CLSM and laser diffraction. Although, the microspheres were smaller at pH 4-6, they retained their spherical shape. However, the suspensions at around pH 4-5 appeared whiter in colour and more opaque. The OD_{500nm} of the suspensions peaked at pH 4.75 and was lowest at extreme pH values (pH 2.22 and 7.67; Figure 31), where the suspensions displayed virtually no turbidity and appeared yellowish and slightly opalescent.

The reduction in size of microspheres at pH values close to the isoelectric point could be due to a reduction of negative charges on the proteins, leading to weaker repulsion between cross-linked proteins inside the microspheres and to a lower affinity for water. Microspheres may shrink at pH 4-6 because the distances between the protein molecules in the microspheres decreased, leading to water being expelled out of the particle. These changes were reversible: when the pH of suspensions at pH 4.11-5.25 was re-adjusted to pH ~7.5, their turbidity again decreased and their particle size re-increased (Figure 31).

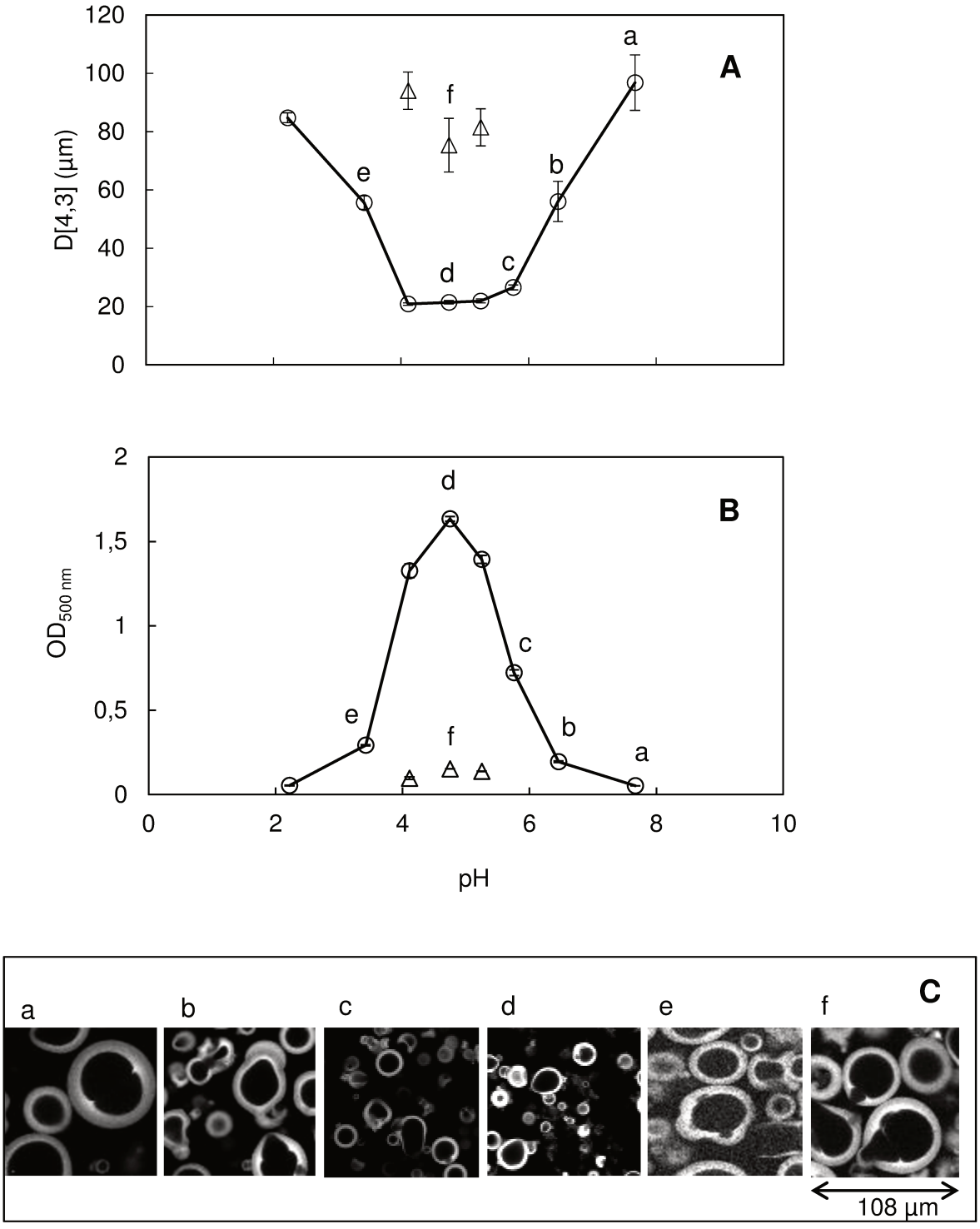


Figure 31: Volume-weighted average diameter (D[4,3]) of microspheres obtained after 36 h of dry heating (A) and optical density at 500 nm (OD_{500nm}) of the suspensions (B) as a function of adjusted pH of suspensions (circle). Triangles show the values for suspensions readjusted to a pH value close to 7.5 after being acidified to the pH value in abscissa. C: a-f confocal microscopy images of suspensions at pH 7.67 (a), 6.46 (b), 5.76 (c), 4.75 (d), 3.42 (e) and the suspension pH 4.75 readjusted at pH ~ 7.5 (f).

4. CONCLUSION

In this study we found that DH of whey proteins at pH 9.5 at a temperature of 100°C for up to 72h led to the formation of AGE products via the MR as a result of the presence of residual free lactose in the powder. After 6 h of DH, the MR was complete, but a protein reticulation process began that led to the formation of stable microspheres in suspension. These microspheres had the same morphology as the powder particles. We showed that the reticulated powder particles were able to swell when placed in the aqueous phase, but this swelling appeared to be limited by the extent of cross-linking occurring as DH time was increased: the longer the DH, the less the microspheres swelled. We also showed that changing the pH of the microsphere suspension led to reversible changes in their size. The analysis of the microspheres described in this study shows that these microparticles display useful properties that could be exploited for use as food ingredients. The capacity of the microparticles to swell as they entrap large quantities of water and their ability to form highly viscous suspensions may be of particular interest to the food industry.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Regional councils of Brittany (grant N°13008651) and Pays de la Loire (grant n°2014-07081) for financial support and INRA for scientific coordination (J. Leonil) through the interregional project PROFIL, managed by the Bba industrial association. The authors would also like to thank M. Pasco, F. Rousseau, and G. Henry for their technical assistance with HPLC, rheological analyses and amino acid analysis; F. Tessier for the determination of CML levels in powders; B. Payre from the “Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie” at Toulouse University, France for carrying out the SEM analyses and B. Robert for spray drying. English-language editing services were provided by Dr E. M. Pilling.

6. RESULTATS ET DISCUSSION COMPLEMENTAIRES

6.1 LES AMI CORRESPONDENT-ILS BIEN AUX PARTICULES DE POUDRE RENDUES INSOLUBLES PAR LE PROCEDE D'ETUVAGE D'UNE POUDRE D'IPS A PH 9,5 ?

Nous avons formulé l'hypothèse que les AMI sont les particules de poudre rendus insolubles par la réticulation des protéines provoquées par l'étuvage à 100 °C et pH 9,5. Les particules de poudre étuvée doivent probablement gonfler lorsqu'elles sont suspendues dans l'eau, car la taille des AMI est supérieure à celle de la poudre. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons suivi l'évolution de particules de poudre, lorsqu'elles entrent au contact avec l'eau, à l'aide du microscope à contraste de phase. La Figure 32 montre les particules de poudre étuvée 36 h ou 72 h avant et quelques secondes après addition d'eau. La Figure 32B montre le gonflement des particules de poudres étuvée 72 h. Les particules de poudre étuvée 72 h gonflent d'environ 4 fois leur taille. Cependant, la poudre n'est pas solubilisée longuement en phase soluble. Ainsi, on peut supposer que le gonflement des AMI observé sur la lamelle n'est pas exactement le même que lorsque la poudre est solubilisée dans l'eau. Cependant, la distribution de taille des particules de poudre étuvée et les distributions de taille des AMI en suspension, montrées Figure 25, sont en accord avec un gonflement de la poudre d'un facteur 4, avec la poudre étuvée 36 h.

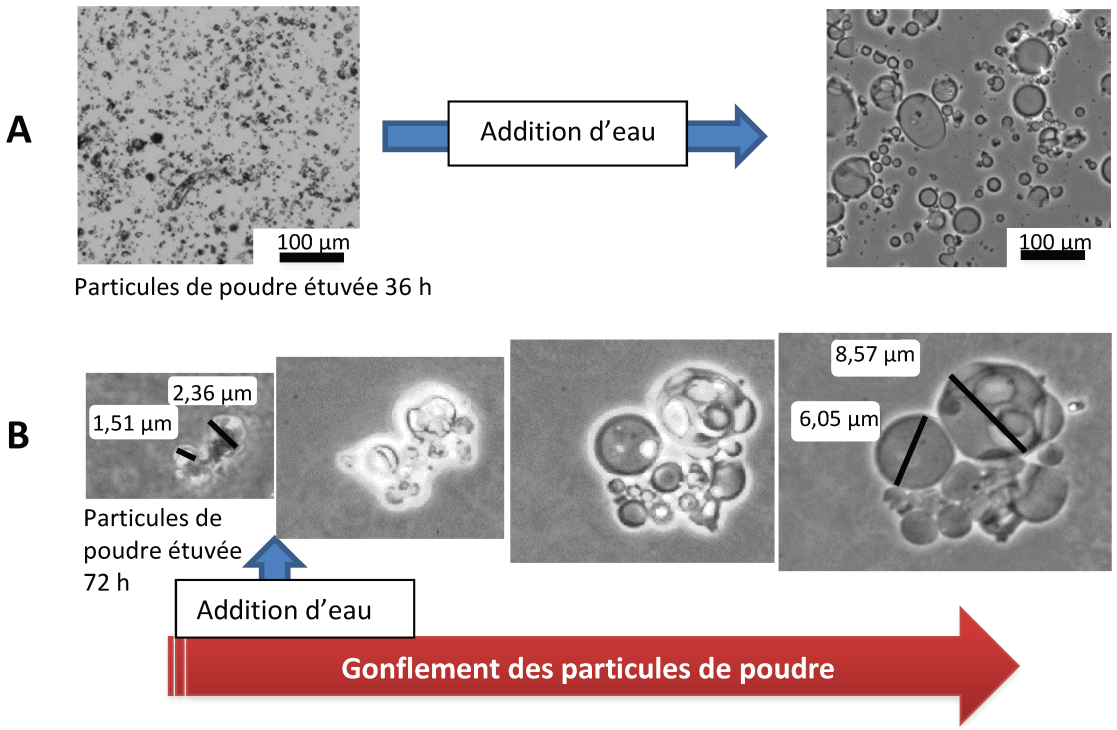


Figure 32 : Micrographies des particules de poudres étuvées 36 h observées avec un objectif x4 (A) et étuvées 72 h observées avec un ojectif x 10 (B) avant et quelques secondes après addition d'eau, obtenues avec le microscope optique à contraste de phase.

On peut conclure que les AMI correspondent aux particules de poudre rendus insolubles par le procédé d'étuvage à 100 °C et à pH 9,5, qui gonflent lorsqu'ils sont suspendus dans l'eau.

6.2 QUELS SONT LES DIFFERENTS TYPES DE LIAISONS IMPLIQUEES DANS LES AMI ?

Une analyse SDS-PAGE des suspensions S0 est réalisée en présence et en absence d'un agent réducteur, afin de déterminer les types d'interactions moléculaires présents dans les AMI. L'agent réducteur utilisé est le DTT. Il permet de rompre les liaisons covalentes de type pont SS. Le tampon dénaturant, contenant du SDS, utilisé lors de l'analyse en présence et en absence de DTT, permet de dissocier les liaisons non covalentes. Les protéines ont été colorées avec du Bleu de Coomassie, et apparaissent en noires sur les gels présentés en Figure 33.

En absence de DTT (Figure 33A), trois bandes majeures apparaissent pour les suspensions réalisées avec la poudre non étuvée, correspondant à la βlg, l'αlac et les caséines. L'intensité de ces bandes diminue considérablement après l'étuvage des poudres pendant 15 et 24 h, en particulier celles correspondant aux caséines. De plus, on observe des bandes noires en haut des puits du gel d'électrophorèse, pour les poudres étuvées 15 et 24 h. Ces bandes correspondent à des polymères, qui ne sont pas dissociés par le tampon dénaturant contenant du SDS, et qui sont trop grands pour pouvoir pénétrer dans le gel. Ces résultats mettent en évidence que l'étuvage à 100 °C et à pH 9,5 forme des polymères, qui sont constitués de PS et de caséines. Toutefois, on ignore si les caséines s'assemblent avec les PS dans les AMI ou si elles polymérisent entre elles, c'est-à-dire séparément. Avec la poudre étuvée 24 h, il reste des bandes noires correspondant à des monomères de βlg et αlac. Cela confirme qu'il reste bien des NP après 24 h d'étuvage, comme observé lors du dosage des protéines par chromatographie (Figure 29).

Après réduction au DDT (Figure 33B), pour les poudres étuvées 15 et 24 h, les bandes correspondantes aux PS et caséines sont plus épaisses, et il reste toujours des bandes noires en haut du gel. Après réduction, il y a donc libération de PS et de caséines, mais il reste toujours des polymères de grande taille. Les polymères sont donc constitués par des liaisons covalentes de type SS, mais aussi par d'autre(s) type(s) de liaisons covalentes que des ponts SS, qui ne sont pas réduits par le DTT. Des polymères de PS constitués de liaisons SS et de liaisons covalentes autres que des liaisons SS ont été observés dans le cas de l'étuvage à 100 °C d'une poudre d'IPS à pH 4,5 et 6,5 (Gulzar *et al.*, 2011b).

Cependant, la structure chimique de ces liaisons est inconnue. Ces auteurs suggèrent que ces liaisons sont des liaisons isopeptidiques intermoléculaires ou des liaisons réticulantes de type lysinoalanine.

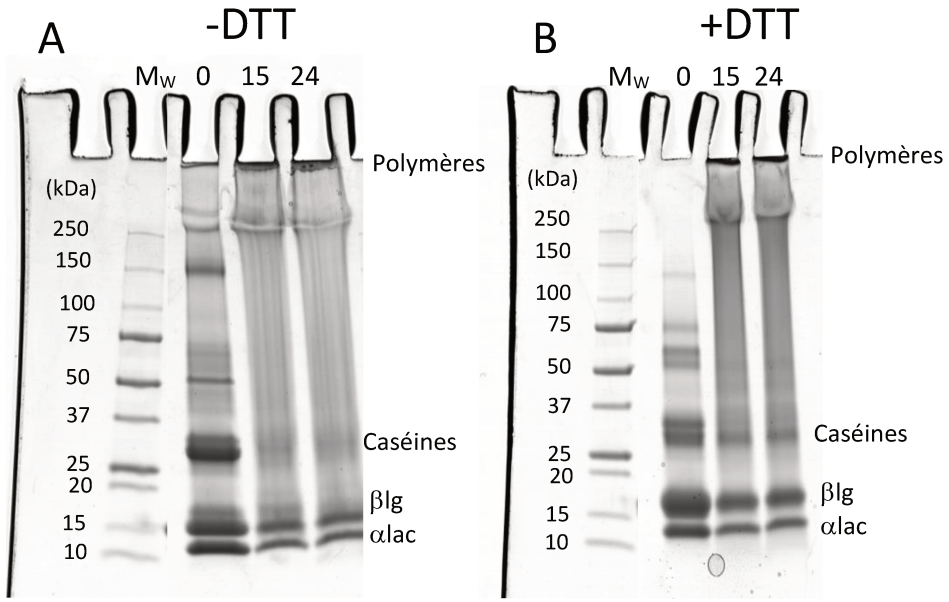


Figure 33 : Gel SDS-PAGE des suspensions de poudres étuvées 0, 15 et 24 h sans (A) et avec (B) réduction au DTT. M_w correspond au kit de marqueurs de poids moléculaire.

On en conclut que les AMI contiennent des PS, et peut être aussi des caséines. Les AMI sont constitués de liaisons covalentes de type SS mais aussi d'autre(s) type(s) de liaisons covalentes que des ponts SS. Il aurait fallu quantifier l'intensité des bandes pour avoir une évaluation de la quantité de liaisons SS, mais la présence des trainées grises dans le gel ne l'a pas permis.

6.3 EFFET DE LA CONCENTRATION EN NACL DANS LES SUSPENSIONS D'AMI SUR LEUR MORPHOLOGIE

Après avoir observé des modifications morphologiques des AMI suite à la variation du pH des suspensions d'AMI dans l'article 2, nous nous sommes intéressés aux propriétés morphologiques des AMI, suite à l'addition de NaCl en différentes concentrations dans le milieu de reconstitution des poudres étuvées. A terme, nous envisageons d'introduire les AMI dans des liquides laitiers comme des crèmes, des sauces ou des fromages. Ces produits contiennent du sel, il est donc intéressant d'étudier le comportement des AMI dans des solutions contenant du sel.

L'effet du sel sur la microstructure des AMI a été étudié avec la poudre étuvée 36 h. La poudre étuvée 36 h est reconstituée dans de l'eau désionisée ou dans des solutions de NaCl à 0,1, 0,5 et 1 M à 0,7 g de poudre/kg, de la même façon que décrit dans la partie D. « Matériel et méthodes ». Cent µL des suspensions sont mélangés à 50 µL de sonde Nile Blue, et 50 µL du mélange sont déposés sur une lamelle en verre, puis observés par CLSM de la même façon que décrit dans la partie D. « Matériel et méthodes ».

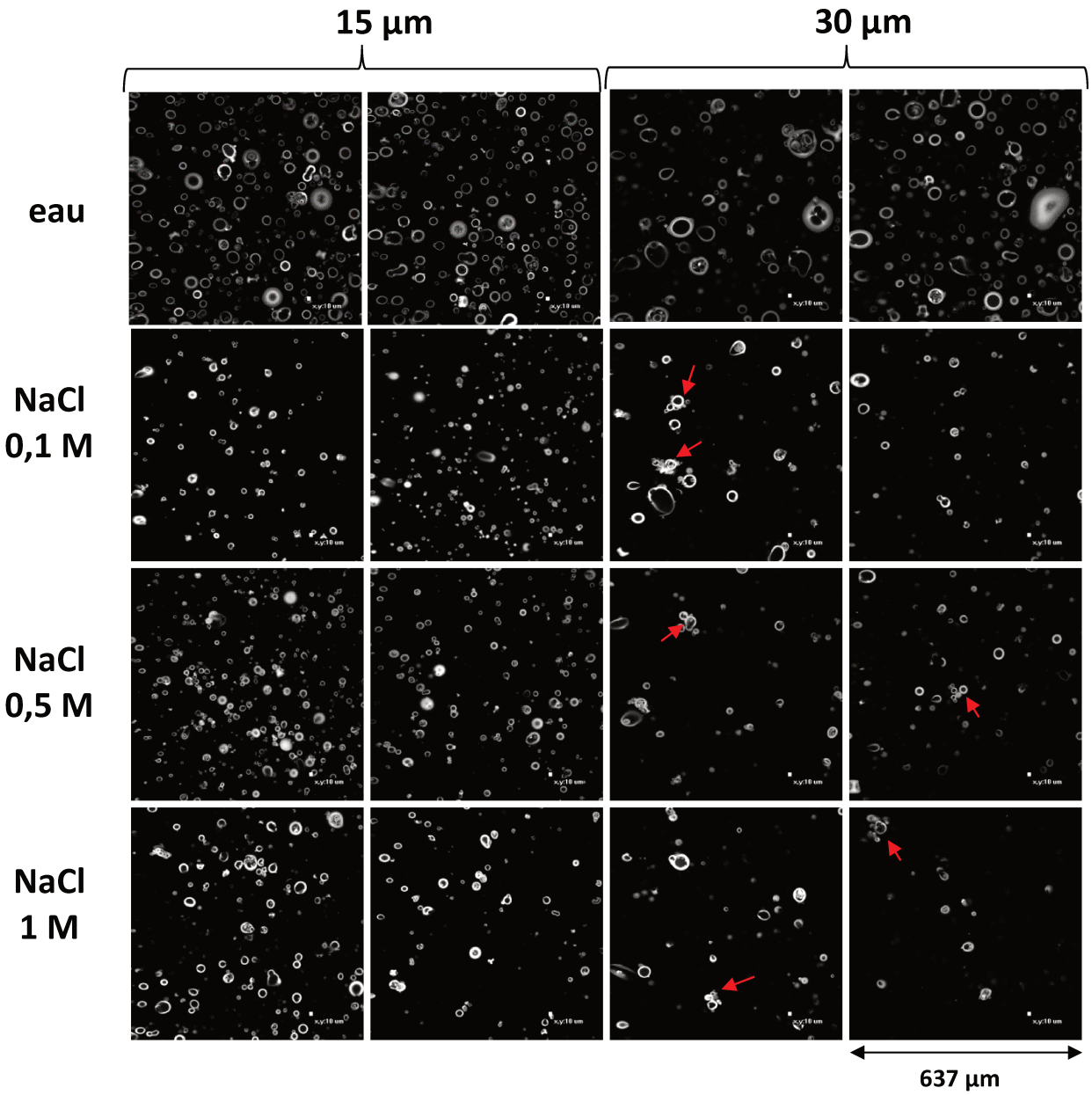


Figure 34 : Micrographies des suspensions d'AMI réalisées à partir de la poudre étuvée 36 h reconstituée dans de l'eau et dans NaCl 0,1, 0,5 et 1 M, obtenues par CLSM, objectif x20, à 15 µm et 30 µm de la lamelle. Les micrographies sont représentatives de l'ensemble des échantillons observés. Les flèches rouges pointent des petits amas d'AMI.

La Figure 34 montre les micrographies des AMI en suspension dans l'eau ou dans une solution de NaCl obtenus par CLSM. Les AMI apparaissent plus petits et donc moins gonflés lorsqu'ils sont suspendus dans les solutions de NaCl que dans l'eau, mais leur morphologie est la même. De plus, on observe la présence de nombreux petits amas d'AMI, quelle que soit la concentration en NaCl. La présence de sel écrante les charges des protéines. Les interactions répulsives électrostatiques seraient alors diminuées, facilitant ainsi l'interaction des AMI entre eux. Par ailleurs, au sein de chaque particule, il y aurait moins de répulsions électrostatiques entre les acides aminés chargés des chaînes protéiques, ce qui aurait pour effet de réduire la taille et le gonflement des AMI. Enfin, l'écrantage des charges rendrait les particules davantage hydrophobes et les capacités de rétention d'eau et donc de gonflement des AMI seraient diminuée, et les AMI pourraient s'agréger par des interactions hydrophobes.

6.4 QUELLE EST LA PART DES PROTEINES SOLUBLES PIEGEES PAR LES AMI ?

Les culots de centrifugation P1 et P2 correspondent aux AMI obtenus avec et sans lavage, respectivement (Figure 11). La Figure 35 montre les rendements secs (DY), les teneurs en eau (WC) et les rendements humides (WY) des AMI avant et après lavage, en fonction du temps d'étuvage de la poudre. Les WC avec et sans lavage ont été calculés en utilisant le DY après lavage correspondant à la valeur exacte en AMI.

Pour tous les temps d'étuvage de la poudre, les DY obtenus après lavage des AMI sont légèrement inférieurs à ceux obtenus sans lavage. Cependant, la différence entre les deux n'est qu'en moyenne de 6 %. Autrement dit, il n'y a que ~6 % des protéines des DY des culots P1 (avant lavage) qui ne font pas partie des AMI. Cependant, il y a davantage de différences entre les valeurs de WC et de WY des AMI obtenus avant et après lavage, pour un même temps d'étuvage de la poudre. Ce phénomène est probablement dû à la concentration en sel du tampon utilisé pour le lavage des culots. Sa molarité de 10 mM est supérieure à la molarité en sels des suspensions d'AMI. Nous l'avons estimée à 2,30 mM, à partir des données de composition en sodium, calcium, potassium, magnésium et chlorure (Chevallier *et al.*, 2018). Cependant, nous ne disposons pas de la teneur de tous les sels présents dans la poudre d'IPS, et cette concentration de 2,3 mM est probablement sous-estimée. Or, nous avons vu précédemment, que la présence de sel réduit les propriétés de gonflement et probablement la

rétention d'eau des AMI. Ceci expliquerait pourquoi le WC et donc le WY sont beaucoup plus faibles après lavage des AMI, alors que le DY est seulement réduit de 6 % par le lavage du culot. De ce fait, dans l'article 2, les DY ont été calculés à partir des culots P2, donc avec un lavage du culot, mais les WY ont été calculés à partir des culots P1, c'est-à-dire sans lavage du culot, et en négligeant la part des protéines solubles piégées par les AMI. Puisque la quantité de protéines dans les culots P1 d'eau est très faible devant la quantité d'eau, l'absence de lavage introduit certainement moins d'erreur sur le WY et le WC que le lavage du culot. De même, pour les mesures de viscosité, il est préférable d'utiliser l'étape de lavage, afin que les AMI obtenus à différents temps d'étuvage se trouvent exactement dans le même environnement physico-chimique. L'environnement physico-chimique a un effet important sur la microstructure des AMI en suspension et pourrait donc aussi avoir un effet important dans les propriétés d'écoulement des suspensions.

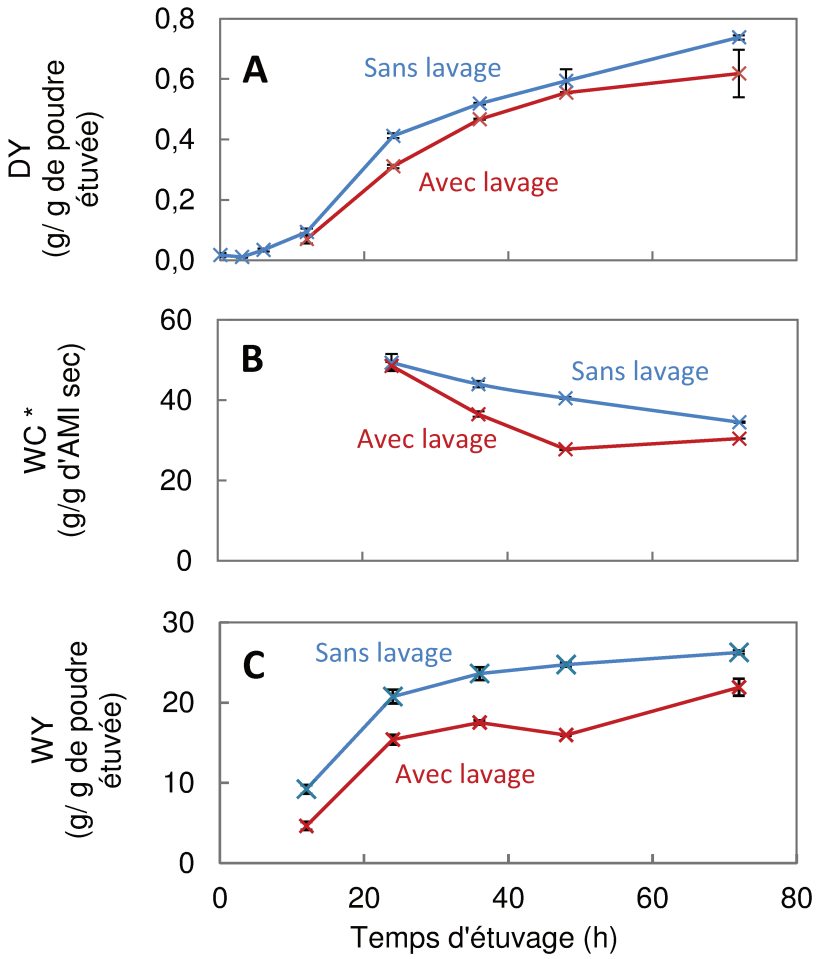


Figure 35 : Rendements secs (DY) (A), teneurs en eau (WC) (B) et rendements humides (WY) (C) des AMI évalués sans (courbes bleues) et avec lavage (courbes rouges), en fonction du temps d'étuvage de la poudre d'IPS. *Les WC avec et sans lavage ont été calculés en utilisant le DY après lavage.

6.5 QUEL EST L'EFFET DU MODE DE SECHAGE SUR LA FORMATION ET LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES AMI ?

Le Tableau 6 compare les résultats obtenus avec l'étuvage à 100 °C et pH 9,5 d'une poudre lyophilisée et d'une poudre pulvérisée :

- de l'intensité de la réaction de Maillard : BI et concentration de CML ;

- des propriétés physico-chimiques ;

-des propriétés morphologiques des AMI.

Tableau 6 : Caractérisation de la réaction de Maillard et des propriétés physico-chimiques et morphologiques des AMI obtenus suite à l'étuvage à 100 °C d'une poudre d'IPS à pH 9,5 lyophilisée et d'une poudre d'IPS à pH 9,5 pulvérisée.

Mode de séchage utilisé	Lyophilisation		Pulvérisation
NP à 0 h d'étuvage (%)	54 ± 5 *	≈	75 ± 9 **
BI à 36 h d'étuvage	56 ± 1	>	27 ± 3
CML à 36 h d'étuvage (ng/mg protéine)	1759 ± 152	≈	1412 ± 201
NP à 36 h d'étuvage (%)	15 ± 3 *	≈	24 ± 6
Forme des AMI	Lamelles angulaires lisses	≠	Sphérique, lisse, creux avec généralement la présence d'un petit trou sur la coque
D[4,3] à 36 h d'étuvage (µm)	~ 700	>	58,68 ± 3,65
DY à 36 h d'étuvage (g/g de poudre)	0,62 ± 0,04 $	>	0,50 ± 0,03 $
WC à 36 h d'étuvage (g/g de matière sèche)	30,21 ± 2,04 $	<	36,37 ± 1,45 $
WY à 36 h d'étuvage (g/g de poudre)	19,28 ± 2,15 $	≈	18,75 ± 1,31 $

* Valeurs obtenues par la méthode de Lowry.
** Valeurs obtenues par RP-HPLC à partir des surnagents S1A.
≈ : pas de différence significatives entre les deux valeurs (P<0,05).
$: Valeurs obtenues sans réaliser l'étape de lavage et les WC ont été calculés par g de matière sèche du culot P1.

A 36 h d'étuvage, la poudre lyophilisée brunit davantage que la poudre pulvérisée. Cependant, la différence de concentration de CML produite entre ces deux poudres après 36 h d'étuvage n'est pas statistiquement significative ($P<0,05$). Il ne semble pas qu'il y ait un réel effet du mode de séchage sur l'intensité de la réaction de Maillard, bien qu'elle apparaisse légèrement plus forte avec la lyophilisation par rapport à la pulvérisation, au regard du brunissement des poudres.

A 0 h d'étuvage des poudres, les quantités de NP ne sont pas statistiquement différentes entre la lyophilisation et la pulvérisation ($P<0,05$). Environ 30 % des PS sont dénaturées avant l'étuvage et il est possible que les procédés de séchage utilisés contribuent à la dénaturation des PS avant l'étuvage, en plus de la dénaturation alcaline qui a lieu avant le séchage. En effet, le chauffage des PS induit leur dénaturation (Cayot and Lorient, 1998). Le séchage par pulvérisation se réalise sous l'action d'air chaud qui entre à 250 °C dans la tour de séchage, mais la température de surface du produit pulvérisé n'est que de l'ordre de 50 °C tant que cette surface est saturée en eau. La température de dénaturation de la βlg, pour des pH supérieurs à 6,8 est de 60-70 °C (de Wit, 2009). Cependant, cette valeur varie avec le pH et la concentration en protéines (Qi *et al*., 1995). Par exemple, la température de dénaturation de la βlg à 120 g/L diminue de 75 à 68 °C avec l'augmentation du pH de 6,75 à 8,05, du fait de l'augmentation de la réactivité des groupements thiols ; à pH 8,05, la température de dénaturation de la βlg diminue d'environ 4 °C entre 2 et 25 g/L et augmente d'environ 4 °C entre 25 et 120 g/L (Qi *et al*., 1995). De plus, la température de la poudre tend ensuite vers la température de l'air de sortie, qui dans notre cas varie entre 90 et 100 °C (Schuck, 2011). Les températures vécues par la poudre au cours du procédé de pulvérisation peuvent donc engendrer la dénaturation des PS. La lyophilisation met en œuvre des températures beaucoup plus basses, puisqu'elle nécessite une étape de congélation, qui a eu lieu à -26 °C dans notre cas. Le produit subit également des basses pressions et une étape de sublimation. Cependant peu d'études ont été entreprises sur l'effet de ces conditions de température et de pression sur la dénaturation des PS. Strambini et Gabellieri (1996) ont démontré que la congélation entraine un déplissement partiel des protéines globulaires. Watanabe *et al*. (1994) ont mis en évidence une dénaturation de l'ovalbumine par des cycles de congélation-décongélation, se traduisant par une accessibilité croissante de la fonction thiol. Il est possible que la congélation associée au pH 9,5 induise une dénaturation non négligeable des PS.

Les AMI obtenus avec la poudre lyophilisée ont une forme et des tailles différentes de celles des AMI obtenus avec la poudre pulvérisée. En effet, les AMI ont une forme et des tailles relatives à celles de la poudre dont ils sont issus, puisqu'ils correspondent aux particules de poudre rendus insolubles par l'étuvage.

Les WY en AMI obtenus après 36 h d'étuvage de la poudre lyophilisée ou pulvérisée sont similaires, mais le DY est légèrement plus élevé et WC légèrement plus faible dans le cas de la lyophilisation que dans le cas de la pulvérisation. Cependant, les valeurs sont proches. Nous avons vu dans l'article 2 que le DY augmente et le WC diminue au cours du temps d'étuvage. Ainsi, la vitesse de formation des AMI semble un peu plus rapide dans le cas de la lyophilisation que dans le cas de la pulvérisation. On se serait plutôt attendu à une formation des AMI favorisée dans le cas de la pulvérisation que dans le cas de la lyophilisation. On peut en effet supposer que le rapprochement entre les protéines est peu probable lors de la lyophilisation, contrairement au séchage par pulvérisation. En effet, lors de la concentration des protéines par évaporation de l'eau au cours de la pulvérisation, le volume de la goutte diminue, et les protéines se rapprochent les unes des autres dans la particule de poudre (Sadek *et al.*, 2013). Lors du séchage par lyophilisation, l'eau est éliminée par sublimation, c'est-à-dire qu'elle passe de l'état solide à l'état gazeux et cette transition se ferait plutôt sans changement de volume du liquide congelé, à notre connaissance, et donc sans rapprochement entre les protéines. Lors de l'étuvage, l'a_w des poudres est faible, la diffusion des molécules est donc limitée. Le rapprochement des protéines devrait donc favoriser les réactions entre les molécules et leur agrégation. Comme la vitesse de production des AMI semble supérieure avec le procédé de lyophilisation que avec le procédé de pulvérisation, on suppose que la conformation des protéines dénaturées est différente avec la lyophilisation et la pulvérisation et quelle est plus favorable à la production de particules insolubles dans le cas de la lyophilisation.

Pour conclure, la formation des AMI pendant l'étuvage semble être plus rapide avec de la poudre lyophilisée, qu'avec de la poudre pulvérisée. Malgré tout, les DY, WC, WY et les taux de dénaturation des PS obtenues suite à la lyophilisation et la pulvérisation sont proches. On obtient donc des AMI avec des propriétés de rétention d'eau des rendements très similaires avec ces deux modes de séchages. Les seules différences importantes liées au séchage, sont la taille et la morphologie des AMI formés suite à l'étuvage.

6.6 QUELLE HYPOTHESE PEUT-ON EMETTRE CONCERNANT LE MECANISME DE FORMATION DES AMI ?

La taille des AMI est légèrement supérieure à celle des particules de poudre étuvée. Ceci est dû au fait que les AMI sont issus des particules de poudre qui gonflent lorsqu'elles sont suspendues dans une phase aqueuse telle que l'eau. De plus, les AMI sont constitués de liaisons covalentes de type pont SS et d'autres types de liaisons covalentes que des pont SS, qui sont probablement des liaisons réticulantes et qui sont non identifiés dans ce travail. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que les AMI sont formés par réticulation des protéines au sein des particules de poudre pendant l'étuvage, et que plus le temps d'étuvage est long et plus la réticulation des protéines est forte.

Un schéma reprenant l'hypothèse du mécanisme de formation des AMI est représenté dans la Figure 36. A temps d'étuvage court, les particules de poudre seraient constituées d'un faible taux de réticulation entre des protéines. Ainsi, lorsque les particules de poudre sont suspendues dans une phase aqueuse, les protéines qui ne seraient pas liées par des liaisons réticulantes se solubiliserait dans l'eau. Les protéines réticulées dans les particules de poudre formeraient un réseau lâche de protéines, qui gonflerait dans l'eau par répulsions électrostatiques entre les acides aminés des chaînes protéiques. Inversement, un temps d'étuvage long induirait un fort taux de réticulation entre les protéines. Il n'y aurait alors qu'une faible proportion de protéines non liées par des liaisons réticulantes, qui se solubiliseraient dans l'eau. Les protéines réticulées dans les particules de poudre formeraient alors un réseau protéique dense et rigide, ce qui provoquerait une augmentation du DY et réduirait la possibilité de piéger de l'eau au sein de la structure et de se déformer, induisant une diminution du WC et des propriétés de gonflement des AMI. La mesure de résistance des particules de poudre réticulées ou des AMI aurait peut-être pu permettre de valider cette hypothèse, mais celle-ci n'a pas été réalisée faute de temps et/ou de matériel pour réaliser cette analyse.

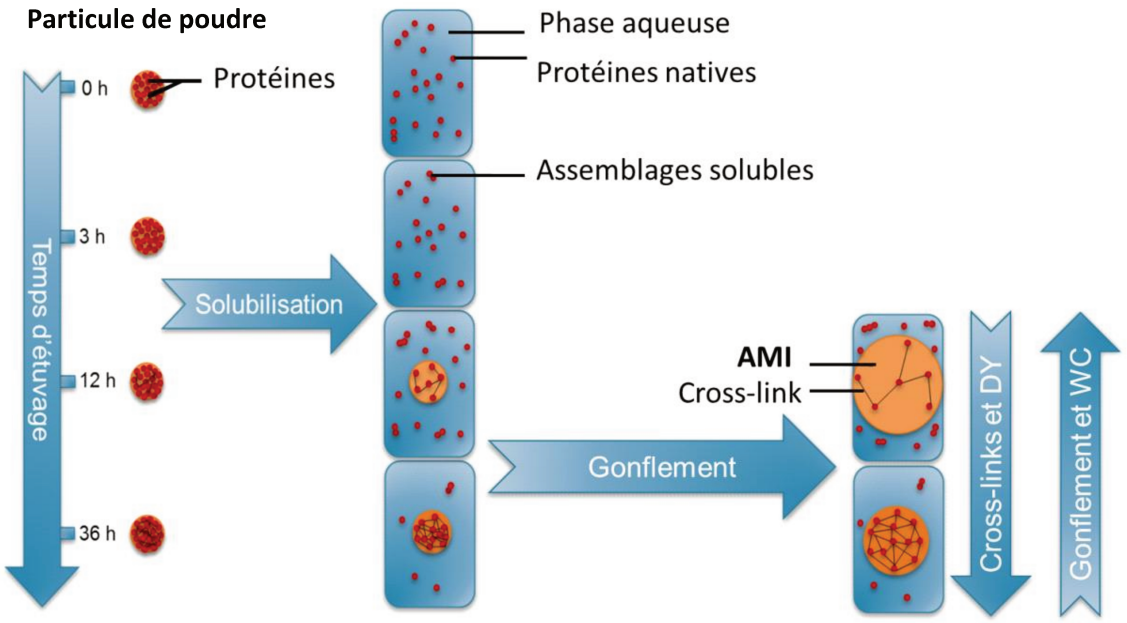


Figure 36 : Hypothèse du mécanisme de formation des AMI ; DY = rendement sec et WC = teneur en eau.

6.7 QUELLE HYPOTHESE PEUT-ON EMETTRE CONCERNANT L'ORIGINE DES LIAISONS RETICULANTES ?

Le lactose et la réaction de Maillard semblent intervenir dans la formation des AMI. La réaction de Maillard est cependant terminée au bout de 3 h d'étuvage car il n'y a plus de lactose libre disponible. Pourtant, il n'y a pas encore d'AMI formés en 3 h d'étuvage, et ceux-ci ne se forment qu'après 6 h d'étuvage.

Cho et Kato (1984) ont étudié le mécanisme de la polymérisation par étuvage du lysozyme, une protéine globulaire issue du blanc d'œuf, en présence de glucose. L'étuvage a été effectué avec une humidité relative de 75 % à 50 °C pendant 30 j. Dans un premier temps, ils ont étuvé le lysozyme avec du glucose pendant 10 j, et supposent une formation de groupements fonctionnels sur les protéines. Dans un deuxième temps, ils ont retiré le glucose résiduel et ont poursuivi l'étuvage du lysozyme en absence de glucose pendant 10 j. Ils ont observé que le lysozyme se polymérisait pendant ces 10 j d'étuvage supplémentaires. La polymérisation n'est donc pas réalisée par la réaction de Maillard, mais cette dernière est indispensable pour créer les groupements fonctionnels permettant la polymérisation.

Ils ont émis l'hypothèse que les agents bifonctionnels, i.e. contenant 2 sites fonctionnels, produits au cours de la réaction de Maillard s'attachent à des résidus Arg, Lys et Trp des protéines, par l'un des 2 sites fonctionnels. Certaines protéines liées avec l'agent bifonctionnel se polymériseraient en se fixant par l'autre site fonctionnel, sur un résidus Lys ou Arg (mais pas Trp) d'une autre protéine. Ils soupçonnent que les agents bifonctionnels sont des composés α-dicarbonylés. Cho *et al*. (1986) ont par la suite montré que les composés α-dicarbonylés, mais aussi les composés α-hydroxycarbonylés, étaient en effet capables de polymériser le lysozyme dans les mêmes conditions. Kato *et al*. (1986) ont eux aussi démontré que la réaction entre les composés α-dicarbonylés et le lysosyme en solution aqueuse menait à la polymérisation de la protéine.

Ainsi, nous soupçonnons que l'hypothèse émise Cho et Kato (1984) pour la polymérisation du lysosyme, pourrait également s'appliquer pour la formation des AMI.

Ainsi, il y aurait deux grandes étapes de la formation des AMI :

- une première étape, la réaction de Maillard, initiée par la lactosylation des protéines qui produirait des groupements fonctionnels ;
- une deuxième étape, la réaction de polymérisation des protéines, grâce à ces groupements fonctionnels.

Les deux étapes décrites ci-dessus sont représentées schématiquement dans la Figure 37.

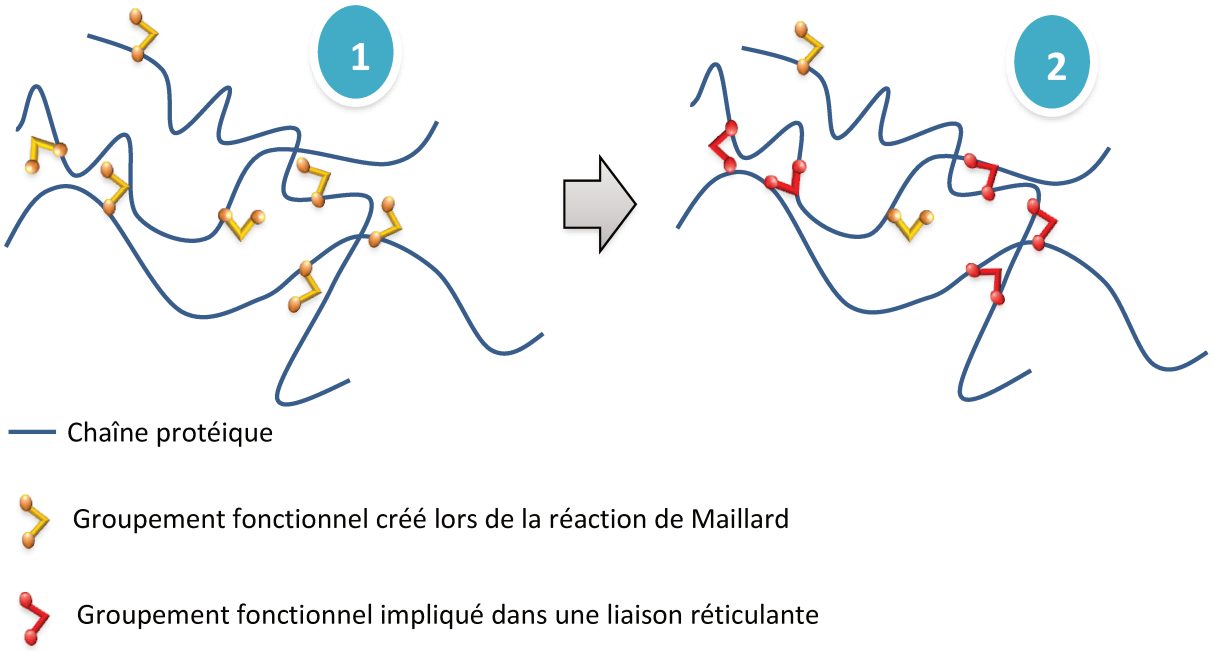


Figure 37 : Schéma hypothétique de formation de liaisons réticulantes entre les protéines.

BILAN DU CHAPITRE 2

Remplacer le séchage par lyophilisation par un séchage par pulvérisation dans le procédé d'étuvage d'une poudre d'IPS à pH 9,5 conduit aussi à la formation d'AMI ayant une forte capacité de rétention d'eau. Par cette méthode de séchage, nous avons pu confirmer que les AMI ont bien une morphologie et des tailles qui sont relatives à celles des particules de poudre. En effet, le séchage par pulvérisation permet d'obtenir des AMI sphériques, lisses et creux, avec parfois un trou à leur surface, ayant des tailles comprises entre 4 et 400 µm, alors que le séchage par lyophilisation permet d'obtenir des AMI avec des tailles plus grosses en forme de lamelles angulaires lisses.

Un résumé des principaux résultats obtenus dans le chapitre 2 sur l'étuvage à pH 9,5 d'une poudre d'IPS produite à l'aide d'un séchage par pulvérisation est schématisé en Figure 38.

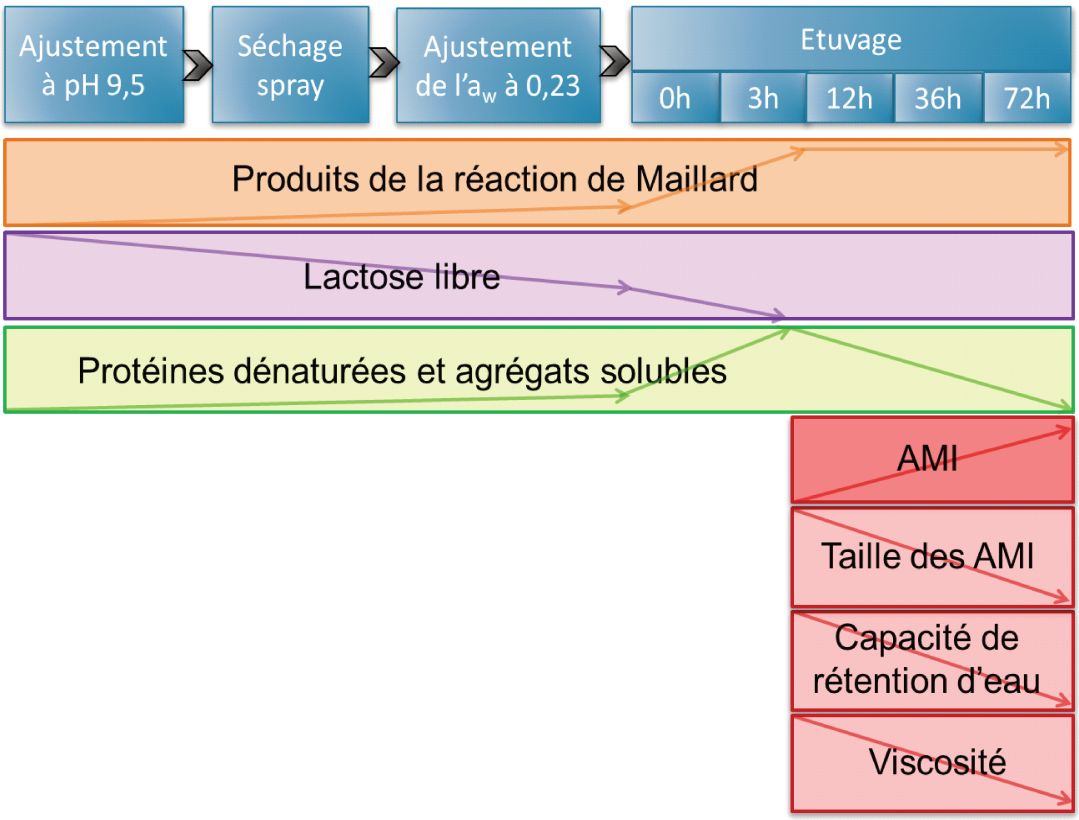


Figure 38 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus dans le chapitre 2.

La Figure 38 met en évidence les résultats suivant :

- Avant l'étuvage, et après les étapes d'alcalinisation à pH 9,5, de séchage par pulvérisation et d'ajustement de l'a_w de la poudre, environ un tiers des molécules de lactose libres présentes dans la poudre d'IPS de départ sont liées à des protéines et il y a formation de CML, l'un des AGE de la réaction de Maillard. Par ailleurs, il y a environ 30 % des PS sous forme de SDAP. La réaction de Maillard et la dénaturation des PS ont donc déjà lieu avant l'étuvage.
- Durant les trois premières heures d'étuvage, les PS continuent de se dénaturer, et au bout de 3 h d'étuvage, environ les trois quarts des PS se retrouvent dans les SDAP. Il y a aussi une augmentation brusque de CML et du brunissement de la poudre, traduisant une augmentation brusque de l'intensité de la réaction de Maillard.
- Au bout de 3 h d'étuvage, l'ensemble des molécules de lactose est conjugué aux protéines. La production de CML et le brunissement de la poudre n'évoluent presque plus après 3 h d'étuvage. La réaction de Maillard est donc finie à 3 h d'étuvage et le lactose est un facteur limitant à la réaction de Maillard. A 3 h d'étuvage, on n'observe pas encore d'AMI dans les suspensions. Un résultat similaire a été obtenu dans les travaux de Famelart *et al*. (2018), où le BI et l'absorbance à 500 nm, quantifiant les produits de la réaction de Maillard, arrêtaient d'évoluer après 6-12 h d'étuvage (6 h est le plus petit temps d'étuvage étudié dans ce travail).
- Les AMI commencent à se former à partir de 6 h d'étuvage. A 6 h, ils sont très peu nombreux et souvent incomplètement formés. Ce n'est qu'après 12 h d'étuvage que les AMI commencent à être nombreux, avec une morphologie ressemblant à celle de la poudre. Au cours du temps d'étuvage, les DY en AMI augmentent, mais les WC diminuent à partir de 24 h d'étuvage. A 24 h d'étuvage, les AMI sont capables de retenir ~66 fois leur poids en eau, mais ne représentent qu'un DY de 0,3 g/ g de poudre étuvée. Le WY n'évolue plus beaucoup après 24 h d'étuvage, puisque le DY continu d'augmenter alors que le WC diminue. Il y a aussi une diminution de la taille des AMI en suspension dans l'eau avec le temps d'étuvage. De plus, les suspensions concentrées en AMI sont très visqueuses, mais leur viscosité diminue avec le temps d'étuvage. Il semble que la taille des AMI, leur capacité de rétention d'eau et leurs propriétés d'écoulement soient corrélées.

Nous avons aussi confirmé dans ce chapitre que les AMI sont les particules de poudre rendues insolubles par l'étuvage à 100 °C et pH 9,5. Lorsque les particules de poudre sont suspendues dans l'eau, ils se mettent à gonfler, donnant lieu aux AMI. La variation de taille des AMI avec l'étuvage correspond donc à une variation de la capacité de la particule à gonfler dans l'eau.

Les propriétés de gonflements des AMI en phase aqueuse sont très sensibles à leur environnement physico-chimique. En effet, l'addition de NaCl réduit la taille des AMI. Il en est de même lorsque le pH des suspensions est proche du pI des PS. La variation de taille des AMI avec le pH est cependant réversible. Les AMI ont donc la particularité de pouvoir gonfler et dégonfler selon leur environnement physico-chimique.

Les AMI sont constitués par des liaisons covalentes de type pont SS mais aussi par des liaisons covalentes autres que des pont SS, qui sont des liaisons réticulantes non identifiés dans ce travail. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que les AMI sont formés par la réticulation des protéines au sein d'une particule de poudre durant l'étuvage à 100 °C et pH 9,5 et que plus le temps d'étuvage est long et plus il y a de réticulation entre les protéines et plus les AMI sont denses et moins ils ont la capacité de gonfler et d'immobiliser l'eau dans leur structure. Nous émettons aussi l'hypothèse que la formation des AMI se fait en deux étapes, la première étant la création de sites fonctionnels sur les protéines induite par la réaction de Maillard, et la deuxième étant la formation des liaisons réticulantes entre les protéines via ces sites fonctionnels créés lors de la première étape.

Notes à prendre en compte pour la poursuite de l'étude :

- Les AMI ont globalement les mêmes propriétés lorsqu'ils sont obtenus avec un séchage par lyophilisation qu'avec un séchage par pulvérisation. Seules la taille et la morphologie des AMI sont très différentes. Le séchage par pulvérisation est plus long à réaliser, et nécessite plus de protéines que le séchage par lyophilisation. Nous avons donc choisi de continuer l'étude de compréhension du mécanisme de formation des AMI en utilisant la poudre lyophilisée.
- Nous avons montré que la quantité de protéines de la phase soluble emprisonnées par les AMI est faible. Pour la poursuite de l'étude, il a donc été choisi de ne pas effectuer d'étape de lavage du culot pour évaluer les DY.

CHAPITRE 3 : ROLE DES CONSTITUANTS DE LA POUDRE D'ISOLAT DE PROTEINES SERIQUES SUR LA FORMATION DES AMI : ROLE DU LACTOSE

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article soumis dans le journal « Food Hydrocolloids » (article 4).

INTRODUCTION :

Les chapitres 1 et 2 ont mis en évidence que l'étuvage à 100 °C d'une poudre d'IPS à pH 9,5 induit la glycation des protéines ainsi que la production d'AGE de la réaction de Maillard, tels que la CML et les mélanoïdines. Le lactose et la réaction de Maillard semblent être impliqués dans la formation des AMI. Au bout de 3 h d'étuvage de la poudre, il n'y a plus de lactose libre et le brunissement de la poudre et la formation de CML n'évoluent presque plus. Le lactose semble être un facteur limitant à la réaction de Maillard, et donc peut être à la dénaturation des PS et à l'intégration des protéines dans les AMI.

Le rôle du lactose dans le mécanisme de formation a été étudié dans ce chapitre.

Principaux objectifs :

- **Déterminer le rôle du lactose dans le mécanisme de formation des AMI.**
- **Déterminer si le lactose présent dans la poudre d'IPS de départ est limitant à la dénaturation des PS et à la formation des AMI.**
- **Etudier l'effet du lactose sur les propriétés physico-chimiques et morphologiques des AMI.**
- **Vérifier qu'il n'y a pas de différences entre un séchage par lyophilisation et par pulvérisation dans la formation des AMI suite à l'ajout de lactose.**

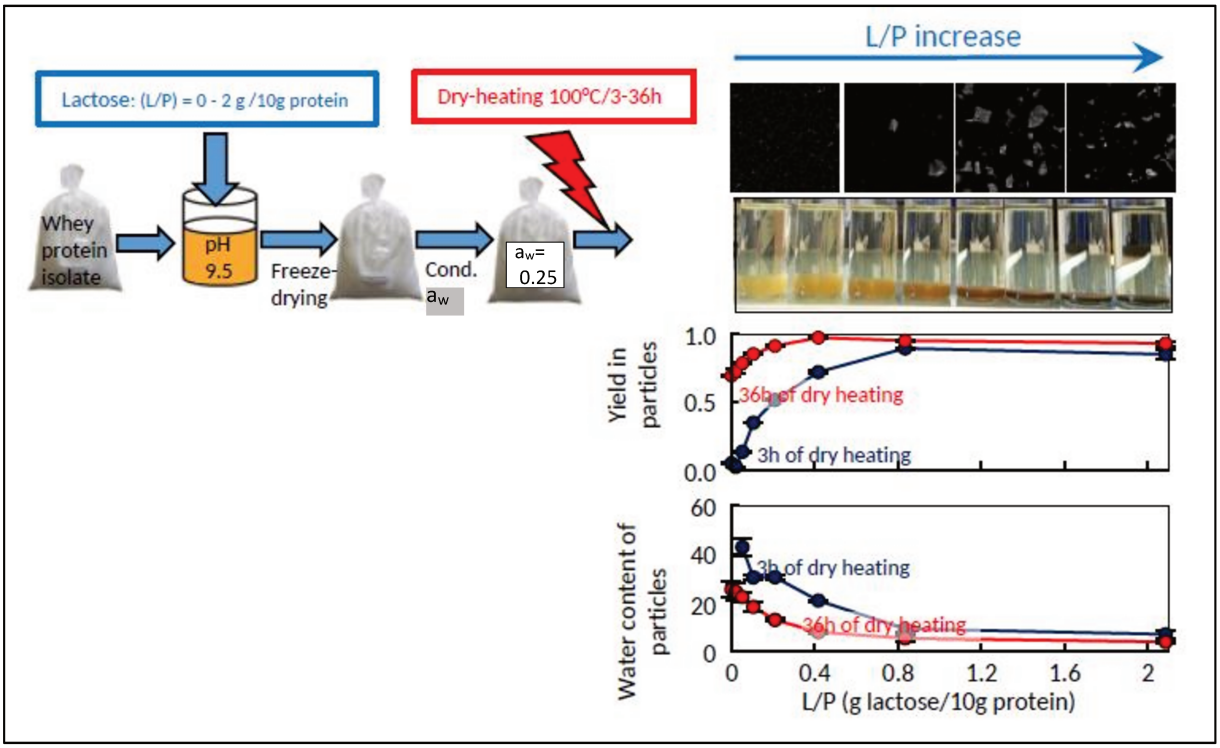
Stratégie :

Différentes quantités de lactose ont été ajoutées à la poudre d'IPS de départ. Le ratio en poids de lactose ajouté aux protéines (L/P) a été ajusté de 0 à 2,09 g/10 g de protéine. Le séchage par lyophilisation a été utilisé dans le procédé d'étuvage à pH 9,5. Les rendements de formation des AMI

et la caractérisation des AMI (taille, morphologie, teneur en eau, densité, etc.) ont été étudiées à 0, 3 et 36 h d'étuvage de la poudre en fonction de la quantité de lactose ajouté. Les résultats obtenus avec la poudre L/P= 0,2 g /10 g ont été vérifiés sur une poudre produite par pulvérisation. De plus, des temps d'étuvage supplémentaires ont été réalisés avec la poudre pulvérisée, afin de suivre l'évolution de la formation des AMI entre 3 et 36 h d'étuvage.

Influence of lactose on the formation of whey proteins microparticles obtained by dry heating at alkaline pH

Elise Schong, Marie-Hélène Famelart



Graphical abstract

Highlights:

- Microparticles were produced by dry heating whey proteins at pH 9.5 with added lactose
- Higher lactose content accelerated the rate and the yield of microparticle production
- Higher lactose content increased the production of Maillard advance end-product (AGE)
- Production of microparticles was not correlated to production of Maillard AGE

Abstract

Dry heating (DH) at 100°C a whey protein isolate powder conditioned at pH 9.5 leads to the formation of stable large porous whey protein microparticles (WPM) by reticulation of the powder. The Maillard reaction (MR) is probably involved in this formation. To confirm the role of the MR, and understand the protein changes during particle formation, the content in lactose in powders was increased, and the changes in powders such as their color or water activity (a_w) were followed and WPM were characterized after 3 and 36 h of DH. Adding lactose increased the rate of denaturation of proteins and of the formation of WPM, and the yield of formation of WPM, but decreased their moisture content, exactly as did prolonged times of DH. Different kinetics were observed with addition of lactose for the MR, the increase in a_w and the formation of WPM. While the MR, as followed by the powder browning, was completed after at least 3h of DH irrespective of the content in added lactose, the increase in a_w, thought to be also due to the progress of the MR, went on increasing from 3 to 36h of DH, and formation of WPM continued to increasing from 3 to 36h of DH at low to medium levels of lactose, but was completed at 3h of DH or even earlier at high levels of lactose. In conclusion, the formation of WPM was not simply related to the MR and needs further investigations.

Keywords: Whey protein; Microparticle; Dry heating; Aggregation; Maillard reaction; Lactose

1. INTRODUCTION

Whey protein isolate (WPI) powders are commonly used in the food industry due to their nutritional value and functional properties. There are many studies on WPI aggregation/denaturation as performed by heating during a liquid process to enhance their functional properties (Nicolai *et al*., 2011a), but an increasing number of studies deals with heating in a dry process, i.e. heating the protein powder (Gulzar *et al*., 2011b; Hiller and Lorenzen, 2010; Liu and Zhong, 2013; Liu *et al*., 2014; Wang *et al*., 2013).

Previous studies showed that a dry heating (DH) at 100°C up to 72 h of a freeze-dried or a spray-dried WPI powder conditioned at pH 9.5 with a water activity ~0.2 leads to the formation of whey protein microparticles (WPM) that have the same shape as that of the powder particles. WPM obtained from DH freeze-dried powders have highly heterogeneous sizes [50-2000 µm] and angular

shape (Famelart *et al*., 2018), while WPM obtained from DH spray-dried powders are spherical with an open hollow structure and sizes centered around 60-90 µm (Schong and Famelart, 2018a). Due to their large sizes, WPM obtained by this DH process can settle down rather rapidly. DH leads to the browning of powders and the formation of advanced glycation end products (AGEs) caused by the Maillard reaction (MR). This powder contains ~6 mg of free lactose per g powder, but there is also some undetermined bound-lactose (Schong and Famelart, 2018a). The MR is a type of non-enzymatic browning reaction. It is initiated by the reaction between a free amino group of protein or an amino acid and a carbonyl group of a reducing sugar. It is a complex cascade reaction that includes rearrangements, isomerisations, dehydratations, cyclisations, enolisations, retroaldolisations, caramelization, condensations, cleavages, and polymerisations and that leads to heterogeneous MR products (Ames, 1992; Hiller and Lorenzen, 2010; Martins *et al*., 2000). Among those, the formation of melanoidins, which are brown nitrogenous polymers, is responsible for the browning (Ames, 1992). Furthermore, several studies have reported that glycosylation of food proteins through the MR can improve their functional properties such as gelling or foaming properties (Handa and Kuroda, 1999; Martinez-Alvarenga *et al*., 2014; Schong and Famelart, 2017).

The aim of this paper was to study the effect of lactose on the formation of WPM by dry heating and increase our knowledge on the WPM formation mechanisms.

2. MATERIEL AND METHODS

2.1 MATERIALS

A commercial whey protein isolate (WPI) powder was obtained from a confidential source. Protein content of WPI powder was ~911 $g.kg^{-1}$ (determined by the Kjeldahl method using 6.38 as conversion factor), which ~82 % is whey protein and ~18 % is casein (determined by polyacrylamide gel electrophoresis (Chevallier *et al*., 2018). Both carboxymethyllysine (CML) and (D2)-CML were provided by PolyPeptide Laboratories France SAS (Strasbourg, France). Lithium buffers pH 2.20, pH 2.80, pH 3.00, pH 3.15, pH 3.50 and pH 3.55 and ninhydrin reagent (EZ Nin reagent) were obtained from Biochrom Ltd (Cambridge, UK). α-Lactose monohydrate (4-O-β-D-galactopyranosyl-α-D-glucose), potassium acetate, amino acid standard, nonafluoropentanoic acid (NFPA) 97%, hydrochloric acid 37%,

trifluoroacetic acid, sodium hydroxide, sodium borohydride and boric acid were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Acetonitrile, glacial acetic acid, sodium acetate trihydrate were from VWR international (Fontenay-sous-Bois, France). Standard of βlactoglobulin (βlg) was from an industrial source, after precipitation at pH 4.6 and freeze-drying the supernatant, and αlactalbumin (αlac) was prepared according to Caussin *et al.* (2003).

2.2 PREPARATION OF DRY HEATED POWDERS

α-Lactose monohydrate at different concentrations (0 to 30 $g.kg^{-1}$) were first dispersed in distilled water. WPI powder was then added so as to reach a final concentration of 150 g of $powder.kg^{-1}$ and stirred overnight at 4°C. The ratio in weight of added lactose to protein (L/P) was adjusted between 0 (no added lactose) and 2.09 g lactose/10 g protein at the highest level. The ratio L/P= 2.09 g/10 g is approximately equivalent to 11 mol lactose/mol protein, assuming that WPI consisted of 82% of βlg and 18% of αlac, and using Mw of 18283 and 14173 $mol.g^{-1}$, respectively. The pH of the solutions was then adjusted to 9.5 with 5 to 1 $mol.L^{-1}$ NaOH, and then rapidly freeze-dried. In order to obtain fine powder particles, freeze-dried powders are first crushed roughly for 1 min with the Lab Blender 400 (Stomacher) and then, crushed with a coffee grinder (Prepline, SEB) during 40 s. Afterward, the powders were kept for 2 weeks at 20 °C in a desiccator with a saturated CH_3CO_2K solution. This time was sufficient to get an a_w of 0.25 ± 0.01 as checked with an a_w meter (Decagon Aqualab 3TE). Powders were then heated at 100 °C up to 96 h in tightly sealed Pyrex tubes. This whole preparation of dry-heated powders was done twice.

2.3 PREPARATION OF WPM DISPERSIONS

The DH powders were reconstituted at almost 10 g of $powder.kg^{-1}$ into distilled water with 0.2 $g.kg^{-1}$ sodium azide. The suspension was stirred overnight at 300 rpm at room temperature. Then, the pH was slowly adjusted to 6.50 ± 0.03 with HCl, and the final concentration was adjusted at 10 g of $powder.kg^{-1}$.

2.4 COLOR ANALYSES OF POWDERS

The color of powders was measured before and after dry heating by using the CR-300 chromameter (Minolta, Roissy, France). The color values were measured as *L** (whiteness), *a** (redness/greenness) and *b** (yellowness/blueness) and the browning index (BI) was obtained according to Maskan (2001) as:

$$BI = \frac{[100(x-0.31)]}{0.17} \qquad \text{equation 1}$$

$$x = \frac{(a* + 1.75L*)}{(5.645L* + a* - 3.012b*)} \qquad \text{equation 2}$$

2.5 MARKER OF THE MR

Carboxymethyllysine (CML) was determined using the method of Niquet-Léridon and Tessier (2011). Analyses were done in duplicate. Briefly, powder amounts equivalent to 10 mg of protein were reduced with 1.5 mL of borate buffer (200 mM, pH 9.5) and 1 mL of sodium borohydride (1 M in 0.1 M NaOH) at room temperature for 4 h. Afterwards, hydrolysis was carried out in 6 N hydrochloric acid at 110°C for 20 h. Hydrolysates were vacuum-dried and the dry residues were reconstituted with 20 mM NFPA containing the internal standards (D2)-CML. After filtration through a 0.45 µm filter, samples were analyzed using an LC-MS/MS device. Quantification of CML was achieved by measuring its peak ratio to the corresponding internal standard and by comparison with a calibration curve. The linear range of CML was from 1 to 200 $ng.mL^{-1}$.

2.6 DETERMINATION OF THE POWDER GRANULAR SIZE DISTRIBUTION

Unheated powder granular size distribution was performed using the Qicpic™ analyser (Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Germany) equipped with the dry disperser Rodos/L module (Sympatec GmbH). Lens M6 was used, allowing measurements of particle sizes between 5 and 1705 µm. Millions of particles were evaluated during 30 s of acquisition. The device combined a powder disperser with a dynamic image analysis as performed with a special pulsed light source using a special imaging objective and a high speed camera with 1024 x 1024 pixels x pixels. Particles are imaged as black and image data are processed and stored, in real time. Measurements were repeated thrice.

2.7 OPTICAL DENSITY AT 500 NM OF WPM SUSPENSIONS

Optical density at 500 nm (OD_{500}) of WPM dispersions was measured using the spectrometer UVmc2 (SAFAS, Monaco) and plastic cuvettes with 1 cm optical path length. Samples were diluted into distilled water when absorbance value at 500 nm was ≥ 0.8. Measurements were repeated 5 times.

2.8 DENATURATION OF WHEY PROTEINS

One mL of suspensions was acidified at pH 4.6 by adding 300 µL of 0.5 M, pH 4.6, acetate-acetic acid buffer and then centrifuged 15 min at 10000 *g* in order to recover residual native proteins in supernatants. Supernatants were frozen until analysis. Native whey proteins, βlg and αlac were quantified in supernatants by reverse phase HPLC with C4 VYDAC colum (214 TP 5215,150 x 2.1 mm). After thawing, supernatants were diluted 10 times in a solution of 0.106 % trifluoroacetic acid (TFA) (buffer A). One hundred µL samples were injected into the column with a flow of 0.2 $mL.min^{-1}$ with an acetonitrile gradient of buffer A and buffer B (acetonitrile + 0.1 % trifluoroacetic acid). The column was equilibrated with 28% buffer B. Then a linear gradient from 28 to 49.6 % in buffer B in 40 min, was applied, and from 49.6 to 80% over 1 min, followed by 3 min at 80%, and back to 28 % over 1 min, and 5 min at 28 %. Proteins were detected at 214 nm. Two standard of βlg and αlac were prepared at 1.13 and 1.03 $g.L^{-1}$, respectively. Concentrations were checked by optical density measurement at 280 nm using extinction coefficients of 0.96 and 2.01 $L.g^{-1}.cm^{-1}$, respectively. Native whey proteins was the sum of the contents in βlg and αlac.

2.9 MICROSTRUCTURE OF WPM BY CONFOCAL MICROSCOPY

WPM dispersions were diluted 10 times with distilled water. Thirty µl of diluted sample were deposited on a glass lamella with 10 µl of 1 % (w/w) Nile Blue. The lamellas were observed with a TE2000-E inverted confocal laser scanning microscope (CLSM) equipped with a Nikon x 20 oil-immersion objective and a Nikon C1Si imaging system (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). An He–Ne laser with an excitation of 632 nm was used at 51 % of the laser power. The emitted light was recorded at 650 nm. The software used for image acquisition was EZ-C1 version 3.40 (Nikon). Each image was digitized as a 512 x 512 $pixel^2$ matrix representing 636 x 636 $µm^2$ taken 5 µm away from the lamella. Representative micrographs of microparticles are shown.

2.10 ANALYSIS OF WPM CLARIFICATION

Clarification of WPM, that is related to the sedimentation of particles with time was followed using a light backscattering method (Turbiscan^{TM} LAB, Formulation, L'Union, France) during 2 h. Approximately 20 mL of suspensions were transferred into the measurement cell of ~2.5 cm diameter (filling height~4 cm). Measurements were carried out at 20 °C. The transmission value at the half height of the tube was plotted against the clarification time and the slope of its increase between 10 and 120 min was determined in %/s.

2.11 DRY EXTRACT AND MOISTURE CONTENT OF WPM

Fractions of 2 g of WPM dispersions were centrifuged at 10 000 *g* for 15 min in order to recover the pellet that contained sedimented WPM. The weights of pellets were calculated in g for an equivalent of 100 g of suspension (WY). Then, pellets were dried using the Speed Vac Concentrator SVC-100H (Savant Instrument) during 13 h with heating at 45 °C. The dry weights were measured and also calculated in g for an equivalent of 100 g of suspension (DY). As 100 g of WPM dispersions contained 1 g of dry heated powder, WY and DY represented the dry and wet yields of formation of WPM in g/g.

The water content (WC) or water entrapment in the pellet was calculated as follow:

WC (g/g of dry WPM) = [WY – DY] / DY equation 3

Measurements were performed 4 times.

3. RESULTS

3.1 POWDER CHARACTERIZATION

Figure 39 shows the a_w and the BI of powders, before and after DH. The a_w increased with the time of DH between 0 and 36 h and with L/P. However, at L/P=0, the a_w of the powder increased by a factor 1.5 after 3 h of DH, and did not change for prolonged times of DH. This means that the change in a_w was completed after at least 3 h of DH. With lactose addition the a_w went on increasing between 3 and 36h of DH (and even between 1h and 3h of DH at L=2.09 g/10g). After 36h of DH, the increase in a_w

with L/P seemed to show a linear trend. Evidently, a maximal value of 1 could be reached, but this plateau is hardly seen till L/P=2.09 g/10g. The value reached after 36h of DH at L=2.09 g/10g was close to 0.7, a very high value, but we still had individual flakes of powder.

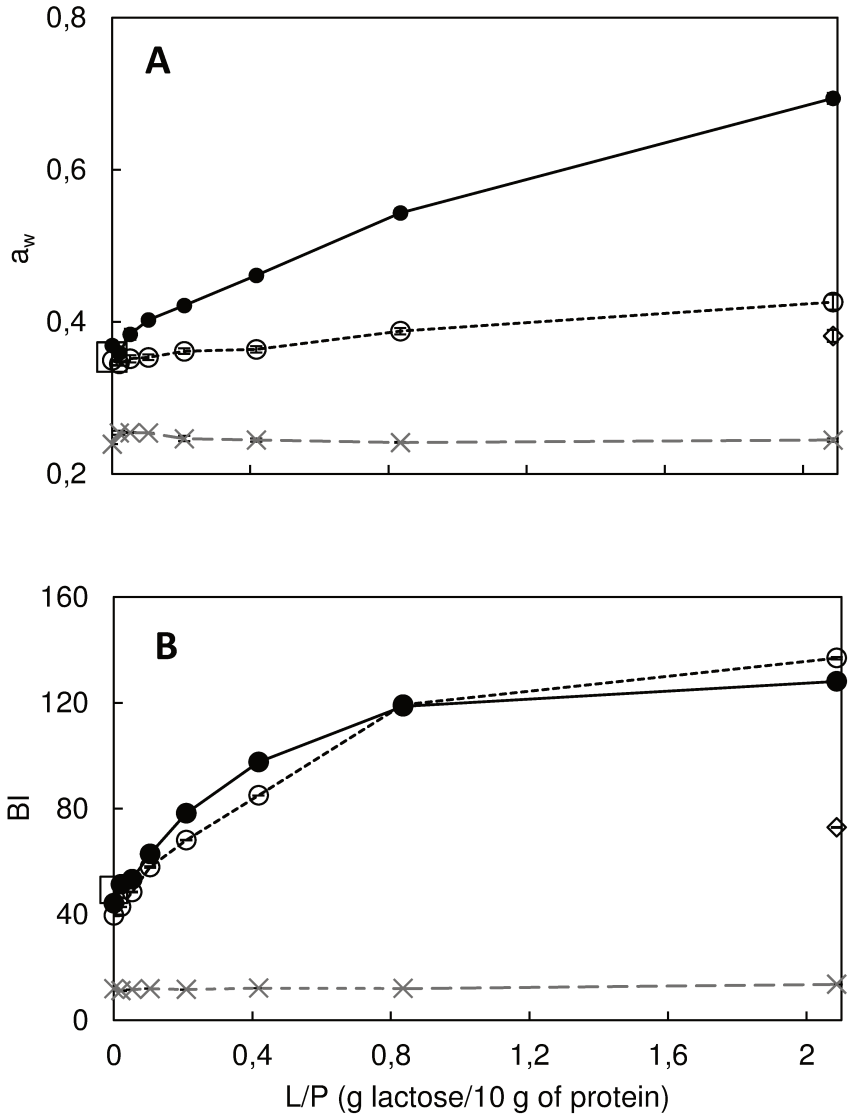


Figure 39: Water activity (a_w) and browning index (BI) as a function of added lactose, L/P (g lactose/10 g protein) at 0 h (×), 1 h (◊), 3 h (○), 36 h (●) and 96 h (□) of dry heating at 100 °C.

On the other hand, the BI increased with L/P and after DH, but this increase was completed after 3h of DH or even before, regardless of the content in added lactose. The increase in BI with the increase in L/P was much higher between 0 and 0.83 g/10g, and a plateau of BI seamed to appear around 150. After only 1 h of DH at the maximum value of L/P, the powder was browner and darker than powders

without added lactose after 3, 36 or 96 h of DH. The addition of lactose increased dramatically the powder browning until a maximum value, but after 3h of treatment, at least, there was no more colour changes in DH powders. The changes in colour of powders seemed to follow a different behaviour than the one followed by the a_w.

The unheated powder granular size distributions are reported in Figure 40. Powder flakes have sizes between around 5 and 300 µm. The volume mean diameter (VMD) of the distribution was 51.69±0.65 µm without added lactose. The addition of lactose slightly increased the VMD to 70.51±0.06 µm at L/P = 2.09 g/10 g.

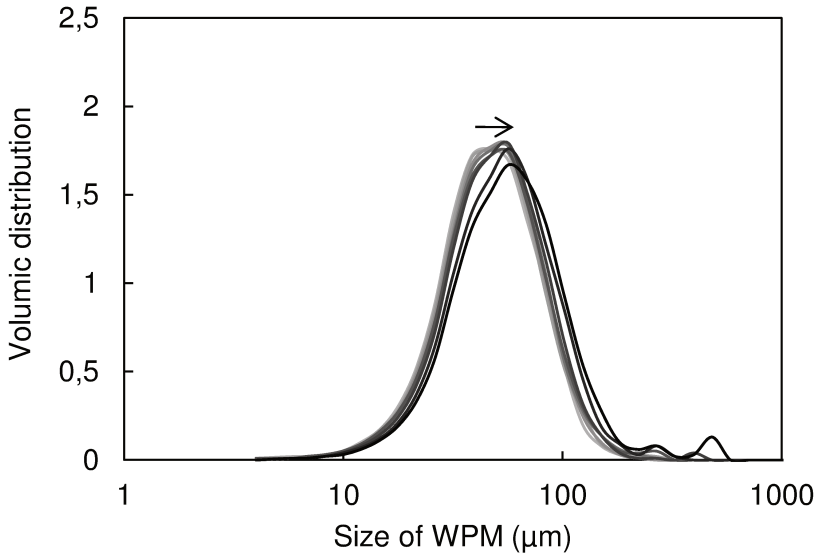


Figure 40: Unheated powder granular size distribution in volume as measured by the QICPIC method as a function of added lactose, L/P (g lactose/10 g protein). Darkness of curves increases with the increase in L/P from 0 to 2.09 g/10 g. The arrow is to help the reader to see the distribution slightly shifting to the right.

3.2 CONTENTS IN CARBOXYMETHYLLYSINE

Contents of carboxymethyllysine, an advanced glycation end-product (AGE) of MR are reported in Tableau 7. The initial WPI powder already contained CML. Preparation of the powder till its DH, including its solubilisation in a lactose solution at 0.83 g/10g, and pH and a_w adjustments of powders, increased the CML by ~3.5. Then, CML further raised after DH for 3 h. However, between 3 and 36 h of DH, CML did not increase anymore and even decreased. After 36h of dry heating at L/P=0.83 g/10g CML was more than twice the value without lactose at the same time of DH. An increase in CML has

also been reported during the time course of the DH (Schong and Famelart, 2018a). This behaviour seemed to be close to the one observed for the colour changes of powders.

Tableau 7 : Carboxymethyllysine (CML) content in ng/mg protein in powders dry heated (DH) at 100 °C.

Powder	CML (ng/mg protein)
WPI starting powder	162 ± 11
36 h DH without added lactose	1599 ± 138
0 h DH with added lactose at 0.83 g/10 g protein*	559 ± 65
3 h DH with added lactose at 0.83 g/10 g protein	4297 ± 34
36 h DH with added lactose at 0.83 g/10 g protein	4013 ± 16

*This powder was adjusted at a_w~0.25.

3.3 LEVEL OF WHEY PROTEIN DENATURATION

The level of native whey proteins in suspensions of WPM as a function of added lactose and time of DH is shown in Figure 41. Powder at L/P=0, adjusted at a_w~0.25 and at 0h DH presented a low extent of denaturation around 30 %. It seems that there is less denaturation of whey protein with increased L/P, but as can be seen in Figure 41B, the peaks of proteins are not well defined. For instance, the 2 peaks of βlg seen before DH at L/P=0 became a single larger peak at L/P=2.09 g/10g. Moreover, the quantification of βlg and αlac is based on the known values of the extinction coefficients for these proteins and we do not know their values after modification, so that the integrations might be doubtful. Proteins were considered as native, because still soluble at pH 4.6, but were probably already modified by the preparation. Reduced and increased retention times of proteins could be explained by higher hydrophilic properties due to the glycation of protein, and to increased hydrophobicity of proteins, respectively. Denaturation of whey proteins increased with the time of DH and addition of lactose, as after 3h of DH at L/P=2.09 g/10g, there were no more native proteins (Figure 41B, sample 4), while at L/P=0 there were still some (Figure 41B, sample 3). Powders at L/P > 0.83 g/10 g after 3 h of DH did not contain any more native proteins (Figure 41A). Native βlg and αlac decreased at the same rate (not shown). This behavior seems different from the behavior of both the color and the a_w changes.

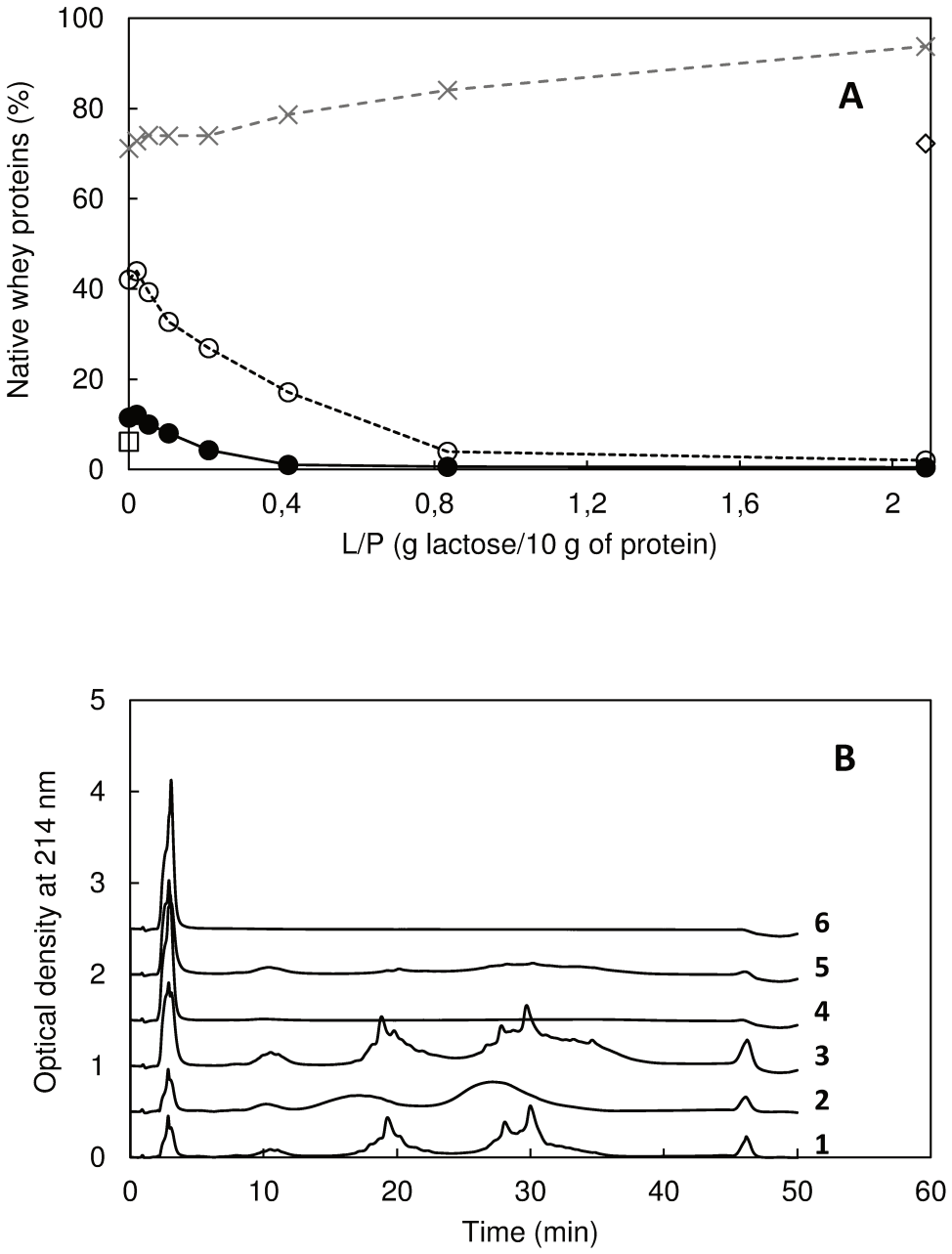


Figure 41: Residual native whey proteins in powder suspensions, as the sum of βlg and αlac contents. A: contents after different times of dry heating as a function of the added lactose, L/P: 0h (×), 1 h (◊), 3 h (○), 36 h (●) and 96 h (□) of dry heating at 100 °C. B: Comparison of the elution profile of pH 4.6-soluble fractions of samples; 1: L/P = 0, dry heating (DH) = 0 h; 2: L/P = 2.09 g/10 g protein, DH = 0 h; 3: L/P = 0, DH = 3 h; 4: L/P = 2.09 g/10 g protein, DH = 3 h; 5: L/P=0, DH=36 h; 6: L/P=2.09 g/10 g protein, DH=36 h.

3.4 CHARACTERIZATION OF WPM DISPERSION

The $OD_{500\ nm}$ of suspensions of dry heated powders as a function of L/P is shown in Figure 42. The $OD_{500\ nm}$ of suspensions increased with the time of DH between 3 and 36h. It also increased with the concentration of added lactose until a maximum at L/P= 0.83 g/10 g after 3 h of DH and at L/P= 0.42 g/10 g after 36 h of DH. The $OD_{500\ nm}$ of suspension after 96 h of DH of the powder at L/P=0 is approximately two-fold higher than the one for the powder at 36 h of DH. The $OD_{500\ nm}$ changes could be related to an increase in the number or size of particles, or to a change in their optical properties such as their refractive index.

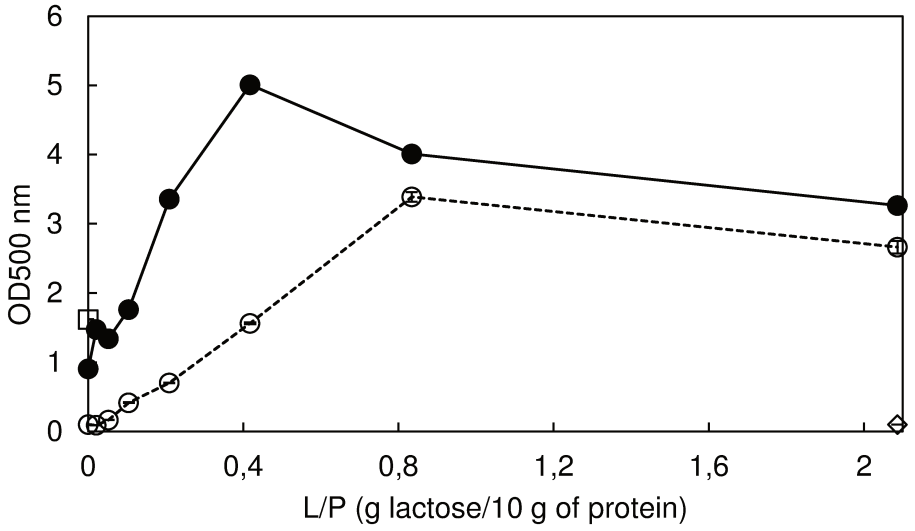


Figure 42: Optical density measured at 500 nm (OD_{500nm}) of powder suspensions as a function of added lactose, L/P. After dry heating at 100 °C for 1 h (◊), 3 h (○), 36 h of dry heating (●) and 96 h of dry heating (□).

The micrographs of WPM obtained by CLSM are shown in Figure 43. In suspensions of powders at 0h of dry heating, no particles are found at this magnification and even at a much higher magnification (not shown). DH for 3 h at L/P ≤ 0.05 g/10 g or DH for 1 h at L/P=2.09 g/10 g produced a very low quantity of WPM. For any other sample, a high content in WPM was found. The number of particles present after 3 h of DH increased when the L/P increased from 0 to 0.8 g/10g. Therefore, CLSM gives some information about the WPM's morphology. WPM had very heterogeneous sizes, approximatively from 3 to 100 µm and had the angular shape of flakes, in accordance with our previous observations (Famelart *et al.*, 2018). Their size appeared to be a little bit larger than the powder flake sizes.

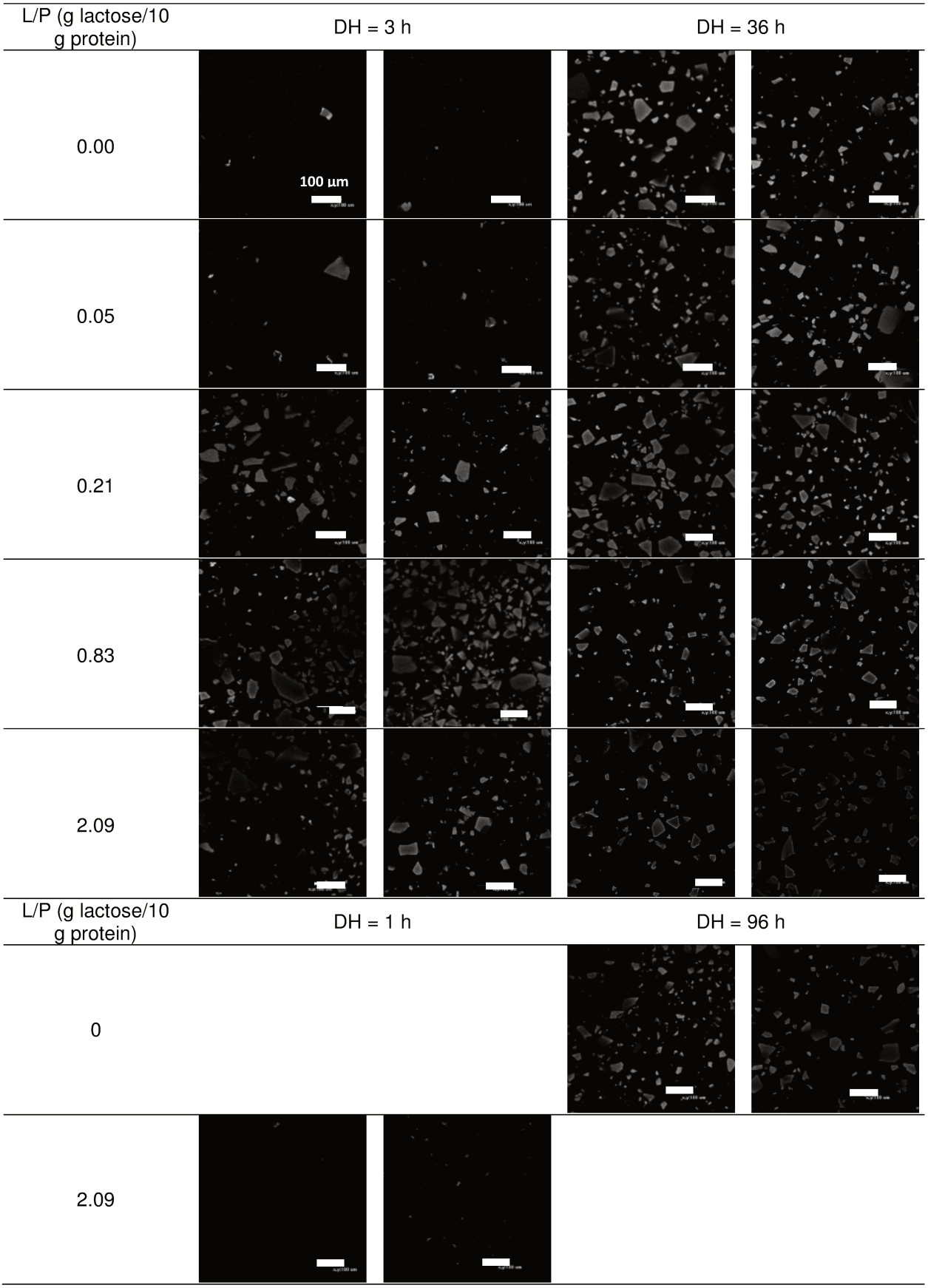


Figure 43: Micrographs of microparticles present in suspensions as observed by confocal laser scanning microscopy after dry heating (DH) at 100 °C for 3 and 36 h as a function of added lactose. The microparticles obtained by DH for 96 h without any added lactose or by DH for 1 h with the highest level of added lactose are also shown. The bar represented 100 µm. Only 2 representative micrographs are shown by condition.

A special feature of the WPM is that they sedimented, due to their very large size. The Figure 44B shows the aspect of the suspensions prepared with powders DH for 36 h after 2 weeks of sedimentation at 20°C stored in quiescent conditions. It is easy to observe that the sedimented WPM occupied a smaller volume and that the brown color was darker with the increase in L/P. According to the Figure 44A, the speed of clarification seemed to decrease a little between L/P=0 and 0.41 g/10 g, and then sharply increased to a maximum at L/P= 2.09 g/10 g.

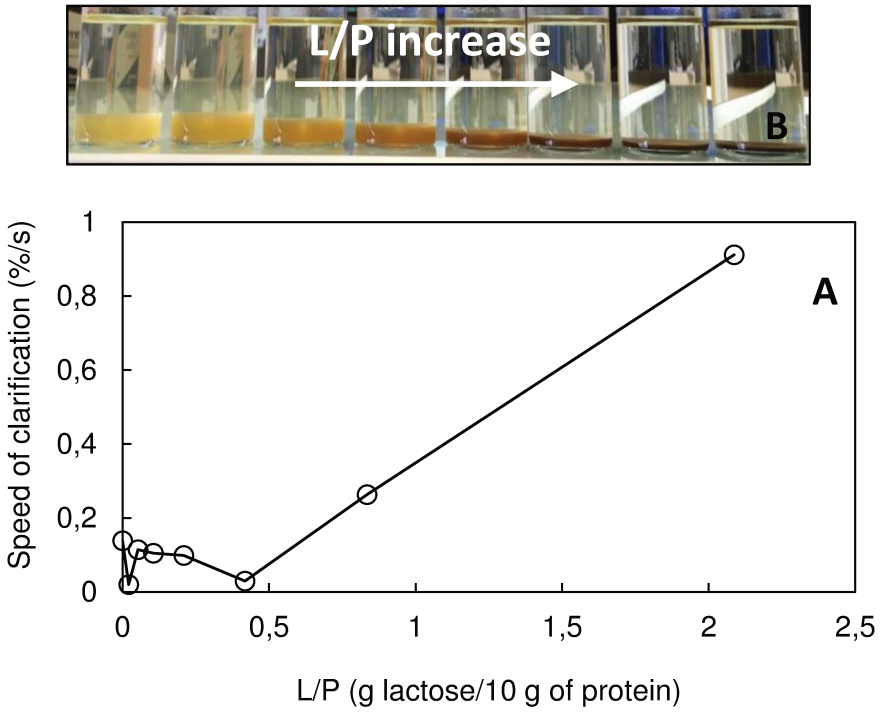


Figure 44: Clarification of suspensions and sedimentation of whey protein microparticles produced by 36 h of dry heating at 100 °C as a function of the added lactose, L/P. A: Rate of clarification of the suspensions. B: Photographs of powder suspensions after 15 d of sedimentation at 20 °C.

3.5 YIELD OF FORMATION OF WPM AND THEIR WATER CONTENT (WC)

As observed by CLSM, there was almost no WPM formed from the dry heated powders at L/P < 0.02 g /10 g of protein in 3 h of DH and for the powder heated only 1 h at the maximum L/P. This is in accordance with the very low dry yields shown in the Figure 45 after DH for 3h at the lowest L/P ratio, or after DH for 1h at the highest L/P ratio**.** Without any lactose addition, the DY is almost at 0.7g/g after 36h of DH, while it is ~0 after 3h of DH. With the L/P increase, the dry yield of formation of WPM increased to a plateau value close to 1. It means almost a total transfer of soluble proteins into WPM,

with a maximal value at 0.98 g of matter/1 g of powder after 36h of DH at L/P ~0.4 g/10g. After 3h and 36h of DH, the plateau was reached at L/P ~0.8 g/10g and at ~0.4 g/10g, respectively. May be the plateau value was a little bit smaller after 3 h of DH than after 36h of DH and decreased a little with the increase in the L/P for the highest values. This behavior seemed close to the behavior of native proteins and of the turbidity changes: at L/P <0.8 g/10g, the reaction was not completed after 3h of DH and went on evolving, while with higher L/P values, the reaction was so rapid that it was completed at least after 3h of DH.

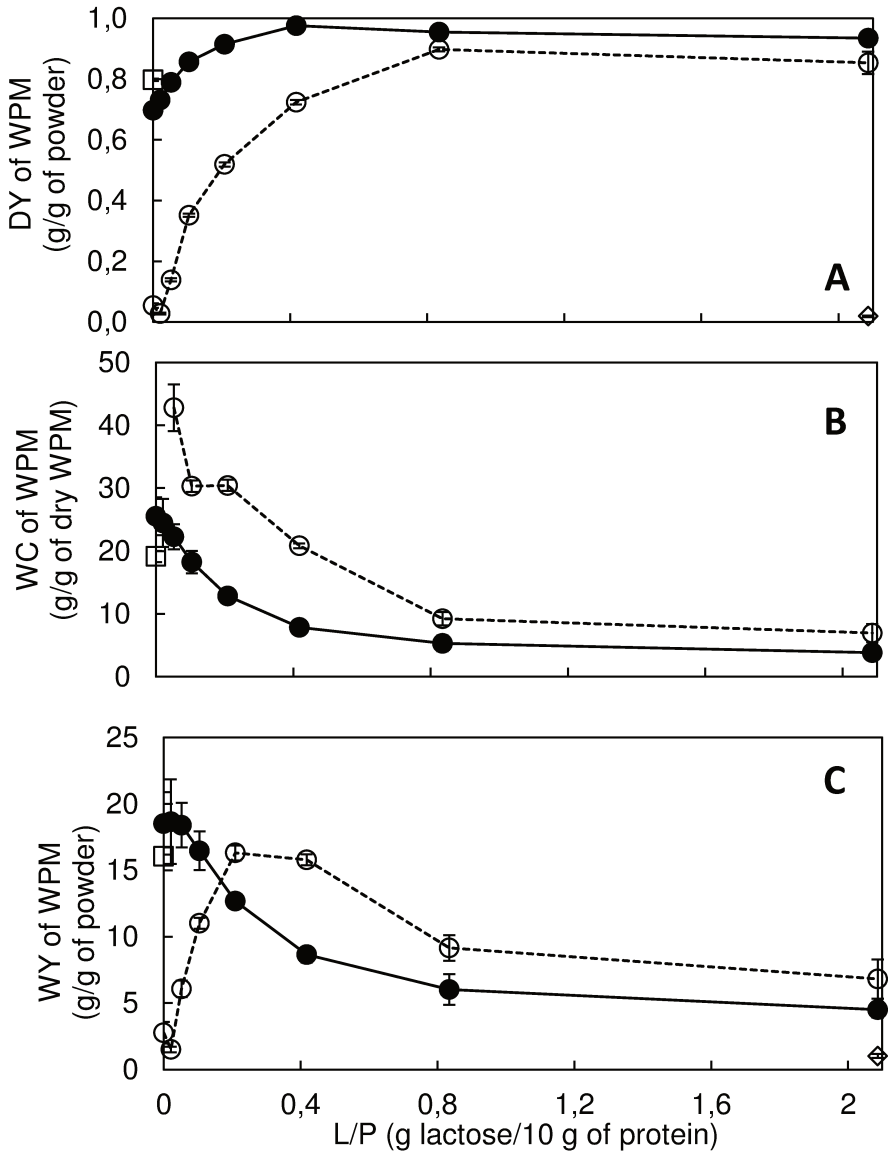


Figure 45: Yield and moisture content of microparticles evaluated in the pellet obtained by centrifugation at 10000 *g* for 15 min at 20 °C as a function of added lactose, L/P. A: dry weight of pellet for 1 g of powder (in g/g); B: water content of microparticles in g per 1 g of microparticle; C: wet weight content of pellet for 1 g of powder (in g/g). After dry heating at 100 °C for 1 h (◊), 3 h (○), 36 h of dry heating (●) and 96 h of dry heating (□).

In the same time, the WC of WPM decreased with the L/P increase. WPM are less hydrated and denser with the increase in lactose contents during DH and with the increase in time of DH. After 3h of DH, with L/P values < 0.2 g/10g, 1 g of WPM was able to retain ~30 times their weight in water, but these values declined to ~5-10 g at L/P> 0.81 g/10g. This behavior was also close to the one for the DY.

Because of a dry yield increasing and a WC decreasing with the L/P ratio, the WY of WPM can increased or decrease with the L/P increase. After 3h of DH, an increase in L/P until 0.2-0.4 g/10g led to a gain in the WY, and then to a loss, while after 36h of DH, the WY first stayed constant and then declined for L/P> 0.05 g/10g.

In conclusion, at L/P = 0.42 g/10 g after 3 h of dry heating, the DY of WPM was close to the value reached after 36h of DH without lactose, with values of WC and WY more or less equivalent. Addition of lactose allowed shortening the process of WPM production.

4. DISCUSSION

DH at 100°C for 3 or 36h a WPI powder conditioned at pH 9.5 was able to produce large and highly hydrated WPM and addition of lactose increased the rate of their production.

First of all, the size of the unheated powder flake was slightly larger when L/P increased (Figure 40). We can suspect that the powder was more rigid in the presence of lactose and consequently more difficult to crush in small flakes. Lactose in powders produced by freeze-drying is more prone to lactose crystallization and is known to be very difficult to crush (Schuck, private communication). This could explain the size increase of flakes with lactose addition.

The DH of whey protein powders at 100°C in the presence of increasing contents in lactose, led to a higher browning of the powder and to higher contents in CML (Figure 39, Tableau 7). These changes were due to the MR. CML is one of the AGE of the MR, and considered as an important marker of the reaction. Another consequence of MR is the formation of brown melanoidins, responsible for the browning (Manzocco *et al*., 2000). So the browning of the powder can be an easy indicator of the intensity of the MR. The Maillard reaction is a very complex reaction initiated by the interaction between a reducing sugar, lactose in the current work, and amino groups of the protein chains

(Maillard, 1912). During this reaction, water molecules are produced as shown in heated model mixtures (Manzocco and Maltini, 1999). An increase in a_w was also observed, thought to be due to the MR (Figure 39). Regarding the BI, it seems that the MR was completed after 3 h of dry heating or even before, regardless the content in added lactose. May be it was the same for CML contents, but we did not measure them at different lactose contents. Nevertheless, the a_w of powders went on increasing after 3 h of dry heating with added lactose. This points out that the increase in a_w was not totally related to the MR progress.

In any event, adding lactose allowed more intensive MR at a given time of DH. Moreover, MR occurred before applying any DH of the powder, as shown by the CML data. This could have happened when the solution of WPI was adjusted at pH 9.5, because the reactivity between sugar and the nucleophilic amino groups is improved by alkaline environments (Martins *et al.*, 2000) and/or during the adjustment of the a_w of powders at 20°C for 2 weeks. While it is well known that the MR progresses very slowly in liquid, it progresses indeed during the storage of WPI powders, as shown by the doubling of the level of protein lactosylation and the 2% loss in βlg monomers in favors of polymers observed after 3 months storage at 20°C and a_w=0.23 (Norwood *et al.*, 2016a).

According to previous studies on DH a whey protein powder in the same conditions without lactose addition, WPM form by reticulation of the powder during its DH (Famelart *et al.*, 2018; Schong and Famelart, 2018a). When the dry heated powder is then suspended in water, powder particles slightly swell to form stable large hydrated microparticles (Schong and Famelart, 2018a). WPM form by cross-links of proteins during the DH. It is well known that the cross-linking of peptide chains occurs during the advances steps of the MR (Cho *et al.*, 1984; Kato *et al.*, 1988). The added lactose accelerated the cross-linking kinetics.

The $OD_{500\ nm}$ increased with L/P due to the formation of WPM, until a critical value of L/P, L/P_{crit}. L/P_{crit} was 0.8 g/10 g after 3 h of DH and 0.4 g/10 g after 36 h of DH (Figure 42). The increase in $OD_{500\ nm}$ appeared to be correlated to the increase in the number of particles as seen by CLSM (Figure 43). The question arises of the reason why this $OD_{500\ nm}$ decreased after the L/P_{crit}. According to the CLSM observations, the number of particles seemed constant above the L/P_{crit}, but WPM included a lower solid content, as DY slightly decreased above the L/P_{crit} (Figure 45A) and they had a lower volumic

fraction, as observed with the sedimented pellets (Figure 44B). A smaller volumic fraction could explain a decrease in the suspension absorbance. The small decrease in DY above L/P_{crit} shows that less material accumulated in the WPM. We could suspect a deeper degradation of proteins, with a concomitant production of small soluble molecules like water, ammonia, peptides or amino acids, either intact or modified. Indeed, ammonia has been detected after the MR as produced from cysteine residues during the Strecker reaction (Mottram, 2007), and we demonstrated a severe ammonia production when the pH during dry heating was higher than 9.5 (personal communication). However, when lactose was added in solution, the powder contained a lower content in proteins per g powder that could also explain a DY decrease.

It has been assumed that for increasing DH times, the powder flakes are more reticulated, and lead to a limited swelling in water and to reduced water contents (Schong and Famelart, 2018a). As added lactose allowed a higher DY (Figure 45A), it probably enhanced the reticulation of proteins inside the flakes and led to an even higher limitation of the swelling that can explain a much lower water content of particles and a lower DO_{500nm} above the L/P_{crit}. In addition to this, at L/P=0, WPM produced by 36 h of DH appeared transparent in phase-contrast optical microscopic, probably because of a high water content and a small refractive index, while WPM produced at L/P= 2.09 g/10 g were opaque (not shown).

The small loss of 30% of native whey protein before the DH (Figure 41) has already been found in previous studies, and is due to the alkaline pH value used in these studies (Famelart *et al*., 2018; Schong and Famelart, 2018a). This has to be related to the alkaline denaturation of whey proteins observed at pH ≥ 7 (Tanford and Taggart, 1961; Tanford *et al*., 1959) and to unfolding and polymerization of whey proteins reported by others above pH 9 (Monahan *et al*., 1995; Partanen *et al*., 2011; Taulier and Chalikian, 2001). According to Famelart *et al*. (2018), βlg and αlac are incorporated into particles formed by DH at pH 9.5, and this is confirmed in the current study as βlg et αlac were equally integrated into WPM, whatever the lactose content. With added lactose, the kinetics of denaturation of βlg and αlac was more rapid, due to the quicker kinetics of WPM formation.

While the browning of powders was completed after 3h of DH, irrespective of the content in lactose, a_w went on increasing between 3 and 36h of DH. These 2 measurements on the powders

seemed not correlated and a_w did not only measure the progress in the MR. However, it should be noted that the intensity of the MR was not correlated to the production of WPM, as the formation of WPM was not completed after 3 h of DH at low contents in lactose. In fact, Famelart *et al*. (2018) show that DH a WPI powder conditioned at pH 3.5 and 6.5 leads to a strong powder browning, but without any microparticle formation. It is only in the alkaline environment that powder browning and WPM are both observed. This points out that the MR can progress without any production of microparticles. Besides, in the current study, the measurements related to the formation of WPM, behaved differently from the BI. Between L/P= 0 and 0.8 g/10g, the formation of WPM was not completed at 3 h and went on progressing between 3 and 36h of DH, and the higher the L/P value, the quicker the kinetics. But with L/P values larger than 0.8g/10g, the addition of lactose led to measurements at 3h more or less identical to values at 36h. It is probably explained by a formation of WPM already completed at 3h at L/P>0.8g/10g. This was the case for the protein denaturation (Figure 41), the turbidity of suspensions (Figure 42), the DY and the WC. It means that above L/P=0.8 g/10g, it has no use to dry-heat for more than 3 h. May be, at L/P values close to or lower than 2.09 g/10g, the reaction was completed at a much shorter time than 3 h, but as shown in Figure 45, not yet at 1h. Increasing the L/P during the DH of whey proteins accelerated the formation of WPM, so that a higher yield in particles was observed at a much short DH time. But, in the same time, the moisture content of WPM decreased significantly, due to a more intense reticulation of proteins and a lower ability to swell in the aqueous phase.

5. CONCLUSIONS

Dry heating at 100°C a whey protein freeze-dried powder made of a whey protein solution at pH 9.5 was able to produce WPM of sizes related to the powder granular size. The kinetics of formation of WPM was dramatically increased by addition of lactose, so that the formation of WPM was completed in a very short time, say after 3 h of DH. Consequently, the powder dry heated for 3 h in the presence of 0.42 g lactose/10g of proteins was similar to the powder dry heated for 36 h without added lactose.

6. ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Regional councils of Brittany (grant N°13008651) and Pays de la Loire (grant n°2014-07081) for the financial support and INRA for scientific coordination (J. Leonil) through the interregional project PROFIL, managed by BBA industrial association. The authors would also like to thank M. Pasco for their technical helps in HPLC analyses and F. Tessier for the determination of carboxymethyl lysine contents in powders.

7. RESULTATS ET DISCUSSION COMPLEMENTAIRES : ETUDE DE LA CINETIQUE DE FORMATION DES AMI AVEC UNE POUDRE ENRICHIE EN LACTOSE ET SECHEE PAR PULVERISATION

7.1 INTRODUCTION

Les résultats précédents ont été obtenus à seulement deux temps d'étuvage de la poudre, i.e. 3 et 36 h d'étuvage. Ces temps correspondent à un temps court et un temps long d'étuvage. Cependant, l'étude de temps d'étuvage intermédiaires serait nécessaire pour compléter l'étude de l'effet du lactose sur la formation des AMI. Par exemple, avec peu de lactose ajouté, le DY à 3 h d'étuvage est proche de 0, alors qu'il est proche de 0,7-0,8 g/g de poudre étuvée à 36 h d'étuvage. Il serait intéressant de voir comment évoluent les rendements entre ces deux temps. De plus, nous avons voulu vérifier que l'addition de lactose à la poudre d'IPS de départ, mène bien à des résultats similaires en effectuant un séchage par pulvérisation plutôt que par lyophilisation, lors du procédé d'étuvage de la poudre à pH 9,5.

Ainsi, nous avons suivi la cinétique de formation des AMI à l'aide d'une poudre produite par un séchage par pulvérisation et contenant une faible quantité de lactose ajouté à la poudre d'IPS de départ. En effet, il y a moins de différences entre les résultats obtenus à 3 et 36 h d'étuvage pour des quantités de lactose ajouté élevées. Nous avons choisi d'ajouter le ratio L/P = 0,21 g/10 g. Il correspond à la quantité de lactose ajouté menant au WY le plus élevé à 3 h d'étuvage. Il correspond aussi à un ratio d'environ une mole de lactose ajouté pour une mole de protéine. La cinétique a été suivie sur 0, 3, 6, 12 et 36 h d'étuvage à 100 °C de la poudre conditionnée à une a_w d'environ 0,24. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus dans le chapitre 2, sur une poudre pulvérisée sans ajout de lactose à la poudre d'IPS de départ.

7.2 RESULTATS

7.2.1 MICROSTRUCTURE DES AMI EN SUSPENSION ET ASPECT DES SUSPENSIONS

La Figure 46 montre les micrographes des suspensions obtenus par CLSM et l'aspect des suspensions après 3 j de décantation naturelle.

Sans lactose ajouté, il n'y a pas ou très peu d'AMI formés après 3 h d'étuvage. A partir de 6 h d'étuvage, on observe une quantité croissante d'AMI avec le temps d'étuvage. Jusqu'à 12 h d'étuvage, la solution est transparente après 3 j de décantation naturelle. A 36 h d'étuvage, il se forme une couche de sédiment trouble de couleur jaunâtre, représentant ~40 % du volume de la suspension.

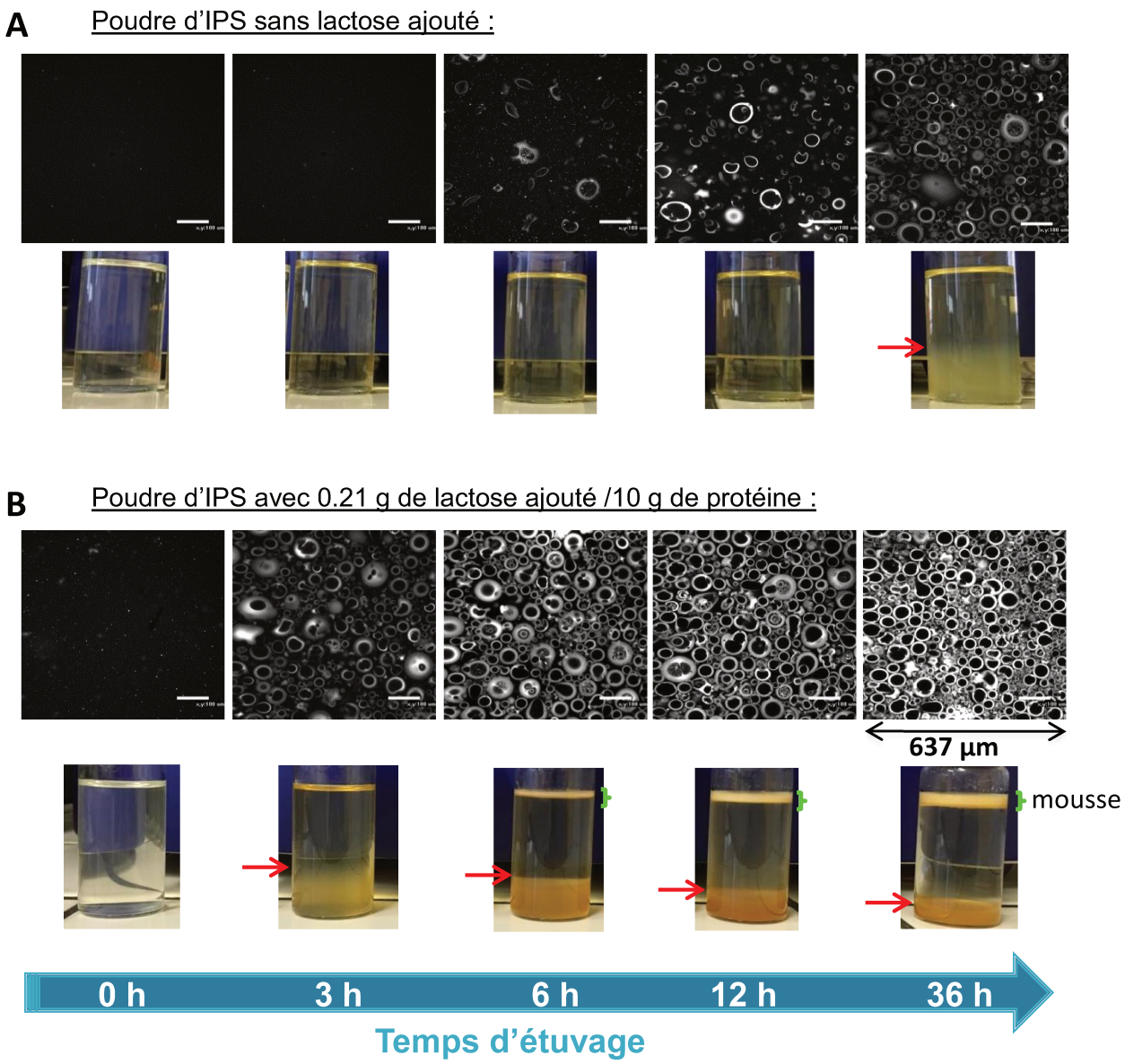


Figure 46 : Micrographies et aspect des suspensions préparées avec la poudre d'isolat de protéines sériques sans (A) et avec L/P= 0,21 g/10 g (B) en fonction du temps d'étuvage, obtenues par microscopie confocale. Les photos des suspensions ont été prises après 3 j de décantation naturelle des AMI à 20 °C. Les flèches rouges indiquent le niveau de décantation des AMI dans les tubes. Les accolades vertes montrent la présence de mousse en surface des suspensions. Les barres représentent 100 µm.

Avec l'ajout de lactose, on observe des AMI en grand nombre dès 3 h d'étuvage. On observe sur les micrographies en Figure 46B que les AMI sont de plus en plus brillants avec le temps d'étuvage qui augmente. L'émission de lumière est proportionnelle à la quantité de sonde fixée sur des objets protéiques de taille supérieure à la résolution du microscope optique, donc sur des particules. L'intensité de la lumière émise par la sonde est donc en lien avec la quantité de protéines qui constituent les AMI.

La suspension avec lactose ajouté à 3 h d'étuvage a un aspect très similaire à la suspension sans lactose ajouté à 36 h d'étuvage après 3 j de décantation naturelle, avec un sédiment légèrement plus orangé. Avec l'ajout de lactose, les sédiments sont de couleur brune orangée entre 6 et 36 h d'étuvage, et sont davantage opaques qu'à 3 h d'étuvage. La hauteur de ces sédiments, indiquée par une flèche rouge sur la Figure 46, diminue avec le temps d'étuvage.

Avec l'ajout de lactose, il y a formation d'une mousse entre 6 et 36 h d'étuvage, indiquée sur la Figure 46 avec une accolade verte. Cette mousse est de plus en plus épaisse pour les temps d'étuvage croissants. La mousse de la suspension à 36 h d'étuvage avec ajout de lactose a été prélevée et observée au CLSM en la mélangeant ou non à une solution d'IPS à ~25 g de protéine/100 g de poudre (Figure 47). La mousse est constituée d'AMI, d'apparence similaire aux AMI en suspension. La micrographie de la Figure 47B montre les AMI de la mousse suspendus dans la solution d'IPS. La cavité des AMI est noire, alors que le fond de la suspension est gris, donc absorbe et émet des protons. Le fond gris correspond à l'émission d'intensité lumineuse par les protéines de la solution d'IPS.

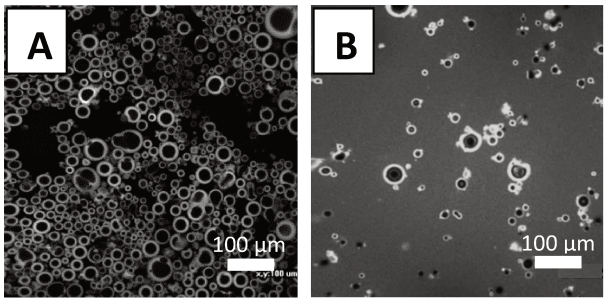


Figure 47 : Micrographies obtenues par CLSM de la mousse prélevée en surface de la suspension de poudre étuvée 36 h avec L/P= 0,21 g/g, décantée naturellement pendant 24 j, avant (A) ou après (B) addition d'une solution de poudre d'IPS à ~25 g de protéine/100 g de poudre.

7.2.2 RENDEMENTS DE LA FORMATION DES AMI ET LEUR TENEUR EN EAU

Le rendement sec ou DY (Dry Yield), le rendement humide ou WY (Wet Yield) et la teneur en eau ou WC (Water Content) des AMI produits avec la poudre d'IPS sans lactose ajouté et avec L/P = 0,21 g/10 g, en fonction du temps d'étuvage, sont représentés en Figure 48.

Dans le cas de la poudre avec le lactose ajouté, le DY augmente rapidement entre 0 et 6 h d'étuvage et atteint un plateau à 12 h d'étuvage, avec une valeur ~0,74 g/g de poudre étuvée. Sans lactose ajouté, le DY est quasiment nul jusqu'à 6 h d'étuvage, puis augmente avec le temps d'étuvage, jusqu'à atteindre aussi un DY de ~0,74 g/g de poudre étuvée au bout de 72 h d'étuvage. Cette augmentation se fait donc plus lentement qu'avec ajout de lactose.

Avec l'ajout de lactose, le WC des AMI est proche de ~38 g/g d'AMI sec à 3 h d'étuvage. Cette valeur est proche de celle obtenue à 36 h d'étuvage sans ajout de lactose. Puis, comme avec la poudre sans lactose ajouté, la valeur du WC diminue avec le temps d'étuvage. Le WC est de ~18 g/g d'AMI secs à 36 h d'étuvage de la poudre avec ajout de lactose, contre ~27 g/g d'AMI secs pour la poudre sans ajout de lactose étuvée 72 h.

Avec l'ajout de lactose, le WY augmente rapidement entre 0 et 6 h d'étuvage jusqu'à atteindre un maximum de ~25 g/g de poudre étuvée. Puis, entre 6 et 36 h d'étuvage, le WY diminue avec le temps d'étuvage. Sans ajout de lactose, le WY augmente entre 6 et 24 h d'étuvage. Puis, les valeurs obtenues entre 24 et 72 h ne sont pas statistiquement différentes, d'après une analyse ANOVA ($P>0,1$), à environ 20 g/g de poudre étuvée.

Le WC diminue et le DY augmente au cours du temps d'étuvage avec ou sans ajout de lactose. Ces changements sont plus rapides en présence de lactose ajouté. En effet, les résultats de DY, WC et WY sont très proches entre la poudre étuvée 3 h avec lactose ajouté et la poudre étuvée 36 h sans lactose ajouté. Il en est de même pour la poudre étuvée 12 h avec lactose ajouté et la poudre étuvée 72 h sans lactose ajouté.

Avec l'ajout de lactose, le DY augmente très faiblement entre 6 et 12 h d'étuvage, alors que le WC diminue fortement. De même, entre 12 et 36 h d'étuvage, le DY n'augmente plus alors de le WC continue de diminuer.

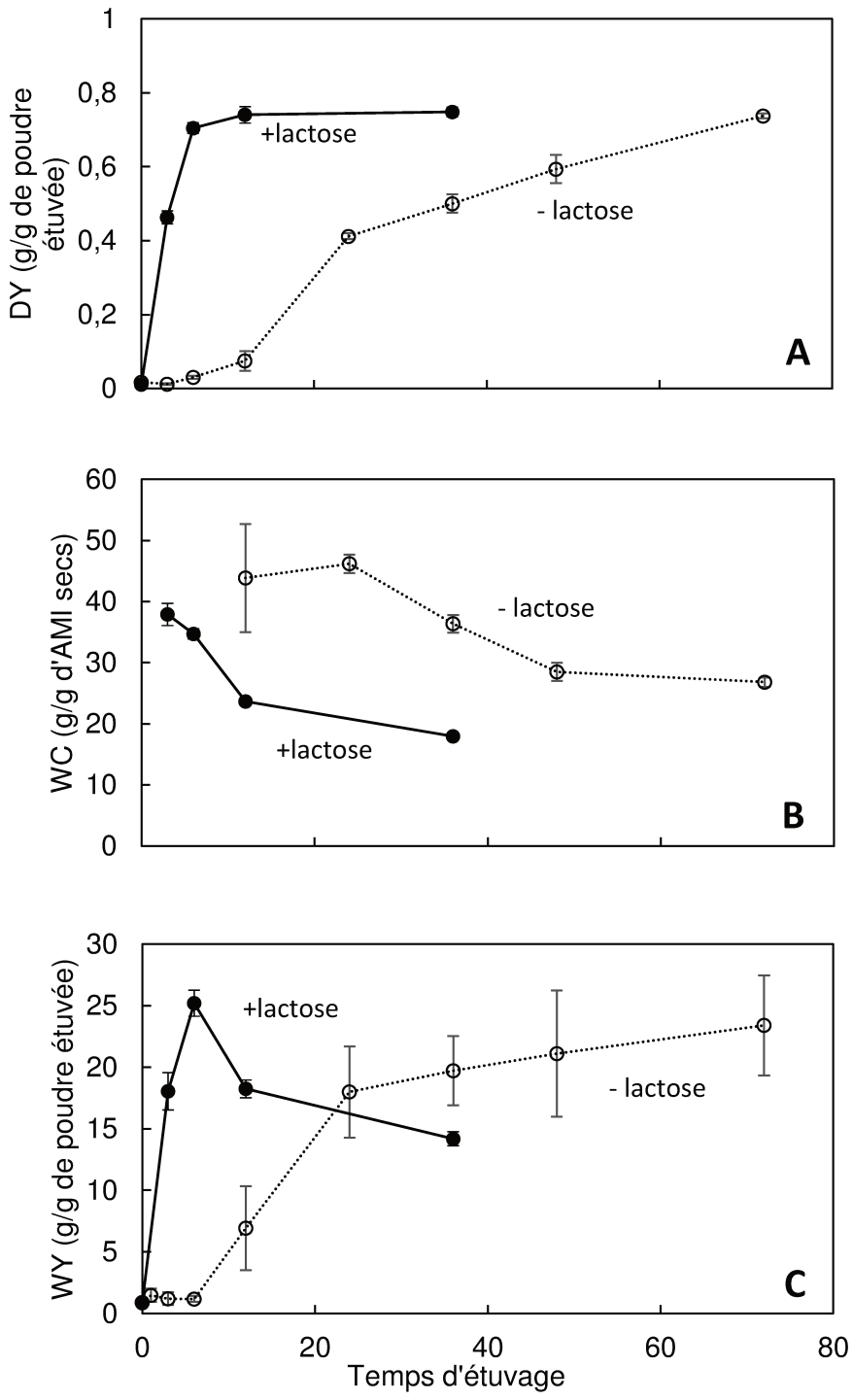


Figure 48 : Rendements secs (DY) (A), teneurs en eau (WC) (B) et rendements humides (WY) (C) des AMI en fonction du temps d'étuvage de la poudre d'isolat de protéines sériques sans ajout de lactose (-lactose ; symboles ouverts) et avec ajout de lactose à L/P= 0,21 g/10 g (+lactose ; symboles fermés).

7.2.3 DENATURATION DES PROTEINES SERIQUES

Figure 49 montre le taux de dénaturation des PN en fonction du temps d'étuvage de la poudre d'IPS, avec ou sans lactose ajouté.

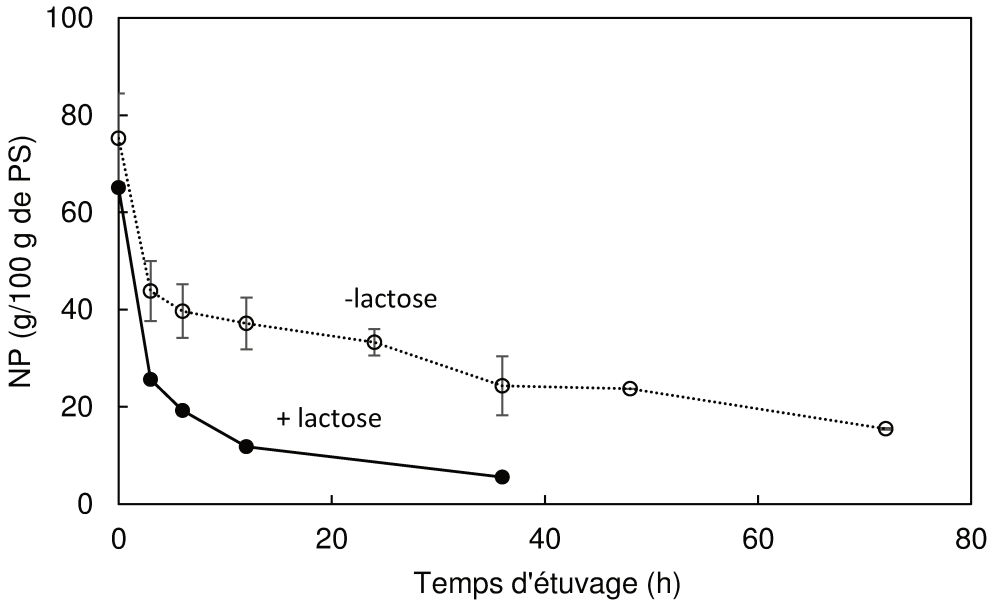


Figure 49 : Protéines natives résiduelles (NP) dans les suspensions de poudre sans ajout de lactose (- lactose ; symboles ouverts) et avec ajout de lactose à L/P = 0,21 g/10 g de poudre (+ lactose ; symboles fermés) en fonction du temps d'étuvage. Les quantités de protéines natives résiduelles ont été calculées comme la somme des quantités de βlg et αlac natives évaluées par RP-HPLC dans les surnageants S1A et sont exprimées pour 100 g de PS totale dans les poudres.

A 0 h d'étuvage, la quantité de PN avec ajout de lactose n'est pas statistiquement différente de celle sans ajout de lactose, d'après une analyse ANOVA (P>0,05). Elle est autour de 30 % (p/p). Entre 0 et 3 h d'étuvage, la vitesse de dénaturation des PN est relativement rapide, avec ou sans ajout de lactose. Elle est néanmoins légèrement plus rapide avec l'ajout de lactose. Après 3 h d'étuvage, il ne reste plus que ~26 et ~44 % (p/p) de PN, avec et sans ajout de lactose, respectivement. Entre 3 et 36 h d'étuvage, la vitesse de dénaturation de PN est environ la même avec ou sans l'ajout de lactose, et elle est plus lente qu'entre 0 et 3 h d'étuvage. A la fin des 36 h d'étuvage, il reste ~6 et ~24 % (p/p) de PN avec et sans ajout de lactose, respectivement.

7.2.4 COMPARAISON ENTRE LE SECHAGE PAR PULVERISATION ET PAR LYOPHILISATION AVEC ET SANS LACTOSE AJOUTE

Les DY et les quantités de PN à 0, 3 et 36 h d'étuvage pour les poudres avec L/P = 0,21 g/10 g et sans lactose ajouté obtenues par lyophilisation ou par pulvérisation sont repris dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Comparaison des rendements secs (DY) et de la quantité de protéines résiduelles natives (NP) en fonction du mode de séchage, de la présence de lactose ajouté à L/P = 0,21 g/10 g et du temps d'étuvage des poudres.

Mode de séchage utilisé	Lyophilisation		Pulvérisation	
Présence de lactose	- lactose	+ lactose	- lactose	+ lactose
DY à 3 h d'étuvage (g/g de poudre étuvée)	0,05 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,46 ± 0,02
DY à 36 h d'étuvage (g/g de poudre étuvée)	0,70 ± 0,01	0,91 ± 0,01	0,50 ± 0,03	0,75 ± 0,01
NP à 0 h d'étuvage (%)	71	74	75 ± 9	65
NP à 3 h d'étuvage (%)	42	27	44 ± 6	26
NP à 36 h d'étuvage (%)	11	4	24 ± 6	6

Les résultats obtenus par lyophilisation et par pulvérisation sont très similaires. Les DY sont plus élevés à 3 et 36 h dans le cas de la lyophilisation, comparés à la pulvérisation, que ce soit avec ou sans ajout de lactose, comme conclu dans le chapitre 2. A 36 h d'étuvage, les DY sont augmentés d'environ 0,2 g/g de poudre étuvée entre la lyophilisation et la pulvérisation, avec ou sans l'ajout de lactose. Les quantités de PN à 0, 3 et 36 h d'étuvage sont très similaires entre le séchage par lyophilisation et par pulvérisation.

7.3 DISCUSSION

L'augmentation du temps d'étuvage avec ou sans ajout de lactose ajouté mène à une augmentation du DY, mais à une diminution du WC. Plus le temps d'étuvage est long, et plus le taux de conversion des protéines solubles en AMI augmente, mais plus les propriétés de rétention d'eau diminuent. En conséquence, il existe un WY maximal, correspondant à un juste milieu entre le DY et le WC. La diminution avec le temps d'étuvage du niveau de sédimentation par décantation naturelle des AMI est corrélée à la diminution du WC des AMI. Ce phénomène avait déjà été observé avec les AMI obtenus par lyophilisation (Schong and Famelart, 2018b). Nous avions supposé qu'avec l'augmentation

du temps d'étuvage, les protéines au sein des particules de poudre étaient davantage réticulées, conduisant à un gonflement dans l'eau limité des AMI et à une teneur en eau réduite (Schong and Famelart, 2018a).

L'ajout de lactose à L/P = 0,21 g/10 g dans une poudre pulvérisée ne permet pas d'augmenter le DY maximal. Dans l'article 3, une poudre lyophilisée avec L/P≥ 0,42 g/10 g de protéine permet d'avoir des DY maximaux supérieurs à ceux obtenus avec les poudres pulvérisées. Donc, soit le lactose est limitant à la formation des AMI, et le ratio L/P = 0,21 g/10 g ne suffit pas pour atteindre un DY maximal plus élevé que sans ajout de lactose, soit la lyophilisation permet d'améliorer les rendements maximaux par rapport à la pulvérisation. En tout cas, la lyophilisation permet d'atteindre des DY un peu plus élevés que la pulvérisation, pour un même temps d'étuvage. Cette observation a déjà été faite dans le chapitre 2 dans le cas d'une poudre d'IPS sans lactose ajouté. Cependant, le taux de dénaturation des PS entre la lyophilisation et la pulvérisation est approximativement le même au cours du temps d'étuvage. Les PN dénaturées se retrouvent soit dans les AMI, soit dans les APDS. Nous avions mis en évidence dans le chapitre 2, qu'au cours du temps d'étuvage, les PN se dénaturent dans un premier temps en APDS, puis les SDAP sont intégrés dans les AMI. Si le taux de dénaturation des PN est bien le même entre la lyophilisation et la pulvérisation, c'est l'intégration des APDS dans les AMI qui se ferait donc plus rapidement avec la lyophilisation.

Malgré le fait que les DY sont très proches entre 6, 12 et 36 h d'étuvage de la poudre pulvérisée avec du lactose ajouté, le WC continue à diminuer entre ces 3 temps d'étuvage. Nous émettons l'hypothèse que le taux de réticulation des protéines continue d'augmenter avec le temps d'étuvage, même lorsque la quantité de protéines intégrées dans les AMI est à son maximum. Ainsi, la structure des AMI deviendrait encore plus rigide et moins spongieuse de 6 à 36 h d'étuvage. Et de ce fait, avec l'augmentation du temps d'étuvage, les propriétés de rétention de l'eau seraient encore diminuées, rendant les AMI plus denses et moins volumineux, sans pour autant augmenter leurs rendements secs. Le fait que les AMI deviennent de plus en plus brillants sur les images de CLSM entre 6 et 36 h ne serait donc pas dû à une augmentation de quantité de protéines dans les AMI avec le temps d'étuvage, mais plutôt à un rapprochement entre les protéines dû à un taux de réticulation plus élevé. On peut en effet supposer que l'épaisseur de la coque des AMI est plus fine et plus dense à 36 h qu'à 6 h d'étuvage avec l'ajout de lactose. Cependant, on peut aussi supposer qu'avec le temps d'étuvage qui augmente, la

structure des protéines change, permettant un démasquage des sites de fixation de la sonde fluorescente, ce qui entrainerait une augmentation de l'émission de fluorescence.

Si le centre des AMI est noir sur la Figure 47B, c'est que la coque des AMI constituant la mousse en surface des suspensions de poudre étuvée 6 h à 36 h avec du lactose ajouté ne doit pas être perméable aux protéines solubles. Cependant, on ne sait pas si la coque des AMI est aussi perméable à l'eau. Le fait que ces AMI flottent laisse penser qu'ils ont une masse volumique plus faible que celle de l'eau, et qu'ils seraient donc remplis d'air plutôt que d'eau. On peut supposer que ces AMI sont constitués de protéines tellement réticulées, que leur coque devient imperméable à la phase aqueuse ou aux protéines solubles résiduelles. Les trous visibles sur quelques AMI présents dans la mousse figurant dans la Figure 47A seraient des trous à l'intérieur de la coque, ne communiquant pas avec l'extérieur.

Augmenter la quantité de lactose dans la poudre d'IPS de départ permet d'intensifier la réaction de Maillard et la vitesse de formation des AMI durant l'étuvage. Cependant, quelle que soit la quantité de lactose ajouté, la réaction de Maillard est terminée après 3 h d'étuvage (Schong and Famelart, 2018b). C'est aussi entre 0 et 3 h d'étuvage que l'ajout du lactose à la poudre de départ permet une dénaturation plus rapide des protéines sériques. La dénaturation qui a lieu entre 0 et 3 h d'étuvage est donc impactée par la réaction de Maillard. Cependant, les protéines continuent à se dénaturer même après 3 h d'étuvage. De plus, ce n'est qu'après 3 h d'étuvage que les AMI commençaient à se former sans lactose ajouté.

Ainsi, l'hypothèse émise dans le chapitre 2, selon laquelle y aurait deux grandes étapes de la formation des AMI, avec la réaction de Maillard seulement impliquée dans la première étape, est renforcée par les résultats de ce chapitre 3. Les résultats du chapitre 3 indiquent que la première étape, concernant la réaction de Maillard, est terminée après 3 h d'étuvage et peut être même avant, quelle que soit la quantité de lactose ajouté.

Les résultats du chapitre 3 laissent supposer que plus il y a de lactose présent dans la poudre initiale, plus il y a une intensification de la réaction de Maillard, et plus il y aurait formation de groupements fonctionnels au sein des protéines, durant la première étape de la formation des AMI. Davantage de groupements fonctionnels permettrait de former davantage de liaisons entre les protéines et donc

d'avoir une réticulation plus forte entre les protéines. De plus, la réaction de formation des AMI à lieu à l'état sec. De ce fait, les molécules ont une capacité réduite à se mouvoir. Donc, plus il y aurait de sites fonctionnels sur les protéines et plus la réaction progresserait vite en augmentant les rencontres entre les groupements fonctionnels et les protéines.

Par ailleurs, il est aussi possible que cette polymérisation des PS touche d'autre protéines présentes dans la poudre, telles que les caséines. Nous avons vu dans le chapitre 2, que les caséines polymérisent suite à l'étuvage, mais sans savoir si elles polymérisent entre elles ou parmi les AMI. La poudre d'IPS contient ~18 g de caséine/100 g de protéine, soit 0,16 g de caséine/g de poudre. Dans le cas de la poudre lyophilisée avec L/P = 0,42 g /10 g, le DY en AMI atteint ~0,98 g/g de poudre (Figure 45A). Ce rendement signifie que la quasi-totalité de la poudre se retrouve dans les AMI. Les caséines semblent donc faire partie des AMI.

7.4 CONCLUSION

L'ajout d'une faible quantité de lactose permet l'accélération de la formation des AMI, et de former des AMI avec les mêmes propriétés de rétention d'eau, les mêmes DY et WY et la même morphologique en 3 h d'étuvage que en 36 h d'étuvage sans ajout de lactose. Les AMI obtenus par lyophilisation et pulvérisation présentaient approximativement les mêmes propriétés au cours du temps d'étuvage. L'effet du lactose sur une poudre obtenue par lyophilisation ou par pulvérisation est donc le même.

Bilan du chapitre 3 :

Dans ce chapitre, le rôle du lactose sur le mécanisme de formation des AMI a été étudié, dans le but de fournir des réponses aux questions suivantes :

- **Quel est le rôle du lactose dans le mécanisme de formation des AMI ?**

Le lactose a principalement pour rôle d'accélérer la formation des AMI. Plus il y a de lactose dans la poudre d'IPS de départ et plus la vitesse de formation des AMI augmente. Les rendements en AMI, et leurs propriétés de rétention de l'eau sont identiques sans lactose ajouté en 36 h d'étuvage et avec 0,21 et 0,42 g de lactose ajouté/10 g de protéine en 3 h d'étuvage. Le lactose permet, entre autres, l'accélération de la vitesse de dénaturation des PS entre 0 et 3 h d'étuvage. Le lactose pourrait aussi être essentiel pour la formation des AMI. En effet, le lactose initie la réaction de Maillard, et les composés issus de cette réaction sont suspectés d'être à l'origine de la polymérisation des protéines. Cependant, la réaction de Maillard est terminée après de 3 h d'étuvage, quelle que soit la quantité de lactose ajouté. Le lactose ne semble donc plus jouer de rôle direct dans la formation des AMI après 3 h d'étuvage.

- **Le lactose présent dans la poudre d'IPS de départ est-il un facteur limitant à la dénaturation des PS et à la formation des AMI ?**

D'après les résultats obtenus avec la poudre pulvérisée, il semblerait que la quantité de lactose présente dans la poudre d'IPS de départ ne soit pas limitante pour la formation des AMI, étant donné que le DY maximal est le même avec ou sans ajout de lactose. Cependant, la quantité de lactose ajouté était peut-être trop faible pour voir un réel effet du lactose sur le DY maximal. Il est difficile de conclure si le lactose présent dans la poudre d'IPS de départ est limitant à l'intégration des protéines dans les AMI ou s'il n'est qu'un catalyseur de la réaction de formation des AMI. Pour répondre à cette question, il faudrait réaliser des temps d'étuvage très longs sur une poudre d'IPS lyophilisée sans lactose ajouté. En effet, la lyophilisation permet d'avoir des DY près de 1g/g de poudre étuvée en ajoutant du lactose. Donc, si on arrive à un DY proche de 1g/g de poudre étuvée sans ajouter de lactose, c'est que la quantité de lactose présente dans la poudre d'IPS de départ n'est pas limitant à la formation des AMI.

- **Quel est l'effet du lactose sur les propriétés physico-chimiques et morphologiques des AMI ?**

Le lactose n'a pas d'effet sur la morphologie des AMI, ni sur leur propriétés physico-chimiques étudiées dans ce chapitre. Il permet d'accélérer la vitesse de formation des AMI et donc, comme avec l'augmentation du temps d'étuvage, il permet d'avoir des AMI plus denses, mais avec une moins bonne capacité de rétention d'eau.

- **Existe-t-il des différences entre l'utilisation d'un séchage par lyophilisation et par pulvérisation dans la formation des AMI, suite à l'ajout de lactose ?**

Les AMI obtenus par lyophilisation et par pulvérisation ont des propriétés similaires avec ou sans ajout de lactose. Comme dans le chapitre 2, on a surtout observé des différences de taille et de morphologie de la poudre et des AMI avec le mode de séchage de l'IPS. Cependant, la lyophilisation permet d'avoir des DY un peu plus élevés que la pulvérisation, pour un même temps d'étuvage.

CHAPITRE 4 : ROLE DES CONSTITUANTS DE LA POUDRE D'ISOLAT DE PROTEINES SERIQUES SUR LA FORMATION DES AMI : ROLE DES CASEINES

La poudre d'IPS contient majoritairement des protéines issues du lactosérum. Néanmoins, elle contient aussi des caséines, qui représentent ~18 % des protéines. Cette quantité est non négligeable. Nous avons vu dans le chapitre 2, que les caséines, comme les PS, polymérisent suite à l'étuvage à 100 °C de la poudre à pH 9,5, et que ces polymères sont constitués de ponts SS mais aussi d'autre(s) type(s) de liaisons covalentes. Cependant, nous ne savons pas si les caséines polymérisent au sein des AMI ou si elles polymérisent entre elles pour former d'autres assemblages que les AMI. Nous avons aussi constaté dans le chapitre précédent, que l'ajout de lactose permet d'avoir, en 36 h d'étuvage, quasiment l'intégralité de la poudre incorporée dans les AMI. Les caséines se retrouvent donc sous la forme d'assemblages insolubles. Ainsi, nous supposons que les caséines font partie des AMI.

De ce fait, nous nous sommes intéressé(e)s au rôle des caséines dans la formation des AMI, ainsi qu'à leur effet sur les propriétés physico-chimiques et morphologiques des AMI.

Principaux objectifs :

- **Déterminer si les caséines font partie des AMI.**
- **Définir si les caséines ont un rôle particulier dans le mécanisme de formation des AMI.**
- **Etudier l'effet des caséines sur les propriétés physico-chimiques et morphologiques des AMI.**
- **Déterminer si les caséines ont un effet sur la dénaturation des PS suite à l'étuvage à 100 °C de la poudre à pH 9,5.**
- **Savoir si une autre source de protéines laitières que les PS est capable de former des AMI.**

Stratégie :

La poudre d'IPS a été supplémentée en caséine sous forme de caséinate de sodium. L'étude a aussi été réalisée avec une poudre de caséinate de sodium seul (CasNa) et une poudre enrichie en caséine

micellaire seule (CasMic), afin de savoir si des poudres de caséines étaient capables de former des AMI, comme la poudre d'IPS.

Les poudres ont été produites par lyophilisation. Les poudres et les assemblages produits par l'étuvage des poudres à 100 °C et pH 9,5 pendant 36 h ont été caractérisés de la même façon que dans le chapitre précédent.

1. PREPARATION DES POUDRES ETUVEES

La poudre de d'IPS est mélangée avec de la poudre de caséinate de sodium avec 0, 20, 25, 33, 50 et 100 % (p/p) de poudre de CasNa. Les mélanges sont appelés respectivement Cas0, Cas20, Cas25, Cas33, Cas50 et Cas100. Un témoin réalisé avec 100 % de poudre CasMic a également été étudié. La suite de la préparation des poudres est la même que celle utilisée dans le chapitre 3. Brièvement, les poudres sont solubilisées à 150 g de poudre totale/kg. Les solutions sont ensuite ajustées à pH 9,5, rapidement congelées et lyophilisées. Les lyophilisats sont ensuite broyés pour obtenir de la poudre, puis conditionnées environ 2 semaines à une a_w de 0,24 ± 0,01. Un g de poudre est ensuite étuvé 36 h à 100 °C dans des petits tubes en pyrex fermés hermétiquement. Chaque poudre est étuvée en double.

2. RESULTATS

2.1 IMPACT DE L'ETUVAGE SUR LES CARACTERISTIQUES DES POUDRES

Le BI des poudres non étuvées est quasiment le même pour l'ensemble des poudres (Figure 50). Entre 0 et 36 h d'étuvage, les BI augmente d'un facteur de ~4 pour l'ensemble des poudre, excepté pour la poudre CasMic dont l'BI augmente d'un facteur 12 entre 0 h et 36 h d'étuvage. L'BI des poudres étuvées 0 et 36 h augmente légèrement entre 0 et 33 % de CasNa puis diminue entre 33 et 100 % de CasNa.

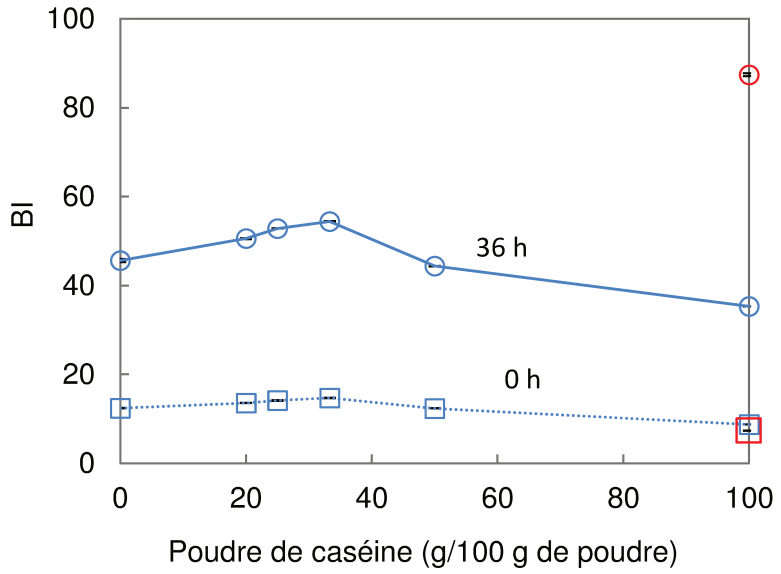


Figure 50 : Indices de brunissement (BI) des poudres étuvées 0 h (□) et 36 h (○), en fonction de la proportion en poudre de caséine. En rouge sont représentés les résultats obtenus avec la poudre enrichie en caséine micellaire et en bleu les résultats avec la poudre de caséinate de sodium.

La Figure 51A montre les distributions de taille des particules de poudres avant l'étuvage obtenues au QICPIC. Les tailles des particules de l'ensemble des poudres sont comprises entre 4 et 600 µm. Le D[4,3] des particules de poudre de Cas0 et de Cas 100 est de ~60 µm et ~100 µm, respectivement. Tous les mélanges des poudres d'IPS et de CasNa ont un D[4,3] intermédiaire entre le D[4,3] de ces deux poudres. Le D[4,3] des particules de poudre CasMic est intermédiaire à ceux de Cas0 et Cas 100, avec une valeur ~70 µm.

La Figure 52 montre l'aspect des particules des poudres étuvées 36 h d'étuvage, et l'aspect de la poudre CasMic à 0 h d'étuvage. Entre 0 et 50 % de CasNa dans la poudre, les particules de poudre sont majoritairement en forme de petites lamelles angulaires lisses avec quelquefois un aspect plissé. Les particules des poudres Cas100 et CasMic ont majoritairement un aspect plissé et recroquevillé sur eux même et sont parfois en forme de lamelles angulaires lisses. Les micrographies de la poudre CasMic confirment l'observation faite au QICPIC : les particules de poudre CasMic sont plus petites que celles des autres poudres. Les poudres ne contenant que CasMic étuvées 0 h et 36 h ont le même aspect. Cet aspect recroquevillé des poudres de caséine n'est donc pas dû à l'étuvage.

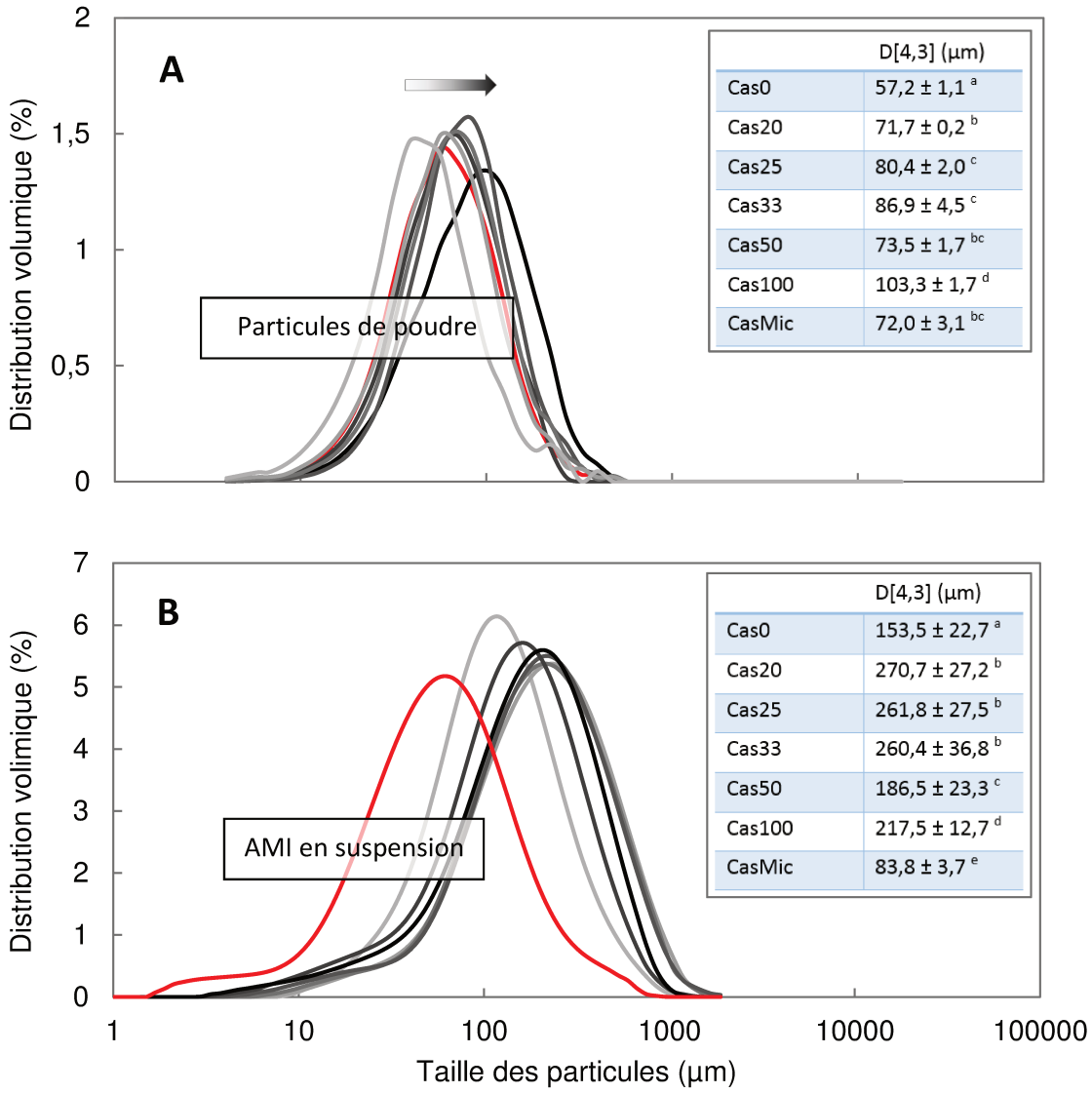


Figure 51 : Distributions de taille des particules des différentes poudres à 0 h d'étuvage, obtenues au QIPIC (A) ; distributions de taille des AMI en suspension dans l'eau, formés suite à l'étuvage à 100 °C des poudres à pH 9,5 pendant 36 h, obtenues au Mastersizer (B). La noirceur des courbes augmente avec l'augmentation de la proportion en poudre de caséinate de sodium de 0 à 100 g/100 g de poudre. La courbe rouge correspond à la poudre enrichie en caséine micellaire. La flèche indique le sens de l'évolution suggéré lors de l'augmentation de la proportion en poudre de caséinate de sodium. Les inserts en A et B correspondent au diamètre moyen en volume des particules (D[4,3]). Les échantillons ayant une lettre différente sont statistiquement différents (P <0,05).

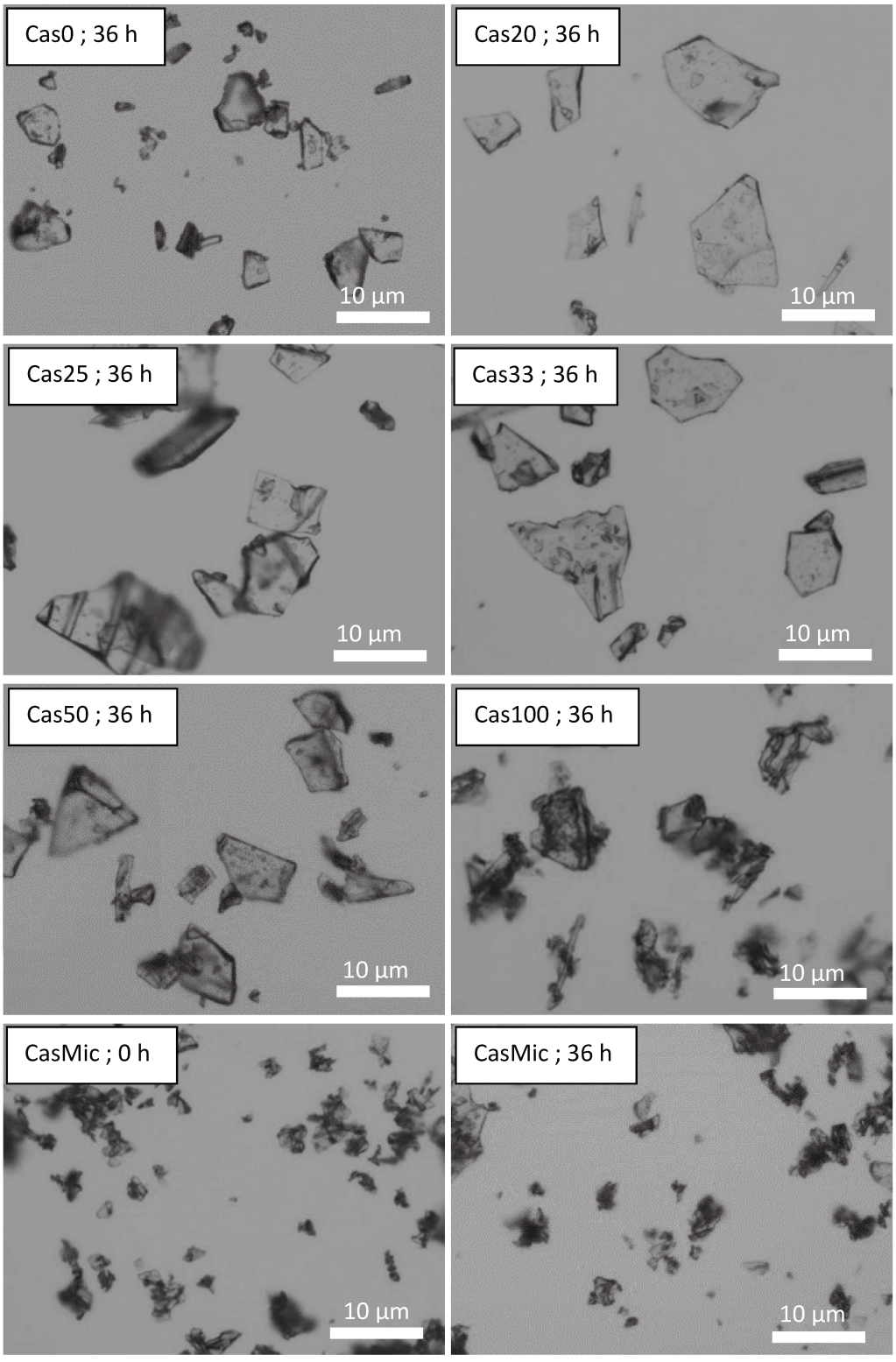


Figure 52 : Micrographies des particules de poudre de Cas0, Cas20, Cas25, Cas33, Cas50, Cas100 étuvées 36 h à 100 °C et de CasMic étuvée 0 et 36 h à 100 °C, obtenues par microscopie optique à contraste de phase (obj x 10).

2.2 CARACTERISATION DES SUSPENSIONS D'AMI

A ce stade, ce que l'on considère comme AMI, ce sont des particules de taille micronique, sans préconiser d'un mécanisme, d'une structure et d'une morphologie identique aux particules formées par étuvage de PS telles qu'étudiées dans les chapitres 1 et 2 de cette thèse.

Les suspensions réalisées avec les poudres étuvées 36 h sont toutes troubles, alors que les suspensions étuvées 0 h sont limpides. Le trouble présent dans les suspensions est dû à la présence de particules en suspension qui diffusent la lumière.

2.2.1 ASPECT DES SUSPENSIONS APRES DECANTATION NATURELLE

L'aspect des suspensions des poudres étuvées 36 h, décantées pendant 5 j à 20 °C, est montré en Figure 53. La hauteur de sédimentation diminue avec la proportion en CasNa. La hauteur de sédimentation pour CasMic est très faible et la couleur du sédiment est brun foncé.

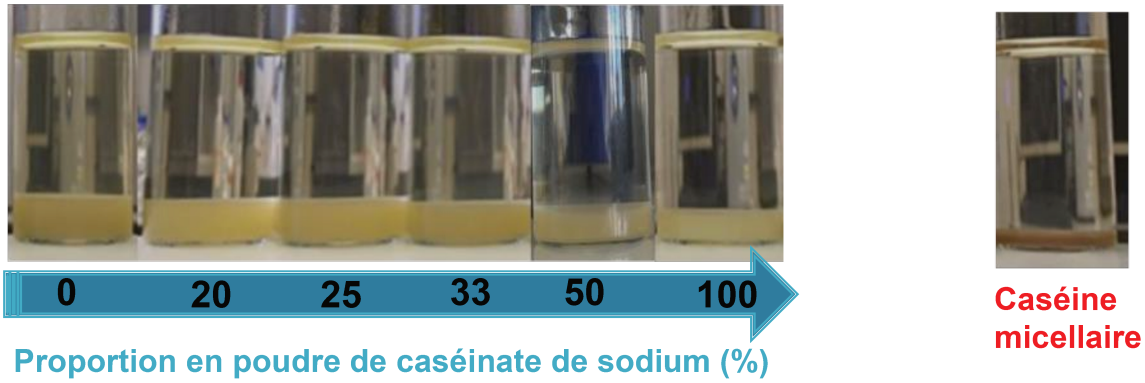


Figure 53 : Aspect des suspensions de poudre étuvée 36 h à 100 °C et à pH 9,5, après 5 j de décantation naturelle à 20 °C.

2.2.2 MICROSTRUCTURE DES AMI

La Figure 54 montre l'aspect des particules en suspension dans de l'eau, obtenues avec les poudres étuvées 36 h, à partir de micrographies obtenues par CLSM. Les micrographies ont été prises à la surface de la lamelle et à 15 µm de lamelle, car les particules de plus grosses tailles ne sont pas toujours visibles à la surface de la lamelle. L'ensemble des poudres conduit à la formation d'AMI après 36 h d'étuvage à 100 °C, que ce soit pour les mélanges avec la poudre CasNa ou pour les poudres Cas100 et CasMic. Entre 0 et 55 % de CasNa, les AMI ont la même morphologie que celle des particules de poudre dont ils proviennent. Ils correspondent à des petites lamelles angulaires lisses. Les AMI obtenus avec

la poudre Cas100 sont majoritairement en forme de lamelles angulaires lisses, et sont parfois un peu ondulés ou avec la présence de dépressions. Cet aspect des AMI est différent de celui des particules de poudre Cas100 dont ils proviennent, qui sont davantage plissés et recroquevillés sur eux même, comme montré en Figure 52. Les AMI obtenus avec la poudre CasMic ont un aspect plissé et recroquevillé, comme celle des particules de poudre dont ils proviennent.

2.2.3 TAILLE DES AMI

Quelle que soit la proportion en poudre CasNa, la taille de ces AMI est comprise entre 3 et 2 000 µm et elle est supérieure à celle des particules de poudre non étuvée dont ils sont issus (les tailles des particules de poudre sont comprises entre 4 et 600 µm, Figure 51B). Le classement des AMI par D[4,3] croissant est le suivant : CasMic < Cas0 < Cas50 < Cas100 < Cas 33, Cas 25, Cas20.

Les AMI obtenus avec la poudre d'IPS sont les particules de poudre rendus insolubles par l'étuvage à pH 9,5 qui gonflent lorsqu'ils sont suspendus dans de l'eau (chapitre 2). Si le mécanisme est le même avec les autres poudres, il est plus intéressant de comparer les différences de taille entre celle des particules de poudre et celle des AMI. En effet, la taille des particules de poudre est différente en fonction de la proportion en CasNa dans la poudre.

La différence entre le D[4,3] des AMI et celui des particules de poudre, appelé ΔD[4,3], en fonction de la composition de la poudre, est présentée dans le Tableau 9. Le ΔD[4,3] de la poudre Cas0 est inférieur à celui de l'ensemble des poudres contenant des caséinates. Plus la proportion en CasNa augmente et plus le ΔD[4,3] est petit. Le ΔD[4,3] obtenu avec de la poudre CasMic est très faible en comparaison. Aussi, la distribution de taille des AMI pour la poudre CasMic est significativement plus large que celle des particules de poudre CasMic étuvée 0 h (Figure 51), avec à la fois des particules plus petites et plus grosses en suspension que dans la poudre.

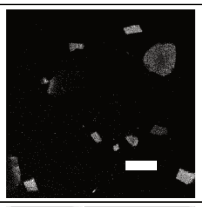
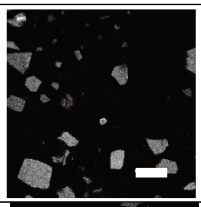
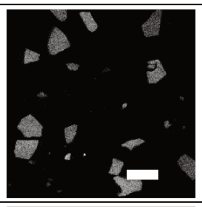
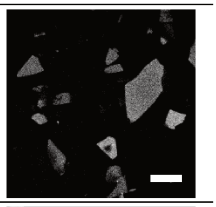
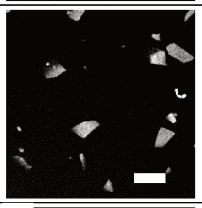
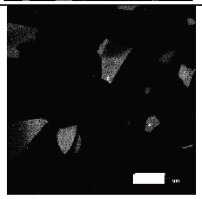
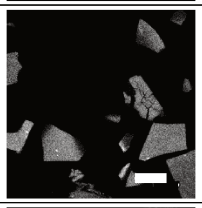
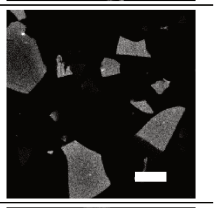
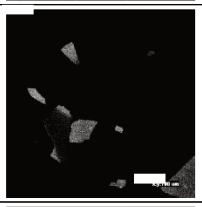
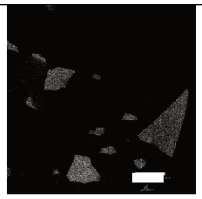
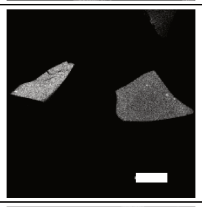
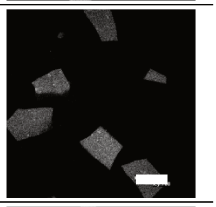
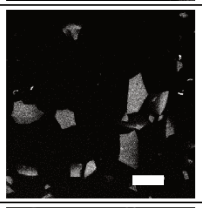
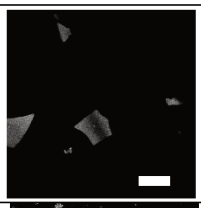
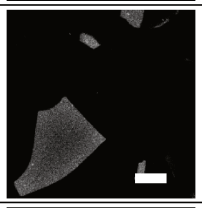
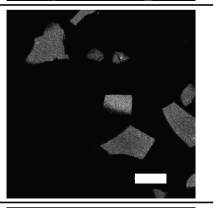
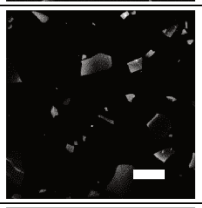
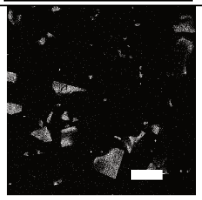
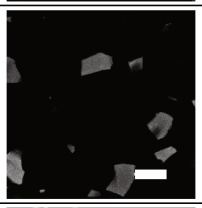
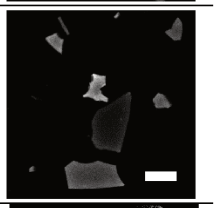
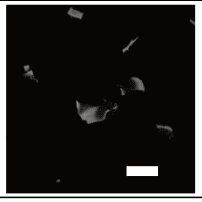
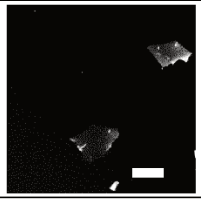
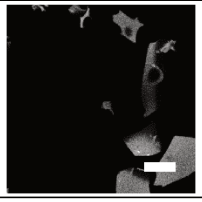
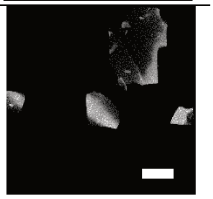
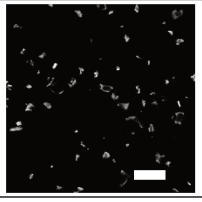
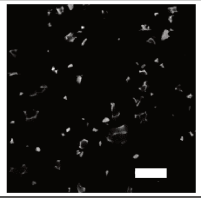
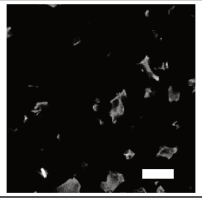
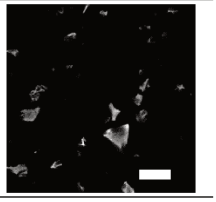
Poudre de caséine (g/100 g de poudre)	Images prises entre 0 et 5 µm de la lamelle		Images prises à 15 µm de la lamelle	
0				
20				
25				
33				
50				
100 (caséinate de sodium)				
100 (caséine micellaire)				

Figure 54 : Micrographies des AMI obtenues par le microscope confocal à balayage laser avec un objectif x20 (barres = 100 µm) après 36 h d'étuvage à 100 °C en fonction de la proportion en poudre de caséine. Les micrographies ont été prises entre 0 et 5 µm et à 15 µm de la lamelle. Seulement 2 micrographies par condition sont montrées, mais elles sont représentatives de l'ensemble des AMI observés.

Tableau 9 : Différence entre le diamètre moyen en volume des AMI et celui des particules de poudre (ΔD[4,3]), en fonction de la composition de la poudre.

	ΔD[4,3] (µm)
Cas0	96,3
Cas20	199,0
Cas25	181,4
Cas33	173,5
Cas50	113,0
Cas100	114,2
CasMic	11,8

2.2.4 RENDEMENTS ET TENEUR EN EAU DES AMI

Pour rappel :

-le rendement humide ou wet yied (WY) en AMI, exprimé en g/g de poudre étuvée, correspond au poids de culot P1, calculé pour 1 g de poudre étuvée dans la suspension S0 centrifugée,

-le rendement sec ou dry yield (RS) en AMI, exprimé en g/g de poudre étuvée, correspond au poids du culot P1 après séchage, calculé pour 1 g de poudre étuvée dans la suspension S0 centrifugée,

-la teneur humide ou water content (WC) des AMI, exprimée en g/g d'AMI sec, correspond à la quantité d'eau piégée par 1 g d'AMI sec.

La Figure 55 montre les DY, WC et WY des AMI obtenus après 36 h d'étuvage, en fonction de la proportion en poudre de caséine.

Le DY en AMI augmente de 0,6 à 0,8 g/g de poudre étuvée, entre 0 et 100 % de CasNa (Figure 55A). Cette augmentation est plus rapide entre 0 et 33 % de CasNa. La poudre CasMic étuvée 36 h conduit à un DY en AMI qui est le plus élevé, avec ~0,9 g/g de poudre étuvée. Autrement dit, la quasi-totalité de la poudre se retrouve intégrée dans les AMI.

Inversement, le WC des AMI diminue avec la proportion en poudre CasNa, et la diminution est plus forte entre 20 et 50 % de CasNa (Figure 55B). Les DY et les WC obtenus avec les différentes proportions

de poudre de CasNa sont corrélés entre eux, avec un coefficient de corrélation R=0,866 (P<0,02). Le WC le plus faible est obtenu avec les AMI issus de la poudre CasMic.

Le WY présente un maximum avec Cas20 et Cas25, mais n'est pas très différent de celui de Cas0 (Figure 55C). Il diminue ensuite pour davantage de CasNa dans la poudre. Le WY passe de 19 à 16 g/g de poudre étuvée, entre 0 et 100 % de CasNa. La diminution du WY est donc modérée. La poudre CasMic étuvée produit des AMI avec un WY beaucoup plus faible, soit seulement 6 g/g de poudre étuvée. Ces AMI retiennent moins d'eau dans leurs structures.

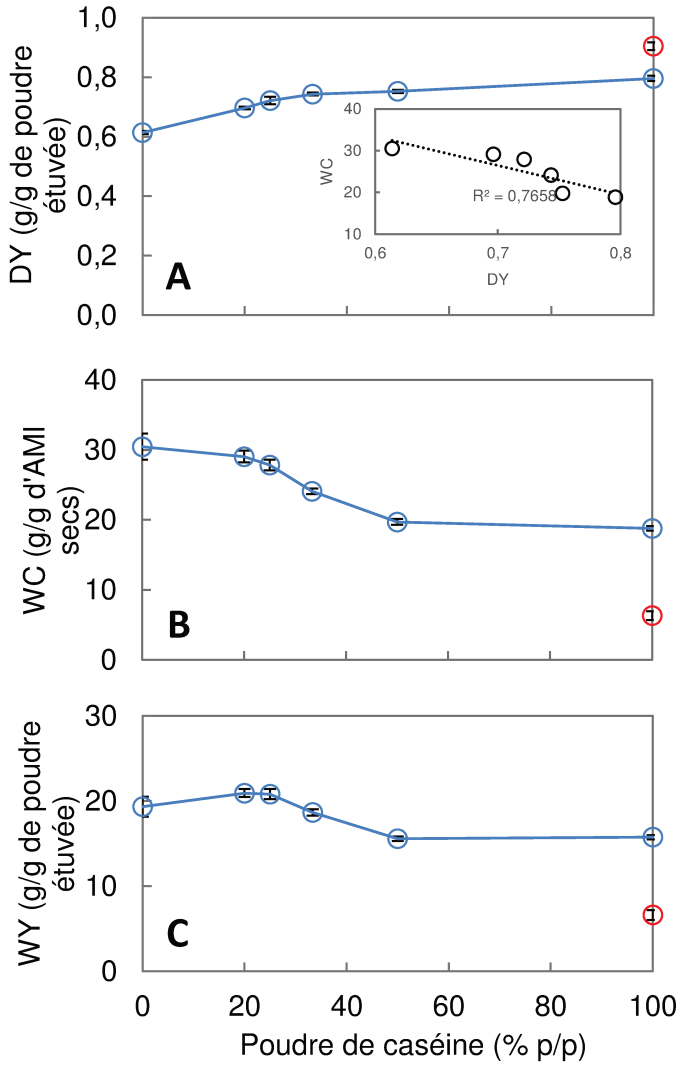


Figure 55 : Rendements sec (DY) (A), teneur en eau (WC) (B) et rendement humide (WY) (C) des AMI obtenus après 36 h d'étuvage à 100 °C de la poudre à pH 9,5, en fonction de la proportion en poudre de caséine. Le cercle rouge correspond à la poudre de caséine micellaire et les cercles bleus correspondent aux mélanges réalisés avec la poudre d'isolat de protéine sérique et de caséinate de sodium. L'insert en A montre la corrélation entre le DY et le WC, en fonction de la proportion en poudre de caséinate.

2.3 EFFET DU CASEINATE SUR LA DENATURATION DES PROTEINES SERIQUES

Les protéines natives résiduelles (NP) ont été quantifiées par RP-HPLC dans les surnageants S1A, obtenus par centrifugation des suspensions S0 acidifiées à pH 4,6. Les pourcentages de NP à 0 et 36 h d'étuvage, par rapport à la quantité totale de PS dans les poudres en fonction de la proportion en poudre de CasNa, sont présentés en Figure 56. Environ 70 % des PS, dont ~50 % de βlg et ~20 % d'αlac, sont natives à 0 h d'étuvage, quelle que soit la proportion en poudre de CasNa. Autrement dit, ~30 % des PS se dénaturent au cours des étapes d'ajustement à pH 9,5, de congélation, de lyophilisation, de broyage et d'ajustement de l'a_w de la poudre. Après 36 h d'étuvage, il ne reste plus que ~15 % de NP pour l'ensemble des poudres. La βlg et l'αlac sont toutes les deux touchées par la dénaturation avec des taux qui ne sont pas ou très peu impactés par la proportion de caséinate.

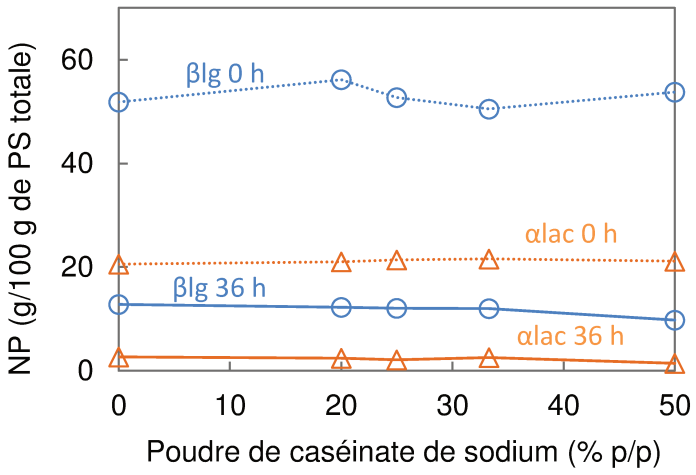


Figure 56 : βlg (○) et αlac (Δ) natives résiduelles quantifiées par RP-HPLC à 0 h (traits en pointillés) et à 36 h d'étuvage à 100 °C de la poudre à pH 9,5 (traits pleins). Les résultats sont exprimés pour 100 g de PS totales présentes dans les poudres.

2.4 GONFLEMENT DES PARTICULES DE POUDRE DE CASEINATE ETUVEE

Une particule de poudre de Cas100 a été observée au microscope à contraste de phase au cours du temps, suivant l'addition d'eau désionisée (Figure 57). Lorsque la particule de poudre est au contact de l'eau, elle se déplie et se met à gonfler. Le gonflement dure une vingtaine de secondes. Les AMI sont donc bien issus du gonflement des particules de poudre, rendus insolubles par l'étuvage à 100 °C de la poudre à pH 9,5, même lorsque la poudre ne contient pas de PS. L'aspect des particules de poudre

après leur gonflement au contact de l'eau est en accord avec l'aspect des particules de poudres AMI en suspension en Figure 54.

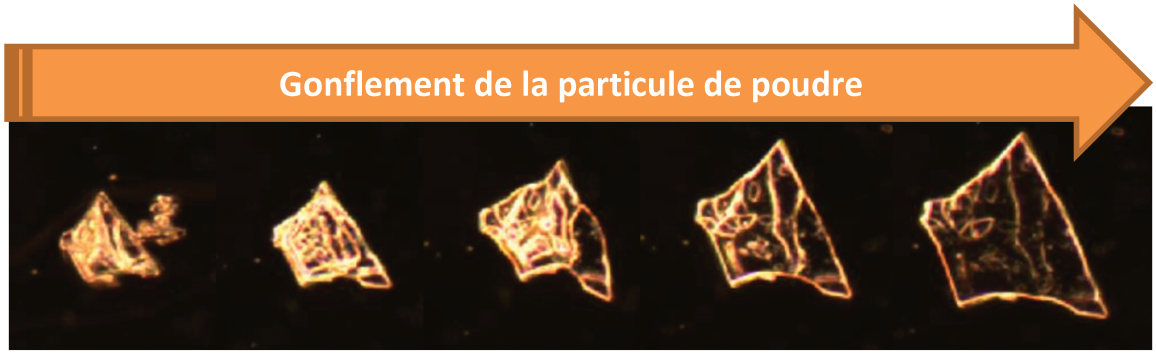


Figure 57 : Gonflement d'une particule de poudre de caséinate de sodium étuvée 36 h à 100 °C et à pH 9,5 dans de l'eau désionisée, observé pendant 20 secondes au microscope à contraste de phase (obj x 4).

3. DISCUSSION

Des AMI se forment quelle que soit la proportion de la poudre CasNa dans la poudre d'IPS. Ces AMI sont de forme angulaire avec des tailles supérieures à celle des particules de poudre, et ont une forte capacité de rétention d'eau. En remplaçant les PS par des caséinates, les propriétés des poudres étuvées et des AMI formés sont proches de celles obtenues avec la poudre Cas0. Toutefois, on note une légère augmentation du DY, accompagnée d'une petite diminution du WC et du WY, avec l'augmentation de la proportion en CasNa (Figure 55). L'augmentation de la proportion en CasNa permet donc d'avoir des AMI un peu plus denses. Les caséines sous forme de caséinate sont donc bien intégrées dans les AMI, puisque le DY ne diminue pas suite à l'augmentation de la proportion en poudre de CasNa et qu'il est même possible d'obtenir avec la poudre Cas100, des AMI similaires aux AMI obtenus avec Cas0.

Le mécanisme de formation des AMI, quelle que soit la proportion en poudre CasNa, semble être le même. En effet, nous avons vu en Figure 57 que les AMI pour la poudre Cas100 sont bien issus du gonflement des particules de poudre et que les AMI avec la poudre CasMic ont la même forme et la même taille que celle des particules de poudre dont ils proviennent (Figure 52 et Figure 54). Les AMI avec les poudres de caséines se formeraient donc aussi par réticulation des protéines dans les particules de poudre.

La réticulation des protéines par l'étuvage à pH 9,5 ne serait donc pas restreinte à des protéines de type globulaire, comme les PS. Nous avons vu précédemment, que la réaction de Maillard était impliquée dans la formation des AMI (parti 2.1). La réticulation de diverses protéines alimentaires induite par la réaction de Maillard durant la transformation des aliments est déjà bien établie, mais les structures chimiques de liaisons réticulantes ne sont pas encore bien connues (Gerrard, 2002). Des polymères de protéines de haut poids moléculaire sont obtenus après incubation de la caséine avec un sucre, ainsi que la formation de composés bruns (Gu *et al*., 2010; Jing and Kitts, 2004; Pellegrino *et al*., 1999). Lorient (1979), a montré que le traitement de caséines à pH alcalin à 120 °C induit la formation de liaisons réticulantes de type lysinoalanyle via la réaction entre une phosphosérine et une lysine dans la caséine α_{s1}. Par ailleurs, l'apparition de produits de la réaction de Maillard, tels que des composés α-dicarbonylés, sont aussi capables d'induire une réticulation entre les protéines (Cho *et al*., 1986; Miller *et al*., 2003). De plus, l'augmentation de pH favorise la formation des composés α-dicarbonylés (Cremer and Eichner, 2000). Le traitement à pH alcalin peut aussi conduire à la formation de déhydroprotéine suite à la β-élimination des résidus cystéine et phosphosérine de protéines alimentaires. La déhydroprotéine est ensuite capable de se lier à une fonction amine ou thiol d'une autre protéine, induisant ainsi la réticulation covalente des protéines (Belitz *et al*., 2009; Friedman, 1999). L'étuvage à pH alcalin pourrait alors engendrer différents types de molécules permettant la réticulation des protéines, PS ou caséines.

Au vu des variations de taille des AMI et des particules de poudre, quand la proportion de CasNa augmente, le gonflement des particules de poudre étuvée 36 h diminue. Les AMI sont donc plus denses, ont une moins bonne capacité de rétention d'eau et une propriété de gonflement réduite. Il semblerait donc que plus la proportion de CasNa augmente, plus les AMI seraient réticulés.

Il est à noter que les augmentations de DY et les diminutions de WC semblent corrélées entre elles, mais ne sont pas strictement corrélées à la proportion en CasNa. De ce fait, il y a très certainement des interactions entre les PS et les caséines qui pourraient expliquer la non proportionnalité entre la proportion de caséinate et les propriétés des AMI. Guyomarc'h *et al*. (2008) ont en effet montré que les PS et la caséine kappa, sous l'action d'un traitement thermique en voie liquide, sont capables d'interagir entre eux et de former des agrégats mixtes, en gardant la même structure mais avec des densités plus faibles que les agrégats de PS pures. Les caséines sont aussi connues pour leur effet

protecteur contre la dénaturation/agrégation thermique des PS (Bhattacharyya and Das, 1999; Morgan *et al*., 2005; O'Kennedy and Mounsey, 2006). On pourrait imaginer que de telles interactions entre caséines et PS pourraient favoriser ou défavoriser la réticulation des protéines au cours de l'étuvage. Dans notre cas, l'addition de caséinate à la poudre d'IPS ne change pas le taux de dénaturation des PS engendrées par l'étuvage à 100 °C pendant 36 h de la poudre à pH 9,5. Cependant, un seul temps d'étuvage a été examiné, et il serait donc nécessaire de caractériser d'autres temps d'étuvage afin de suivre les cinétiques de formation des AMI et de dénaturation des PS, afin de comprendre l'effet de la caséine sur les PS lors de l'étuvage à pH 9,5.

L'intensité de la réaction de Maillard telle qu'on peut l'apprécier par les valeurs du BI (Figure 50), n'est pas non plus corrélée à la proportion de CasNa. Le BI augmente entre 0 et 33 % de CasNa, puis diminue au-delà. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la superposition de deux effets :

- La caséine n'est pas une protéine structurée et n'a pas de conformation privilégiée. Elle forme une pelote statistique et tous les acides aminés changent de position entre l'intérieur et l'extérieur de la protéine. Autrement dit, les sites masqués se démasquent et deviennent accessibles. Ainsi, toutes les lysines sont potentiellement accessibles, ce qui améliorerait la réactivité de la lysine vis-à-vis du lactose. La réaction de Maillard serait alors facilitée. Une augmentation de l'intensité de Maillard a pour conséquence une augmentation de l'intensité du brunissement.
- La poudre de CasNa et celle d'IPS contiennent 0,319 ± 0,003 et 0,613 ± 0,017 g de lactose libre/100 g d'EST, respectivement. La poudre de CasNa contient moins de lactose libre que la poudre d'IPS, donc la quantité de lactose libre dans les poudres diminue avec la proportion de CasNa. La diminution de la quantité de lactose présente dans la poudre diminuerait l'intensité de la réaction de Maillard lors de l'étuvage à 100 °C des poudres à pH 9,5 (Schong and Famelart, 2018b). Une diminution de l'intensité de Maillard entraine une diminution de l'intensité de brunissement.

Ainsi, entre 0 et 33 % de CasNa, l'augmentation de l'BI pourrait être due à l'augmentation de la réactivité des lysines et entre 33 et 100 % de CasNa, la diminution de l'BI pourrait être due à la diminution de la quantité de lactose dans les poudres, diminuant l'intensité de la réaction de Maillard.

Les distributions de taille reflètent la résistance de la poudre au broyage, puisqu'elles ont toutes été broyées de la même manière. La résistance de la poudre face au broyage peut dépendre de la composition de la poudre en protéine, lactose et sel. Le D[4,3] des particules des poudres de Cas0 et de Cas 100 est de ~60 µm et ~100 µm, respectivement. Ce résultat montre que la poudre de Cas100 est beaucoup plus résistante au broyage que la poudre Cas0. Tous les mélanges des poudres d'IPS et de CasNa ont un D[4,3] intermédiaire entre le D[4,3] de ces deux poudres. La résistance de ces poudres au broyage est probablement la moyenne pondérée des résistances des poudres Cas0 et de Cas100. Le D[4,3] des particules de poudre CasMic est de ~70 µm. La poudre CasMic a donc une résistance et une taille intermédiaire à celles des poudres Cas0 et Cas100. Cependant, il est bien connu que les poudres de lactose sont difficiles à broyer, et ajouter du CasNa revient à réduire la teneur en lactose, et nos résultats ne s'expliquent pas par leur différence de teneur en lactose. Ils doivent donc s'expliquer plutôt par la nature des protéines de la poudre ou la présence de sels.

Le fait que la poudre Cas100 soit plus difficile à broyer que la poudre Cas0 pourrait être dû au fait que la formation des AMI soit déjà initiée avant l'étuvage des poudres, c'est-à-dire dès que la solution est ajustée à pH 9,5. En effet, le traitement alcalin de protéines alimentaires sans étuvage peut mener à la formation de liaisons réticulantes de type lysinoalanine, dehydroalanine et lanthionine, ainsi que des ponts SS (Friedman, 1999). Ainsi, on peut supposer que des liaisons entre les protéines se formeraient déjà avant l'étuvage des poudres, sans aller jusqu'à la réticulation qui mène à la formation d'AMI. La formation de ces liaisons serait plus intense entre les caséines qu'entre les PS, du fait de leur structure ouverte et flexible que faciliterait l'accès aux réactifs. La poudre de Cas100 serait de ce fait, plus difficile à broyer.

La poudre CasMic brunit fortement après 36 h d'étuvage. Le degré de brunissement est souvent utilisé pour quantifier la réaction de Maillard dans les produits alimentaires (Martins *et al.*, 2000). Une forte intensité de brunissement traduit une forte intensité de la réaction de Maillard. En effet, la quantité de lactose présente dans cette poudre est de 3,141 ± 0,124 g de lactose libre/100 g d'EST. La quantité en lactose de la poudre CasMic est beaucoup plus élevée que celles des poudres CasNa et IPS qui contiennent 0,319 ± 0,003 et 0,613 ± 0,017 g de lactose libre/100 g d'EST, respectivement. L'addition de lactose permet d'augmenter l'intensité de la réaction de Maillard par l'étuvage à 100 °C d'une poudre de d'IPS à pH 9,5 (Schong and Famelart, 2018b). En effet, le lactose initie la réaction de

Maillard, donc plus il est présent en grande quantité, plus la réaction de Maillard peut avoir lieu. Cependant, en particulier à pH alcalin, des réactions de caramélisation qui ont lieu lorsqu'on chauffe de sucre seul, peuvent aussi se produire et augmenter le brunissement provoqué par la réaction de Maillard (Ajandouz and Puigserver, 1999).

Le ΔD[4,3] pour la poudre CasMic est environ de 12 alors qu'il est supérieur à 96 pour les autres poudres (Tableau 9). Les particules de poudre CasMic étuvée 36 h gonflent donc moins lorsqu'elles sont suspendues dans l'eau. De ce fait, les AMI sont plus petits avec la poudre CasMic qu'avec les autres poudres (Figure 51B). Le DY en AMI est plus élevé pour la poudre CasMic que pour les autres poudres, mais les AMI produits à partir de la poudre CasMic ont une capacité de rétention d'eau plus faible que les AMI produits avec les autres poudres. Les protéines des AMI produits avec la poudre CasMic seraient donc davantage réticulées au bout de 36 h d'étuvage, comparés aux AMI obtenus avec les autres poudres. Les protéines des particules de poudre CasMic deviendraient tellement réticulées à 36 h d'étuvage, que les AMI en suspension seraient très denses et quasiment indéformables. Cela pourrait expliquer que les AMI ne gonfleraient presque pas, et qu'ils conserveraient l'aspect replié que possèdent les particules de poudre, contrairement à la poudre Cas100 dont les particules se déplient et gonflent lorsqu'elles sont solubilisées dans l'eau.

L'effet du temps d'étuvage et de l'ajout de lactose sur la formation des AMI par étuvage à pH 9,5 d'une poudre d'IPS est d'augmenter les rendements en AMI, mais aussi de diminuer la capacité de rétention d'eau des AMI (Schong and Famelart, 2018b). L'augmentation du DY en AMI avec la poudre CasMic est donc probablement dû à la forte teneur en lactose de la poudre CasMic. Selon le dosage par chromatographie ionique, il y a ~3 g de lactose libre/100 g d'EST dans la poudre CasMic, ce qui correspond environ à 0,33 de lactose ajouté/10 g de protéine, sans compter le lactose qui pourrait être fixé aux protéines dans les poudres initiales. Or le BI de la poudre CasMic après 36 h d'étuvage à 100 °C a une valeur intermédiaire entre les poudres d'IPS avec 0,21 et 0,42 g de lactose ajouté/10 g de protéine à 36 h d'étuvage (Schong and Famelart, 2018b). Les DY associés de ces 2 poudres sont aussi élevés que pour la poudre CasMic avec des WC de ~13 et ~8 g/g d'AMI secs, respectivement. Les AMI produits à partir de la poudre CasMis ont un WC assez proche de ces valeurs, avec ~6 g/g d'AMI secs. Or, les AMI produits dans ces poudres d'IPS étuvées seulement 3 h ont des WC plus de 2 fois supérieurs aux AMI produits dans les mêmes poudres étuvées 36 h. On peut donc imaginer que pour des temps

d'étuvage plus courts de la poudre CasMic, les WC des AMI seraient plus élevées. Cependant des études supplémentaires doivent être entreprises, notamment en réalisant des temps d'étuvage plus courts, afin de mieux comprendre la formation des AMI à partir de la poudre CasMic.

Les particules de poudre obtenues avec les poudres Cas0 et Cas100 ou CasMic sont différentes morphologiquement. Les particules de poudre Cas0 sont majoritairement en forme de lamelles angulaires lisses alors que ceux de la poudre Cas100 et CasMic ont majoritairement l'aspect plissé et recroquevillé. Sadek *et al*. (2014) ont également montré une différence de morphologie entre les particules d'une poudre d'IPS et ceux d'une poudre de caséine micellaire, obtenues suite à un séchage par pulvérisation d'une solution à 100 g de poudre/L ajustée à pH 6,6. Les particules de poudre d'ISP sont lisses, alors que celles de la poudre de caséine micellaire sont ridées, denses et plus compacts. Sadek *et al*. (2014) ont aussi réalisé des mélanges entre les poudres d'IPS et de caséine micellaire à différents ratios. Les mélanges donnent des formes hybrides. Ces auteurs supposent que la coque formée à l'interface eau/air de la particule de poudre est plus fine et plus flexible avec la caséine micellaire qu'avec les PS. Il est possible que le même type de mécanisme ait lieu lors du séchage par lyophilisation. Ainsi, les particules des poudres Cas100 et CasMic seraient plus déformables que ceux de la poudre d'Cas0, ce qui mènerait plus facilement à des structures plissées lors du broyage des poudres de caséine. On pourrait aussi supposer que les plis se forment déjà pendant le séchage par sublimation lors de la lyophilisation.

4. CONCLUSION

La présence des caséinate de Na ne joue pas un rôle majeur dans la formation des AMI. Quelle que soit la quantité de caséinate ajoutée, après 36 h d'étuvage, le DY, le WY, le WC et la morphologie des AMI ainsi que le taux de dénaturation des PS ne sont pas beaucoup modifiés, même avec 100 % de poudre de CasNa. Ajouter un peu de caséinate de sodium permet même d'augmenter un peu les WY.

Le DY augmente légèrement avec la proportion en poudre de CasNa, mais la teneur en eau et le gonflement des AMI diminuent. Il y a peut-être une augmentation du taux de réticulation des protéines dans les AMI avec la proportion en poudre de CasNa. Il serait donc intéressant d'étudier si la vitesse

de réticulation augmente avec le caséinate, en suivant la formation des AMI au cours du temps d'étuvage.

Les AMI produits à partir de caséines micellaires sont plus petits, plus denses et retiennent moins de phase soluble. Cependant, un seul temps d'étuvage a été étudié. Il est donc difficile de conclure si ce phénomène s'observe pour tous les temps d'étuvage ou si les protéines des AMI sont davantage réticulées, du fait de la forte teneur en lactose dans la poudre, qui entrainerait une cinétique de formation des liaisons réticulantes plus rapide qu'avec la poudre Cas0.

Un fait remarquable est que les AMI peuvent être produits à partir d'autres protéines que les PS et avec des protéines de structures différentes. On peut donc imaginer que d'autres protéines non laitières puissent aussi mener à la formation d'AMI de même type.

Bilan du chapitre 4 :

Dans ce chapitre, le rôle des caséines sur le mécanisme de formation des AMI a été étudié, dans le but de fournir des réponses aux questions suivantes :

- **Les caséines font-elles partie des AMI et ont-elles un rôle particulier dans le mécanisme de formation des AMI ?**

Les caséines font partie intégrante des AMI et semblent avoir le même rôle que les PS dans le mécanisme de formation des AMI. En effet, peu importe la proportion en poudre de caséinate ajouté à la poudre d'IPS, les caséines sont intégrées dans les AMI au même titre que les PS, suite à l'étuvage à 100 °C de la poudre à pH 9,5, et les rendements sont proches quelle que soit la quantité de caséinate.

- **Quel est l'effet des caséines sur les propriétés physico-chimiques et morphologiques des AMI ?**

L'ajout de caséinate de sodium a peu d'effet sur les propriétés physico-chimiques et morphologiques des AMI. Leur taille, leur densité et leur teneur en eau ne sont pas très différentes. Ajouter 20-25 % (p/p) de poudre de caséinate de sodium à la poudre d'IPS améliore un peu les rendements humides et secs.

- **Quel est l'effet des caséines sur la dénaturation des PS suite à l'étuvage à 100 °C de la poudre à pH 9,5 ?**

Les caséines n'ont pas d'effet notable sur le taux de dénaturation des PS après 36 d'étuvage de la poudre à pH 9,5.

- **Une autre source de protéines laitières que les PS est-elle capable de former des AMI ?**

Il est possible de produire des AMI avec des poudres de caséines. Avec la poudre de Cas100, les AMI obtenus après 36 h d'étuvage sont très similaires à ceux obtenus avec la poudre d'IPS. Avec la poudre enrichie en caséine micellaire, les AMI sont plus petits, plus denses et retiennent moins d'eau que ceux obtenus avec la poudre d'IPS après 36 h d'étuvage, mais la différence de quantité de lactose présente dans les poudres pourrait en être la cause.

CHAPITRE 5 : COMPREHENSION DU MECANISME DE FORMATION DES AMI A PARTIR D'UNE POUDRE DE B-LACTOGLOBULINE PURE

La poudre d'IPS est un mélange contenant majoritairement des PS, mais aussi des quantités non négligeables de caséines, de lactose et de minéraux résiduels. Nous avons vu dans les chapitres précédents, que le lactose est un facteur important de la formation des AMI. En effet, l'ajout de lactose en petite quantité permet d'accélérer fortement la réaction de formation d'AMI. Le lactose permet d'initier la réaction de Maillard en se liant aux protéines. Cette réaction produit des molécules, telles que des composés α-dicarbonylés, qui sont soupçonnés d'être à l'origine de liaisons réticulantes entre les protéines, conduisant à la formation des AMI. Les caséines, sous forme de caséinate de sodium, n'ont que peu d'effet sur la formation des AMI, mais se retrouvent dans les AMI.

Afin d'étudier plus finement le rôle de chacun des constituants de la poudre d'IPS sur la formation des AMI, la poudre de βlg pure a été utilisée seule, puis mélangée avec du lactose, du caséinate de sodium ou du $CaCl_2$. L'effet du $CaCl_2$ a aussi été étudié dans ce chapitre, car l'ion calcium est capable de provoquer/améliorer l'agrégation des protéines en réduisant les interactions répulsives par écrantage des charges des protéines et en formant des ponts ioniques entre les protéines (Bryant and McClements, 2000).

Principaux objectifs :

- **Etudier l'effet de la composition de la poudre sur la formation des AMI en utilisant un mélange de poudres moins complexe que la poudre d'IPS.**
- **Déterminer si la βlg seule suffit à la formation d'AMI.**
- **Définir si le lactose est nécessaire à la formation d'AMI ou s'il est seulement un catalyseur de réaction.**
- **Définir si les caséines sous forme de caséinate de sodium et le $CaCl_2$ ont un rôle dans la formation des AMI.**

Stratégie :

Chacun des constituants a été ajouté en quantité proche de celle dosée dans la poudre d'IPS commerciale. La poudre a été produite par un séchage par lyophilisation. Les propriétés morphologiques et physico-chimiques des poudres et des assemblages produits par étuvage à pH 9,5 pendant 0, 3, 12 et 36 h à 100 °C ont été caractérisées, de la même façon que dans les chapitres précédents.

1. PREPARATION DES POUDRES ETUVEES

Des solutions contenant des mélanges de poudre de βlg pure avec des poudres de :

- α-lactose monohydraté (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) ou de
- CasNa (Lactalis, Bourgbarré, France) ou de
- Ca Cl_2.2H_2O (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)

ont été préparées comme indiqué dans le Tableau 10. Dans un premier temps, des solutions de lactose, de $CaCl_2$ et de CasNa ont été agitées à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 15 minutes à température ambiante. La poudre de βlg a été rajoutée dans un deuxième temps. Les poudres ont été solubilisées à 150 g de poudre totale/kg. Les solutions ont été ensuite ajustées à pH 9,5, rapidement congelées et lyophilisées. Les lyophilisats ont été ensuite broyés pour obtenir de la poudre, puis la poudre a été conditionnée environ 2 semaines à une a_w de ~0,24. Un g de poudre a été ensuite étuvé 0, 3, 12 et 36 h à 100 °C dans des petits tubes en pyrex fermés hermétiquement. Chaque poudre a été étuvée en double.

Tableau 10 : Composition des suspensions pour la préparation des poudres étuvées.

Nom de l'échantillon	βlg+lac	βlg+CasNa	βlg+$CaCl_2$	βlg
Poudre de α-lactose monohydraté (g/kg de solution)	2,7	-	-	-
Poudre de CasNa (g/kg de solution)	-	31	-	-
Poudre de $CaCl_2.2H_2O$ (g/kg de solution)	-	-	2,0	-
Poudre de βlg (g/kg de solution)	150,0	150,0	150,0	150,0
Lactose libre dans la poudre finale (g/kg de poudre)*	16,81	0,52	<0,01	<0,01
Caséine dans la poudre finale (g/kg de poudre)**	-	148,9	-	-
Calcium dans la poudre finale (g/kg de poudre)***	0,25	0,25	5,0	0,25
βlg dans la poudre finale (g/kg de poudre)	908,5	768,0	912,7	924,8

* D'après un dosage du lactose libre par chromatographie ionique, il y a moins de 0,01 g de lactose libre/kg dans la poudre de βlg.
** D'après un dosage par SDS-PAGE, il y a 869 g de caséines/kg dans la poudre de CasNa.
*** D'après sa fiche technique, il y a 0,25 g de calcium/kg dans la poudre de βlg.

Les poudres de CasNa et $CaCl_2$ ont été ajoutées dans des quantités proches de celle mesurées dans la poudre d'IPS, i.e. ~0,2 g de caséine/g de PS et ~3 g de calcium/kg de poudre. Une certaine quantité de lactose peut être fixée sur les protéines, suite au procédé de préparation de la poudre commerciale d'isolat de PS. Dans sa thèse, Gulzar (2011) avait estimé qu'environ la moitié des molécules de lactose était fixée sur les protéines dans une poudre d'IPS provenant du même fabriquant. De ce fait, nous avons supposé qu'il y a approximativement la même proportion de lactose fixé sur les PS dans la poudre d'IPS utilisée pour cette thèse. C'est pourquoi la quantité de lactose ajouté dans les solutions est entre 2 et 3 fois supérieure à la quantité de lactose libre quantifiée dans la poudre d'IPS.

2. RESULTATS

2.1 IMPACT DE L'ETUVAGE SUR LES CARACTERISTIQUES DES POUDRES

L'a_w et le BI des différentes poudres lyophilisées en fonction du temps d'étuvage sont reportés en Figure 58. Pour l'ensemble des poudres, l'a_w augmente légèrement de ~0,2 à ~0,3 entre 0 et 3 h, puis tend vers en plateau pour les temps d'étuvage plus long. L'a_w qui augmente le plus est celle de la poudre βlg+lac. Le BI augmente légèrement suite à l'étuvage des poudres de βlg, βlg+CasNa et βlg+CaCl2. La poudre βlg+lac, a un BI qui augmente fortement après 3 h d'étuvage, puis qui est presque constant entre 12 et 36 h d'étuvage. Comme pour l'a_w, le BI augmente plus vite entre 0 et 3 h d'étuvage qu'entre 3 et 36 h d'étuvage pour l'ensemble des poudres. Le classement des poudres par brunissement croissant est les suivant : βlg < βlg+$CaCl_2$ < βlg+CasNa < βlg+lac.

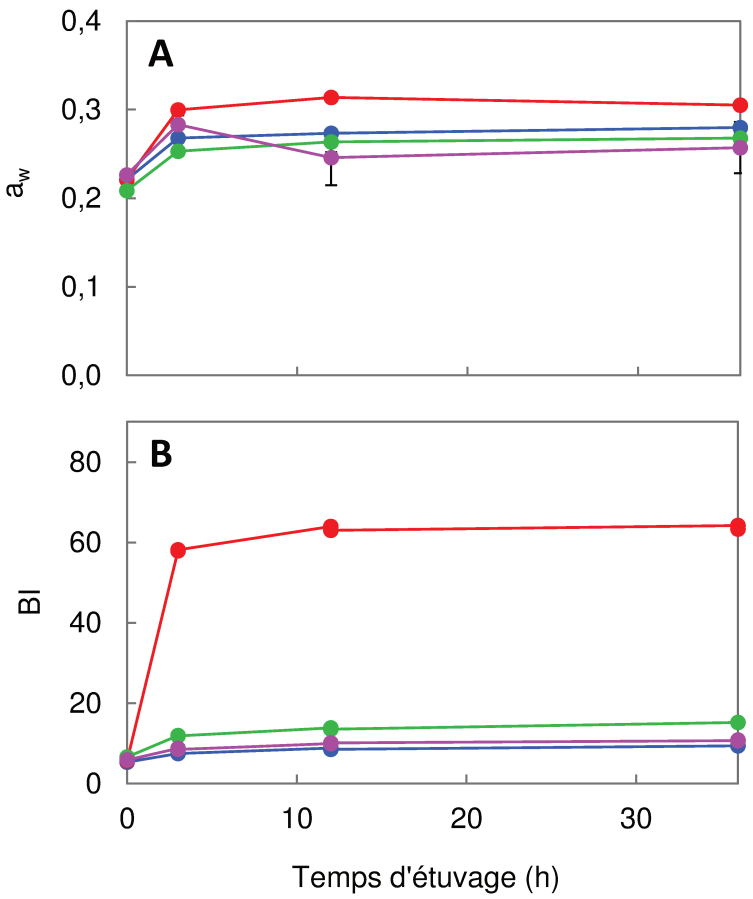


Figure 58 : Activités de l'eau (a_w) (A) et indices de brunissement (BI) (B) des poudres de βlg (●), de βlg+lac (●), de βlg+CasNa (●) et de βlg+$CaCl_2$ (●) en fonction du temps d'étuvage.

Les distributions de taille des particules de poudre avant l'étuvage ont été déterminées au QICPIC (Figure 59). Les tailles des particules de poudres sont comprises entre 5 et 500 µm pour l'ensemble des poudres. Le D[4,3] de la poudre βlg est significativement plus petit que ceux des poudres βlg+CasNa et βlg+$CaCl_2$, avec une différence de taille de ~10 µm. Le D[4,3] de la poudre βlg+lac n'est pas significativement différent de l'ensemble des autres poudres.

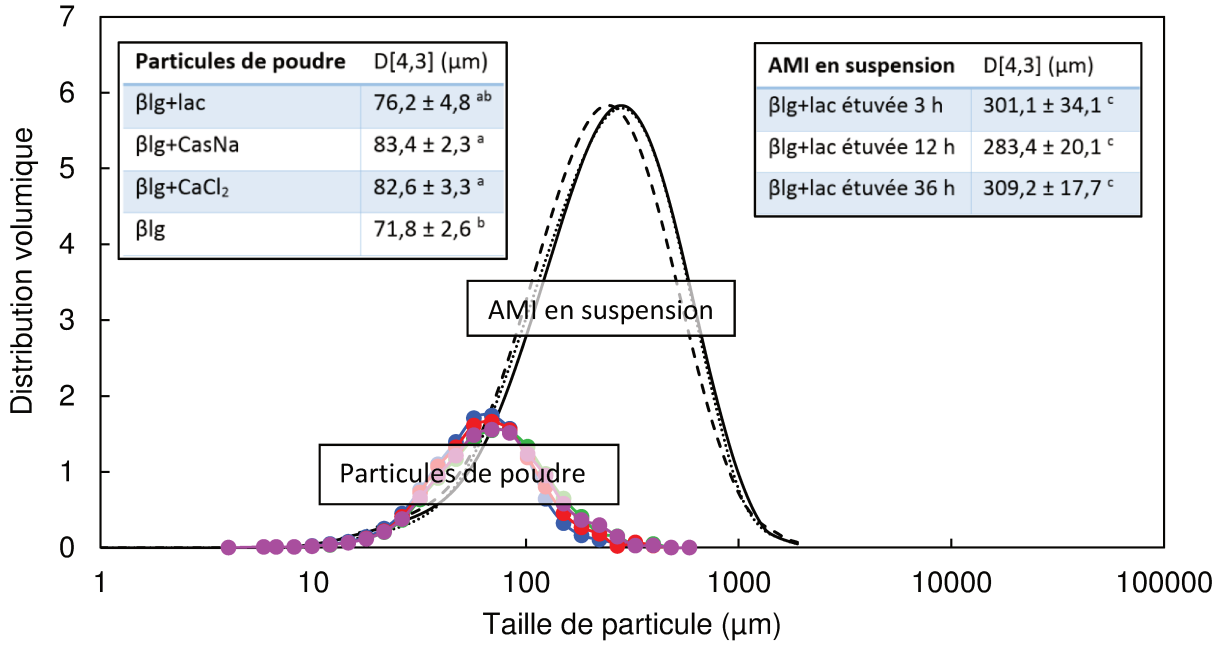


Figure 8 : Distribution de taille des particules de poudre avant l'étuvage déterminées au QICPIC des poudres de βlg (●), de βlg+lac (●), de βlg+CasNa (●) et de βlg+$CaCl_2$ (●) ; distributions de taille des AMI en suspensions issus de la poudre de βlg+lac étuvée à 100 °C pendant 3 (····), 12 (- -) et 36 h (—) déterminées à l'aide du Mastersizer. Les inserts correspondent au diamètre moyen en volume ([D4,3]) des particules de poudre et des AMI en suspension. Les échantillons ayant une lettre différente sont statistiquement différents (P <0,05).

2.2 CONTENU EN CARBOXYMETHYLLYSINE

La CML, l'un des AGE de la réaction de Maillard, a été dosée dans la poudre βlg+lac étuvée 0, 3 et 36 h (Tableau 11). La poudre non étuvée contient déjà de la CML et il y a une augmentation rapide de sa concentration entre 0 et 3 h d'étuvage. Entre 3 et 36 h d'étuvage, l'augmentation de la concentration en CML n'est pas significative (P>0,05). La formation de CML et donc les stades finaux de la réaction de Maillard, sont terminés à 3 h d'étuvage, et même peut-être avant 3 h d'étuvage.

Tableau 11 : Carboxyméthyllysine (CML) dosée dans les poudres étuvées à 100 °C.

Poudre	CML (ng/mg de protéine)
βlg+lac étuvée 0 h*	245
βlg+lac étuvée 3 h	2014 ± 36
βlg+lac étuvée 36 h	2204 ± 233

*Cette poudre a été ajustée à a_w~0.24.

2.3 CARACTERISATION DES SUSPENSIONS S0

2.3.1 DENSITE OPTIQUE A 500 NM DES SUSPENSIONS S0

Les suspensions S0 sont obtenues en reconstituant les différentes poudres étuvées 0, 3, 12 et 36 h dans l'eau désionisée à une concentration finale de 10 g de poudre/kg. Les $OD_{500\ nm}$ des suspensions S0 sont représentées en Figure 60. Les $OD_{500\ nm}$ des suspensions réalisées avec les poudres de βlg et de βlg+CaCl2 sont inférieures à 0,1. La $OD_{500\ nm}$ est un peu plus élevée avec βlg+CasNa, même avant l'étuvage, mais elle reste faible, ne dépassant pas 0,2. La suspension réalisée avec la poudre étuvée βlg+lac a une la $OD_{500\ nm}$ qui augmente fortement en 3 h d'étuvage, puis augmente de plus en plus lentement jusqu'à 36 h d'étuvage. La courbe tend vers un plateau à 36 h d'étuvage, avec une $OD_{500\ nm}$ d'environ 0,8. Cette augmentation de $OD_{500\ nm}$ est le signe de la formation de particules qui diffusent la lumière.

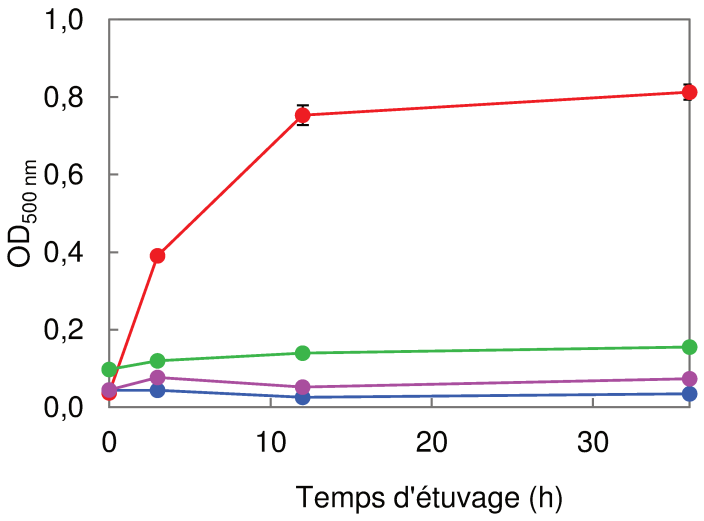


Figure 60 : Densités optiques des suspensions à 500 nm ($OD_{500\ nm}$) en fonction du temps d'étuvage des poudres de βlg (●), de βlg+lac (●), de βlg+CasNa (●) et de βlg+$CaCl_2$ (●).

2.4 ASPECT DES CULOTS P1

Il n'y a pas formation de véritables culots après centrifugation de 2 g de suspensions S0 réalisées à partir des poudres de βlg, βlg+CasNa et βlg+$CaCl_2$, alors qu'avec la poudre βlg+lac, des culots volumineux jaunâtres et translucides sont obtenus dès 3 h d'étuvage de la poudre (Figure 61). Le volume du culot obtenu à partir de cette poudre βlg+lac augmente entre 3 et 12 h d'étuvage, mais il est peu différent entre 12 et 36 h d'étuvage.

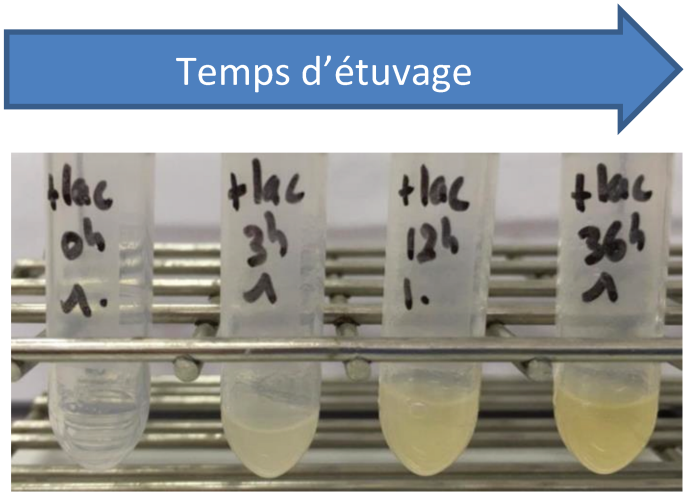


Figure 61 : Photographie des culots P1 obtenus après centrifugation de 2 g des suspensions S0 contenant 10 g de poudre/kg de suspension préparées à partir de la poudre βlg+lac étuvée à 100 °C pendant 0, 3, 12 et 36 h.

2.5 SUSPENSIONS S0 OBSERVEES PAR MICROSCOPIE CONFOCALE

Les micrographies des suspensions S0 préparées à partir des différentes poudres étuvées 0, 3, 12 et 36 h d'étuvage obtenues par CLSM sont représentées en Figure 62. On observe des AMI de grande taille et en grande quantité uniquement dans les suspensions réalisées avec la poudre βlg+lac et ceci quel que soit le temps d'étuvage de la poudre. Les AMI sont de la même forme que celle des particules de poudre lyophilisées, c'est-à-dire en forme de lamelles angulaires lisses. Quelques petites particules insolubles sont présentes dans les suspensions préparées avec les poudres non étuvées. Ces petites particules se retrouvent aussi dans les suspensions réalisées à partir des poudres de βlg, de βlg+CasNa et de βlg+$CaCl_2$ à tous les temps d'étuvage. A 36 h d'étuvage de la poudre βlg+$CaCl_2$, on observe également la présence de microparticules fibrillaires, mais en faible quantité. Ces dernières microparticules n'ont pas la même morphologie que celle des AMI obtenus avec la poudre βlg+lac.

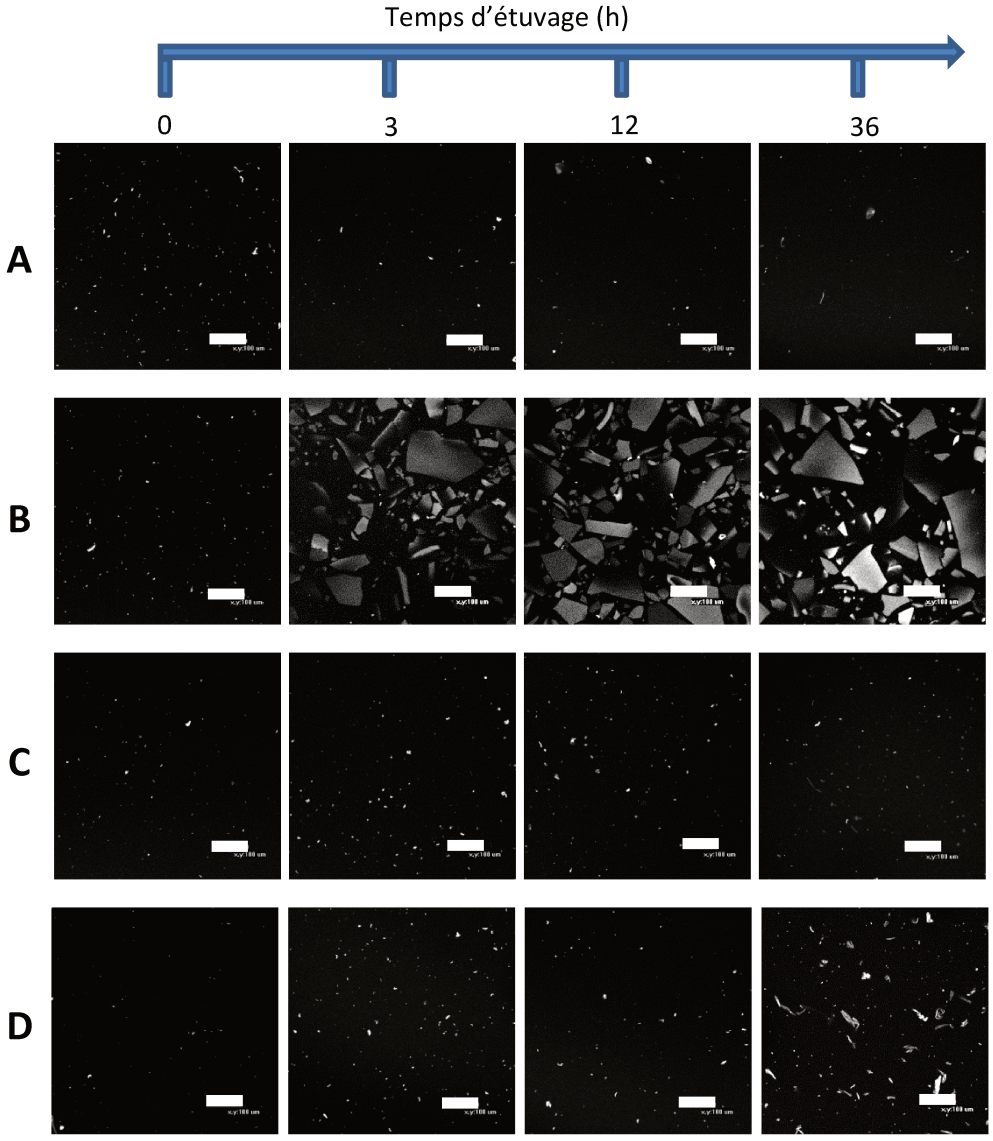


Figure 62 : Micrographies des suspensions d'AMI réalisées avec les poudre de βlg (A), de βlg+lac (B), de βlg+CasNa (C) et de βlg+$CaCl_2$ (D) étuvées 0, 3, 12 et 36 h observées au CLSM avec un obj x20 (barres = 100 µm) entre 0 et 5 µm de la lamelle. Les photos sont représentatives de l'ensemble de l'échantillon observé.

2.6 DISTRIBUTION DE TAILLE DES AMI

Les distributions de taille des AMI dans les suspensions réalisées avec la poudre de βlg+lac étuvée 3, 12 et 36 h, obtenues au Mastersizer sont représentées en Figure 60. La taille des AMI est comprise entre 10 et 2 000 µm, avec un D[4,3] proche de 300 µm pour tous les temps d'étuvage. Les D[4,3] ne sont pas significativement différents, d'après une ANOVA (P>0,05) et donc le temps d'étuvage n'a pas

d'effet sur le D[4,3] des AMI. Les D[4,3] des AMI sont environ 4 fois plus élevés que ceux des particules de poudre non étuvés.

2.7 RENDEMENTS ET TENEUR EN EAU DES AMI

Pour rappel :

-le rendement humide ou wet yied (WY) en AMI, exprimé en g/g de poudre étuvée, correspond au poids de culot P1, calculé pour 1 g de poudre étuvée dans la suspension S0 centrifugée,

-le rendement sec ou dry yield (RS) en AMI, exprimé en g/g de poudre étuvée, correspond au poids du culot P1 après séchage, calculé pour 1 g de poudre étuvée dans la suspension S0 centrifugée,

-la teneur en eau ou water content (WC) des AMI, exprimée en d'eau g/g d'AMI sec, correspond à la quantité d'eau retenue dans 1 g d'AMI sec.

Les microparticules obtenues à 36 h d'étuvage de la poudre de $CaCl_2$, sont présentes en trop faible quantité pour avoir un réel culot P1. De ce fait, il n'est pas possible de d'évaluer les rendements en microparticules et leur teneur en eau par cette méthode. Dans le cas des poudres de βlg et βlg+CasNa, il n'y a pas de microparticules présentes dans les suspensions (Figure 62).

Le DY, DY et le WC des AMI, en fonction du temps d'étuvage de la poudre de βlg+lac sont représentés en Figure 63.

Le DY augmente avec le temps d'étuvage, et il augmente plus rapidement entre 0 et 3 h d'étuvage qu'entre 3 et 36 h d'étuvage. Au bout de 36 h d'étuvage, le DY est à ~0,5 g/g de poudre étuvée. Autrement dit, environ la moitié de la matière sèche de la poudre, c'est-à-dire essentiellement de la βlg (teneur en βlg de la poudre : ~93 g/100 g d'EST) se trouve intégrée dans les AMI.

Les WC sont compris entre 30 et 40 g/g d'AMI secs entre 3 et 36 h d'étuvage et ne sont pas statistiquement différents d'après un test ANOVA ($P>0,05$). Le temps d'étuvage n'a donc pas d'effet sur le WC des AMI.

Du fait d'un WC invariable au cours de l'étuvage, le WY augmente à peu près de la même façon que le DY, c'est-à-dire qu'il augmente rapidement entre 0 et 3 h d'étuvage, puis moins rapidement entre 3 et 12 h d'étuvage et finit par être constant entre 12 et 36 h d'étuvage.

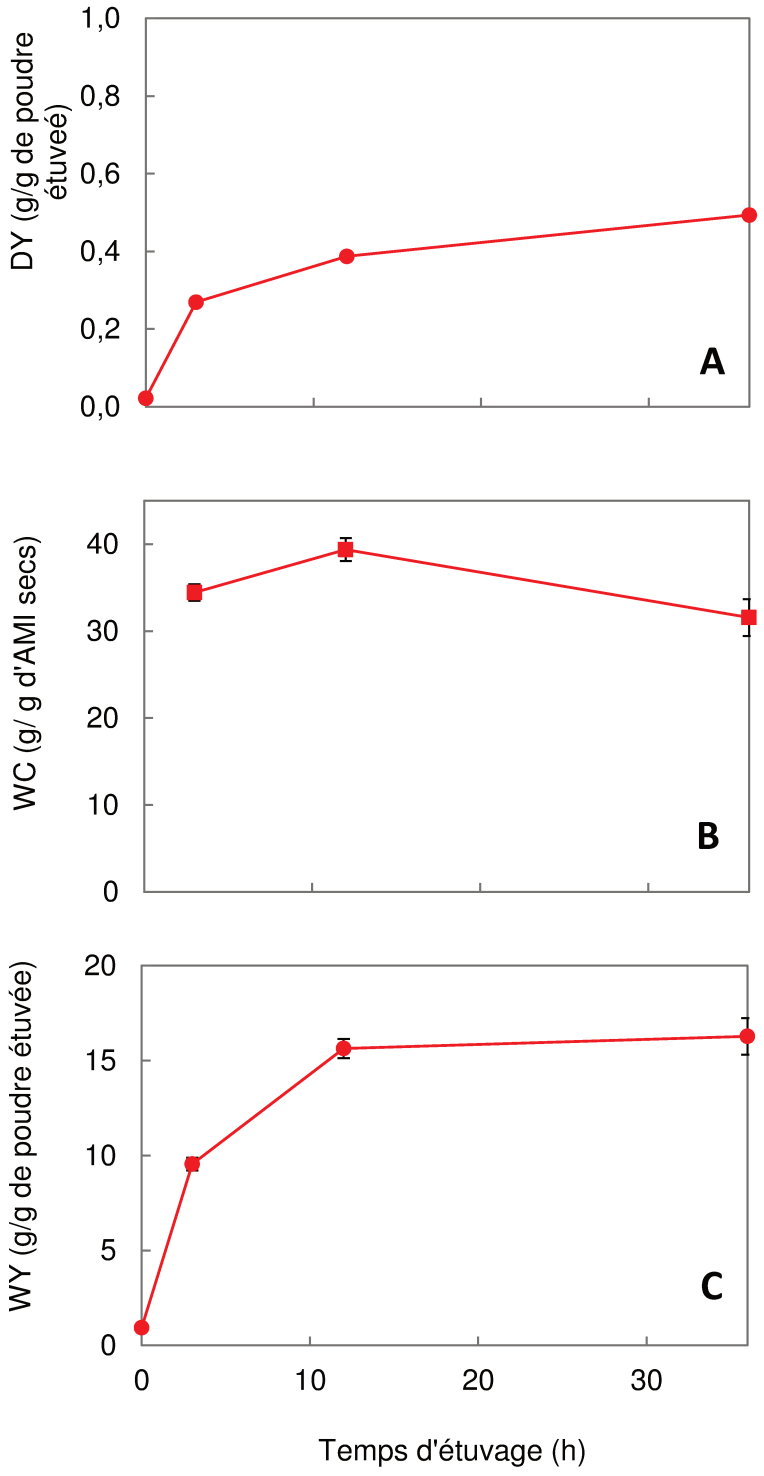


Figure 63 : Rendement sec (DY) (A), teneur en eau (WC) (B) et rendement humide (WY) (C) en fonction du temps d'étuvage de la poudre de βlg+lac.

2.8 DENATURATION DE LA βLG ET FORMATION DE SDAP

Les quantités de βlg native résiduelle et de SDAP, en fonction du temps d'étuvage des différentes poudres, sont représentées en Figure 64.

D'après la Figure 64A, ~17 à 26 % (p/p) de la βlg se trouve déjà dénaturée avant l'étuvage, dans les poudres de βlg, βlg+lac et βlg+CasNa. Environ 94 % (p/p) de la βlg reste native avant l'étuvage dans la poudre βlg+$CaCl_2$. Cette valeur est plus forte que pour les autres poudres de βlg avant étuvage. Le $CaCl_2$ aurait peut-être un effet protecteur envers la dénaturation de la βlg avant l'étuvage de la poudre βlg+$CaCl_2$. Dans l'ensemble des poudres, la βlg se dénature de plus en plus au cours de l'étuvage. Dans le cas de la poudre de βlg seule, il ne reste que ~35 % (p/p) de βlg résiduelle après 36 h d'étuvage. La caséine n'a pas d'effet sur le taux de dénaturation de la βlg quel que soit le temps d'étuvage de la poudre, par rapport à la poudre de βlg seule. Pour tous les temps d'étuvage, il y a moins de βlg dénaturée avec βlg+$CaCl_2$ que pour les autres poudres. Le lactose accentue la dénaturation de la βlg pendant l'étuvage.

La Figure 64B montre qu'avant l'étuvage de l'ensemble des poudres, des SDAP sont déjà présents, et leur quantité augmente avec l'étuvage. Il faut noter qu'avec la poudre βlg+CasNa, la quantité de SDAP dosée est surestimée par la quantité de caséine ajoutée, puisque comme des SDAP, les caséines précipitent à pH 4,6. Cependant, nous ne savons pas si les caséines font partie des assemblages solubles ou non. Entre 0 et 12 h d'étuvage de la poudre βlg+lac, la quantité de SDAP formés est approximativement la même que celle obtenue avec la poudre βlg seule. Cependant, il y a une diminution de la quantité de SDAP entre 12 et 36 h d'étuvage de la poudre de βlg+lac. Quel que soit le temps d'étuvage, il y a moins de SDAP formés dans les suspensions réalisées avec la poudre βlg+$CaCl_2$ qu'avec la poudre βlg.

La βlg se dénature dans toute les poudres suite à l'étuvage, mais davantage dans la poudre βlg+lac. Dans les poudres βlg, βlg+CasNa et βlg+$CaCl_2$, le taux de dénaturation de la βlg est significativement corrélé ($P<0,01$) à la formation de SDAP. En effet, pour ces poudres, il n'y a pas de formation d'AMI, et la βlg ne se dénature que pour former des SDAP. En revanche, des AMI se forment avec la poudre βlg+lac. Le βlg se dénature et intègre soit les SDAP, soit les AMI. La diminution de la quantité de SDAP

entre 12 et 36 h d'étuvage est donc compensée par l'augmentation de la quantité de protéines qui intègrent les d'AMI au cours de l'étuvage.

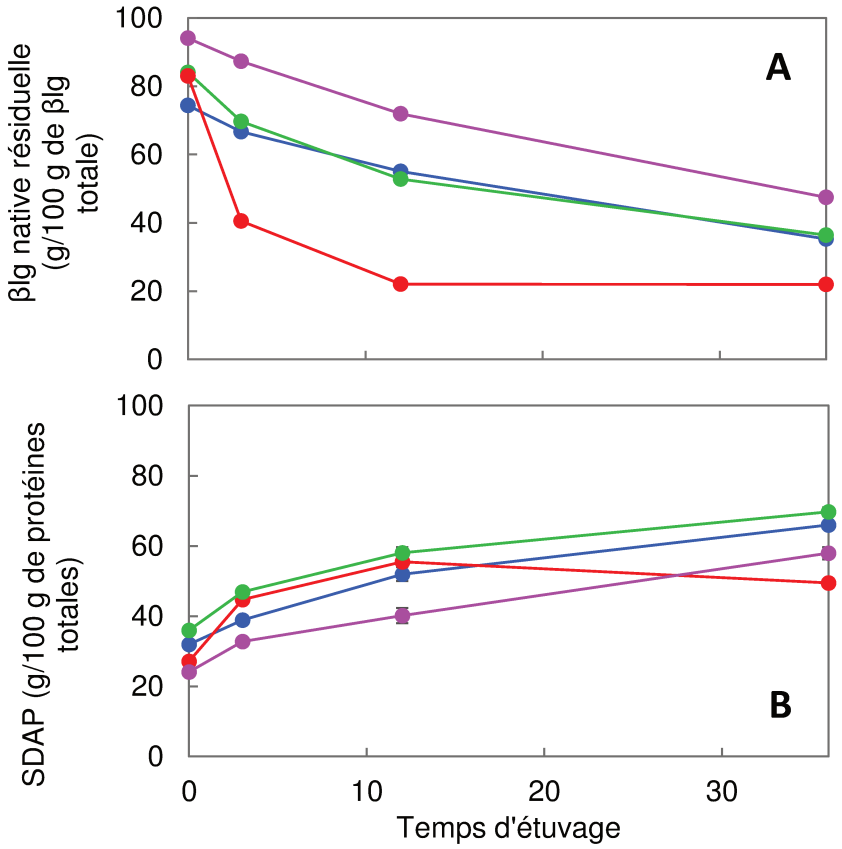


Figure 64 : Quantités de βlg native résiduelle (A) et d'assemblages et protéines dénaturées solubles (SDAP) (B) en fonction du temps d'étuvage des poudres de βlg (●), de βlg+lac (●), de βlg+CasNa (●) et de βlg+$CaCl_2$ (●).

La Figure 65 montre les profils obtenus par RP-HPLC de la βlg native résiduelle. La βlg native résiduelle a été dosée à partir des surnageants S1A obtenus après centrifugation des suspensions S0 acidifiées à pH 4,6. Deux pics sont élués à 28 et 30 min, qui correspondent respectivement au variant B et A de la βlg. L'intensité des 2 pics diminue avec le temps d'étuvage et cette diminution est plus rapide avec la poudre βlg+lac et très légèrement plus lente avec la poudre βlg+$CaCl_2$ comparée aux poudres de βlg et βlg+CasNa. Ce résultat est en accord avec les résultats présentés en Figure 64A. Comparé au témoin βlg, il y a un léger décalage vers la gauche pour la courbe correspondant à la poudre βlg+lac à 0 h d'étuvage, indiquant que la βlg est devenue davantage hydrophile. Dès 3 h d'étuvage de βlg+lac, une trainée sur la courbe apparait pour des temps de rétention longs, entre 31

et 39 min, correspondant à des composés plus hydrophobes que la βlg. L'étuvage de βlg+lac semble donc former une multitude de composés davantage hydrophobes que la βlg initiale, tandis que le conditionnement à pH 9,5 produit une βlg davantage hydrophile que la βlg initiale.

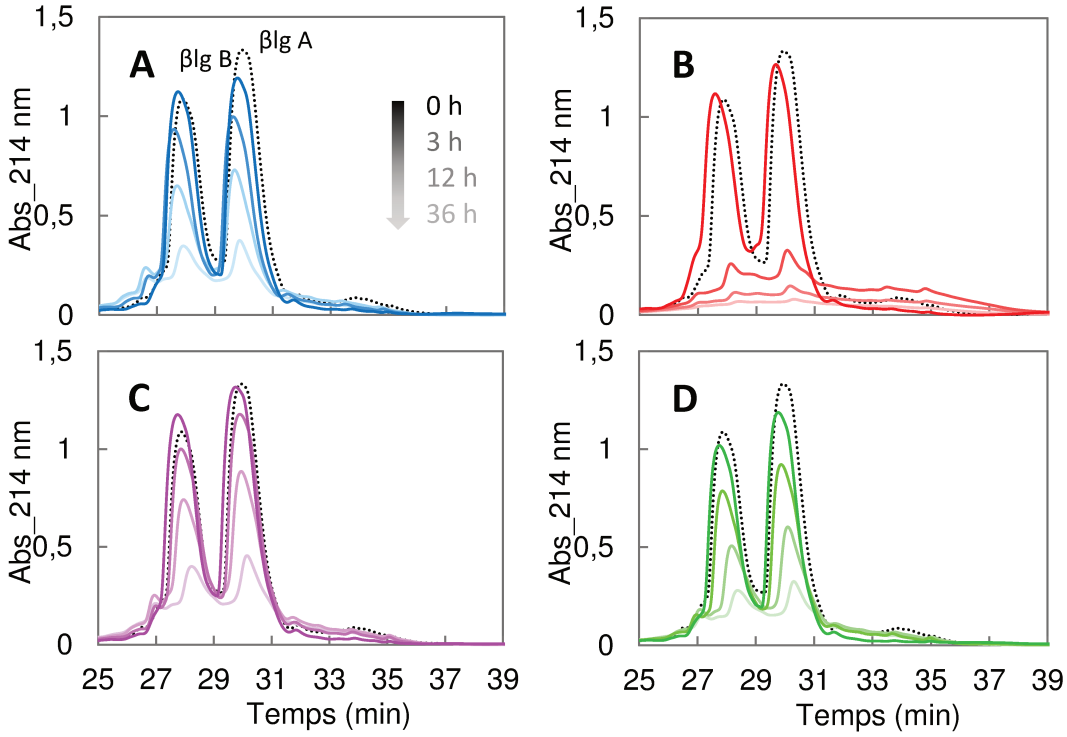


Figure 64 : Profils RP-HPLC de la β-lactoglobuline (variant A et B) présente dans les fractions solubles à pH 4,6, obtenues à partir des poudres de βlg (A), βlg+lac (B), βlg+$CaCl_2$ (C) et βlg+CasNa (D) étuvées à 100 °C pendant 0, 3, 12 et 36 h. L'intensité des couleurs diminue avec l'augmentation du temps de l'étuvage. La courbe en pointillé correspond à un témoin de β-lactoglobuline initiale non traitée.

3. DISCUSSIONS

3.1 DENATURATION DE LA βlg

Environ 20 % (p/p) de la βlg est déjà sous forme de SDAP avant l'étuvage pour les poudres βlg, βlg+lac et βlg+CasNa. Ce résultat est proche des résultats obtenus avec la poudre d'IPS, où environ 30 % de PS (p/p) se retrouvent dénaturées avant l'étape d'étuvage (Chapitre 1, 2, 3 et 4) (Famelart *et al.*, 2018; Schong and Famelart, 2018a, 2018b). L'étape d'alcalinisation à pH 9,5 et peut être l'étape de séchage par lyophilisation ou par pulvérisation qui ont lieu avant l'étuvage en seraient responsables. Cette dénaturation est ensuite accentuée par l'étuvage à 100 °C des poudres, et plus l'étuvage est long et plus la βlg se dénature et forme des SDAP dans les différentes poudres. Même sans la présence de

sucre, des petits agrégats solubles, contenant des liaisons covalentes de type SS, mais aussi d'autres types de liaisons covalentes que les liaisons SS, sont produits par l'étuvage d'une poudre de βlg ou αlac à pH ≥ 6,5 (Enomoto *et al*., 2007; Gulzar *et al*., 2011a, 2013). Les liaisons covalentes autres que les pont SS sont suspectées d'être crées, soit par l'amidation entre un carbonyle et un groupement ε-aminé, soit par transamidation entre ces groupes entrainant la libération d'ammonium, soit par la création de liaisons isopeptidiques, soit par des réactions impliquant la dehydroalanine (Enomoto *et al*., 2007; Gulzar *et al*., 2011a, 2013). Ces deux derniers types de liaisons sont favorisés à pH alcalin et dans un milieu avec une faible humidité puisqu'ils requièrent la libération de molécule d'eau. Des travaux supplémentaires devraient être entrepris pour étudier la nature des SDAP formés avec et sans la présence de lactose.

L'ajout de caséinate n'a pas ou peu d'effet sur le taux de dénaturation de la βlg, comme nous l'avons déjà observé dans le chapitre précédent, ni sur la formation des SDAP. Cependant, par la méthode de dosage utilisée, nous ne pouvons pas déterminer si le caséinate fait partie d'assemblages solubles ou non.

Le $CaCl_2$ semble avoir un petit effet protecteur contre la dénaturation de la βlg avant l'étuvage, mais à 36 h d'étuvage, quelques particules insolubles fibrillaires se forment avec la poudre βlg+$CaCl_2$ (Figure 62D). Le $CaCl_2$ est connu pour favoriser l'agrégation de la βlg suite à un traitement thermique en voie liquide (Caussin and Bouhallab, 2004; Simons *et al*., 2002). En effet, il écrante les charge des protéines, permettant la diminution des répulsions électrostatiques entre les protéines. De plus, du fait que le calcium du $CaCl_2$ soit un ion divalent, il permet le pontage ionique entre les protéines, facilitant leur agrégation (Bryant and McClements, 1998). Il semblerait donc que le $CaCl_2$ favorise l'agrégation des protéines dénaturées, probablement par pontage ionique et/ou par l'écrantage des charges des protéines, sans pour autant favoriser la dénaturation de la βlg.

La présence de lactose ne semble pas avoir d'effet sur la dénaturation de la βlg avant l'étuvage, mais elle permet d'augmenter l'hydrophilie de la protéine. En effet, nous avons vu dans le chapitre 2 qu'il y a une importante glycation des PS qui se produit avant l'étape d'étuvage, et la glycation de PS permet d'augmenter leur caractère l'hydrophile (Schong and Famelart, 2017).

Suite à l'étuvage, le lactose accélère la vitesse de dénaturation de la βlg, par comparaison avec les poudres ne contenant pas ou très peu de lactose.

A 36 h d'étuvage des poudres de βlg et βlg+CasNa, il y a davantage de dénaturation qu'à 3 h d'étuvage de la poudre βlg+lac, alors qu'aucun AMI ne se forment avec les poudres de βlg et βlg+CasNa et qu'il y a déjà formation d'AMI avec la poudre βlg+lac étuvée 3 h. La dénaturation de la βlg est peut-être indispensable à la formation des AMI, mais elle n'est pas suffisante. Il faut la présence de lactose et que la réaction de Maillard ait lieu.

3.2 LA REACTION DE MAILLARD

Dans nos précédents résultats sur l'étuvage d'une poudre de IPS à pH alcalin, nous avons mis en évidence un brunissement des poudres suite à l'étuvage, dû à la formation de la réaction de Maillard (Schong and Famelart, 2018b). Cette réaction est initiée par la réaction entre un groupement NH_2 d'une protéine telle que la βlg et le groupement carboxylique d'un sucre tel que le lactose et conduit à la formation de mélanoïdines, des composés colorés responsables du brunissement.

Dans cette étude utilisant de la poudre de βlg pure, seule la poudre supplémentée en lactose brunit de façon significative, suite à l'étuvage à 100 °C et pH 9,5. Le BI de la poudre de βlg+lac augmente fortement en 3 h d'étuvage, puis n'augmente presque plus entre 3 et 36 h d'étuvage. Il en va de même pour la formation de CML. L'augmentation de la formation de CML est strictement corrélée à l'augmentation du BI ($P<0,01$). De plus, il y a déjà formation de CML avant l'étuvage de la poudre. Les mêmes observations ont déjà été faites avec la poudre de d'IPS. La réaction de Maillard démarre donc avant l'étuvage des poudres et se termine avant 3 h d'étuvage, que ce soit avec la poudre de βlg+lac ou avec la poudre d'IPS. Par ailleurs, sans la présence de sucre, la réaction de Maillard ne peut pas avoir lieu, et le BI des poudres de βlg et βlg+$CaCl_2$ n'augmente quasiment pas au cours de l'étuvage. Le BI de la poudre de βlg+CasNa augmente légèrement, probablement grâce à la présence de traces de lactose dans la poudre de CasNa (la poudre CasNa contient 0,319 g de lactose libre/100 g d'EST d'après un dosage par chromatographie ionique).

Dans l'article 3, nous avons mis en évidence que l'a_w n'était pas corrélée avec l'intensité de la réaction de Maillard. L'augmentation de l'a_w des poudres ne contenant pas de lactose après l'étuvage,

confirme qu'il y bien d'autre(s) réaction(s) que la réaction de Maillard qui se produisent, et que ces réactions ne font pas partie de la réaction de Maillard. Ces réactions pourraient correspondre par exemple à la formation de liaisons isopeptidiques et/ou les réactions qui impliquent la dehydroalanine, qui sont des réactions libérant des molécules d'eau. Ainsi, ces types de liaisons pourraient se retrouver dans les SDAP après l'étuvage des poudres de βlg, βlg+CasNa et βlg+$CaCl_2$ et ne seraient pas suffisantes pour la formation d'AMI.

3.3 CARACTERISATION DES SUSPENSIONS

Il n'y a pas formation d'AMI pour les poudres βlg, βlg+CasNa et βlg+$CaCl_2$, alors qu'on observe des AMI dès 3 h d'étuvage de la poudre βlg+lac. La $OD_{500\ nm}$ des suspensions est quasi nulle pour les suspensions réalisées avec les poudres βlg, βlg+$CaCl_2$, puisque aucun AMI ne se forme (Figure 60 et Figure 62). La $OD_{500\ nm}$ non nulle des suspensions réalisées à βlg+CasNa est certainement due aux petites particules de caséine, qui sont sans doute responsables d'une faible diffusion de lumière (Figure 60).

Pour la poudre βlg+lac, le DY en AMI augmente avec le temps d'étuvage et cette augmentation est corrélée avec l'augmentation de la $OD_{500\ nm}$ des suspensions de cette poudre. Cependant, l'augmentation de la $OD_{500\ nm}$ n'est pas corrélée à l'intensité de la réaction de Maillard, puisqu'elle évolue entre 3 et 36 h d'étuvage (Figure 60), contrairement à l'intensité de la réaction de Maillard qui n'évolue plus après 3 h d'étuvage de la poudre, puisque les produits de Maillard n'augmentent plus après 3 h d'étuvage de la poudre (Figure 58B et Tableau 11).

Les AMI obtenus avec la poudre βlg+lac étuvée dès 3 h, sont similaires aux AMI obtenus avec l'étuvage d'une poudre d'IPS à pH 9,5 étudiés dans les précédents chapitres de cette thèse. En effet, Les AMI ont la même morphologie que celle des particules de poudre dont ils sont issus, c'est-à-dire en forme de lamelles angulaires lisses. Le D[4,3] des AMI est ~4 fois supérieur à celui des particules de poudre. Comme pour la poudre d'IPS, les AMI obtenus avec βlg+lac présentent aussi une forte rétention d'eau et forment un culot P1 très volumineux, translucide et jaunâtre. Nous pouvons donc affirmer que les AMI obtenus avec βlg+lac ont le même mécanisme de formation que les AMI obtenus avec la poudre d'IPS, c'est-à-dire, qu'ils sont formés par les particules de poudre rendus insolubles par l'étuvage à 100 °C et pH 9,5. Ces particules gonflent lorsqu'elles sont suspendues dans la phase

aqueuse. Plus le temps d'étuvage est long, plus les AMI sont denses, et moins ils gonflent dans l'eau et moins ils retiennent d'eau.

Durant les 3 premières heures d'étuvage de la poudre βlg+lac, il y a davantage de SDAP formés que d'AMI. Entre 3 et 12 h d'étuvage, il y a de plus en plus d'AMI et de SDAP qui se forment mais la quantité de SDAP diminue entre 12 et 36 h d'étuvage, alors que celle des AMI continue à augmenter. Ce phénomène confirme que les NP, suite à l'étuvage à pH 9,5, sont d'abord dénaturées en SDAP, qui sont intégrés ensuite dans les AMI. Ce mécanisme avait déjà été observé sur les poudres d'IPS séchées par pulvérisation puis étuvées (Schong and Famelart, 2018a).

Les AMI obtenus à 3, 12 et 36 h d'étuvage ont des distributions de taille similaires entre elles, ce qui est certainement lié au fait que les propriétés de rétention d'eau des AMI sont aussi similaires entre elles, pour les mêmes temps d'étuvage (Figure 59 et Figure 63).

3.4 DIFFERENCES ENTRE LES AMI FORMES AVEC LA βLG PURE ET AVEC UN ISOLAT DE PROTEINES SERIQUES

Les AMI produits avec une poudre d'IPS séchée soit par lyophilisation, soit par pulvérisation, et étuvée 12 ou 36 h ont des WC compris entre 27 et 38 g/ g d'AMI sec (Schong and Famelart, 2018a, 2018b) (Figure 66). Ces valeurs sont très proches de celles obtenues avec la poudre βlg+lac, qui contient ~0,2 g de lactose/10 g de βlg. A 36 h d'étuvage, les DY sont aussi relativement similaires entre les poudres d'IPS et de βlg+lac. La seule différence notable est que les AMI se forment dès 3 h d'étuvage avec la poudre βlg+lac et que la teneur en eau ne diminue pas avec le temps d'étuvage, alors qu'il n'y a pas encore d'AMI formés à 3 h d'étuvage avec la poudre d'IPS. La formation des AMI paraît donc plus rapide entre 0 et 3 h d'étuvage avec la poudre de βlg+lac qu'avec la poudre d'IPS, mais paraît un peu plus lente entre 3 et 36 h d'étuvage.

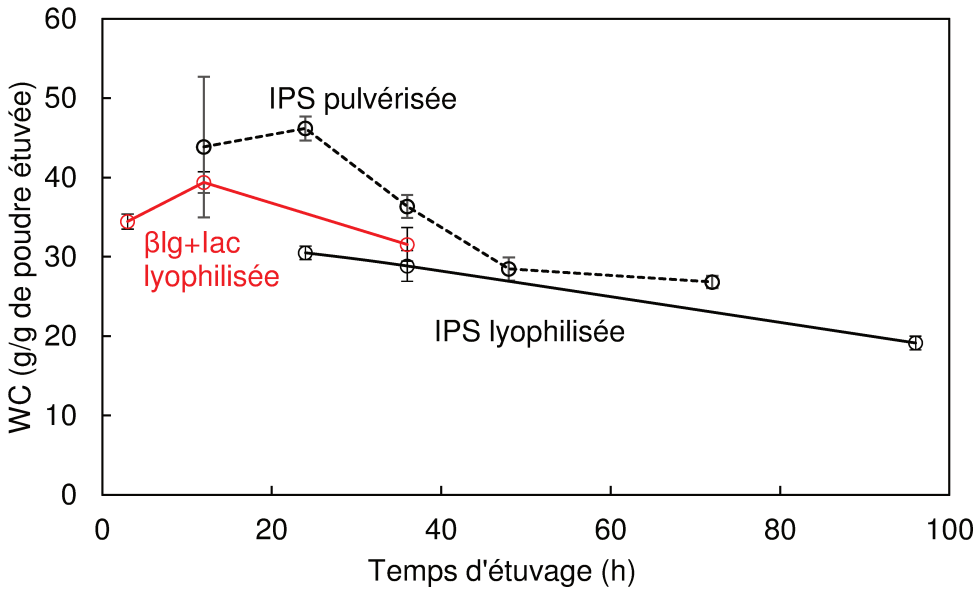


Figure 65 : Teneur en eau (WC) des AMI produits avec la poudre βlg+lac (courbe rouge) et avec la poudre d'IPS (courbes noires) lyophilisée (trait plein) ou pulvérisée (trait en pointillé), en fonction du temps d'étuvage.

Avec les poudres d'IPS, le WC des AMI diminue avec le temps d'étuvage, alors qu'avec la poudre de βlg+lac, le WC des AMI ne diminue pas de façon significative avec le temps d'étuvage. Cette différence peut s'expliquer par la différence de composition de la poudre. En effet, les AMI sont sensibles à leur environnement physico-chimique. En effet, nous avons vu dans le chapitre 2 que la présence de sel et le pH ont des effets importants sur les propriétés de gonflement des AMI. Cependant, entre 12 et 36 h d'étuvage, les valeurs de WC avec βlg+lac sont proches des valeurs obtenues avec la poudre d'IPS pulvérisée. A 36 h d'étuvage de la poudre βlg+lac, il est possible que la phase de diminution du WC en AMI commence, mais que cette diminution ne soit pas encore significative. Il faudrait tester des temps d'étuvage de la poudre de βlg+lac plus longs pour vérifier cette hypothèse.

Environ 30 % des PS restent natives au bout de 3 h d'étuvage de la poudre βlg+lac et celle d'IPS lyophilisée. Le fait qu'il y ait formation d'AMI dès 3 h d'étuvage avec la poudre de βlg, contrairement à la poudre d'IPS, n'est donc pas lié à une différence de taux de dénaturation des protéines.

Le DY en AMI à 3 h d'étuvage pour la poudre βlg+lac est plus élevé que ceux obtenus avec les poudres d'IPS lyophilisées avec L/P = 0 et 0,05 g/10 g, mais moins élevé que pour L/P = 0,1 g/10 g

(Tableau 12). A 36 h d'étuvage, le DY en AMI est le plus faible pour la poudre βlg+lac comparé aux poudres d'IPS lyophilisées avec L/P = 0, 0,05 et 0,1 g/10 g. La différence de quantités de lactose dans les poudres n'explique donc pas, à elle seule, les différences de DY en AMI obtenus avec la poudre de βlg+lac et les poudre d'IPS lyophilisée.

La poudre βlg+lac brunit davantage que les poudres d'IPS lyophilisées avec L/P = 0 et 0,05 g/10 g, mais brunit de la même façon que la poudre d'IPS lyophilisée avec L/P = 0,1 g/10 g. En revanche, la quantité de CML formée n'est pas différente significativement entre la poudre de βlg+lac étuvée 3 h et les poudres d'IPS lyophilisées avec L/P = 0 et 0,05 g/10 g étuvée 36 h. Les intensités de la réaction de Maillard semblent donc similaires avec la poudre βlg pure et la poudre d'IPS.

Tableau 12 : Rendement sec (DY), indice de brunissement (BI) et quantité de carboxyméthyllysine (CML) dans la poudre de βlg+lactose, et dans les poudres d'IPS lyophilisée un ratio lactose/protéine (L/P) = 0, 0,05 et 0,1 g/10 g de protéine. Les échantillons ayant les mêmes lettres sont statistiquement identique (P>0,05).

		DY (g/g de poudre étuvée)	BI	CML (ng/mg de protéine)
poudres étuvées 3 h	βlg+lac	0,27 ± 0,004	58,1 ± 0,1 [a]	2014 ± 36 [c]
	IPS; L/P = 0	0,05 ± 0,01	39,7 ± 0,3	-
	IPS; L/P = 0,05	0,14 ± 0,003	48,5 ± 0,2	-
	IPS; L/P = 0,1	0,35 ± 0,005	57,9 ± 0,3 [a]	-
poudres étuvées 36 h	βlg+lac	0,49 ± 0,001	63,8 ± 0,7 [b]	2204 ± 233 [c]
	IPS; L/P = 0	0,70 ± 0,01	44,3 ± 0,5	1599 ± 138 [c]
	IPS; L/P = 0,05	0,79 ± 0,01	53,3 ± 0,3	-
	IPS; L/P = 0,1	0,86 ±0,003	62,9 ± 0,4 [b]	-

Les différences observées concernant les DY en AMI et les produits de la réaction de Maillard, entre la poudre βlg+lac et celle d'IPS lyophilisée avec et sans lactose ajouté, sont certainement liées aux différences de composition de la poudre. En effet, la réaction de Maillard est très complexe et les composés présents dans les poudres pourraient influencer les différentes voies de la réaction de Maillard.

Nous avons émis l'hypothèse dans les chapitres précédents, que la formation d'AMI suit deux étapes qui sont, d'une part, la création de groupements fonctionnels sur les protéines induites par la réaction de Maillard, et d'autre part la réaction de polymérisation suite à la réticulation des protéines induite par ces groupements fonctionnels. La première étape, serait déjà initiée dès l'étape d'alcalinisation des solutions, et se poursuivrait durant les 3 premières heures de l'étuvage.

Les résultats obtenus avec la poudre βlg+lac viennent renforcer cette hypothèse, indiquant que la dénaturation de la βlg n'est pas suffisante à la formation des AMI, et que la réaction de Maillard est nécessaire. Aussi, on peut supposer que l'étape de polymérisation est facilitée dans la poudre de βlg+lac comparé à la poudre d'IPS, contrairement à la création des groupements fonctionnels sur les protéines qui serait diminuée. Ainsi, les polymères se formeraient plus vite, mais avec des rendements plus faibles.

L'étape d'alcalinisation est aussi une étape essentielle pour former des AMI, puisque l'étuvage d'une poudre d'IPS à des pH ≤ 6,5 ne conduit pas à la formation d'AMI, alors qu'elle conduit à la réaction de Maillard (Famelart *et al.*, 2018). Une hypothèse pourrait être que les deux sortes de liaisons réticulantes induites, l'une par la réaction de Maillard et l'autre par les pH alcalins, soient tous les deux nécessaires pour avoir une réticulation conduisant à la formation des AMI. Une autre hypothèse, plus probable, est que la dénaturation alcaline des protéines pourrait conduire à un déplissement des protéines qui démasquerait des acides aminés réactifs enfouis à l'intérieur de la protéine (Casal *et al.*, 1988a; Monahan *et al.*, 1995; Partanen *et al.*, 2011; Taulier and Chalikian, 2001). Ce déplissement pourrait faciliter la réaction entre les lysines et les résidus lactose d'une part, puis la réaction entre les acides aminés et les groupements fonctionnels conduisant à la réticulation des protéines d'autre part.

Nous avons aussi vu dans le chapitre précédent que la poudre de CasNa seule conduisait à la formation d'AMI, alors qu'il n'y a pas de formation d'AMI avec la poudre de βlg+CasNa. La quantité de lactose dans la poudre βlg+CasNa ne semble suffisante pour qu'il y ait formation d'AMI en 36 h d'étuvage. On en conclut que, soit la cinétique de formation des AMI est fortement ralentie puisqu'il y a très peu de lactose dans la poudre de βlg+CasNa, et que 36 h n'est pas un temps d'étuvage suffisant pour voir apparaitre des AMI, soit il y a une quantité de lactose minimale à avoir dans la poudre pour que des AMI se forment.

4. CONCLUSION

La βlg est partiellement dénaturée avant l'étuvage, probablement à cause de l'alcalinisation des solutions protéiques. En effet, il est connu que les pH alcalin ont un effet dénaturant sur la βlg (Casal *et al*., 1988a; Roels *et al*., 1971; Taulier and Chalikian, 2001). La dénaturation de la βlg se poursuit au cours l'étuvage de la poudre à 100 °C, qu'elle soit seule ou en présence de $CaCl_2$, de caséinate ou de lactose. La dénaturation par l'étuvage est favorisée par la présence de lactose, et la dénaturation par l'alcalinisation est un peu ralentie en présence de $CaCl_2$. La caséine n'a pas d'effet sur le taux de dénaturation de la βlg. Des AMI se forment uniquement avec la poudre de βlg supplémentée en lactose. La dénaturation de la βlg seule ne suffit donc pas à la formation d'AMI et la présence de lactose est nécessaire, contrairement à la présence de la caséine et du $CaCl_2$. Le lactose permet d'initier la réaction de Maillard, qui est probablement responsable de la formation de molécules nécessaires à la réticulation des protéines, et à la formation des AMI.

Bilan du chapitre 5 :

Rappel des principaux résultats :

- **Il n'y a pas de formation d'AMI avec la βlg seule, ni avec l'ajout de $CaCl_2$ et de CasNa.**
- **La présence de lactose est nécessaire pour former des AMI.**
- **Il y a formation d'AMI avec le mélange βlg+lac (0.17 g/10 g βg) dès 3 h d'étuvage de la poudre. Les AMI ont la même morphologie que celle des particules de poudre étuvée et ont une forte capacité de rétention de l'eau.**
- **Les capacités de rétention d'eau et les tailles des AMI sont constantes après 3, 12 et 36 h d'étuvage de la poudre de βlg+lac.**
- **Le DY et le WY augmentent avec le temps d'étuvage de la poudre de βlg+lac.**
- **La dénaturation de la βlg commence avant l'étuvage, et s'accentue suite à l'étuvage à 100 °C de l'ensemble des poudres étudiées. Le classement de la dénaturation de la βlg par l'étuvage, de la moins dénaturée à la plus dénaturée est le suivant : βlg+$CaCl_2$ < βlg ~ βlg+CasNa < βlg+lac.**

Le lactose est un élément clef de la formation des AMI, contrairement aux autres constituants de la poudre d'IPS. Il permet d'accélérer la vitesse de formation des AMI lorsqu'on l'ajoute à la poudre d'IPS, et sa présence est indispensable pour former des AMI à partir de βlg pure.

F. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. CONCLUSION GENERALE

L'objectif du projet était de comprendre le mécanisme de formation des AMI par l'étuvage d'une poudre d'IPS à pH 9,5, et de caractériser les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des AMI en suspension.

Cette étude a permis de mettre en évidence que les AMI sont les particules de poudre rendus insolubles par le procédé d'étuvage de la poudre à pH 9,5, et qui gonflent lorsqu'ils sont suspendus dans l'eau. Les AMI ont donc des tailles supérieures à celles des particules de poudre et la même morphologie que celle des particules de poudre. Ils sont constitués de protéines liées par des liaisons covalentes de type pont SS et d'autre(s) type(s) de liaisons covalentes que des ponts SS. Les AMI sont des particules très hydratées capables d'apporter de la viscosité en suspension aqueuse concentrée.

Les AMI sont très sensibles face à leur environnement physico-chimique. Un pH près du pI des PS ou la présence de NaCl de 0,1 à 1 M réduit la taille des AMI et donc réduit probablement la rétention d'eau dans les particules et la capacité à apporter de la viscosité. La contraction est réversible lorsque le pH redevient proche de la neutralité. Les AMI peuvent donc gonfler et dégonfler en fonction de leur environnement.

Les AMI en suspension sont de plus en plus petits, denses, et de moins en moins capables de retenir de l'eau et d'apporter de la viscosité au cours du temps d'étuvage et avec une addition de lactose. L'addition de lactose permet d'accélérer la formation des AMI. On obtient les mêmes rendements en AMI et les mêmes capacités à retenir l'eau en 3 h d'étuvage en présence d'une faible teneur en lactose, qu'en 36 h d'étuvage sans addition de lactose. De plus, à partir d'une certaine quantité de lactose ajouté à la solution de PS de départ, il est possible d'obtenir des rendements de formation en AMI proches de 1.

Les PS ne sont pas les seules protéines laitières à pouvoir former des AMI. Les caséines seules et les mélanges de caséines et de PS peuvent aussi former des AMI. La morphologie, les rendements et la capacité à retenir d'eau des AMI formés avec du caséinate sont très semblables à ceux des AMI formés avec la poudre d'IPS.

Le lactose est un élément clef à la formation des AMI. Il se lie aux protéines au début de la réaction de Maillard, et cette fixation du lactose sur les protéines commence avant l'étuvage des poudres. La réaction de Maillard est terminée avant l'apparition des premiers AMI, dans le cas de l'étuvage de la poudre d'IPS seule. Cependant, elle reste essentielle à la formation des AMI. Elle agit donc de façon indirecte, certainement par l'intermédiaire de ses produits de réaction, qui permettraient de former des liaisons réticulantes entre protéines au cours de l'étuvage de la poudre.

L'alcalinisation de la poudre à pH 9,5 est aussi une étape essentielle. Elle permet d'avoir environ 30 % (p/p) de PS dénaturée avant l'étape de l'étuvage des poudres. Elle permet très certainement le déplisssement des protéines et l'accès à, d'une part, la lysine, le seul acide aminé modifié par l'étuvage, et d'autre part aux acides aminés N-terminaux. Ces acides aminés peuvent en effet être enfouis dans la structure native des protéines.

Les poudres d'IPS lyophilisées ou pulvérisées étuvées à pH 9,5, conduisent à des rendements et des propriétés de rétention d'eau des AMI très similaires. La formation des AMI est un peu plus rapide avec la lyophilisation qu'avec la pulvérisation. Les grandes différences entre ces 2 modes de séchage utilisés sont la morphologie et la taille des particules de poudre.

2. PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Un aspect que j'ai totalement négligé dans cette thèse est l'état du lactose dans la poudre, c'est-à-dire s'il est à l'état amorphe ou cristallisé. On sait en effet que le lactose peut cristalliser au cours du stockage des poudres. Le lactose amorphe est peut-être plus réactif que sa forme cristallisée, et l'état amorphe permet peut-être davantage de mobilité. Cet aspect devrait être étudié pour la poursuite du projet.

Dans cette thèse, nous avons étudié les phénomènes se produisant durant l'étuvage des poudres de protéine sériques à pH 9,5. Or nous avons mis en évidence des phénomènes se produisant avant l'étape d'étuvage. Par exemple :

- la glycation des protéines se produit en phase liquide avant le séchage et/ou au cours du conditionnement et du stockage de la poudre,

- le pH alcalin de la solution de des PS induit une dénaturation d'environ 30 % (p/p) des protéines.

Nous avons mis en évidence dans ce travail, que l'étape d'alcalinisation et la présence de lactose sont nécessaires à la formation des AMI. Ainsi, pour mieux comprendre le mécanisme de formation des AMI, il serait primordial de découpler l'effet de l'alcalinisation à pH 9,5 de l'effet du lactose sur la formation des AMI. Des travaux ont déjà été initiés dans cette direction par notre équipe de recherche. Le procédé de production des AMI se fait en étapes successives :

1) une étape en phase liquide au cours de laquelle le pH est ajusté. Dans notre cas, cette étape était la plus courte possible, mais si on la prolonge de plusieurs heures, on note des effets favorables sur la production des AMI (travaux en cours),
2) une étape de séchage,
3) une étape de conditionnement de la poudre en a_w, qui a lieu à 20 °C pendant 2-4 semaines,
4) une étape d'étuvage de la poudre.

Ces travaux en cours ont pour objectif d'étudier à quelle étape le pH alcalin et le lactose jouent leur rôle et de répondre à des questions comme :

- Est-ce que le lactose est indispensable lors de l'étape d'alcalinisation pour former des AMI ?
- Est-ce que le pH alcalin est indispensable lors de l'étuvage ?

Cela consiste par exemple :

- à ajouter du lactose à une solution de βlg avant l'ajustement du pH à 9,5 ou à l'ajouter immédiatement avant le séchage par lyophilisation.
- à ajuster le pH de la solution protéique à 9,5, puis de l'abaisser à 6,5 immédiatement avant le séchage.

Pour approfondir l'étude de la formation des AMI, il serait peut-être judicieux de travailler sur les premiers stades de la formation des AMI, c'est-à-dire avant l'apparition des premières particules. Les mesures de disparition des groupes aminés par la méthode OPA, par exemple, qui utilise la colorimétrie pourraient être facilement entreprises, et la détermination des sites de glycation par spectrométrie de masse et les sites de réticulation seraient envisageables aux premiers stades de la

réaction. A des stades plus avancés de la formation des AMI, la réticulation des protéines est trop importante et la présence de particules diffusantes complexes est un handicap pour ces analyses. Il serait aussi intéressant, d'étudier les liens entre la glycation et la réticulation des protéines sur les petits assemblages à des stades précoces de la formation des AMI.

L'étape d'alcalinisation à pH 9,5 est nécessaire à la formation des AMI. Nous avons supposé que c'est la dénaturation des PS induite par l'alcalinisation qui est importante pour la formation des AMI. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier si un autre mode de dénaturation que l'alcalinisation serait capable de former des AMI par étuvage en présence de lactose. On pourrait, par exemple, réaliser une dénaturation des PS par un traitement thermique en solution. Cette méthode permet en effet de contrôler très précisément le niveau de dénaturation atteint. De la même façon, on pourrait penser que l'étape d'alcalinisation n'est pas indispensable pour former des AMI par étuvage de la poudre de caséinate, car les caséines sont des protéines non structurées. Un étuvage de la poudre de caséinate à pH 6,5 pourrait donc valider cette hypothèse du rôle de la dénaturation. Entre temps, une autre hypothèse sur le rôle du pH alcalin est apparue dans les travaux récents de l'équipe. Au cours du temps de stockage à pH alcalin d'une solution de βlg, on met en évidence une polymérisation de la protéine. C'est peut-être cette polymérisation qui est indispensable à la formation d'AMI, et on retrouverait les polymères formés en phase liquide à pH alcalin dans les AMI. Des travaux de caractérisation du taux de polymérisation, d'une part à pH 9,5, puis, d'autre part, après réajustement à pH 6,5, puis de l'aptitude à former des AMI par étuvage en présence de lactose permettrait peut-être de conclure sur le rôle éventuel de cette polymérisation protéique à pH alcalin sur la formation des AMI.

D'autres travaux ont été initiés sur l'optimisation de la formation des AMI, en vue d'une utilisation du procédé pour produire un ingrédient d'origine laitière capable d'apporter de la viscosité. L'objectif de cette étude serait de pourvoir former des AMI fonctionnels en un temps minimum d'étuvage, compte tenu du coût important de cette étape de chauffage. La stratégie est de faire varier les différents paramètres utilisés lors du procédé de fabrication des AMI, comme le temps d'incubation des solutions à pH alcalin, la valeur du pH alcalin, la concentration en protéines des solutions, le temps et la température d'étuvage, etc. sur les rendements et les propriétés de rétention d'eau des AMI. Certains facteurs étudiés ont, en effet, des effets connus sur la réaction de Maillard et pourraient

améliorer les rendements en AMI. Par exemple, la concentration en protéine lors du séchage pourrait modifier la densité des particules de poudre et donc potentiellement modifier la porosité des AMI et leur capacité à retenir l'eau. D'ailleurs, il aurait été judicieux de mesurer les masses volumiques des poudres obtenues par pulvérisation et par lyophilisation et de les corréler à la capacité de rétention d'eau des AMI pour tenter d'attribuer les différences observées entre les 2 procédés de séchage.

Les AMI peuvent se former en utilisant une autre source de protéine que les PS. Nous avons vu qu'on arrive à former des AMI à partir de poudres de caséine, avec des rendements et des propriétés de rétention d'eau similaires à ceux obtenus à partir de PS. Ainsi, il serait intéressant d'approfondir l'étude de la formation d'AMI par étuvage de caséines. Il serait également intéressant d'étudier si d'autres sources de protéine que des protéines laitières, telles que des protéines végétales ou des protéines d'œufs, pourraient être utilisées pour former des AMI par étuvage.

Il serait intéressant d'approfondir l'étude des propriétés de viscosité des AMI produits par pulvérisation en fonction de la composition de la poudre étuvée, dans des environnements aqueux différents et en mélange avec d'autres protéines, comme la caséine. Il serait aussi intéressant d'étudier leurs comportements dans des matrices laitières modèles, telles que des crèmes desserts et des fromages fondus. Des travaux ont aussi été initiés à ce sujet.

Il est peut-être possible de mettre en œuvre un concentré de PS, beaucoup moins couteux, plutôt qu'un IPS dans la production d'AMI, qui serait intéressant d'un point de vue économique. En effet, la présence de lactose et de caséines résiduelles dans le concentré pourraient améliorer les rendements et la vitesse de production des AMI. Des essais devraient être conduits pour valider cette hypothèse.

Certains produits de Maillard sont reconnus pour être néfastes pour la santé. Il serait sans doute nécessaire de s'interroger sur la toxicité des AMI en collaboration avec des chercheurs nutritionnistes.

G. REFERENCES

Ajandouz, E.H., and Puigserver, A. (1999). Nonenzymatic Browning Reaction of Essential Amino Acids: Effect of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics. J. Agric. Food Chem. *47*, 1786–1793.

Akkermans, C., van der Goot, A.J., Venema, P., Van der Linden, E., and Boom, R.M. (2008). Formation of fibrillar whey protein aggregates: Influence of heat and shear treatment, and resulting rheology. Food Hydrocoll. *22*, 1315–1325.

Ames, J.M. (1990). Control of the Maillard reaction in food systems. Trends Food Sci. Technol. 150–154.

Ames, J.M. (1992). The Maillard Reaction. In Biochemistry of Food Proteins, (Dordrecht: B.J.F.Hudson), pp. 99–154.

Andersen, C.M., and Mortensen, G. (2008). Fluorescence Spectroscopy: A Rapid Tool for Analyzing Dairy Products. J. Agric. Food Chem. *56*, 720–729.

Augustin, M.A., and Udabage, P. (2007). Influence of Processing on Functionality of Milk and Dairy Proteins. Adv. Food Nutr. 53, 1–38.

Belitz, H.-D., Grosch, W., and Schieberle, P. (2009). Food chemistry (Berlin: Springer).

Bhattacharyya, J., and Das, K.P. (1999). Molecular chaperone-like properties of an unfolded protein, as-casein. J. Biol. Chem. *274*, 15505–15509.

Boland, M.J. (2014). Milk Proteins From Expression to Food (Burlington: Elsevier Science).

Bosch, L., Alegria, A., Farre, R., and Clemente, G. (2007). Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk-cereal based infant foods during storage. Food Chem. *105*, 1135–1143.

Boye, J.I., and Ismail, A.A., Alli, I. (1996). Effects of physicochemical factors on the secondary structure of beta-lactoglobulin 33931. J. Dairy Res. 63, 97–109.

Brew, K., Vanaman, T.C., and Hill, R.L. (1967). Comparison of the Amino Acid Sequence of Bovine α-Lactalbumin and Hens Egg White Lysozyme. J. Biol. Chem. *242*, 3747–3748.

Broersen, K., Voragen, A.G.J., Hamer, R.J., and Jongh, H.H.J. de (2004). Glycoforms of β-Lactoglobulin with improved thermostability and preserved structural packing. Biotechnol. Bioeng. *86*, 78–87.

Brownlow, S., Cabral, J.H.M., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C.T., and Sawyer, L. (1997). Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 angstrom resolution - Still an enigmatic lipocalin. Structure *5*, 481–495.

Bryant, C.M., and McClements, D.J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. Trends Food Sci. Technol. *9*, 143–151.

Bryant, C.M., and McClements, D.J. (2000). Influence of NaCl and CaCl2 on Cold-Set Gelation of Heat-denatured Whey Protein. J. Food Sci. *65*, 801–804.

Bushmarina, N.A., Blanchet, C., Vernier, G., and Forge, V. (2005). Repliement des protéines : exemple de l'α-lactalbumine. J. Phys. IV Proc. *130*, 209–228.

Casal, H.L., Köhler, U., and Mantsch, H.H. (1988a). Structural and conformational changes of beta-lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. Biochim. Biophys. Acta *957*, 11–20.

Casal, H.L., Köhler, U., and Mantsch, H.H. (1988b). Structural and conformational changes of β-lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. Biochim. Biophys. Acta *957*, 11–20.

Caussin, F., and Bouhallab, S. (2004). Environnement minéral et propriétés fonctionnelles des protéines sériques. In Minéraux et Produits Laitiers, F. Gaucheron, ed. (Londres, England: Tec et Doc), pp. 343–390.

Caussin, F., Famelart, M.H., Maubois, J.L., and Bouhallab, S. (2003). Mineral modulation of thermal aggregation and gelation of whey proteins: from Ã¡-lactoglobulin model system to whey protein isolate. Le Lait *83*, 353–364.

Cayot, P., and Lorient, D. (1998). Structures et technofonctions des proteines du lait (Paris, France: Tec & Doc, Lavoisier).

Chapeau, A.-L., Hamon, P., Rousseau, F., Croguennec, T., Poncelet, D., and Bouhallab, S. (2017). Scale-up production of vitamin loaded heteroprotein coacervates and their protective property. J. Food Eng. 206, 67–76.

Chellan, P., and Nagaraj, R.H. (1999). Protein Crosslinking by the Maillard Reaction: Dicarbonyl-Derived Imidazolium Crosslinks in Aging and Diabetes. Arch. Biochem. Biophys. *368*, 98–104.

Chevallier, M. (2017). Stabilisation des émulsions laitières aux cours des traitements technologiques : action combinée des agrégats de protéines de lactosérum et des caséines. Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé.

Chevallier, M., Riaublanc, A., Lopez, C., Hamon, P., Rousseau, F., Thevenot, J., and Croguennec, T., (2018). Increasing the heat stability of whey protein-rich emulsions by combining the functional role of WPM and caseins. Food Hydrocoll. 76,164-172.

Cho, R.K., Okitani, A., and Kato, H. (1984). Chemical Properties and Polymerizing Ability of the Lysozyme Monomer Isolated after Storage with Glucose. Agric. Biol. Chem. *48*, 3081–3089.

Cho, R.K., Okitani, A., and Kato, H. (1986). Polymerization of Acetylated Lysozyme and Impairment of Their Amino Acid Residues Due to α-Dicarbonyl and α-Hydroxycarbonyl Compounds. Agric. Biol. Chem. *50*, 1373–1380.

CNIEL (2017). L'économie laitière en chiffres - Edition 2017 (CNIEL).

Cremer, D.R., and Eichner, K. (2000). The influence of the pH value on the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and in plant powders. Eur. Food Res. Technol. *211*, 247–251.

Croguennec, T., O'Kennedy, B.T., and Mehra, R. (2004). Heat-denaturation/aggregation of β-lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. Int. Dairy J. *14*, 399–409.

Desfougères, Y., Lechevalier, V., Pezennec, S., Artzner, F., and Nau, F. (2008). Dry-Heating Makes Hen Egg White Lysozyme an Efficient Foaming Agent and Enables Its Bulk Aggregation. J. Agric. Food Chem. *56*, 5120–5128.

Dissanayake, M., Liyanaarachchi, S., and Vasiljevic, T. (2012). Functional properties of whey proteins microparticulated at low pH. J. Dairy Sci. *95*, 1667–1679.

Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L., and Rouvet, M. (2009). Mechanism of formation of stable heat-induced β-lactoglobulin microgels. Int. Dairy J. *19*, 295–306.

Dunnill, P., and Green, D.W. (1966). Sulphydryl groups and the N⇄R conformational change in β-lactoglobulin. J. Mol. Biol. *15*, 147–151.

El-Salam, M.H.A., el-Shibiny, S., and Salem, A. (2009). Factors Affecting the Functional Properties of Whey Protein Products: A Review. Food Rev. Int. 25, 251–270.

Enomoto, H., Li, C.P., Morizane, K., Ibrahim, H.R., Sugimoto, Y., Ohki, S., Ohtomo, H., and Aoki, T. (2007). Glycation and phosphorylation of á-lactoglobulin by dry-heating: Effect on protein structure and some properties. J. Agric. Food Chem. *55*, 2392–2398.

Enomoto, H., Hayashi, Y., Li, C.P., Ohki, S., Ohtomo, H., Shiokawa, M., and Aoki, T. (2009). Glycation and phosphorylation of α-lactalbumin by dry heating: Effect on protein structure and physiological functions. J. Dairy Sci. *92*, 3057–3068.

Famelart, M.-H., Schong, E., and Croguennec, T. (2018). Dry heating a freeze-dried whey protein powder: Formation of microparticles at pH 9.5. J. Food Eng., 224, 112-120.

Famelart M.H., Guyomarc'h F., Morand M., and Novales B. (2011). Agrégation protéique et propriétés gélifiantes et moussantes des protéines laitières – quoi de neuf sur le plan des connaissances ? Innov. Agron. *13*, 117–132.

Feinberg, M., Dupont, D., Efstathiou, T., Louâpre, V., and Guyonnet, J.-P. (2006). Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. Food Chem. *98*, 188–194.

FIL-IDF (1993). Provisional Standard 26A, Dried milk and dried cream - determination of water content. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D., and Mc Guffey, M.K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. Trends Food Sci. Technol. 13, 151–159.

Foegeding, E.A., and Davis, J.P. (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach. Food Hydrocoll. *25*, 1853–1864.

Friedman, M. (1999). Chemistry, Biochemistry, Nutrition, and Microbiology of Lysinoalanine, Lanthionine, and Histidinoalanine in Food and Other Proteins. J. Agric. Food Chem. *47*.

Gaucheron, F., Le Graet, Y., Piot, M., and Boyaval, E. (1996). Determination of anions of milk by ion chromatography. Le Lait *76*, 433–443.

Gerrard, J.A. (2002). Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. Trends Food Sci. Technol. *13*, 391–399.

Gerrard, J.., Brown, P.., and Fayle, S.. (2002). Maillard crosslinking of food proteins I: the reaction of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde with ribonuclease. Food Chem. *79*, 343–349.

Gerrard, J.., Brown, P.., and Fayle, S.. (2003a). Maillard crosslinking of food proteins II: the reactions of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde with wheat proteins in vitro and in situ. Food Chem. *80*, 35–43.

Gerrard, J.., Brown, P.., and Fayle, S.. (2003b). Maillard crosslinking of food proteins III: the effects of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde upon bread and croissants. Food Chem. *80*, 45–50.

Gu, F.-L., Kim, J.M., Abbas, S., Zhang, X.-M., Xia, S.-Q., and Chen, Z.-X. (2010). Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein–glucose. Food Chem. *120*, 505–511.

Gulzar, M. (2011). Dry heating of whey proteins under controlled physicochemical conditions : structures, interactions and functionalities. Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé.

Gulzar, Bouhallab, and Croguennec (2011a). Structural consequences of dry heating on Beta-Lactoglobulin under controlled pH. Procedia Food Sci. *1*, 391–398.

Gulzar, Bouhallab, Jardin, Briard-Bion, and Croguennec (2013). Structural consequences of dry heating on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin at pH 6.5. Food Res. Int. *51*, 899–906.

Gulzar, M., Bouhallab, S., Jeantet, R., Schuck, P., and Croguennec, T. (2011b). Influence of pH on the dry heat-induced denaturation/aggregation of whey proteins. Food Chem. *129*, 110–116.

Gulzar, M., Lechevalier, V., Bouhallab, S., and Croguennec, T. (2012). The physicochemical parameters during dry heating strongly influence the gelling properties of whey proteins. J. Food Eng. 112, 296–303.

Guyomarc'h, F., Nono, M., Nicolai, T., and Durand, D. (2008). Heat induced aggregation of whey proteins in the presence of k-casein or sodium caseinate. F. Guyomarc'h, ed. p.

Guyomarc'h, F., Famelart, M.-H., Henry, G., Gulzar, M., Leonil, J., Hamon, P., Bouhallab, S., and Croguennec, T. (2014). Current ways to modify the structure of whey proteins for specific functionalities—a review. Dairy Sci. Technol. 1–20.

Ha, E., and Zemel, M.B. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). J. Nutr. Biochem. *14*, 251–258.

Habeeb, A.F.S.A. (1973). A sensitive method for localization of disulfide containing peptides in column effluents. Anal. Biochem. *56*, 60–65.

Handa, A., and Kuroda, N. (1999). Functional Improvements in Dried Egg White through the Maillard Reaction. J. Agric. Food Chem. *47*, 1845–1850.

Haque, M.K., and Roos, Y.H. (2006). Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 7, 62–73.

Hartkopf, J., Pahlke, C., Lüdemann, G., and Erbersdobler, H.F. (1994). Determination of Nε - carboxymethyllysine by a reversed-phase high-performance liquid chromatography method. J. Chromatogr. A 672, 242–246.

H/Gebriel, H. (2014). The influence of addition of whey protein aggregates on the rheology of suspensions and gels of milk caseins. Rapport de stage de Master 2 Food Identity de l'ESA d'Angers.

Hiller, B., and Lorenzen, P.C. (2010). Functional properties of milk proteins as affected by Maillard reaction induced oligomerisation. Food Res. Int. *43*, 1155–1166.

Hodge, J.E. (1953). Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. J. Agric. Food Chem. *1*, 928–943.

Hodgman, C.D. (1962). Handbook of Chemistry and Physics, Forty-Fourth Edition 1962-1963, 44th edition. The Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, US.

Holt, C., and Sawyer, L. (1993). Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α_{S1} -, β- and κ-caseins. J Chem Soc Faraday Trans *89*, 2683–2692.

Ibrahim, H.R., Kobayashi, K., and Kato, A. (1993). Improvement of the surface functional-properties of β-lactoglobulin and α-lactalbumin by heating in a dry state. Biosci. Biotechnol. Biochem. *57*, 1549–1552.

International Dairy Federation (2016). Milk and dairy products - Determination of nitrogen content Part 4: Determination of protein and non-protein nitrogen content and true protein content calculation (Reference method). Int. Stand. 20–4.

International Dairy Federation (2014). Milk and dairy products - Determination of nitrogen content Part 1: Kjeldahl principle and crude protein. Int. Stand. 20–1.

International Dairy Federation (2010). Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method). Int. Stand. 21B.

International Dairy Federation (2004). Milk - Determination of casein-nitrogen content - Part 2: Direct method. Int. Stand. 29.2.

Inthavong, W., Kharlamova, A., Chassenieux, C., and Nicolai, T. (2016). Structure and flow of dense suspensions of protein fractal aggregates in comparison with microgels. Soft Matter *12*, 2785–2793.

Jiang, Z., and Brodkorb, A. (2012). Structure and antioxidant activity of Maillard reaction products from α-lactalbumin and β-lactoglobulin with ribose in an aqueous model system. Food Chem. *133*, 960–968.

Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., Martín-Álvarez, P.J., Olano, A., and López-Fandiño, R. (2005). Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of β-lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. Food Hydrocoll. *19*, 831–837.

Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., and López-Fandiño, R. (2007). Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. Food Hydrocoll. *21*, 433–443.

Jing, H., and Kitts, D.D. (2004). Chemical characterization of different sugar-casein Maillard reaction products and protective effects on chemical-induced cytotoxicity of Caco-2 cells. Food Chem. Toxicol. *42*, 1833–1844.

Jung, J.-M., Savin, G., Pouzot, M., Schmitt, C., and Mezzenga, R. (2008). Structure of Heat-Induced β-Lactoglobulin Aggregates and their Complexes with Sodium-Dodecyl Sulfate. Biomacromolecules *9*, 2477–2486.

Kato, A., Ibrahim, H.R., Watanabe, H., Honma, K., and Kobayashi, K. (1989). New approach to improve the gelling and surface functional properties of dried egg white by heating in dry state. J. Agric. Food Chem. *37*, 433–437.

Kato, H., Chuyen, N. van, Utsunomiya, N., and Okitani, A. (1986). Changes of amino acids composition and relative digestibility of lysozyme in the reaction with .ALPHA.-dicarbonyl compounds in aqueous system. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) *32*, 55–65.

Kato, Y., Matsuda, T., Kato, N., and Nakamura, R. (1988). Maillard reaction of ovalbumin with glucose and lactose. Browning and protein polymerization induced by amino-carbonyl reaction of ovalbumin with glucose and lactose. J. Agric. Food Chem. *36*, 806–809.

Kella, N.K.D., and Kinsella, J.E. (1988). Structural stability of β-lactoglobulin in the presence of kosmotropic salts A kinetic and thermodynamic study. Int. J. Pept. Protein Res. *32*, 396–405.

Kinsella, J.E., and Whitehead, D.M. (1989). Proteins in Whey: Chemical, Physical, and Functional Properties. In Advances in Food and Nutrition Research, (Elsevier), pp. 343–438.

Kong, Z.-L., Shinohara, K., Mitsuiki, M., Murakami, H., and Omura, H. (1989). Desmutagenicity of furan compounds towards some mutagens. Agric. Biol. Chem. *53*, 2073–2079.

Krissansen, G.W. (2007). Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. J. Am. Coll. Nutr. 26, 713S–723S.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680–685.

Law, A.J.R., and Leaver, J. (1997). Effect of protein concentration on rates of thermal denaturation of whey proteins in milk. J. Agric. Food Chem. *45*, 4255–4261.

Law, A.J.R., and Leaver, J. (2000). Effect of pH on the thermal denaturation of whey proteins in milk. J. Agric. Food Chem. *48*, 672–679.

Liu, J., Ru, Q., and Ding, Y. (2012). Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review. Food Res. Int. 49, 170–183.

Liu, G., and Zhong, Q. (2013). Thermal aggregation properties of whey protein glycated with various saccharides. Food Hydrocoll. *32*, 87–96.

Liu, Q., Kong, B., Han, J., Sun, C., and Li, P. (2014). Structure and antioxidant activity of whey protein isolate conjugated with glucose via the Maillard reaction under dry-heating conditions. Food Struct. *1*, 145–154.

Liu, W.R., Langer, R., and Klibanov, A.M. (1991). Moisture-induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state. Biotechnol. Bioeng. *37*, 177–184.

Lorient, D. (1979). Covalent bonds formed in proteins during milk sterilization: studies on caseins and casein peptides. J. Dairy Res. *46*, 393–396.

Loveday, S.M., Su, J., Rao, M.A., Anema, S.G., and Singh, H. (2012). Whey Protein Nanofibrils: The Environment–Morphology–Functionality Relationship in Lyophilization, Rehydration, and Seeding. J. Agric. Food Chem. *60*, 5229–5236.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.

Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., and Malcata, F.X. (2007). Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. Food Res. Int. 40, 1197–1211.

Maillard, L.C. (1912). Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoïdines par voie méthodique. Comptes Rendus Séances Académie Sci. *janvier-juin*.

Manzocco, L., and Maltini, E. (1999). Physical changes induced by the Maillard reaction in a glucose–glycine solution. Food Res. Int. *32*, 299–304.

Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M.C., and Lerici, C.R. (2000). Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. Trends Food Sci. Technol. *11*, 340–346.

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

Martinez-Alvarenga, M.S., Martinez-Rodriguez, E.Y., Garcia-Amezquita, L.E., Olivas, G.I., Zamudio-Flores, P.B., Acosta-Muniz, C.H., and Sepulveda, D.R. (2014). Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate – Maltodextrin conjugates. Food Hydrocoll. *38*, 110–118.

Martins, S.I.F.., Jongen, W.M.., and van Boekel, M.A.J.. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. Trends Food Sci. Technol. *11*, 364–373.

Maskan, M. (2001). Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. J. Food Eng. *48*, 169–175.

Mathieu, J. (1998). Initiation à la physicochimie du lait (Paris: Tec & Doc - Lavoisier).

McGann, T.C.A., Donnelly, W.J., Kearney, R.D., and Buchhemm, W. (1980). Composition and size distribution of bovine casein micelles. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *630*, 261–270.

Miao, S., and Roos, Y. h. (2004). Comparison of Nonenzymatic Browning Kinetics in Spray-dried and Freeze-dried Carbohydrate-based Food Model Systems. J. Food Sci. 69, 322–331.

Miller, A.G., Meade, S.J., and Gerrard, J.A. (2003). New insights into protein crosslinking via the Maillard reaction: structural requirements, the effect on enzyme function, and predicted efficacy of crosslinking inhibitors as anti-ageing therapeutics. Bioorg. Med. Chem. *11*, 843–852.

Mine, Y. (1997). Effect of Dry Heat and Mild Alkaline Treatment on Functional Properties of Egg White Proteins. J. Agric. Food Chem. *45*, 2924–2928.

Monahan, F.J., German, J.B., and Kinsella, J.E. (1995). Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins. J. Agric. Food Chem. *43*, 46–52.

Morand, M., Guyomarc'h, F., Pezennec, S., and Famelart, M.H. (2011). On how k-casein affects the interactions between the heat-induced whey protein/k-casein complexes and the casein micelles during the acid gelation of skim milk. Int. Dairy J. *21*, 670–678.

Morgan, F., Bouhallab, S., Mollé, D., Henry, G., Maubois, J.-L., and Léonil, J. (1998). Lactolation of β-Lactoglobulin Monitored by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. Int. Dairy J. 8, 95–98.

Morgan, F., Molle, D., Henry, G., Venien, A., Leonil, J., Peltre, G., Levieux, D., Maubois, J.-L., and Bouhallab, S. (1999a). Glycation of bovine beta-Lactoglobulin: effect on the protein structure. Int. J. Food Sci. Technol. *34*, 429–435.

Morgan, F., Venien, A., Bouhallab, S., Molle, D., Leonil, J., Peltre, G., and Levieux, D. (1999b). Modification of bovine β-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: immunochemical characterization. J. Agric. Food Chem. 47, 4543–4548.

Morgan, P.E., Treweek, T.M., Lindner, R.A., Price, W.E., and Carver, J.A. (2005). Casein proteins as molecular chaperones. J. Agric. Food Chem. *53*, 2670–2683.

Morr, C.V., and Ha, E.Y.W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. *33*, 431–476.

Mottram, D.S. (2007). The Maillard Reaction: Source of Flavour in Thermally Processed Foods. In Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 269–283.

Nagaraj, R.H., Shipanova, I.N., and Faust, F.M. (1996). Protein Cross-linking by the Maillard Reaction: ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND *IN VIVO* DETECTION OF A LYSINE-LYSINE CROSS-LINK DERIVED FROM METHYLGLYOXAL. J. Biol. Chem. *271*, 19338–19345.

Nicolai, T. (2016). Formation and functionality of self-assembled whey protein microgels. Colloids Surf. B-Biointerfaces 137, 32–38.

Nicolai, T., Britten, M., and Schmitt, C. (2011a). β-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. Food Hydrocoll. *25*, 1945–1962.

Nicolai, T., Britten, M., and Schmitt, C. (2011b). β-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. Food Hydrocoll. *25*, 1945–1962.

Niquet-Léridon, C., and Tessier, F.J. (2011). Quantification of Nε-carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography–linear ion trap tandem mass spectrometry. Food Chem. *126*, 655–663.

Norwood, E.-A., Chevallier, M., Le Floch-Fouéré, C., Schuck, P., Jeantet, R., and Croguennec, T. (2016a). Heat-Induced Aggregation Properties of Whey Proteins as Affected by Storage Conditions of Whey Protein Isolate Powders. Food Bioprocess Technol. *9*, 993–1001.

Norwood, E.-A., Le Floch-Fouéré, C., Briard-Bion, V., Schuck, P., Croguennec, T., and Jeantet, R. (2016b). Structural markers of the evolution of whey protein isolate powder during aging and effects on foaming properties. J. Dairy Sci. 99, 5265–5272.

Norwood, E.-A., Pezennec, S., Burgain, J., Briard-Bion, V., Schuck, P., Croguennec, T., Jeantet, R., and Le Floch-Fouéré, C. (2017). Crucial role of remaining lactose in whey protein isolate powders during storage. J. Food Eng. 195, 206–216.

Nyemb, K., Guérin-Dubiard, C., Dupont, D., Jardin, J., Rutherfurd, S.M., and Nau, F. (2014). The extent of ovalbumin in vitro digestion and the nature of generated peptides are modulated by the morphology of protein aggregates. Food Chem. 157, 429–438.

O'Kennedy, B.T., and Mounsey, J.S. (2006). Control of heat-induced aggregation of whey proteins using casein. J. Agric. Food Chem. *54*, 5637–5642.

O'Mahony, J.A., Drapala, K.P., Mulcahy, E.M., and Mulvihill, D.M. (2017). Controlled glycation of milk proteins and peptides: Functional properties. Int. Dairy J., 25th Anniversary of the International Dairy Journal 67, 16–34.

Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Sivaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E., and Kraulis, P.J. (1986). The structure of β-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. Nature *324*, 383–385.

Partanen, R., Torkkeli, M., Hellman, M., Permi, P., Serimaa, R., Buchert, J., and Mattinen, M.-L. (2011). Loosening of globular structure under alkaline pH affects accessibility of β-lactoglobulin to tyrosinase-induced oxidation and subsequent cross-linking. Enzyme Microb. Technol. *49*, 131–138.

Patel, S. (2015a). Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. J. Funct. Foods 19, Part A, 308–319.

Patel, S. (2015b). Emerging trends in nutraceutical applications of whey protein and its derivatives. J. Food Sci. Technol.-Mysore 52, 6847–6858.

Pellegrino, L., van Boekel, M.A.J.S., Gruppen, H., Resmini, P., and Pagani, M.A. (1999). Heat-induced aggregation and covalent linkages in β-casein model systems. Int. Dairy J. *9*, 255–260.

Purwanti, N., Moerkens, A., van der Goot, A.J., and Boom, R. (2012). Reducing the stiffness of concentrated whey protein isolate (WPI) gels by using WPI microparticles. Food Hydrocoll. *26*, 240–248.

Qi, X.L., Brownlow, S., Holt, C., and Sellers, P. (1995). Thermal denaturation of β-lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol. *1248*, 43–49.

Qin, B.Y., Bewley, M.C., Creamer, L.K., Baker, H.M., Baker, E.N., and Jameson, G.B. (1998). Structural Basis of the Tanford Transition of Bovine β-Lactoglobulin. Biochemistry (Mosc.) *37*, 14014–14023.

Qu, P., Lu, H., Yan, S., and Lu, Z. (2010). Influences of cationic, anionic, and nonionic surfactants on alkaline-induced intermediate of bovine serum albumin. Int. J. Biol. Macromol. 46, 91–99.

Ribadeau-Dumas, B. (1981). Actualites dans le domaine de la connaissance de la structure et des proprietes biochimiques des proteines laitieres. Rev. Laitière Fr. 17–32.

Roels, H., Préaux, G., and Lontie, R. (1971). Polarimetric and chromatographic investigation of the irreversible transformation of -lactoglobulin A and B upon alkaline denaturation. Biochimie *53*, 1085–1093.

Rufián-Henares, J.A., and Morales, F.J. (2007a). Effect of in Vitro Enzymatic Digestion on Antioxidant Activity of Coffee Melanoidins and Fractions. J. Agric. Food Chem. *55*, 10016–10021.

Rufián-Henares, J.A., and Morales, F.J. (2007b). Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity of Coffee Melanoidins. J. Agric. Food Chem. *55*, 1480–1485.

Sadek, C., Tabuteau, H., Schuck, P., Fallourd, Y., Pradeau, N., Le Floch-Fouéré, C., and Jeantet, R. (2013). Shape, Shell, and Vacuole Formation during the Drying of a Single Concentrated Whey Protein Droplet. Langmuir *29*, 15606–15613.

Sadek, C., Li, H., Schuck, P., Fallourd, Y., Pradeau, N., Le Floch-Fouéré, C., and Jeantet, R. (2014). To What Extent Do Whey and Casein Micelle Proteins Influence the Morphology and Properties of the Resulting Powder? Dry. Technol. *32*, 1540–1551.

Sawyer, W.H. (1968). Heat Denaturation of Bovine β-Lactoglobulins and Relevance of Disulfide Aggregation. J. Dairy Sci. *51*, 323–329.

Schong, E., and Famelart, M.-H. (2017). Dry heating of whey proteins. Food Res. Int. *100*, 31–44.

Schong, E., and Famelart, M.-H. (2018a). Dry heating of whey proteins leads to formation of microspheres with useful functional properties. Food Res Int. *submitted*.

Schong, E., and Famelart, M.-H. (2018b). Influence of lactose on the formation of whey proteins microparticles obtained by dry heating at alkaline pH. Food Hydrocoll. *submitted*.

Schuck, P. (2011). Modifications des propriétés fonctionnelles des poudres de protéines laitières: Impact de la concentration et du séchage. Innov. Agron. *13*, 71–99.

Sen, P., Ahmad, B., and Khan, R.H. (2008). Formation of a molten globule like state in bovine serum albumin at alkaline pH. Eur. Biophys. J. EBJ 37, 1303–1308.

Simons, J.W.F.A., Kosters, H.A., Visschers, R.W., and De Jongh, H.H.J. (2002). Role of calcium as trigger in thermal á-lactoglobulin aggregation. Arch. Biochem. Biophys. *406*, 143–152.

Sproston, M.J., and Akoh, C.C. (2016). Antioxidative Effects of a Glucose-Cysteine Maillard Reaction Product on the Oxidative Stability of a Structured Lipid in a Complex Food Emulsion: Antioxidant effects of glucose-cysteine MRP…. J. Food Sci. *81*, C2923–C2931.

Strambini, G.B., and Gabellieri, E. (1996). Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. Biophys. J. *70*, 971–976.

Sun, Y., Hayakawa, S., and Izumori, K. (2006). Antioxidative Activity and Gelling Rheological Properties of Dried Egg White Glycated with a Rare Keto-hexose through the Maillard Reaction. J. Food Sci. *69*, C427–C434.

Talansier, E., Loisel, C., Dellavalle, D., Desrumaux, A., Lechevalier, V., and Legrand, J. (2009). Optimization of dry heat treatment of egg white in relation to foam and interfacial properties. LWT-Food Sci. Technol. *42*, 496–503.

Tanford, C., and Taggart, V.G. (1961). Ionization-linked Changes in Protein Conformation. II. The N → R Transition in β-Lactoglobulin. J. Am. Chem. Soc. *83*, 1634–1638.

Tanford, C., Bunville, L.G., and Nozaki, Y. (1959). The Reversible Transformation of β-Lactoglobulin at pH 7.51. J. Am. Chem. Soc. *81*, 4032–4036.

Taulier, N., and Chalikian, T.V. (2001). Characterization of pH-induced transitions of beta-lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. J. Mol. Biol. *314*, 873–889.

Tavares, G.M., Croguennec, T., Hamon, P., Carvalho, A.F., and Bouhallab, S. (2017). How the presence of a small molecule affects the complex coacervation between lactoferrin and β-lactoglobulin. Int. J. Biol. Macromol. *102*, 192–199.

Van Audenhaege, M. (2011). Modifications structurales et fonctionnelles de protéines globulaires du lait lors de la filtration frontale. Ecole Doctorale ABIES.

Van Boekel, M.A.J.S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. Food Chem. *62*, 403–414.

Van der Plancken, I., Van Loey, A., and Hendrickx, M. (2007). Effect of Moisture Content during Dry-Heating on Selected Physicochemical and Functional Properties of Dried Egg White. J. Agric. Food Chem. *55*, 127–135.

Van Nguyen, C. (2006). Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. Mol. Nutr. Food Res. *50*, 1140–1149.

Vardhanabhuti, B., and Foegeding, E.A. (1999). Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. J. Agric. Food Chem. *47*, 3649–3655.

Walkenstrom, P., Nielsen, M., Windhab, E., and Hermansson, A.M. (1999). Effects of flow behaviour on the aggregation of whey protein suspensions, pure or mixed with xanthan. J. Food Eng. *42*, 15–26.

Wang, Q., and Ismail, B. (2012). Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality, solubility, thermal stability and molecular configuration of whey proteinv. Int. Dairy J. *25*, 112–122.

Wang, Q., He, L., Labuza, T.P., and Ismail, B. (2013). Structural characterisation of partially glycosylated whey protein as influenced by pH and heat using surface-enhanced Raman spectroscopy. Food Chem. *139*, 313–319.

Watanabe, T., Kitabatake, N., and Doi, E. (1994). Method for the Accurate Measurement of Freezing-induced Denaturation of Ovalbumin with 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). Biosci. Biotechnol. Biochem. *58*, 359–362.

de Wit, J.N. (1998). Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. J. Dairy Sci. *81*, 597–608.

de Wit, J.N. (2009). Thermal behaviour of bovine á-lactoglobulin at temperatures up to 150 øC. A review. Trends Food Sci. Technol. *20*, 27–34.

Wong, N.P., Jenness, R., Keeney, M., and Marth, E.H. (1988). Fundamentals of dairy chemistry (New York: Van Nostrand Reihold Co).

Yadav, J.S.S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R.D., and Surampalli, R.Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. Biotechnol. Adv. 33, 756–774.

Yen, G.-C., Tsai, L.-C., and Lii, J.-D. (1992). Antimutagenic effect of Maillard Browning products obtained from amino acids and sugars. Food Chem. Toxicol. *30*, 127–132.

Zhang, Z., Arrighi, V., Campbell, L., Lonchamp, J., and Euston, S.R. (2016). Properties of partially denatured whey protein products 2: Solution flow properties. Food Hydrocoll. *56*, 218–226.

Zhou, P., Liu, X., and Labuza, T.P. (2008). Moisture-induced aggregation of whey proteins in a protein/buffer model system. J. Agric. Food Chem. 56, 2048–2054.

H. VALORISATION DES TRAVAUX

1. BREVET

Famelart, M.-H, Croguennec, T., Schuck, P., & Schong, E. Stabilized protein aggregate particles, and process for the preparation of said particles.

2. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Schong, E., & Famelart, M.-H. (2017a). Dry heating of whey proteins. Food Research International, 100, 31–44 (article 1).

Famelart, M.-H., Schong, E., & Croguennec, T. (2018). Dry heating a freeze-dried whey protein powder: Formation of microparticles at pH 9.5. J. Food Eng., 224, 112-120 (article 2).

Schong, E., & Famelart, M.-H. (2018a). Dry heating of whey proteins leads to formation of microspheres with useful functional properties. Food Res. Int., submitted (article 3).

Schong, E., & Famelart, M.-H. (2018b). Influence of lactose on the formation of whey proteins microparticles obtained by dry heating at alkaline pH. Food Hydrocolloids, submitted (article 4).

3. COMMUNICATIONS ORALES

Schong, E., & Famelart, M.-H. (2017). An original way to produce functional particles by dry heating whey proteins. 10th NIZO Dairy Conference - Innovations in Dairy Ingredients, 1-3 October 2017 Papendal, The Netherlands.

Schong, E., & Famelart, M.-H. (2017). Propriétés d'écoulement d'assemblages microniques produits par étuvage d'une poudre d'isolat de protéines sériques à pH alcalin. 52ème Congrès du Groupe Français de Rhéologie, 24-27 octobre 2017, Nice, France.

Schong,E., Famelart, M.H. (2017). An original way to produce functional particles by dry heating whey proteins, Presented at Colloque Biopolymers (2017-11-29-2017-12-01) Nantes (FRA), Nantes, France (conférence Famelart M.H.).

4. AFFICHES

Schong, E., & Famelart, M.-H. (2017). Outstanding whey protein particles produced by dry heating. 7th International Colloids Conference 18-21 June 2017 Sitges, Barcelona, Spain.

Schong, E., & Famelart, M.-H. (2017). Outstanding whey protein particles produced by dry heating. 10th NIZO Dairy Conference - Innovations in Dairy Ingredients, 1-3 October 2017 Papendal, The Netherlands.

I. ANNEXE

Dry heated whey protein microparticles

Supporting Materials

Marie-Hélène FAMELART[1]*, Elise Schong[1], Thomas Croguennec[1]
[1] STLO, UMR 1253, INRA, Agrocampus Ouest, 35000 Rennes, France

*Corresponding author; Tel: +33.223.48.53.43; Fax: +33.223.48.53.50; email address: marie-helene.famelart@inra.fr

TABLE OF CONTENTS

S1: **Fluorescence of Maillard reaction markers**

S2: **Denaturation of whey proteins**

S3: **Effect of the pH of the WPI solution before freeze-drying on the formation of WPM**

S1. Fluorescence of Maillard reaction markers

The effect of DH was studied by following markers of the Maillard reaction according to Andersen and Mortensen (2008) or Bosch *et al*. (2007) on the solution 2 with λexc = 347 nm and emission λem = 360-500 nm for advanced glycation end products (AGE) by using the FLX-Xenius fluorimeter (SAFAS, Monaco) with bandwidth emission = 10 nm and bandwidth excitation= 10 nm. A solution of pure βlg at 10 g.kg-1 was also measured.

Many different wavelengths have been used as markers for the Maillard reaction (Andersen and Mortensen, 2008). At λexc 340-350 nm, the maximum of emission is reported at 415 nm (Andersen and Mortensen, 2008; Bosch et al., 2007), or at 440 nm (Andersen and Mortensen, 2008; Feinberg et al., 2006). Our results show that λem max was around 440-450 nm in samples before DH and 430-440 nm after DH and that the maximum fluorescence (MF) increased after DH (Figure S2). The MF was dramatically higher for the current samples than for a solution of pure βlg, indicating that some AGE were already present before the DH treatment, probably due to the drying process used to produce the whey protein powder. Moreover, the MF increased after DH. The MF was higher at pH 9.5 than at pH 6.5 and 3.5, in untreated and treated samples, so that the maximum was reached after DH at pH 9.5, but the difference between powders dry heated at pH 6.5 and 9.5 was rather low.

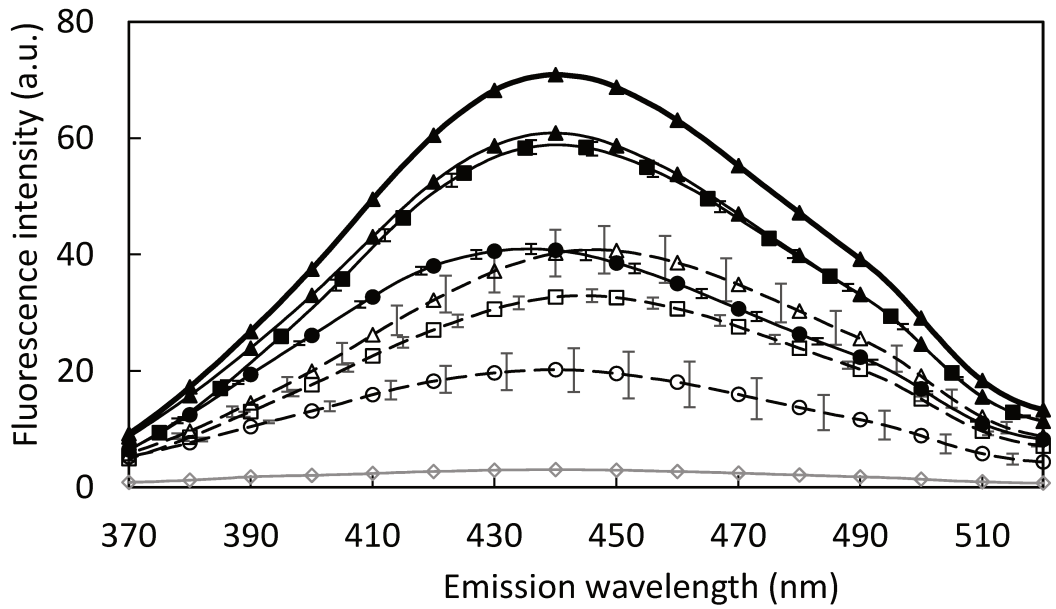


Figure S1. Differential scanning calorimetry scans on solutions at 50 g.kg^{-1} made of powder at pH 3.5 (A), 6.5 (B)and 9.5 (C), before (blue, 4 repetitions) and after (red and pink, 2-4 repetitions) DH for 36 h, except one sample on 2 at pH 9.5 that was dry heated only for 24 h (red curve).

S2. *Denaturation of whey proteins*

Differential scanning calorimetry (DSC) was performed to assess the thermal denaturation of proteins in the powder during DH. Solutions were prepared with powders before and after DH at a final concentration of 50 $g.kg^{-1}$ with their pH adjusted at 6.5 and after an overnight stirring at 4 °C. DSC was done on a Q1000 DSC device (TA Instruments France, Guyancourt, France). Protein suspensions (90 mg) and water sample were sealed into high volume sample DSC pans (pans, lids and seals 900825.902, TA Instruments). They were equilibrated at 20 °C for 1 min and then heated to 100 °C at 2 °C/min.

DSC was used to estimate protein denaturation due to DH. This method has been used extensively in characterizing the thermal denaturation of whey proteins. While each protein suspension sample was heated, the endothermic heat flow caused by the protein unfolding is measured. Heat flow curves before and after DH were dramatically different, showing a larger and smaller peak after treatment (Figure S1) due to a severe denaturation during the DH process.

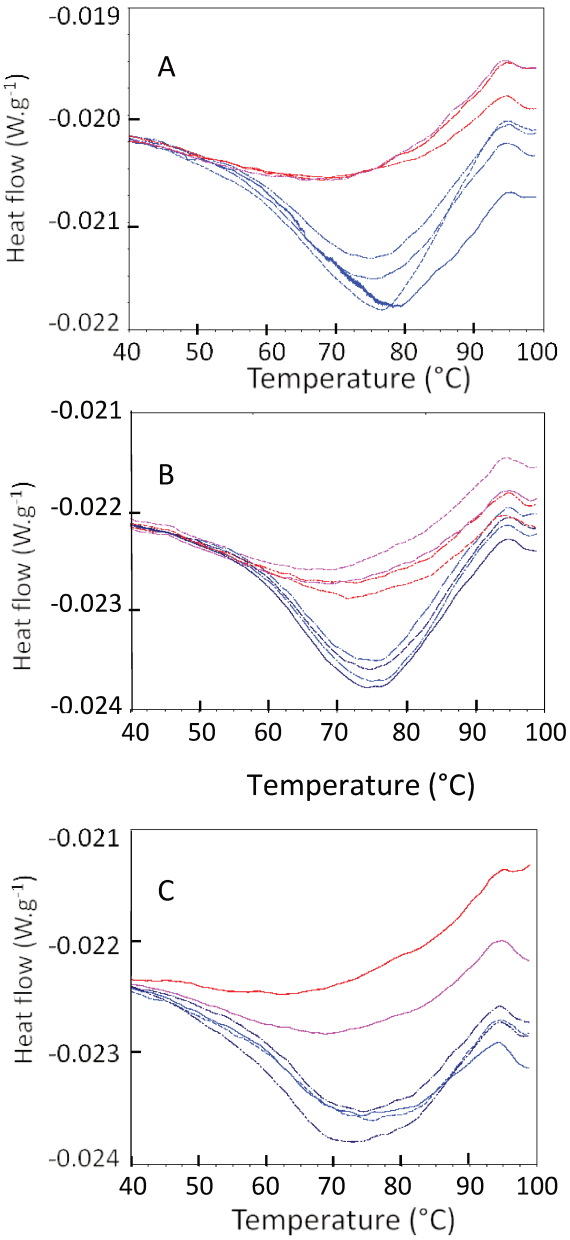


Figure S2. Differential scanning calorimetry scans on solutions at 50 $g.kg^{-1}$ made of powder at pH 3.5 (A), 6.5 (B)and 9.5 (C), before (blue, 4 repetitions) and after (red and pink, 2-4 repetitions) dry heating for 36 h, except one sample on 2 at pH 9.5 that was dry heated only for 24 h (red curve).

S3. Effect of the pH of the WPI solution before freeze-drying on the formation of WPM

The pH of the WPI solution at 150 g.kg^{-1} was adjusted between 7.0 and 11.5 before freeze-drying, then the freeze-dried powder was conditioned at a_w= 0.23 and dry heated at 100 °C for 36 h. The analytical methods are the same than the one given in the article.

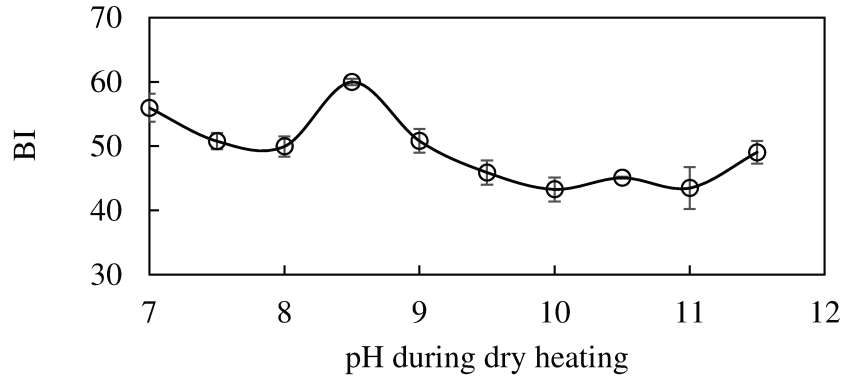


Figure S3.1. Browning index (BI) as a function of the pH during dry heating

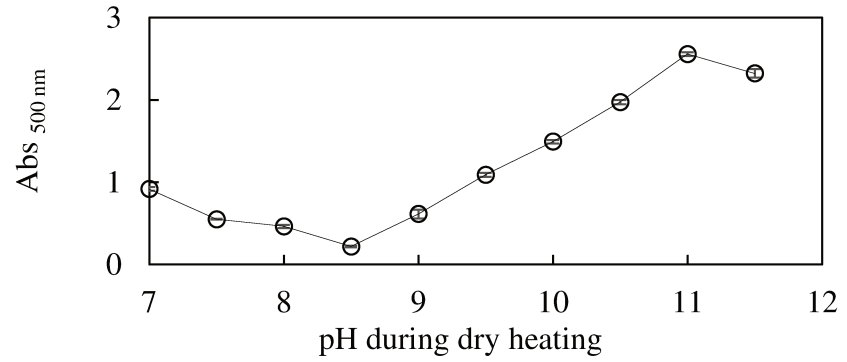


Figure S3.2. Absorption at 500 nm of the solution 1 prepared from powder dry heated at different pH values

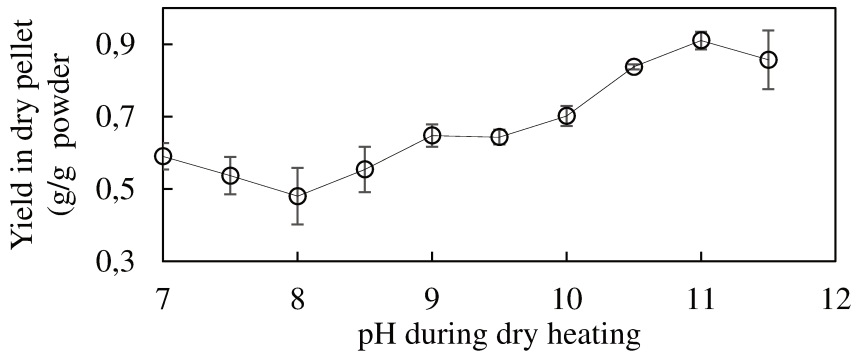


Figure S3.3. Yield in dry pellet obtained by centrifugation of solution 1 prepared with dry heated powder as a function of the pH during DH

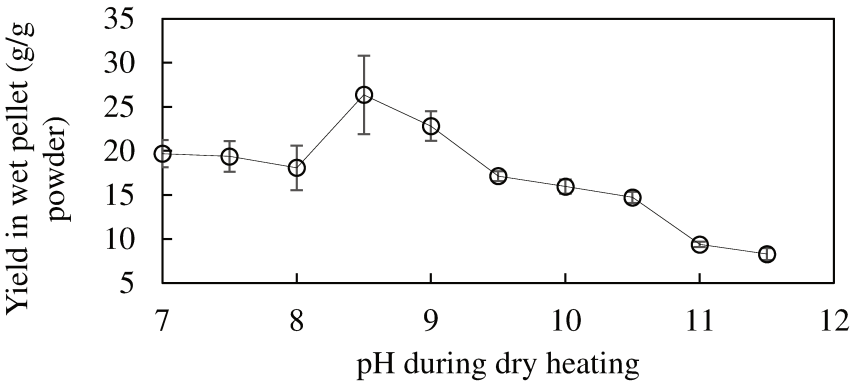


Figure S3.4. Yield in wet pellet obtained by centrifugation of solution 1 prepared with dry heated powder as a function of the pH during DH

According to these results, the browning index was maximal at pH ~ 8.5, while the amount of WPM was minimal at pH 8.0-8.5 and maximal at pH 11. At pH 11, the yield in dry material was 0.91 g/g of DH, a very high yield. The maximal retention of water in the WPM was at pH 8.5.

At pH 10.5 and above, the odor of ammonia was perceived when opening the tubes just after dry heating. This aroma was perceived as higher in this order: pH 10.5<pH 11.5<pH 11.0.

References

Andersen, C.M., and Mortensen, G. (2008). Fluorescence Spectroscopy: A Rapid Tool for Analyzing Dairy Products. J. Agric. Food Chem. *56*, 720–729.

Bosch, L., Alegria, A., Farre, R., and Clemente, G. (2007). Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk-cereal based infant foods during storage. Food Chem. *105*, 1135–1143.

Feinberg, M., Dupont, D., Efstathiou, T., Louâpre, V., and Guyonnet, J.-P. (2006). Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. Food Chem. *98*, 188–194.

RÉSUMÉ *ABSTRACT*

Assemblages microniques de protéines sériques produits par étuvage à pH 9.5 : mécanisme de formation et propriétés physico-chimiques et fonctionnelles

L'étuvage de poudre de protéines sériques (PS) de lait permet l'amélioration des propriétés techno-fonctionnelles des protéines : aptitude à la formation de gel, mousse, ou émulsion. L'objectif de cette thèse était d'étudier le mécanisme de formation et les propriétés physico-chimiques et rhéologiques d'assemblages de PS de taille micronique ou AMI produits par étuvage à 100 °C d'une poudre d'isolat de PS ajustée à pH 9,5 et à une activité d'eau proche de 0,2. Pour cela, la caractérisation morphologique des assemblages, la dénaturation des protéines, la diminution de lactose libre et la formation de produits de Maillard ont été suivies au cours du temps d'étuvage. Le rôle de chacun des constituants de la poudre a aussi été étudié en faisant varier sa composition. Les résultats obtenus montrent que l'étuvage à pH 9,5 permet la formation d'assemblages de taille et de forme relatives à celle des particules de poudre étuvée. Dans un premier temps, des réactions de glycation des protéines s'opèrent, des agrégats solubles sont produits et les poudres brunissent, tandis que les produits terminaux de la réaction de Maillard se forment. Ensuite, la quantité d'agrégats solubles diminue avec la formation concomitante des AMI. Les AMI possèdent des propriétés de rétention d'eau très élevées ce qui leur confère des propriétés viscosifiantes. L'addition de lactose à la poudre d'isolat de PS permet d'accélérer la cinétique de formation des AMI et d'obtenir des AMI plus denses en protéines. Les caséines sont aussi intégrées dans les AMI, mais ont très peu d'effets sur leurs propriétés structurales et de capacité de rétention d'eau.

Mots-clefs : protéines sériques, assemblage, interaction, étuvage, agrégation, réaction de Maillard, rhéologie

Micronic assemblies of whey proteins produced by dry heating at pH 9.5: mechanism of formation and physicochemical and functional properties

The dry heating of whey protein powder increases the functional properties of proteins such as their ability to form gels, foams or emulsions. The aim of this PhD thesis was to study the mechanism of formation and the physicochemical and rheological properties of protein assemblies of micrometer sizes that were produced by dry heating at 100 °C a whey protein powder isolate adjusted at pH 9.5 at a water activity of 0.2. Thus, morphological properties, protein denaturation, lactose conjugation and products of the Maillard reaction were studied during the time course of the dry heating. The role of each compound of the powder has also been studied by modification of the powder composition. Dry heating at pH 9.5 was able to form large assemblies of size and shape related to the size of the dry heated powder particles. In the first step, the glycation of proteins increased. Soluble aggregates formed and the powder browning progressed, while advanced glycated end products of the Maillard reaction were found. Then, the content in soluble aggregates decreased and large protein assemblies of micrometer sizes formed. These large assemblies were highly hydrated, and had very high viscosity values. Addition of lactose to the whey protein isolate powder allowed increasing the speed of formation of these large assemblies, increasing their density, and reaching higher yields of production. Caseins were able to join to whey proteins in the large assemblies, and had very poor effects on their structural properties and ability to retain the aqueous phase.

Keywords: *whey proteins, assembly, interaction, dry heating, aggregation, Maillard reaction, rheology*

AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr