



**HAL**  
open science

# Conception d'itinéraires technologiques pour la production et la stabilisation par séchage d'assemblages protéiques fractals

Domitille de Guibert

► **To cite this version:**

Domitille de Guibert. Conception d'itinéraires technologiques pour la production et la stabilisation par séchage d'assemblages protéiques fractals. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2020. Français. NNT : 2020NSARB335 . tel-03152297v3

**HAL Id: tel-03152297**

**<https://theses.hal.science/tel-03152297v3>**

Submitted on 25 Feb 2021

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE **Domitille de Guibert**

AGROCAMPUS OUEST  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600  
*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*  
Spécialité : Génie des procédés agroalimentaires

## **Conception d'itinéraires technologiques innovants pour la production et la stabilisation par séchage d'assemblages protéiques fractals.**

**Thèse soutenue publiquement à Rennes, le 20/02/2020**

**Unité de recherche : UMR 1253 Science & technologie du lait & de l'œuf**

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Jack Legrand      Professeur Université de Nantes  
Camille Michon    Professeure INRAE

### **Composition du Jury :**

Examineurs :	Fatou Toutie Ndoye	Chargée de recherche, INRAE Anthony
	Karine Loubière	Directrice de recherche CNRS, Laboratoire de Génie Chimique,
	Toulouse	
Dir. de thèse :	Romain Jeantet	Professeur Agrocampus Ouest, UMR INRA-AO STLO
Co-dir. de thèse :	Guillaume Delaplace	Directeur de recherches, UMR INRA-CNRS-Université de Lille UMET

### **Invité**

Marie-Laure Sansous      Chargée de projets R&D, Laiterie de Montaigu, Saint Georges de Montaigu



[Tapez ici]



[Tapez ici]



## REMERCIEMENTS

---

Après trois années de thèse, je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin ont participé à ma thèse.

Je remercie les membres du jury qui ont pris le temps d'évaluer mon travail de thèse, Karine Loubière, Fatou Toutie Ndoye, Jack Legrand, Camille Michon et Marie-Laure Sansous.

Je remercie particulièrement mes encadrants à savoir Romain Jeantet, mon directeur de thèse et Guillaume Delaplace mon co-directeur de thèse. Merci pour votre confiance, votre accompagnement quotidien et votre soutien durant toutes ces années. Merci de m'avoir appris à aller au fond des choses et à toujours viser l'exigence dans le travail pour avoir la satisfaction du travail bien accompli.

Je remercie Yves Le Loir de m'avoir accueilli au sein du laboratoire UMR INRA-AO STLO. Je remercie les régions Bretagne et Pays de la Loire pour le financement du projet ainsi que Joëlle Léonil qui en a été la coordinatrice scientifique. Je remercie le pôle de compétitivité Valorial et spécialement Morgane Raison, Stéphan Rouverand et Karine Le Roux pour la gestion du projet Profil. Je remercie l'ensemble des partenaires industriels de ce projet (association BBA) ainsi que les différents partenaires académiques. Merci pour votre implication dans ce projet et pour nos discussions toujours enrichissantes.

Je remercie l'équipe SMCF et l'équipe PFL pour leur bonne humeur et pour les échanges scientifiques nombreux et de qualité notamment lors des réunions d'équipe. Je remercie les membres de mon comité de thèse qui ont cheminé à mes côtés durant ces années et qui m'ont permis de me poser les bonnes questions et de pousser plus loin mon raisonnement scientifique. Merci à Cécile Le Floch-Fouéré, Stéphane Pezennec, Alain Riaublanc et Luc Fillaudeau.

Je remercie particulièrement toutes celles et ceux avec qui j'ai travaillé de près. Merci à Yingying et Marie pour ce trio d'un an si agréable et performant. Merci à Anna, François et Ali. Merci également à Thierry, Serge, Marielle, Valérie, Camille, Perrine, Florence, Marie Hélène. J'ai adoré travailler avec vous.

Merci à toutes les personnes du bâtiment 23 pour votre accueil et votre gentillesse : merci à Claire, Margaux, Peggy, Coralie, Juliane, Frédérique, Amélie, Dominique, Marie-Claude, Monique, Jean Jacques, Françoise, Catherine, Valérie, Maryvonne, Olivier, Nathalie et Thomas. Merci à mes collègues de bureau de passage (Federico, Marek, Marie, Ousmane...)



Merci à tous les doctorants, post-doctorants, stagiaires que j'ai eu la chance de rencontrer durant ma thèse.

Un immense merci à ma famille pour leur soutien de toujours. Merci à Alexandre, Ambre, et bébé 2 qui font la joie de chacune de mes journées. Merci à mes parents, mes frères et sœurs, mes neveux et nièces, ma belle famille, mes amis de toujours pour leur accompagnement sans faille.

## VALORISATION DES TRAVAUX

---

### Article:

De Guibert D, Martin F, Hennetier M, Gu YY, Le Floch Fouéré C, Delaplace G, Jeantet R. 2020. Flow process and heating conditions modulate the characteristics of whey protein aggregates. J Food Eng 264, pp. 109675. DOI :10.1016/j.jfoodeng.2019.07.022.

### Communications orales :

Hennetier M, De Guibert D, Gu YY, Solé V, Garnier C, Delaplace G, Jeantet R, Riaublanc A. 2018. Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled with Multi-Angle Light Scattering and Differential Refractometer (AF4-MALS-DRi): An analysis tool to characterize milk protein aggregates produced in semi-industrial way. 19th International Symposium on Field- and Flow-Based Separations (FFF 2018), May 14<sup>th</sup> – 18<sup>th</sup>, Columbia, USA.

De Guibert D, Hennetier M, Gu YY, Riaublanc A, Delaplace G, Jeantet R. 2018. Heating and flow process conditions modulate the size and properties of whey protein aggregates. 32nd EFFoST International Conference, November 6<sup>th</sup> – 8<sup>th</sup>, Nantes, France.

De Guibert D, Martin F, Kharlamova A, Kerjough A, Le Floch Fouéré C, Delaplace G, Jeantet R. 2020. Dried whey protein fractal aggregates for substituting texturizing additives in dairy products. 15th International Hydrocolloids Conference, March 2<sup>nd</sup> – 5<sup>th</sup>, Melbourne, Australia.

### Poster :

De Guibert D, Hennetier M, Gu YY, Riaublanc A, Delaplace G, Jeantet R. 2017. Conception d'un itinéraire technologique innovant pour l'obtention d'agrégats protéiques fractals. Colloque PROFIL September 21st, Rennes, France.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>i</b>
<b>VALORISATION DES TRAVAUX</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>iv</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>vii</b>
<b>CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART</b> .....	<b>1</b>
1.1 Les agents de texture utilisés dans l'industrie laitière.....	3
1.2 La tendance au « clean label ».....	5
1.3 Quelques éléments de physicochimie et d'économie de la filière laitière.....	7
1.4 Les protéines solubles et agrégats de protéines solubles de lait.....	9
1.4.1 Les protéines solubles majoritaires du lait.....	9
1.4.2 La dénaturation-agrégation de protéines solubles .....	10
1.4.3 Les agrégats de protéines solubles.....	14
1.5 Concentration-Séchage en industrie laitière.....	27
1.5.1 Concentration par filtration tangentielle .....	28
1.5.2 Séchage par pulvérisation .....	30
1.5.3 Réhydratation des poudres .....	33
<b>CHAPITRE 2 : STRATÉGIE</b> .....	<b>36</b>
<b>CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>41</b>
3.1 Production des agrégats.....	43
3.1.1 Matière première .....	43
3.1.2 Influence de paramètres matière sur la formation des agrégats.....	43
3.1.3 Mise au point de la ligne de production.....	45
3.1.4 Influence des conditions de procédé sur la formation des agrégats .....	48
3.1.5 Choix des paramètres matière et procédé pour une production à l'échelle semi-industrielle.....	56
3.1.6 Etude de l'encrassement induit par les mélanges 1 et 2.....	56
3.2 Concentration et séchage par pulvérisation .....	57
3.2.1 Ultrafiltration.....	57
3.2.2 Séchage par pulvérisation .....	58
3.2.3 Analyses des poudres d'agrégats de protéines solubles.....	60
3.3 Caractérisation des agrégats produits .....	63
3.3.1 Propriétés intrinsèques : taille et morphologie des agrégats .....	63
3.3.2 Propriétés comportementales .....	69

3.3.3	Propriétés fonctionnelles .....	71
<b>CHAPITRE 4 : CONTRÔLE DES PROPRIÉTÉS INTRINSÈQUES DE MÉLANGES D'AGRÉGATS PURS FRACTALS ET FRACTALS / MICROGELS PRODUITS A L'ÉCHELLE PILOTE ET DE MANIÈRE CONTINUE 76</b>		
4.1	Modulation de la forme des agrégats par la mise en œuvre de conditions physicochimiques différentes.....	78
4.1.1	Choix des conditions d'obtention d'agrégats de différentes formes (sphérique vs branchés).....	78
4.1.2	Caractérisation des deux mélanges d'agrégats formés dans des conditions de procédé continu	79
4.2	Variation de la taille des agrégats via des leviers matière .....	81
4.3	Variation de la taille des agrégats via des leviers procédé .....	84
4.3.1	Influence du régime d'écoulement et du temps de montée en température.....	85
4.3.2	Influence de la température de chauffe.....	93
4.3.3	<i>Mécanismes impliqués dans la formation d'agrégats par un procédé continu.</i> ....	95
4.4	Étude de l'encrassement.....	99
<b>CHAPITRE 5 : IMPACT DES OPÉRATIONS DE CONCENTRATION À DIFFÉRENTES ÉCHELLES SUR LES PROPRIÉTÉS INTRINSÈQUES DES DEUX MÉLANGES D'AGRÉGATS SÉLECTIONNÉS .....101</b>		
5.1	Résultats .....	103
5.1.1	Compression osmotique.....	103
5.1.2	Ultrafiltration.....	105
5.1.3	Séchage par pulvérisation .....	107
5.1.4	Propriété des poudres et redispersion.....	108
5.2	Discussion .....	112
5.2.1	Mélanges 1 et 2 : des comportements différents en fonction du degré de concentration, liés à une différence de conformation des agrégats. ....	113
5.2.2	Mélanges 1 et 2 : des comportements différents en fonction de la cinétique de concentration et temps passé à l'état concentré, liés à une différence de réactivité des agrégats. 116	
<b>CHAPITRE 6 : PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES MÉLANGES D'AGRÉGATS PRODUITS EN CONTINU, CONCENTRÉS, SÉCHÉS ET REDISPERSÉS .....119</b>		
6.1	Propriétés de gélification induite par l'acidité .....	121
6.1.1	Fonctionnalités différentes en fonction du mélange utilisée .....	122
6.1.2	Fonctionnalités différentes des agrégats du mélange 2 en fonction du volume traité lors de l'essai .....	124
6.2	Propriétés viscosifiantes des agrégats des mélanges 1 et 2.....	127
6.2.1	Fonctionnalités différentes des agrégats du mélange 2 en fonction du volume de solution traitée .....	127
6.2.2	Fonctionnalités différentes en fonction du mélange utilisée .....	128
6.3	Propriété de texturation d'émulsion .....	130

<b>CONCLUSION.....</b>	<b>136</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>140</b>
<b>LISTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>142</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>152</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>158</b>

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

La maîtrise de la texture, composante essentielle des propriétés organoleptiques d'un aliment formulé, est un enjeu crucial pour les professionnels de l'agroalimentaire. Dans le domaine laitier, la texture découle le plus souvent de la structuration de la matrice via des phénomènes physicochimiques qui se déroulent au cours des étapes de transformation, comme par exemple la coagulation lactique et/ou présure en fabrication fromagère ou de produits laitiers fermentés. Cependant, pour certains produits laitiers tels que les desserts lactés, les glaces ou les fromages fondus, la texture finale est obtenue par ajout d'additifs appelés agents de texture. Il s'agit souvent de polyosides extraits d'algues, de graines ou produits par des bactéries, qui permettent d'une part de texturer le produit et d'atteindre ainsi les caractéristiques gustatives recherchées, mais également de stabiliser le système vis à vis des séparations de phase et de la décantation des éléments dispersés (sédimentation ou crémage). Utilisés en petite quantité, leur innocuité a bien sûr été garantie et leur utilisation est soumise à réglementation (règlement CE n°1333/2008). Ainsi leur présence doit obligatoirement être mentionnée sur les étiquettes des produits commercialisés. Cependant, la présence d'additifs est aujourd'hui de plus en plus rejetée par les consommateurs, qui recherchent des produits « naturels » et « sains » en opposition aux aliments fortement transformés et/ou formulés. Pour répondre à cette attente, les industriels ont engagé depuis une dizaine d'années une démarche de simplification des étiquetages appelée « Clean Label », qui vise à limiter autant que possible le recours aux additifs, ou à défaut à choisir des ingrédients ménagers connus du consommateur tout en conservant les propriétés attendues des produits.

C'est dans ce contexte que le projet PROtéines Fonctionnalisées pour l'Industrie Laitière (PROFIL ; 2014-2019), a été conçu par un consortium d'industriels laitiers (Bba Milk Valley, incluant Bel, CF&R, Coopérative d'Isigny Sainte-Mère, Eurial, Lactalis, Laiterie de Montaigu, Laïta, Savencia Fromage & Dairy, SILL, Entremont-Sodiaal) et de nombreux partenaires académiques (UMR INRA - Agrocampus Ouest Science et Technologie du Lait et de l'Œuf STLO, UR Biopolymères Interactions et Assemblages BIA, Oniris, Université du Maine, Université de Bretagne Occidentale, Université de Rennes 1). Ce projet, porté par l'UMR STLO et de grande envergure (budget global de 18,4 M€, dont 4,4 M€ de financement ; 11 thèses ; 6 ans de CDD), est financé intégralement par les Régions Bretagne et Pays de la Loire dans un contexte de spécialisation régionale de plus en plus affirmé. PROFIL est un projet d'innovation qui vise à s'appuyer sur la plasticité des protéines laitières afin de générer des assemblages aux propriétés intrinsèques (taille, structure supramoléculaire) maîtrisées, et exploiter leurs propriétés multifonctionnelles (propriétés texturantes, émulsifiantes, antifongiques et

encapsulantes/vectorisantes) pour créer des produits laitiers sans additifs et d'origine 100% laitière (développés par les partenaires industriels).

Les objectifs du projet sont de :

- Répondre aux évolutions des attentes des consommateurs par le biais de mentions telles que « à base d'ingrédient 100% naturels » et « sans » (conservateurs, colorants, arômes artificiels).
- Renforcer la compétitivité de l'offre française dans un contexte de marché mondial grandissant et avec des compétiteurs fortement concurrentiels dans la filière laitière.
- Créer de la valeur ajoutée pour les protéines laitières afin de maintenir un prix du lait attractif pour le secteur de la production.
- Trouver des relais de croissance dans de nouvelles utilisations des protéines laitières et faire face à la concurrence des autres sources protéiques, notamment végétales.

Ce projet comporte quatre principaux axes de recherche, en fonction des propriétés fonctionnelles cibles:

#### **Axe 1 : Propriétés anti-fongiques**

**Objectifs** : développer des effets anti-fongiques in situ à partir des composants du lait.

**Sorties applicatives** : supprimer les conservateurs sur les fromages affinés à la coupe, des produits frais et fromages fondus.

#### **Axe 2 : Propriétés interfaciales (émulsifiantes et foisonnantes)**

**Objectifs** : Produire des ingrédients fonctionnels permettant de foisonner, émulsifier et stabiliser les interfaces des produits laitiers multiphasiques.

**Sorties applicatives** : créer de nouveaux ingrédients pour remplacer les sels de fonte dans les fromages fondus. Formuler des nouveaux ingrédients pour les crèmes, les fromages fondus, desserts lactés, spécialités fromagères et produits frais laitiers.

#### **Axe 3 : Propriétés texturantes**

**Objectifs** : Texturer des produits laitiers in situ pour obtenir un comportement technologique ou culinaire spécifique.

**Sorties applicatives** : Supprimer les hydrocolloïdes (amidons modifiés, pectines, alginates, carraghénanes, agar-agar, farine de caroubes...) des crèmes et desserts lactés frais en conservant le comportement rhéologique et organo-sensoriel. Explorer de nouvelles

propriétés culinaires des fromages ingrédients. Produire des nouveaux produits laitiers (par exemple avec une texture fibrée ou des laits avec de nouvelles propriétés culinaires)

#### **Axe 4 : Vectorisation, encapsulation**

**Objectifs :** utiliser des assemblages protéiques du lait pour protéger ou véhiculer des molécules d'intérêt nutritionnel.

**Sorties applicatives :** Vectoriser des composants actifs pour les séniors dans différentes matrices (créer de nouveaux produits fonctionnels). Vectoriser des constituants (eg., vitamines) dans des poudres lactières infantiles.

#### **Axe 5 : Axe transversal**

**Objectifs :** développer à l'échelle pilote et de manière robuste et stable des agrégats protéiques dont l'intérêt a été identifié à l'échelle paillasse dans les axes 2 et 3. Connaître l'influence des agrégats sur les propriétés organoleptiques des produits laitiers dans lesquels ils sont incorporés.

**Sorties applicatives :** Utiliser ces agrégats produits à l'échelle pilote et stabilisés dans des matrices lactières en substitut d'agent de texture.

Cette thèse s'inscrit dans le cinquième et dernier axe, transversal et principalement en appui des axes 2 et 3. Cet axe a été proposé lors de la conception du projet pour développer à l'échelle pilote les solutions identifiées comme les plus prometteuses à l'échelle laboratoire. En particulier, PROFIL a permis de concevoir à l'échelle laboratoire des assemblages de protéines solubles de forme ramifiée et peu denses appelés agrégats fractals dont les propriétés fonctionnelles sont maîtrisées (thèses de Marie Chevallier (2017 ; Rennes), Thibaut Loiseleux (2018 ; Nantes) et Anna Kharlamova (2018 ; Le Mans)). Ce type d'assemblage a en particulier montré de bonnes capacités stabilisantes d'émulsions et de texturation, qui en font de bons candidats pour remplacer certains additifs alimentaires dans des crèmes et produits laitiers. Il convient au préalable d'établir un procédé industriel pour les produire de façon répétable et à une échelle significative, puis parvenir à les stabiliser sous une forme propice à leur mise en œuvre (eg, forme pulvérulente). Une telle approche de scale-up est effectivement indispensable à toute démarche d'innovation.

Ainsi, ce travail de thèse, articulé en six chapitres, cherche à établir des itinéraires technologiques robustes et innovants pour la production d'assemblages protéiques fractals à l'échelle industrielle qui permette de stabiliser ces agrégats par concentration-séchage pour créer un nouvel ingrédient laitier.



Il vise à s'assurer à chaque étape (production, concentration, séchage et redispersion) que les propriétés intrinsèques et fonctionnelles des assemblages sont comparables à celles étudiées à l'échelle laboratoire.

Le chapitre 1 est consacré à l'état de l'art sur lequel s'appuie l'étude : sont abordés l'utilisation d'agents de texture en industrie laitière et la politique clean label ; le mélange, la technologie et les propriétés fonctionnelles des protéines solubles et des agrégats de protéines solubles laitières ; et enfin les connaissances se rapportant aux étapes de concentration-séchage en industrie laitière.

Le chapitre 2 s'attache à décrire la stratégie adoptée et l'approche globale de la thèse.

Le chapitre 3 décrit les matériels et méthodes utilisés au cours du projet.

Les résultats expérimentaux sont présentés en trois chapitres qui s'articulent de la façon suivante : le chapitre 4 aborde le contrôle des propriétés intrinsèques (taille et morphologie) des agrégats produits en continu ; le chapitre 5 s'intéresse à l'impact des opérations de concentration à différentes échelles sur les propriétés intrinsèques des mélanges d'agrégats produits ; et enfin le chapitre 6 est consacré à l'étude des fonctionnalités des mélanges d'agrégats produits.

## CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART

---

*La première partie de cet état de l'art répertorie les différents agents de texture d'origine variée, utilisés dans l'industrie laitière et replace dans son contexte l'apparition d'une nouvelle tendance à la réduction des ingrédients dans les produits alimentaires, aussi appelée tendance au « Clean Label ».*

*Les mécanismes de dénaturation-agrégation des protéines solubles (PS) et leurs paramètres d'influence à savoir la température, le pH, et la force ionique, seront ensuite présentés. Nous entrerons particulièrement en détail sur la formation de deux types d'agrégats de PS que sont les microgels (agrégats sphériques, denses et peu réactifs) et les fractals (agrégats ramifiés, peu denses et très réactifs). Nous nous intéresserons aux propriétés fonctionnelles de ces derniers en répertoriant leur capacité à augmenter la viscosité, à former un gel, à texturer et stabiliser des émulsions et à se comporter en matrices plus complexes (type yaourt). Nous verrons ensuite qu'il est difficile de quantifier ou séparer les agrégats fractals et microgels quand ils sont produits au sein d'un même mélange.*

*Dans une dernière partie, nous aborderons la stabilisation des denrées alimentaires par diminution de la disponibilité de l'eau à travers les opérations de concentration par filtration tangentielle et de séchage par pulvérisation utilisées en industrie laitière.*

*Les principaux objectifs de travail abordés dans ce chapitre :*

- Répertorier les agents de texture utilisés dans l'industrie laitière et contextualiser la tendance actuelle de réduction d'ingrédients dans les produits alimentaires, ou « Clean Label ».*
- Comprendre les mécanismes de dénaturation-agrégation de protéines solubles et présenter les conditions de formation à l'échelle paillasse des agrégats microgels et fractals. Résumer les propriétés fonctionnelles de ces derniers.*
- Comprendre les opérations de stabilisation par concentration et séchage par pulvérisation utilisées en industrie laitière.*

## TABLE DES MATIÈRES

---

<b>CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART</b> .....	Erreur ! Signet non défini.
<b>1.1</b> Les agents de texture utilisés dans l'industrie laitière.....	<b>3</b>
<b>1.2</b> La tendance au « clean label ».....	<b>5</b>
<b>1.3</b> Quelques éléments de physicochimie et d'économie de la filière laitière.....	<b>7</b>
<b>1.4</b> Les protéines solubles et agrégats de protéines solubles de lait.....	<b>9</b>
1.4.1 Les protéines solubles majoritaires du lait.....	9
1.4.2 La dénaturation-agrégation de protéines solubles .....	10
1.4.3 Les agrégats de protéines solubles.....	14
<b>1.5</b> Concentration-Séchage en industrie laitière.....	<b>27</b>
1.5.1 Concentration par filtration tangentielle .....	28
1.5.2 Séchage par pulvérisation .....	30
1.5.3 Réhydratation des poudres .....	33

## 1.1 Les agents de texture utilisés dans l'industrie laitière

---

Les agents de texture sont des macromolécules ajoutées à une formulation en faible quantité (0,1 à 0,3% dans la majorité des cas et jusqu'à 15% pour la gélatine) et qui permettent de renforcer la texture du produit alimentaire considéré. Il peut s'agir d'hydrocolloïdes, tels que l'amidon ou les polysaccharides d'origine végétale (algues ou agrumes) ou d'origine fermentaire (xanthane), de protéines animales comme la gélatine ou encore de molécules amphiphiles. La fabrication de certaines catégories de produits laitiers (desserts lactés, fromages fondus ou glaces par exemple) inclut le recours fréquent à ces agents de texture.

De manière plus générale, les additifs les plus utilisés en industrie laitière sont répertoriés dans le Tableau 2. On en distingue plusieurs catégories selon leur rôle technologique :

- Les gélifiants permettent de former un gel grâce à des liaisons entre molécules conduisant à la création d'un réseau tridimensionnel.
- Les épaississants augmentent la viscosité en altérant la mobilité de l'eau sans pour autant créer de liaisons.
- Les émulsifiants limitent la séparation de phases en se plaçant à l'interface entre deux phases non miscibles comme l'eau et la matière grasse.
- Enfin, les amidons modifiés par traitement chimique, physique ou enzymatique forment une catégorie à part entière.

Au vu du Tableau 2, il existe ainsi de nombreux additifs d'origine variée mais non laitière pour répondre à diverses applications laitières. Différents critères doivent être considérés pour choisir un additif, comme la fonctionnalité souhaitée (texture épaissie, gélifiée...), le comportement du texturant dans la matrice (pH, extrait sec...), le comportement de l'additif durant le procédé (température de gélification, solubilité à froid ou à chaud...), la viscosité désirée lors du conditionnement ou encore les conditions d'utilisation et de conservation du produit (température de stockage, cuisson...). Les agents de texture peuvent agir en synergie et leur association est souvent nécessaire pour combiner les fonctionnalités et texture recherchées.

Tableau 2 : Additifs permettant de contrôler la texture, les plus fréquemment utilisés en industrie laitière

	<b>Additif</b>	<b>Code</b>	<b>Origine</b>	<b>Rôle technologique</b>	<b>Utilisation en industrie laitière</b>
Macromolécules	Amidons modifiés	E14XX	Polysaccharides issus de céréales (maïs, riz, blé), tubercules (pomme de terre) ou racine (manioc)	Epaississant	Laits gélifiés type flan au caramel, et crèmes dessert
	Alginates	E400 à E404	Polysaccharides extrait d'algue brune	Epaississant/ Gélifiant en présence de calcium	Crèmes, fromages
	Carraghénanes	E407	Polysaccharides extraits d'algues	Epaississant/ Gélifiant	Crèmes dessert, glaces, fromages fondus, suspensions de cacao des boissons lactées.
	Farine de graines de caroube et graines de guar	E410 et E412	Polysaccharides issus de l'albumen de graines de légumineuses	Epaississant	Crèmes glacées
	Gomme Xanthane	E415	Polysaccharides produits par fermentation du glucose par <i>Xanthomonas campestris</i>	Epaississant	Fromages fondus tartinables, desserts lactés
	Pectines	E440	Polysaccharides végétaux, extraits de sous-produits des jus (cidre, jus d'orange et pomme) ou huiles essentielles	Gélifiant en présence de calcium ou de saccharose selon le degré de méthylation	Crèmes pâtisseries
	Cellulose et dérivés	E460 à E466	Polysaccharides issus du bois	Epaississant résistant au traitement thermique/ Gélifiant	Boissons lactières stérilisées
Petites molécules	Diglycérides d'acide gras	E471	Glycérides obtenus par hydrolyse à partir de graisses animales ou huiles végétales	Emulsifiant	Crèmes dessert
	Lécithines	E322	Phospholipides extraits du soja ou du tournesol	Emulsifiant	Crèmes légères, crèmes glacées

## 1.2 La tendance au « clean label »

De nombreuses études sur les comportements et attitudes alimentaires des français et pays développés en général ont été menées depuis une dizaine d'années et sont unanimes sur l'évolution de la tendance de consommation vers la naturalité. Pourquoi ? parce que les inquiétudes des consommateurs en ce qui concerne l'alimentation progresse, renforcées par les différents scandales alimentaires qui ont éclaté au cours des dernières années et par la remise en cause de certaines substances chimiques dans le développement de pathologies. La recherche de la naturalité répond à ce besoin de réassurance et à la demande des consommateurs d'être mieux informés sur la composition des aliments. Dans cette optique, les consommateurs privilégient les produits dit « clean-label », c'est-à-dire des produits avec le moins d'ingrédients possible et des produits qui soient le plus naturels possible, c'est à dire sans ingrédients artificiels. La notion de naturalité est donc la tendance actuelle et devient inévitablement au cœur des problématiques des professionnels de l'agroalimentaire et des scientifiques comme l'illustre l'augmentation des publications répondant au mot clé « naturalness » et « clean label » sur le moteur de recherche de Web of Science (Figure 1A). Cette tendance se reflète naturellement dans le domaine laitier comme le montre l'augmentation de la proportion de papiers répondant au mot clé « dairy » parmi les publications répondant au mot clé « naturalness » depuis quarante ans (B).

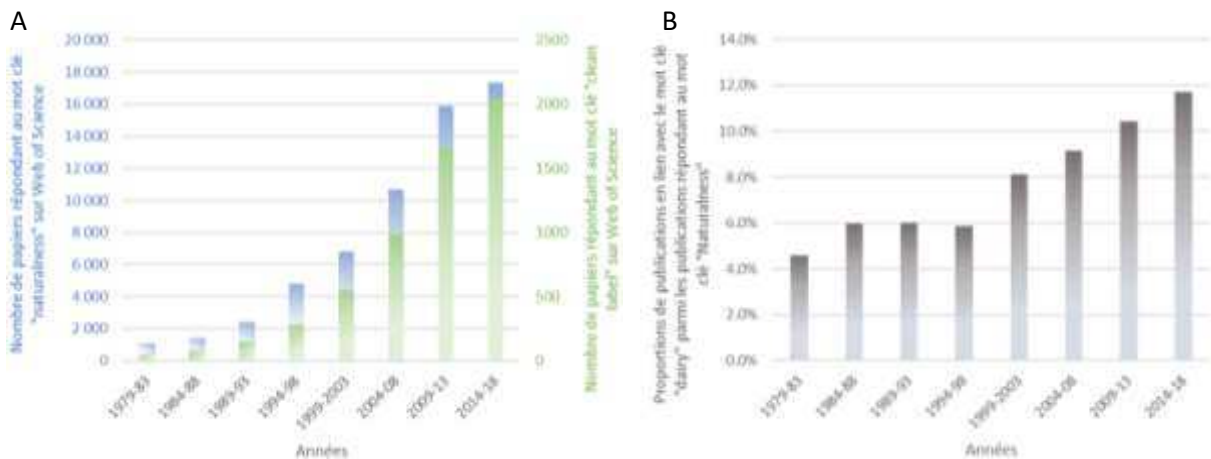


Figure 1 : Etude bibliométrique sur Web of Science. Nombre de publications répondant au mots clés "Naturalness" (bleu) et "Clean Label" (vert) (A) et proportion de publications répondant au mot clé « dairy » parmi les publications répondant au mot clé « naturalness » (B).

Bien que de nombreuses publications dans la littérature mentionnent le caractère naturel, le concept même de naturalité ne fait pas consensus et la notion même de clean label n'est pas règlementée. (Román et al., 2017) ont conduit récemment une méta-analyse regroupant les résultats de 72 études menées sur 85 000 consommateurs dans 32 pays différents et majoritairement développés pour mieux caractériser cette notion. Dans cette étude, la naturalité a pu être classée selon trois axes : comment

la matière première a-t-elle été produite, comment a-t-elle été transformée et comment se présente le produit final (Figure 2). Dans cet espace, la naturalité est entre autres définie par l'utilisation d'aliments exempts de colorants, d'arômes artificiels, de conservateurs, d'additifs, de résidus chimiques ou hormonaux ou encore de modifications génétiques. Ainsi, la réduction d'ingrédients, ou « clean label » répond à bon nombre des attentes des consommateurs. Un rapport parlementaire sur l'alimentation présenté en septembre 2019 à l'Assemblée Nationale prévoit d'ailleurs de réduire de 338 à 48 le nombre d'additifs autorisés en industrie agroalimentaire d'ici 2025. Le développement de nouveaux ingrédients de substitution « Clean Label » s'impose par conséquent comme une stratégie décisive pour les industriels.



Figure 2 : Critères d'importance de la naturalité des aliments perçus par les consommateurs. Adapté de Romàn, Sanchez-Siles et Siegrist (2017).

Comme vu précédemment, de nombreux additifs non laitiers sont utilisés en industrie laitière pour texturer les matrices et l'enjeu pour les professionnels de ce secteur est de trouver des substituts à ces additifs pour obtenir des aliments 100% laitiers. C'est dans ce cadre que de nombreuses recherches se portent aujourd'hui sur les protéines solubles laitières, et agrégats de protéines solubles au fort potentiel techno-fonctionnel.

### 1.3 Quelques éléments de physicochimie et d'économie de la filière laitière

En 2018, 23,9 milliards de litres de lait de vache ont été collectés en France, puis transformés en divers produits laitiers (par ordre décroissant : fromages et spécialités, ingrédients laitiers, laits conditionnés, yaourt et desserts lactés, crèmes conditionnées, beurre. Données : CNIEL, 2019).

D'un point de vue physicochimique, le lait bovin est un mélange complexe constitué d'eau, de lactose, de lipide, de protéines et de minéraux selon les proportions indiquées en Figure 3. Parmi les protéines, on distingue deux fractions majeures classées selon leur solubilité. Les caséines qui précipitent à pH 4,6 représentent 80% des protéines totales du lait bovin et sont majoritairement présentes sous forme de micelles dont le diamètre varie de 30 à 600 nm, avec une valeur moyenne de 200 nm (McGann et al., 1980). A l'inverse, les protéines solubles (PS) qui restent solubles à pH 4,6 sont principalement constituées de  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ lg : 60%), d' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ la : 22%), d'immunoglobulines (Ig : 9.1%) et de Bovine Serum Albumine (BSA : 5.5%).

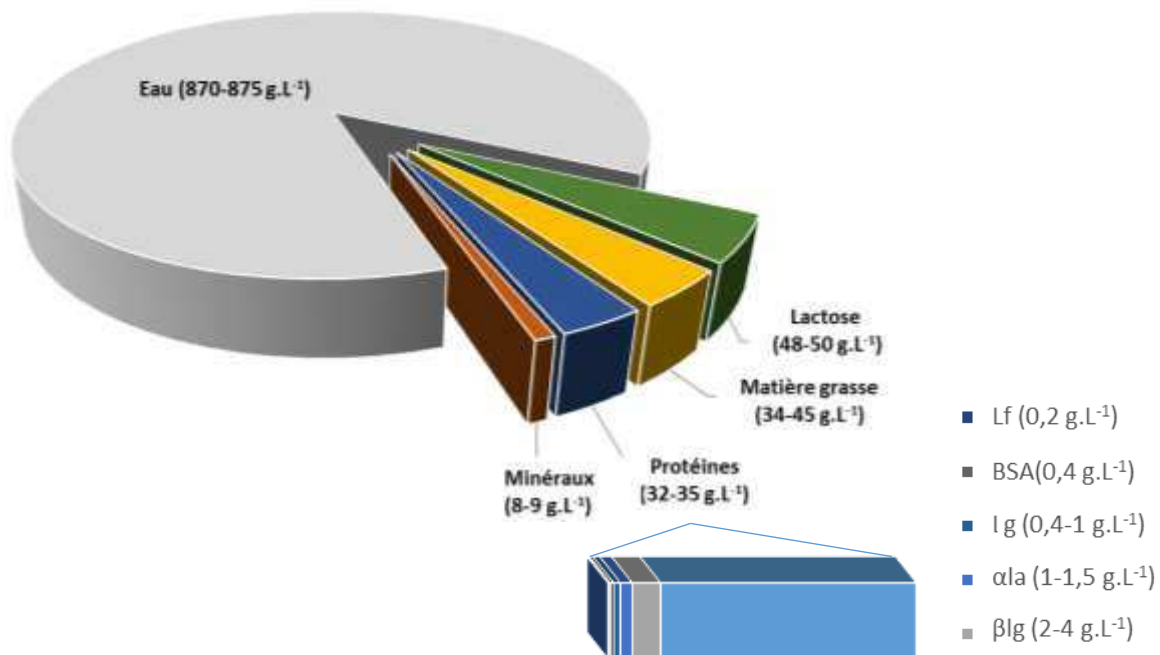


Figure 3 : Composition du lait bovin. Adapté de Wong et al. (1988).

A partir des différents constituants du lait, il est possible de former divers ingrédients dont la place grandissante dans la filière laitière est en partie due aux progrès scientifiques et technologiques dans le domaine.

A partir des années 1970, le développement des techniques membranaires (ultrafiltration, microfiltration...) a permis d'envisager le « cracking » du lait et du lactosérum et la concentration sélective de protéines, de lactose, de minéraux. Cette première approche a conduit à des ingrédients



qui étaient extrêmement purifiés et chers à produire (par exemple la  $\beta$ Ig). Elle a ensuite conduit dans un deuxième temps l'industrie à concevoir une nouvelle génération d'ingrédients laitiers mieux adaptés au marché (Figure 4), tant en termes de volumes que de rapport coût/bénéfice au vu de leurs propriétés techno-fonctionnelles (texturantes, émulsifiantes, organoleptiques) et nutritionnelles (nutrition infantile, sportive ou à destination des séniors) qui les rendent aujourd'hui incontournables dans de nombreuses applications alimentaires. Dans ce schéma, il est intéressant de noter que des co-produits (lactosérum, babeurre) valorisés aujourd'hui pour des raisons économiques et environnementales sont ainsi devenus des produits à haute valeur ajoutée (Smithers, 2015, 2008).

Il est ainsi possible d'isoler les protéines solubles du lait et de les sécher pour former un ingrédient appelé isolat de PS ou Whey Protein Isolate (WPI ; Figure 4). Plusieurs étapes sont nécessaires : La première consiste à écrémer un lait préalablement standardisé pour enlever la matière grasse présente. Le lait écrémé est ensuite microfiltré à  $0,1\mu\text{m}$  afin d'éliminer les caséines qui sont retenues dans le perméat. Afin de déminéraliser et délactoser le microfiltrat tout en accroissant la teneur en protéines, une ultrafiltration est effectuée ; elle peut être complétée par une étape de diafiltration pour amener les concentrations en lactose et minéraux à des valeurs inférieures à 5% w/w, à l'exception de sels tel le calcium qui est associé aux protéines négativement chargées. Les PS sont soit

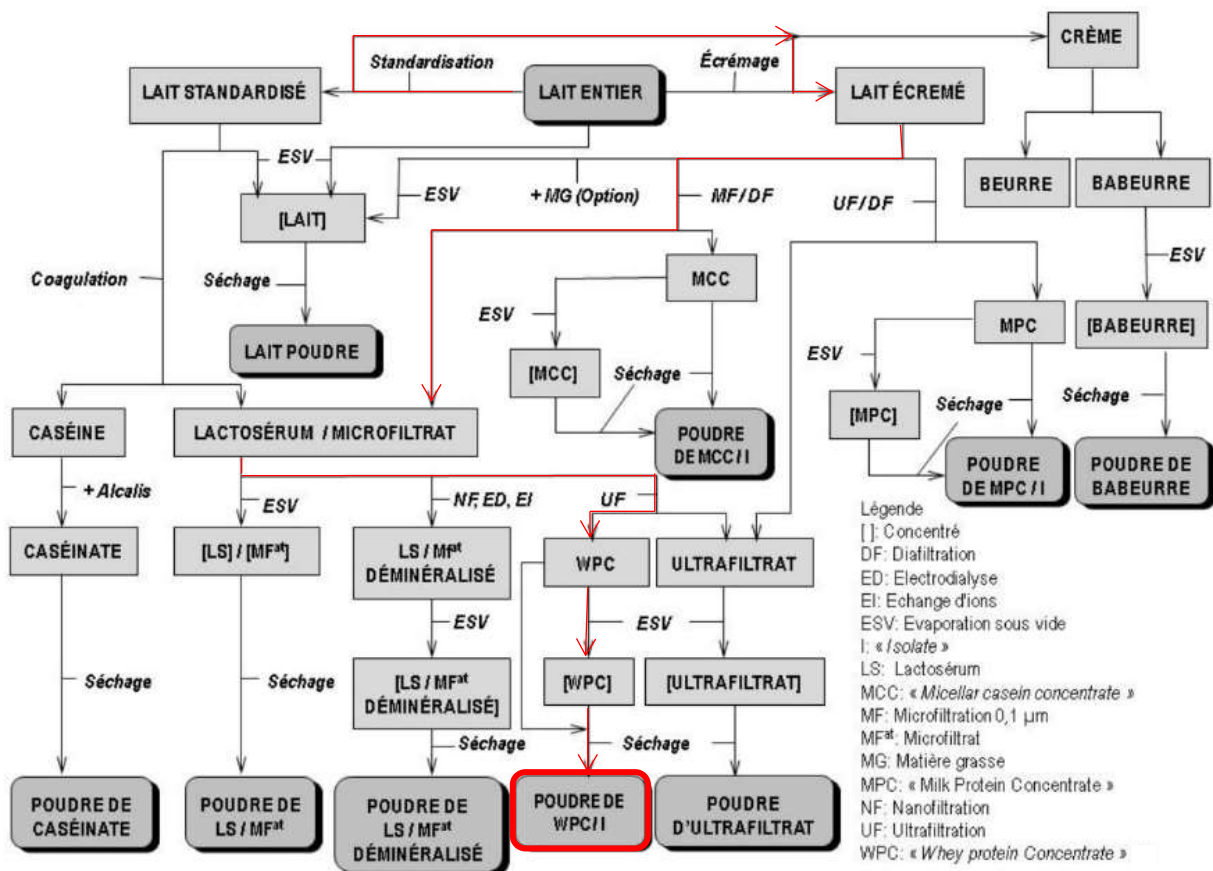


Figure 4 : Cracking du lait. En rouge, étapes nécessaires pour former un isolat de protéines solubles à partir d'un lait standardisé. Adapté de Schuck (2002).

concentrées à 25-30 % lors de cette étape d'UF, soit concentrées à posteriori par évaporation sous vide. Elles sont ensuite séchées par atomisation pour obtenir des poudres de WPI avec une teneur minimale en protéines de 90%.

Le domaine des ingrédients laitiers est source d'innovation constante et l'un des défis scientifiques actuels est d'explorer les capacités des assemblages protéiques. En effet les protéines laitières sont capables de s'assembler et peuvent ainsi répondre à de multiples applications potentielles (Nicolai and Durand, 2013), en substituant ainsi certains agents texturant non laitiers.

## 1.4 Les protéines solubles et agrégats de protéines solubles de lait

---

### 1.4.1 Les protéines solubles majoritaires du lait

#### 1.4.1.1 La $\beta$ -lactoglobuline

La  $\beta$ -lactoglobuline (notée  $\beta$ lg) est la protéine soluble majeure du lait bovin, présente de 2 à 4 g.L<sup>-1</sup>. Constituée de 162 acides aminés, elle a une masse moléculaire de 18,3kDa et un point isoélectrique autour de 5,2. Elle se présente sous forme de monomère, dimère ou encore d'octomère selon le pH, la force ionique et/ou la température. A pH neutre, elle est sous forme dimérique (Gaucheron, 2004), les deux monomères étant maintenus entre eux par des interactions non-covalentes. La  $\beta$ lg possède 5 résidus cystéines dont 4 sont impliqués dans des ponts disulfures (S-S). La fonction thiol libre (-SH) de la cystéine qui n'est pas impliquée dans une liaison disulfure se situe dans le cœur hydrophobe de la protéine : elle n'est donc pas accessible à l'état natif, mais le devient quand la protéine se déplie à l'état dénaturé (*molten globule*). La  $\beta$ lg se dénature progressivement à partir de 60°C et plus (Chen and Dickinson, 1998).

#### 1.4.1.2 L' $\alpha$ -lactalbumine

L' $\alpha$ -lactalbumine (notée  $\alpha$ la) est la deuxième protéine soluble majeure du lait bovin, présente de 1 à 1,5 g.L<sup>-1</sup>. Constituée de 123 acides aminés, elle a un poids moléculaire de 14,2 kDa et un point isoélectrique se situant entre 4,2 et 4,5 selon Farrell et al. (2004) et entre 4,8 et 5,1 selon Bryant et McClements (1998). L' $\alpha$ la est sous forme monomérique et possède 8 résidus cystéines, tous impliqués dans des liaisons disulfures : elle n'a donc pas de thiol libre. Sa température de dénaturation réversible est de 62°C et sa dénaturation devient irréversible à 80°C (Bryant and McClements, 1998; Cayot and Lorient, 1998) : au-delà de cette température, un ou plusieurs des ponts disulfures présents se rompent, conduisant à la formation d'un groupement -SH libre très réactif.

### 1.4.2 Les mécanismes de dénaturation-agrégation de protéines solubles

Sous l'effet d'un traitement thermique supérieur à leur température de dénaturation, les liaisons de faible énergie se rompent entraînant une modification des structures quaternaire, tertiaire et secondaire des protéines, appelée dénaturation. Ce phénomène rend accessibles les acides aminés hydrophobes et/ou groupements sulfhydriles (-SH) des protéines dénaturées, entre lesquelles des interactions peuvent ainsi se créer jusqu'à leur agrégation. De nombreuses études ont été menées sur la réaction de dépliement-agrégation de la  $\beta$ lg particulièrement (Apenten et al., 2002; Considine et al., 2007; Croguennec et al., 2004; Mehalebi et al., 2008; Nicolai et al., 2011; Tolkach and Kulozik, 2007), conduisant à proposer un mécanisme en 4 étapes (Figure 5) :

- 1) Dissociation. Les dimères de  $\beta$ lg se dissocient en monomères sous l'effet du traitement thermique.
- 2) Dénaturation. La protéine se déplie et expose ses groupements -SH libres ainsi que ses résidus hydrophobes : elle devient réactive.
- 3) Agrégation. Via des réactions d'échange -SH/S-S et/ou interactions non covalentes, des oligomères sont produits à partir des monomères réactifs avec la création de liaisons disulfures ou non-covalentes. Les températures comprises entre 65 et 85°C favorisent les interactions non-covalentes tandis qu'au-delà de 85°C, les échanges S-S/-SH sont favorisés.
- 4) Polymérisation. Les oligomères produits vont s'associer via des interactions covalentes et non covalentes pour former des agrégats de plus haut poids moléculaire (agrégats primaires voire agrégats secondaires selon des conditions qui seront détaillées au paragraphe 1.4.3) pouvant conduire jusqu'à la gélification.

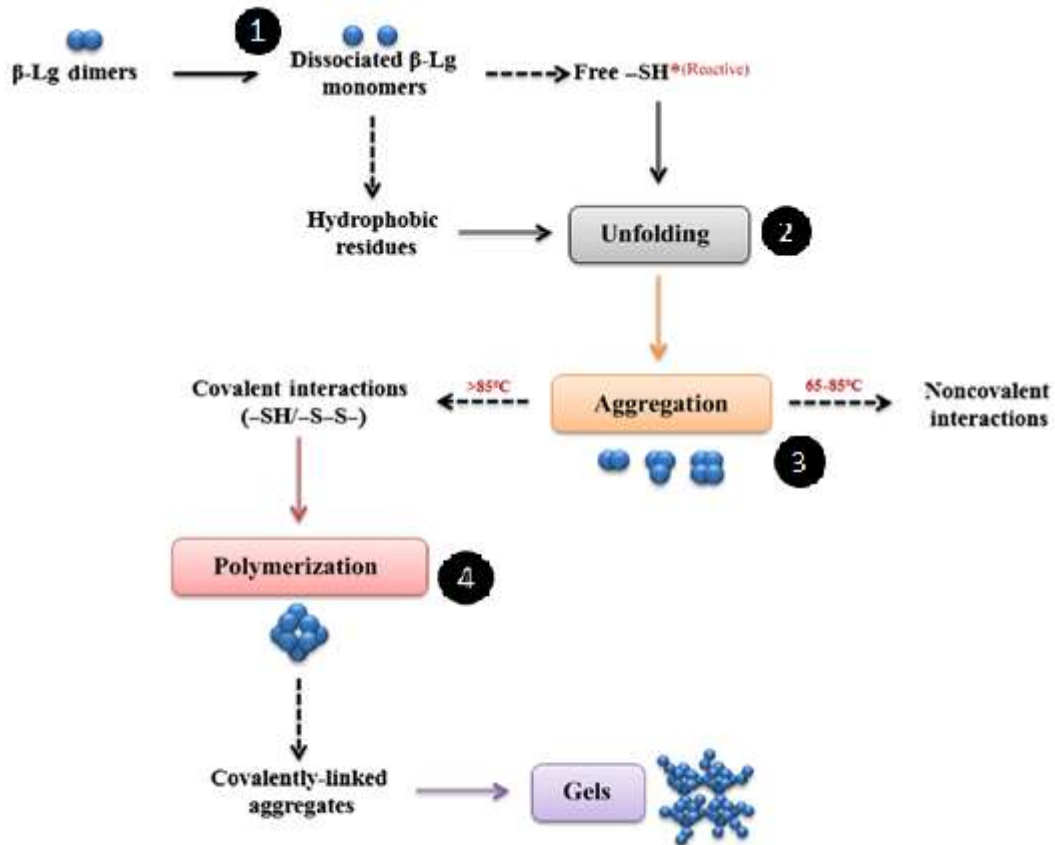


Figure 5 : Mécanisme en 4 étapes de dissociation-dénaturation-agrégation-polymérisation de la βlg. Adapté de Wijayanti et al. (2019).

L'agrégation de l'αla suit une voie similaire à celle de la βlg en terme d'initiation et de propagation une fois un -SH libre relargué.

L'agrégation de protéines peut se faire aussi bien à partir de protéines purifiées, qu'à partir de mélange de PS, type WPI. Dans ce dernier cas, le mécanisme de formation des agrégats est gouverné par la βlg, protéine majoritaire. La dénaturation-agrégation est complexe et les étapes 2, 3 et 4 dépendent fortement des propriétés moléculaires de la protéine, elles-mêmes influencées par les conditions de température, concentration, force ionique et pH.

Les étapes 2 et 3 du mécanisme correspondant à la dénaturation-agrégation des protéines sont influencées par la température, par le pH et par la concentration en NaCl. L'influence de chacun des paramètres est détaillée ci-après.

La quatrième étape de polymérisation conduit à l'obtention d'agrégats de protéines dont la morphologie dépend de la densité de charge négative de la protéine, elle-même influencée par le pH mais aussi par la présence d'ions notamment divalents. La taille et la stabilité des agrégats vont

également être impactées par la concentration en protéine et en sel . Nous étudierons plus en détail les agrégats de protéines solubles de type microgels et fractals dans la partie suivante.

#### 1.4.2.1 Influence de la température

La température joue un rôle majeur dans la dénaturation et l'agrégation des protéines comme le montrent les températures critiques de dénaturation réversible et irréversible de la  $\beta$ lg et de l'ala citées plus haut. Effectivement, à faible température la protéine native se déplie puis se replie au refroidissement, mais à température plus élevée, une agrégation des espèces dépliées a lieu et la protéine ne peut pas retrouver son état natif au refroidissement. Les cinétiques de dépliement et d'agrégation peuvent être décrites selon l'équation (1) utilisée par Tolkach et Kulozik (2007) et représentées à l'aide du graphe d'Arrhénius (Figure 6) :

$$\ln k_n = n \ln \alpha + \ln k_{agg} \quad (1)$$

Avec  $\alpha$  la fraction de protéines partiellement et réversiblement dénaturées,  $k_{agg}$  la constante de vitesse d'agrégation, et  $k_n$  la constante de vitesse telle que :

$$C_t = C_0 \cdot e^{-knt} \quad (2)$$

Avec  $C_t$  et  $C_0$ , les concentrations en protéines natives aux temps  $t$  et  $t=0$  respectivement.

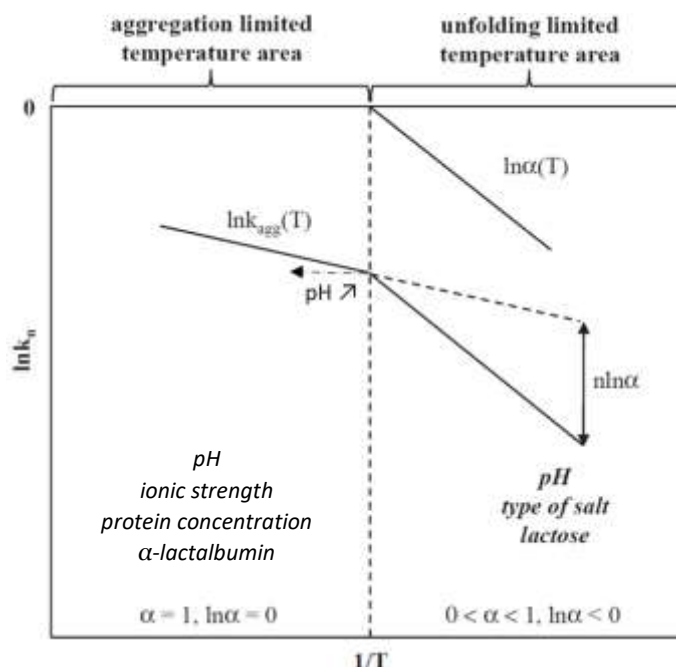


Figure 6 : Représentation d'Arrhénius. Adapté de Tolkach et Kulozik (2007).

La fraction de protéines dénaturées  $\alpha$  (%) augmente avec la température jusqu'à une température critique à laquelle  $\alpha = 1$ , c'est-à-dire  $\ln \alpha = 0$  et donc  $\ln K_n = \ln k_{agg}$ , expliquant le changement de pente

observée sur le graphe d'Arrhénius. Cette température critique est de l'ordre de 80°C à pH 6,8 pour une solution contenant 53,3 g.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ lg et 264 mg.kg<sup>-1</sup> de calcium (Petit et al., 2011). Le changement brutal d'énergie d'activation qui l'accompagne caractérise la transition entre une réaction à faible température dans laquelle il faut apporter beaucoup d'énergie pour déplier la protéine et activer les groupes thiols (dépliage limitant), et une réaction à température plus élevée où les protéines sont complètement dépliées et où une énergie plus faible est nécessaire pour provoquer l'aggrégation, qui est de fait limitante par rapport à la dénaturation.

#### 1.4.2.2 Influence du pH

Selon la température à laquelle on se place, le pH n'a pas la même influence sur le taux de dénaturation des protéines (Figure 7). Ainsi, Hoffmann et van Mil (1999) observent une augmentation du taux de dénaturation en augmentant le pH de 6,0 à 8,0 en se plaçant à 65°C. Verheul et Roefs (1998) font les mêmes observations en se plaçant à 65 et 68,5°C ; en revanche, ils observent une vitesse constante avec l'augmentation du pH en se plaçant à 75°C. Zúñiga et al. (2010) rapportent même une légère diminution du taux de dépliage avec l'augmentation du pH de 6,0 à 6,8 en se plaçant à 80°C. Donato et al. (2009) observent de manière concordante une diminution du taux de dénaturation de pH de 5,7 à 7,0 en se plaçant à 85°C, alors que ce taux augmente sur la même gamme de pH à 70°C.

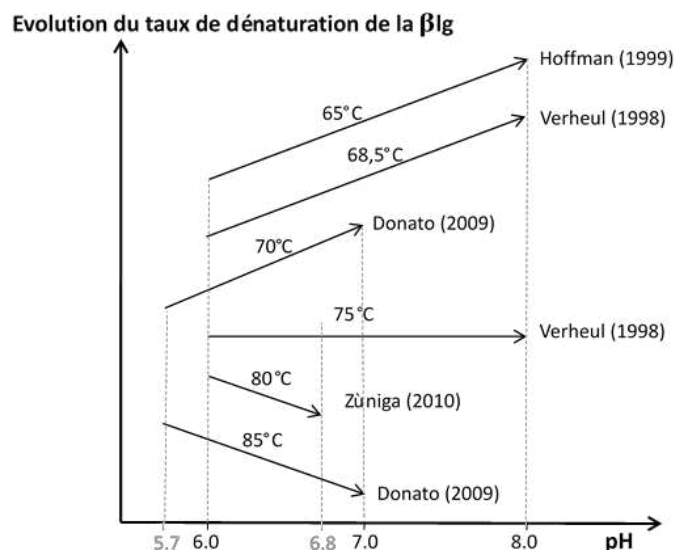


Figure 7 : Impact de l'augmentation du pH sur le taux de dénaturation de la  $\beta$ lg en fonction de la température de travail.

Enfin, la température de transition entre la réaction où la dénaturation est limitante et la réaction où l'aggrégation est limitante augmente avec le pH (pH  $\nearrow$  ; Figure 6). Ainsi, Tolkach et Kulozik (2005)

observent un changement de pente à 86°C en se plaçant à pH 3,0 tandis que ce même changement a lieu à 105°C en se plaçant à pH 8,0.

#### 1.4.2.3 Influence de la force ionique

Le taux de dénaturation des protéines dépend également de la force ionique et donc de la quantité de sel ( $\text{CaCl}_2$  ou  $\text{NaCl}$ ) ajouté. Unterhaslberger (2004) observe ainsi un taux de dénaturation maximum en fonction de la quantité de  $\text{NaCl}$  ajouté (Figure 8), autour de 150 mM. L'effet du  $\text{CaCl}_2$  est plus important que le  $\text{NaCl}$  (Croguennec et al., 2004). Petit et al (2011) montrent que l'augmentation de la concentration en calcium améliore les cinétiques de dépliement et d'agrégation de la  $\beta\text{lg}$  (Figure 9) en interagissant spécifiquement avec la  $\beta\text{lg}$  via des ponts calciques et/ou interactions conformationnelles.

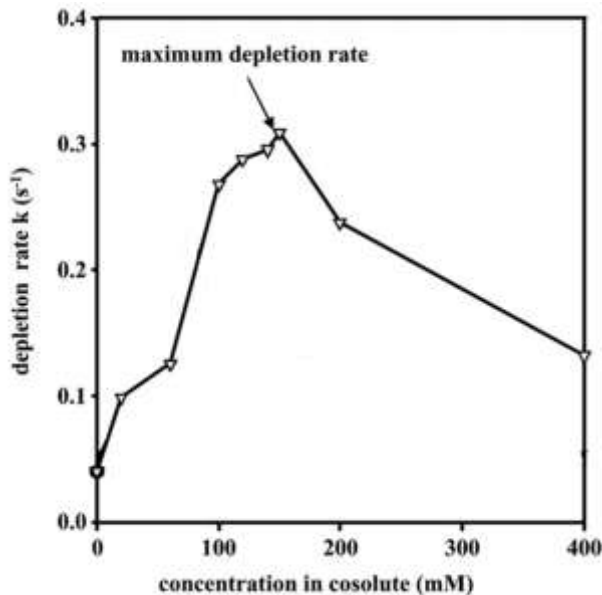


Figure 8 : Evolution du taux de dénaturation de  $\beta\text{lg}$  en fonction de la concentration en  $\text{NaCl}$  après chauffage à 80°C d'une solution de  $\beta\text{lg}$  à 10 g.L<sup>-1</sup> à pH 7,0. Adapté de Unterhaslberger (2004).

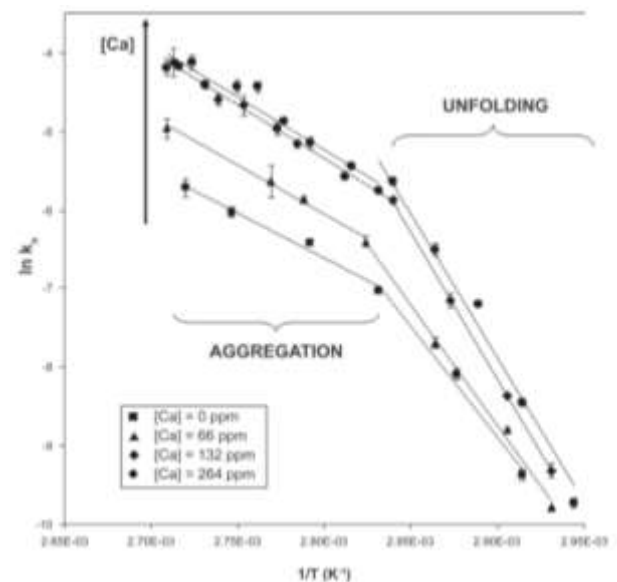


Figure 9 : Influence de la concentration en calcium sur la constante de vitesse de dépliement et d'agrégation de la  $\beta\text{lg}$ . (Petit et al 2011).

#### 1.4.3 Les agrégats de protéines solubles

Si les propriétés fonctionnelles des PS sont connues depuis longtemps et que ces dernières sont couramment utilisées dans les produits alimentaires, ce n'est que récemment que des agrégats de PS ont été conçus dans le but d'explorer de nouvelles fonctionnalités (production de gel, stabilisation d'émulsion, encapsulation...) et d'étendre l'utilisation des protéines lactières (Mahmoudi et al., 2011; Nicolai and Durand, 2013).

En fonction des conditions de répulsions électrostatiques, la structure des agrégats formés ainsi que leur concentration limite de gélification  $C_g$  varient (Mahmoudi et al., 2007; Nicolai et al., 2011; Schmitt



et al., 2009). Ainsi, lorsque le pH est en dessous du point isoélectrique (pI) des protéines, celles-ci sont chargées positivement et les fortes répulsions électrostatiques intermoléculaires les poussent à s'assembler plutôt en bâtonnets (ou fibrille) (Jung et al., 2008). Quand le pH est proche du pI, les protéines sont peu chargées et l'agrégation est favorisée sous forme d'agrégats sphériques et denses appelés microgels. Enfin, quand le pH est de l'ordre de 7 et que les protéines sont chargées négativement, les répulsions électrostatiques sont très fortes, (densité de charges négatives élevée) et elles s'assemblent sous forme d'agrégats fractals. Ces modalités d'agrégation en voie liquide diffèrent fondamentalement de celles conduisant à l'obtention d'agrégats microniques (AMIs), formés à pH 9,5 après étuvage en voie sèche (Schong and Famelart, 2018)).

Ces différents agrégats ont été obtenus à l'échelle laboratoire (Chevallier et al., 2016a; Jung et al., 2008; Kharlamova et al., 2016; Loiseleux et al., 2018; Nicolai et al., 2011; Schong and Famelart, 2018) et sont présentés en Figure 10.

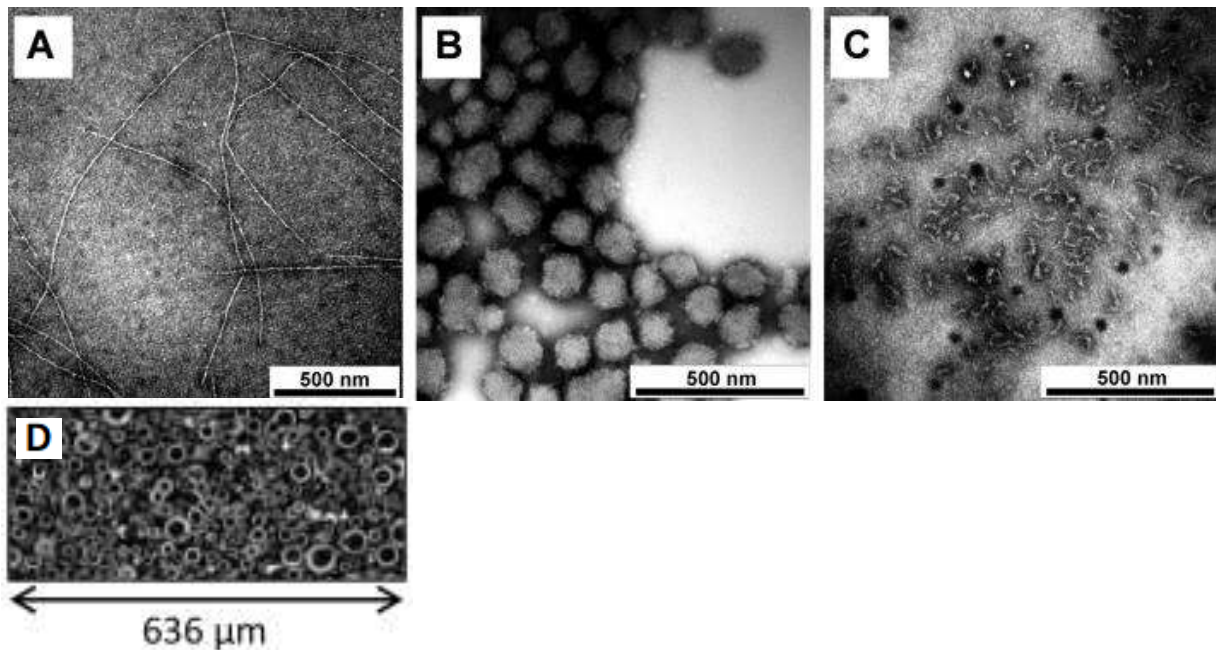


Figure 10 : Observation microscopique de différents agrégats de  $\beta$ lg. Observation TEM de fibrilles (A), microgels (B) fractals (C) (Jung et al., 2008). Observation confocale d'agrégats microniques AMIs (D) (Schong et Famelart., 2018).

Dans cette étude bibliographique nous rentrerons plus particulièrement en détail sur les agrégats de type microgels et fractals.

### 1.4.3.1 Les microgels

#### 1.4.3.1.1 Formation

La formation des assemblages microgels est un processus en plusieurs étapes. Après que des oligomères de protéines aient été formés (étape 3, Figure 5), ceux-ci vont s'assembler dans un premier



temps via des liaisons hydrogène, hydrophobes, et disulfure pour former de petits agrégats primaires, de forme sphérique ( $R_h = 150\text{nm}$ ) et très denses appelés microgels (Nicolai et al., 2011; Schmitt et al., 2010). Cette forme particulière d'agrégats n'est obtenue que dans des conditions de faibles répulsions électrostatiques : il faut que la charge nette de la protéine soit environ de -5 pour former des microgels (Phan-Xuan et al., 2014). A titre indicatif, la charge nette de la  $\beta\text{lg}$  dans de l'eau milliQ est de -7 (McKenzie, 1971). Pour diminuer la charge négative de la protéine, il faut soit ajouter des protons en diminuant par exemple le pH proche du pI (Donato et al., 2009), soit ajouter des ions divalents comme  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  qui pontent spécifiquement les protéines (Phan-Xuan et al., 2014). Les ions monovalents tels que le NaCl ne peuvent qu'écranter les charges de la protéine sans s'y fixer, ce qui n'est pas suffisant pour induire une diminution de leur charge négative. On peut également jouer sur les deux paramètres en même temps et faire varier le ratio  $R = [\text{Ca}^{2+}]/[\beta\text{lg}]$  en fonction du pH de la solution. Ainsi, Phan-Xuan et al. (2013) montrent que pour former des microgels, il faut au moins se placer à  $R = 2,5$  à pH 7,5 et à  $R = 1$  à pH 6,5 (Figure 11). Quel que soit le levier utilisé, il est crucial de maîtriser le taux de calcium présent dans la matière première (WPI par exemple).

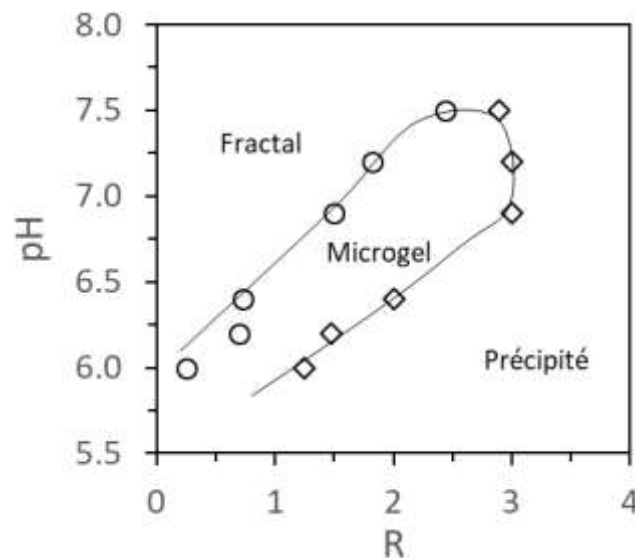


Figure 11 : Zone de formation des agrégats fractals et microgels en fonction des conditions de pH et ratio  $R = [\text{Calcium}]/[\beta\text{lg}]$  à une concentration de  $60\text{ g.L}^{-1}$ . Les ronds représentent le ratio  $R$  limite en-dessous duquel des microgels sont formés, les losanges représentent le ratio limite  $R$  en-dessous duquel un précipité apparaît. La ligne continue est un guide pour les yeux. Adapté de Phan Xuan (2004).

Dans un deuxième temps et si la charge nette de la protéine est de l'ordre de -2 (Phan-Xuan et al., 2014) et que la concentration en protéines est élevée (Mehalebi et al., 2008), les agrégats primaires peuvent s'associer entre eux ou avec de nouvelles protéines dénaturées pour former des microgels de plus grande taille et de densité équivalente. L'agrégation secondaire des microgels peut aller jusqu'à une gélification ou une précipitation des agrégats.

La taille des microgels augmente avec la concentration en protéines jusqu'à une concentration limite de gélification  $C_g$ . Cette  $C_g$  ainsi que la taille des agrégats peuvent également être modulées par le pH (Donato et al., 2009; Mehalebi et al., 2008; Schmitt et al., 2009) (Figure 12), par le temps de traitement thermique et la température. Donato et al. (2009) montrent ainsi que les agrégats les plus grands sont formés après traitement thermique d'1h à 85°C.

D'après Mehalebi, Nicolai et Durand (2008), il est très difficile de former des agrégats stables dans la gamme de pH de 4,5 à 5,7 étant donné qu'ils précipitent à très faible concentration.

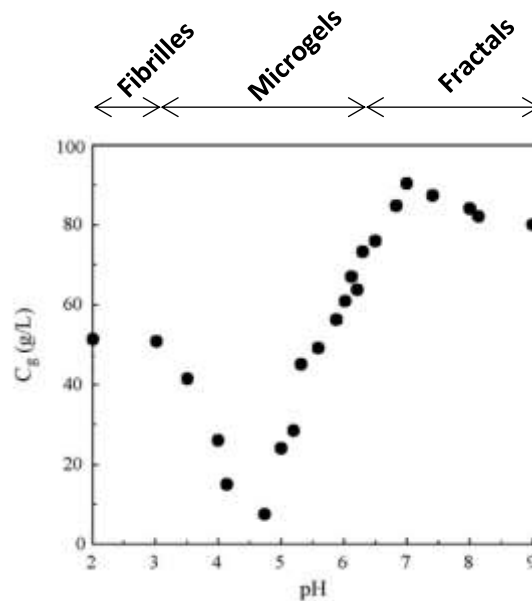


Figure 12 : Diagramme d'état sol-gel de solutions de  $\beta$ lg après traitement thermique. Adapté de Mehalebi (2008).

Au cours de leur formation, les microgels internalisent les charges positives (ions  $\text{H}^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ ) au sein de l'agrégat pour neutraliser les charges négatives des protéines qui les constituent et tendre ainsi vers plus de stabilité. Effectivement, les microgels sont très stables et inertes une fois formés. L'internalisation des charges positives dans l'agrégat a pour conséquence d'augmenter la charge négative des protéines natives en solution ainsi que celle des protéines de surface de l'agrégat, permettant une stabilisation de l'ensemble par des répulsions électrostatiques.

Des conditions de répulsions électrostatiques élevées sont défavorables à la formation de nouveaux microgels et au contraire favorables à la formation d'agrégats fractals primaires (Phan-Xuan et al., 2011), comme cela sera discuté plus en détail ci-après. Ainsi c'est souvent un mélange d'agrégats microgels et fractals qui est formé. Si l'on stabilise la charge nette de la solution par ajout de petites quantités de HCl par exemple dans le but de ne former que des microgels, alors ceux-ci précipitent (Phan-Xuan et al., 2011).

### 1.4.3.2 Les fractals

#### 1.4.3.2.1 Formation

Contrairement aux microgels, les agrégats fractals sont formés dans des conditions de fortes répulsions électrostatiques entre protéines à densité de charge négatives élevée. Les agrégats fractals sont formés en plusieurs étapes selon un processus schématisé sur la Figure 13.

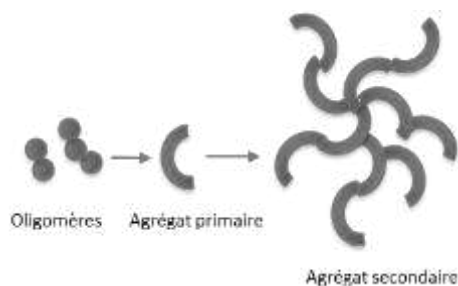


Figure 13 : Représentation schématique du processus de formation des agrégats fractals. Adapté de Nicolai, Britten et Schmitt (2011).

Une fois des oligomères formés en concentration suffisante de manière similaire à l'étape 3 précédente (Figure 5) et dans des conditions de  $\text{pH} > \text{pI}$ , des agrégats fractals de petite taille (60 nm) et de forme incurvée, appelés « agrégats primaires », sont formés (Nicolai et Schmitt, 2011). La concentration critique en oligomères permettant la formation d'agrégats fractals primaires est d'autant plus basse que le pH est proche du pI et que la force ionique de la solution est élevée.

Dans des conditions de concentration élevée en protéines et/ou de répulsions électrostatiques réduites, les agrégats fractals primaires réactifs s'assembleraient ensuite en agrégats fractals « secondaires » de forme ramifiée. Ces agrégats fractals secondaires seraient maintenus par des liaisons de type hydrophobes, hydrogène, et disulfure ; des forces électrostatiques participeraient également au maintien de la structure de ces agrégats.

La taille et la masse molaire des agrégats fractals ainsi formés augmentent de façon exponentielle avec la concentration en protéines jusqu'à la  $C_g$  (Figure 14) qui dépend également du pH comme nous venons de le voir (Figure 12).

La présence de NaCl contribue également à former des agrégats de plus grande taille : Mahmoudi et al. (2007) observent ainsi une diminution de la  $C_g$  en présence de NaCl (Figure 15).

Il a également été observé que plus la taille des agrégats fractals augmente, et plus leur densité diminue. La structure ouverte des agrégats fractals leur donne un certain degré de flexibilité et la capacité à s'interpénétrer (Nzé et al., 2015). Ce point est crucial dans la perspective ultérieure de concentrer des agrégats fractals en vue de leur donner un statut d'ingrédient, ce type d'interaction étant favorisé à plus haute fraction volumique.

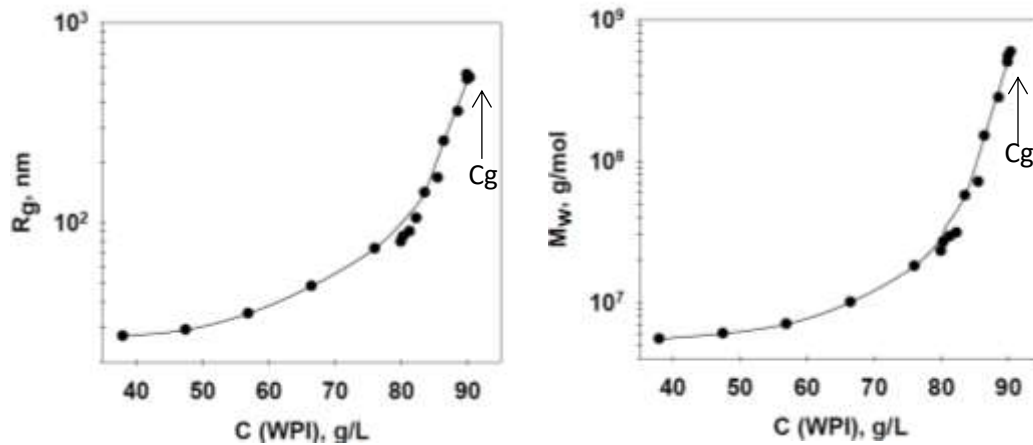


Figure 14 : Influence de la concentration en protéines sur la taille et la masse molaire des agrégats fractals. Adapté Kharlamova (2017).

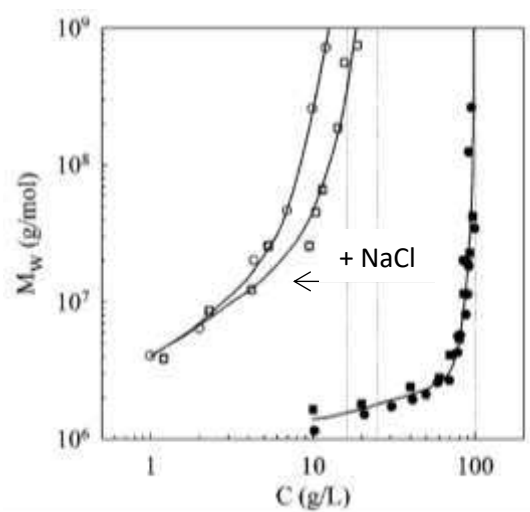


Figure 15 : Masse molaire en fonction de la concentration en WPI (carrés) ou  $\beta$ lg (ronds) formés en présence de 0.1M NaCl (blancs) ou en absence de sel (noirs). Adapté de Mahmoudi et al. (2007).

### 1.4.3.3 Propriétés et application des microgels et fractals

#### 1.4.3.3.1 Propriétés viscosifiantes

Les agrégats fractals, contrairement aux microgels très denses, sont des agrégats à structure d'autant plus ouverte et à densité d'autant plus faibles qu'ils sont de grande taille. Ceci implique qu'à même

concentration en protéines, les agrégats fractals de grande taille occupent plus d'espace que les petits agrégats fractals, qui eux même occupent plus d'espace que les microgels (Baussay et al., 2004; Inthavong et al., 2016; Nzé et al., 2015). Cette capacité à occuper l'espace s'accompagne d'une augmentation de la viscosité des solutions. Ainsi, Inthavong et al. (2016) comparent à concentration équivalente, la viscosité induite par des  $\beta$ lg natives, des microgels et des fractals de plus ou moins grande taille (Figure 16). Ils montrent que les agrégats fractals de grande taille induisent une augmentation de viscosité plus importante que les fractals de petite taille, que les microgels et que les  $\beta$ lg natives. Ainsi, les agrégats fractals de grande taille sont de bons candidats pour renforcer la viscosité des produits laitiers. Au contraire, les microgels qui n'induisent qu'une faible augmentation de la viscosité pourraient être utilisés dans des produits liquides pour augmenter la teneur en protéines sans augmenter la viscosité (produit à destination des sportifs, séniors...). L'utilisation de  $\beta$ lg native est limitée du fait de son instabilité à la chaleur.

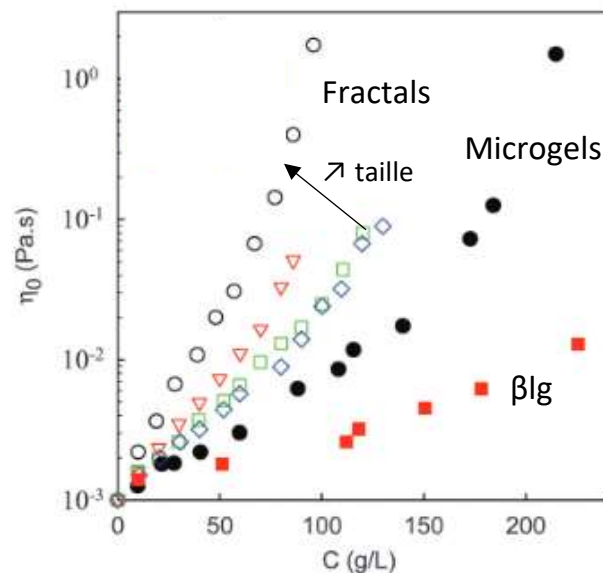


Figure 16 : Viscosité en fonction de la concentration en agrégats fractals (symboles ouverts), en microgels (ronds noirs) et en  $\beta$ lg (carrés rouges). Adapté de Inthavong (2016).

#### 1.4.3.3.2 Capacité à former des gels

La gélification à froid a été étudiée pour les agrégats fractals et microgels par Donato et al (2011), Kharlamova et al (2018a; 2018b). La gélification à froid consiste à diminuer les répulsions électrostatiques entre les agrégats soit en ajoutant du calcium ( $\text{CaCl}_2$ ), soit en diminuant le pH (ajout de HCl). La capacité de gélifier à froid est importante pour certaines applications alimentaires (produit frais, préservation des vitamines qui pourraient être dénaturées à chaud, etc...). Pour comparer la capacité des agrégats à gélifier à froid, plusieurs paramètres sont mesurés : la rigidité du gel, la rétention d'eau (absence de synérèse), l'homogénéité du gel. Nous avons déjà vu que les microgels

étaient moins denses que les fractals, et qu'il leur fallait donc plus de protéines pour former un réseau qui occupe le même espace. Ceci a un impact sur leur capacité à gélifier à froid. Ainsi, Kharlamova et al (2018a) ont montré qu'à concentration en protéines équivalente, les gels formés avec des microgels étaient moins forts que les gels formés à partir de fractals, et qu'ils étaient plus hétérogènes (Figure 17). Différents paramètres participent également à la rigidité du gel comme le nombre de jonction présentes, la longueur des branchements entre jonctions, la capacité des agrégats à coller les objets présents, et enfin la rigidité inter-agrégats.

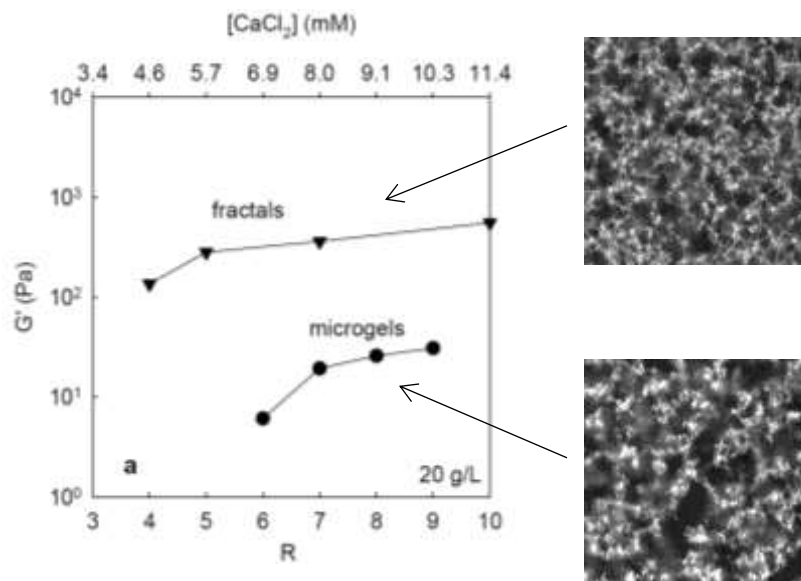


Figure 17 :  $G'$  en fonction du ratio  $R = [\text{Calcium}]/[\text{Protéine}]$  et en fonction de la concentration en calcium. Images de microscopie confocale à balayage laser de gels formés à partir d'agrégats fractals ou microgels. Adapté de Kharlamova (2018).

Ces mêmes auteurs ont également montré que, quelle que soit la taille initiale des agrégats fractals, le gel finalement formé a toujours la même force. La synérèse (fragilisation du gel avec apparition de poches de sérum) en revanche apparaît davantage pour les gels formés à partir d'agrégats de grande taille que pour les gels formés à partir d'agrégats fractals de petite taille (Figure 18) : les auteurs n'expliquent pas ce phénomène, hormis l'hypothèse de subtiles différences d'organisation du réseau et d'élasticité des structures.

Ainsi, les agrégats fractals ont une capacité plus importante à former un gel que les agrégats microgels. De plus les agrégats fractals de petite taille ont la capacité à former un gel qui retient plus d'eau et est moins sujet à la synérèse, démontrant leur potentialité d'ingrédient texturant.

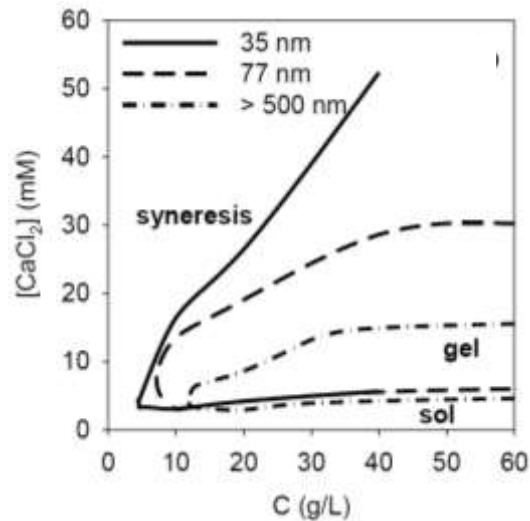


Figure 18 : Impact de la taille des agrégats fractals sur le diagramme d'état. (Kharlamova et al., 2018b).

#### 1.4.3.3 Capacité à texturer et stabiliser des émulsions

##### Texturation d'émulsion

Les émulsions de type huile dans eau sont constituées de trois zones aux propriétés physicochimiques différentes. Tout d'abord, la phase dispersée correspond aux gouttelettes de matière grasse dispersées dans la phase continue, elle-même correspondant à la partie aqueuse de l'émulsion. Enfin l'interface correspond à la surface des gouttelettes couverte d'émulsifiants, c'est-à-dire de molécules amphiphiles.

Par nature, les émulsions sont intrinsèquement instables. Des phénomènes de floculation, coalescence ou séparation de phase peuvent avoir lieu (Figure 19) conduisant à un état thermodynamiquement plus stable pour lequel les deux phases seront séparées par une interface minimale.

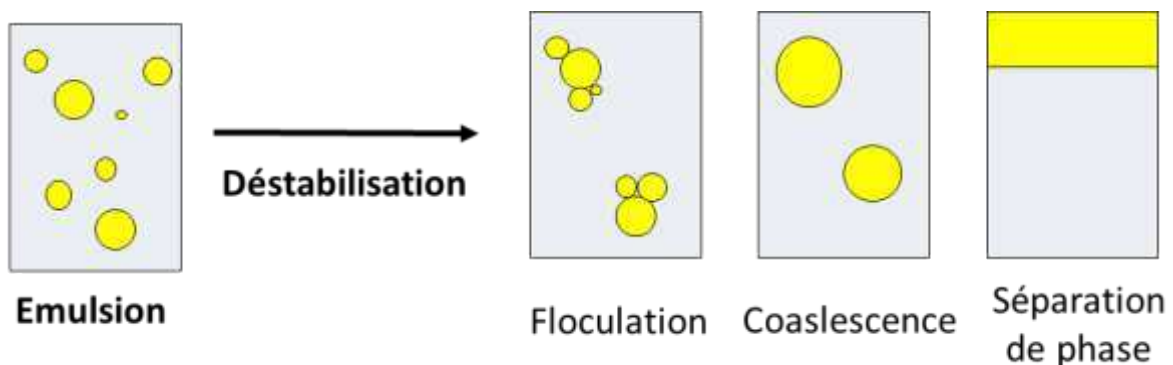


Figure 19 : Représentation schématique des phénomènes de déstabilisation d'émulsion par floculation, coalescence et séparation de phase

Il existe différents moyens de stabiliser une émulsion, en agissant à différentes échelles (Moussier et al., 2019).

A l'échelle de l'interface, l'augmentation de l'épaisseur du film interfacial (de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres), mais également l'augmentation de sa viscoélasticité par des émulsifiants de type protéines (McClements et al., 2005) vont augmenter la stabilité de l'émulsion.

A l'échelle de l'émulsion, le réseau des gouttelettes de matière grasse peut participer à la stabilisation et à la texture d'une émulsion quand la fraction volumique de matière grasse est supérieure à 30%. Les gouttelettes forment alors un réseau à elles-seules. Ce réseau peut être rigidifié par des agrégats protéiques qui vont ponter des gouttelettes et ainsi augmenter le temps de vie des connexions entre gouttelettes. La forte viscosité voire la gélification de la phase continue va également permettre de ralentir la remontée des gouttelettes de matière grasse et participer parallèlement à la texturation de l'émulsion. Enfin, l'ancrage des gouttelettes de matière grasse dans la phase continue grâce à l'élaboration d'un réseau protéines-lipides conduit également à une stabilisation et à l'augmentation de texture de l'émulsion.

Ainsi, une méthode classique pour stabiliser une émulsion est de créer une couche de protéines adsorbées à l'interface des deux phases (Dickinson, 1996; Surel et al., 2014). Les propriétés interfaciales des agrégats fractals et microgels ont été étudiées par différents auteurs (Chevallier et al., 2016b; Loiseleux, 2018; Mahmoudi et al., 2011, 2010; Murphy et al., 2016; Surel et al., 2014).

Les agrégats de PS ont révélé une capacité à texturer des émulsions allant de 5 à 30% de matière grasse en connectant des gouttelettes de matière grasse (Loiseleux, 2018; Surel et al., 2014). Cependant, Loiseleux (2018), en travaillant sur des émulsions modèles, a montré qu'à concentration équivalente en protéines, les agrégats fractals ( $R_g$  moy = 149nm) texturaient mieux l'émulsion que les microgels

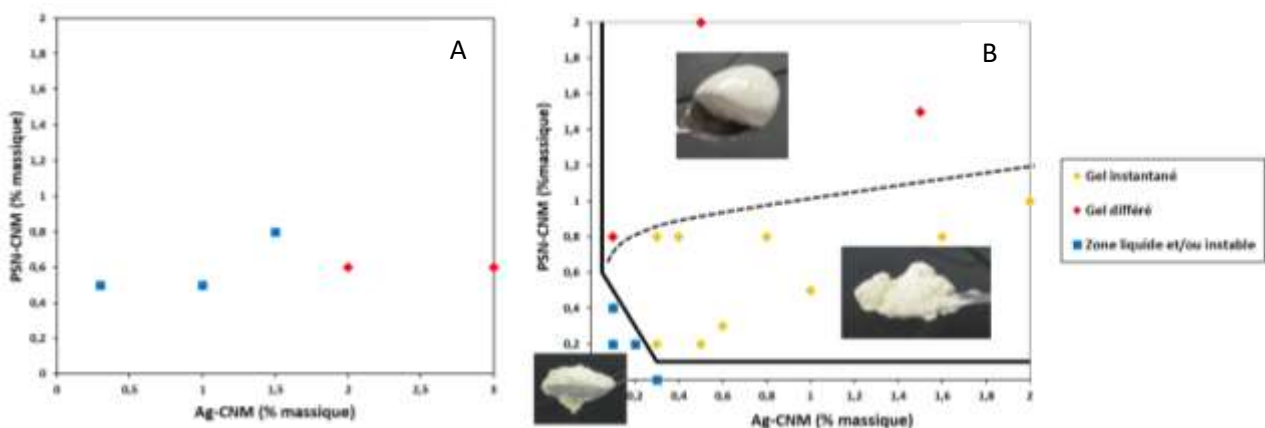


Figure 20 : Diagramme de texturation d'émulsions fabriquées à partir de WPI natif (PSN-CNM) et d'agrégats de PS (Ag-CNM). Les émulsions sont fabriquées à partir d'agrégats microgels (A) et d'agrégats fractals (B). Loiseleux (2018).



stables ( $R_g$  moy = 180 nm). Effectivement, le diagramme d'état réalisé avec les microgels montre qu'il n'est pas possible de former des émulsions qui gélifient dès la sortie de l'homogénéisateur (gel instantané) et qu'il faut des concentrations en agrégats plus importantes pour observer une texturation à 20°C (Figure 20). L'auteur attribue cette différence à la forte densité des microgels qui, à concentration équivalente, sont 6,25 fois moins nombreux que les agrégats fractals, et qui par conséquent sont moins à même d'établir des points de contact entre gouttelettes de matière grasse.

Les agrégats fractals pourraient donc être utilisés pour texturer des émulsions laitières type crème à différentes teneurs en matière grasse, et auraient un intérêt particulier pour texturer des émulsions low-fat.

### Stabilisation d'émulsions à différents traitements thermiques : chauffage, congélation-décongélation.

Chevallier (2017) a étudié l'impact de la présence d'agrégats microgels ou fractals à l'interface ou dans la phase continue d'émulsion modèle, sur la stabilité de cette dernière et face à différents traitements thermiques : chauffage, congélation et décongélation.

Elle montre qu'une émulsion ayant subi un cycle de congélation-décongélation reste stable quel que soit le type de protéines natives ou d'agrégats (fractals ou microgels) présent dans la phase continue. Cependant, quand une émulsion est chauffée, la présence de microgels dans la phase continue permet de stabiliser l'émulsion, contrairement aux protéines solubles natives. La présence de fractals dans la phase continue permet également de stabiliser l'émulsion mais sur des gammes de concentrations plus restreintes que les microgels (Figure 21). De plus, la taille des agrégats fractals a un impact sur la stabilité de l'émulsion : plus ils sont grands et moins l'émulsion est stable au traitement thermique.

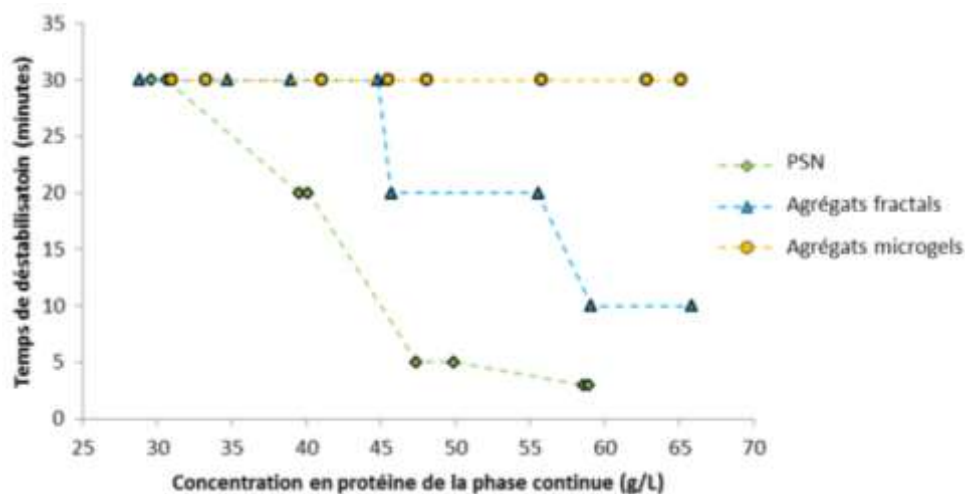


Figure 21 : Stabilité d'émulsions préparées à partir de PS native (PSN) ou d'agrégats de PS présents dans la phase continue. Adapté de Chevallier (2017).

Si en revanche les agrégats (fractals ou microgels) sont adsorbés à la surface des gouttelettes de matière grasse, alors les émulsions sont instables au traitement thermique.

En industrie, les émulsions de produits laitiers (crèmes, laits, crèmes glacées, mousses) subissent souvent des étapes de traitement thermique. Il est donc important que les émulsions soient stables à la congélation décongélation mais également au chauffage. Les microgels, s'ils sont présents dans la phase continue, présentent un plus grand intérêt que les fractals pour assurer cette stabilité.

#### 1.4.3.3.4 Application à des matrices plus complexes

Des travaux sur l'impact de l'ajout d'agrégats fractals et microgels produits au laboratoire sur des matrices plus complexes (type yaourt) ont également été conduits par Gélébart (2019). L'auteur montre qu'utilisés dans des yaourts (maigres ou gras), les agrégats fractals réactifs participent au réseau protéique de la même manière que les protéines natives, n'apportant pas d'amélioration de texture. En revanche, les microgels, peu réactifs, ne participent pas au réseau protéique : à concentration équivalente, ils induisent donc une perte de texture. Cette propriété des microgels permet cependant à texture équivalente, d'avoir un produit enrichi en protéines.

Pour conclure, les agrégats microgels une fois formés sont stables et très denses : ils peuvent permettre d'augmenter la teneur en protéines de certains produits laitiers et également d'apporter une stabilité des émulsions au traitement thermique s'ils sont introduits dans la phase continue. En revanche, les agrégats fractals sont très réactifs et peu denses de par leur structure ouverte. Ils permettent d'augmenter la viscosité des produits, de former des gels et de texturer des émulsions. La Figure 22 récapitule les avantages et inconvénients des 2 types d'agrégats pour différentes fonctionnalités d'intérêt.

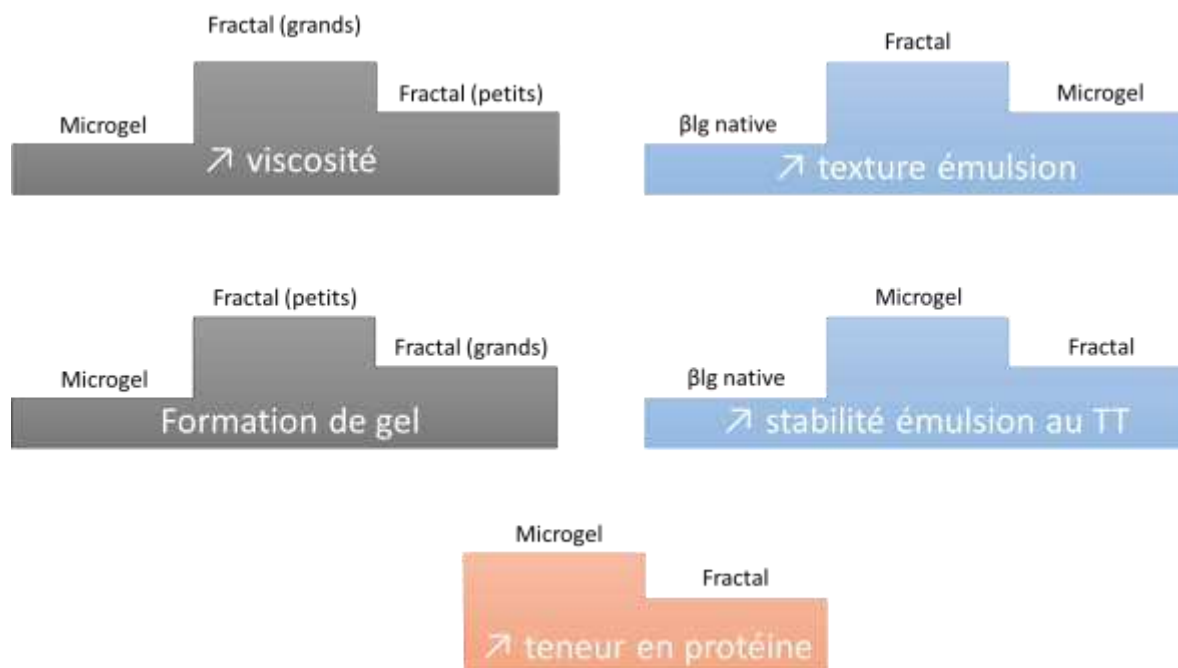


Figure 22 : Schéma récapitulatif des différentes propriétés fonctionnelles des agrégats microgels et fractals représenté sous forme de podiums.

#### 1.4.3.4 Critères de différenciation des agrégats fractals et microgels

Si les critères de formation et les propriétés des agrégats fractals et microgels sont connus, il n'en reste pas moins difficile de savoir quel type d'agrégat est réellement produit quand on se place dans une zone de formation à pH et ratio calcium sur protéines intermédiaires (Figure 11) et il est encore plus difficile de séparer des agrégats fractals et des microgels d'un mélange. A quoi reconnaît-on une solution d'agrégats fractals d'une solution d'agrégats microgels ?

Le premier critère de différenciation réside dans la couleur de la solution d'agrégats traitée thermiquement. Effectivement, les solutions d'agrégats de type microgels sont blanches, tandis que les solutions d'agrégats de petite taille sont transparentes. Cependant, les solutions d'agrégats fractals de grande taille produites en présence de sel sont elles aussi de couleur blanche du fait de la diffusion de la lumière.

Le deuxième critère de différenciation se fait sur la densité. Effectivement les agrégats microgels sont des agrégats sphériques très denses tandis que les agrégats fractals sont peu denses. Une précipitation par centrifugation pourrait être un critère de discrimination comme le suggère Phan-Xuan et al. (2014) qui utilisent une centrifugation à 50000g pendant 1 heure. Cependant quand on centrifuge une solution d'agrégats purement fractals dans ces conditions, on observe également une précipitation des agrégats fractals de grande taille ( $R_h = 140\text{nm}$ ) jusqu'à 22 p/p% et une précipitation des agrégats fractals de petite taille ( $R_h = 40\text{nm}$ ) jusqu'à 5 p/p% (données internes, non publiées). Des conditions

de centrifugation plus basses ont également été testées et ne permettent pas non plus de séparer correctement et de manière sûre les agrégats fractals des agrégats microgels.

Un troisième critère de différenciation repose sur la forme des agrégats. Effectivement les agrégats microgels sont de forme sphérique tandis que les agrégats fractals de grande taille sont de forme ramifiée. Les agrégats fractals primaires de petite taille sont de forme incurvée non branchée. Il est possible d'apprécier la structure des agrégats par la valeur de la dimension fractale  $df$ , définie comme :

$$M_w \propto R_g^{df} \quad (3)$$

Avec  $M_w$  masse molaire et  $R_g$  rayon de giration. Il a été montré que les agrégats microgels avaient une  $df$  de l'ordre de 3 tandis que les agrégats fractals avaient une  $df$  de l'ordre de 2,1 à 2,2 (Loiseleux et al., 2018; Mahmoudi et al., 2007). Dans un mélange d'agrégats fractals et microgels, la  $df$  sera intermédiaire.

On peut également évaluer la structure des agrégats par le facteur de forme  $R_g/R_h$  défini comme le rapport du rayon de giration sur le rayon hydrodynamique. Le facteur de forme d'une sphère est de l'ordre de 0,74 tandis que celui d'un agrégat branché de forme étoilée est de l'ordre de 1,4 et le  $R_g/R_h$  d'un bâtonnet fin est de 2,36 (Adolphi and Kulicke, 1997). Dans un mélange d'agrégats fractals et microgels, le facteur de forme sera intermédiaire.

Des observations microscopiques permettent de repérer la présence d'agrégats fractals (structure branchée) et la présence d'agrégats microgels (structure sphérique), mais la quantification des deux espèces dans un mélange est difficile avec cette technique car la proportion de chaque agrégat varie en fonction de la position sur les grilles de microscopie.

Enfin un dernier critère de différenciation des agrégats fractals et microgels pourrait reposer sur leurs propriétés fonctionnelles. Effectivement on a vu que les microgels et les fractals avaient des propriétés différentes. Un mélange d'agrégats des deux types pourrait avoir des propriétés intermédiaires.

## 1.5 Concentration-Séchage en industrie laitière

---

Pour utiliser des ingrédients dans des matrices alimentaires, il est essentiel que ceux-ci soient stables et se présentent sous une forme facile à doser. A ce titre, le séchage par atomisation est aujourd'hui une méthode de stabilisation très utilisée dans le domaine des ingrédients laitiers, permettant leur stockage puis leur incorporation dans des matrices de manière simplifiée. Généralement, cette opération est précédée d'une étape de concentration à moindre coût énergétique, par évaporation

sous vide ou encore par filtration tangentielle. Mais en quoi l'étape de concentration-séchage est-elle une méthode de stabilisation ?

L'altération des aliments est due principalement à des évolutions biochimiques et microbiennes qui interviennent essentiellement en phase aqueuse. En effet, l'eau, si elle est disponible, est à la fois un excellent solvant, permettant la croissance des microorganismes, la mobilité des réactifs et favorisant les réactions enzymatiques ou chimiques (Labuza et al., 1970). La notion de disponibilité de l'eau s'est imposée pour évaluer la susceptibilité d'un milieu à ces évolutions. Elle est caractérisée par l'activité de l'eau (*water activity* ou  $A_w$ ) qui est le rapport des pressions partielles de l'eau du produit ( $P$ ) et de l'eau pure à la même température ( $P^0$ ) :

$$A_w = \frac{P}{P^0} \quad (4)$$

Une diminution de disponibilité de l'eau ralentit le déroulement des réactions et peut contribuer ainsi à l'augmentation de la conservation d'un produit (Figure 23). L' $A_w$  peut être diminuée par apport d'agents hydrophiles qui fixent les molécules d'eau (saumurage), par cristallisation (congélation) ou encore par élimination de l'eau disponible du produit (concentration-séchage). Lors du séchage, l' $A_w$  des poudres dépend des propriétés physico-chimiques du concentré et des traitements technologiques appliqués qui sont autant de leviers de contrôle. L' $A_w$  cible des poudres industrielles finales est souvent de 0,2 mais peut bien sûr différer selon le cahier des charges du client.

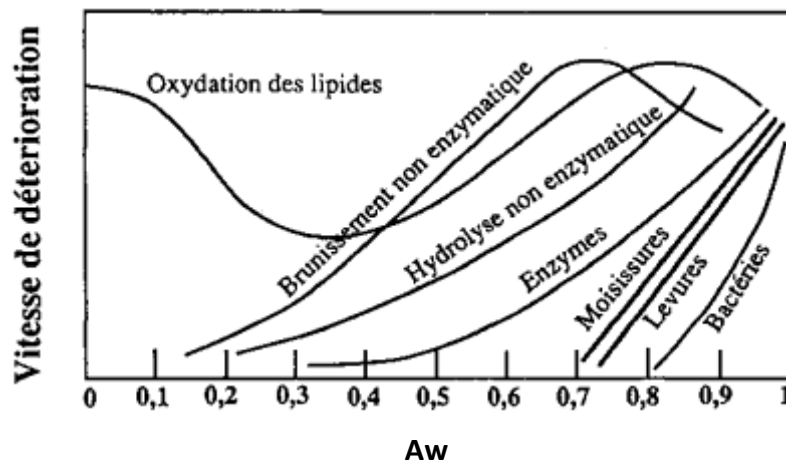


Figure 23 : Représentation de la stabilité des aliments en fonction de l'activité de l'eau. Adapté de Labuza et al (1970).

### 1.5.1 Concentration par filtration tangentielle

Généralement, un produit avant séchage est concentré jusqu'à 25 p/p % de matière sèche. Cette pré-concentration peut se faire par filtration tangentielle, qui consiste à séparer les constituants d'un fluide

par passage au travers d'une membrane poreuse, sous l'action d'un gradient de pression. Sur le même principe qu'un tamis, une fraction du liquide est retenue : on l'appelle le rétentat, et une fraction traverse la membrane : le perméat.

Le choix d'une membrane se raisonne à partir de critères de sélectivité et de productivité, qui sont notamment conditionnés par la taille de ses pores ou encore son seuil de coupure (*molecular weight cut-off*, MWCO exprimé en  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ou Da). Le MWCO correspond à la masse molaire limite des molécules retenues à 90% (Daufin et al., 1998). On définit les différentes classes de procédé de séparation en fonction de la nature des objets biologiques et moléculaires séparés : la microfiltration et l'ultrafiltration, dont il sera question dans ce manuscrit, retiennent ainsi respectivement les particules, colloïdes et microorganismes et l'ensemble des protéines (Figure 24). Bien entendu, toutes les espèces de plus grande dimension sont retenues également.

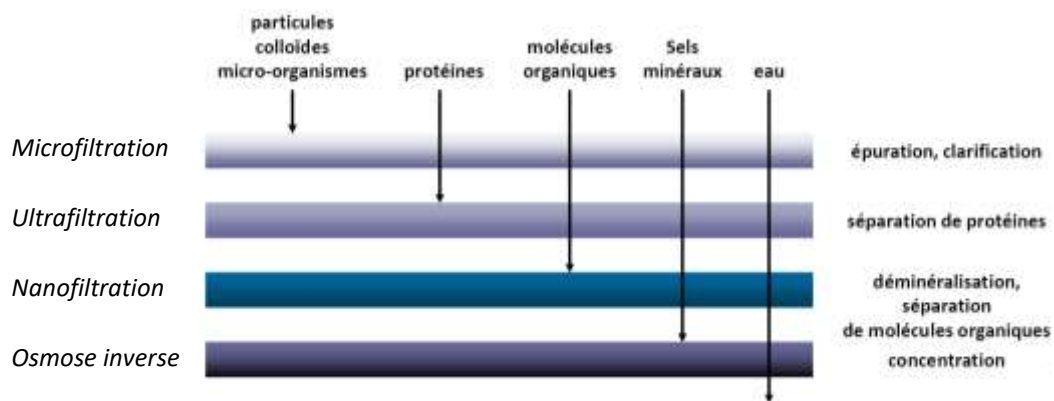


Figure 24 : Procédé de séparation sélective par filtration tangentielle (Jeantet 2011)

La productivité du procédé dépend de la vitesse de filtration  $J$  ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) qui correspond à une densité de flux volumique. Celle-ci augmente avec la température et la différence de pression transmembranaire  $PT$ , et diminue avec l'augmentation de la viscosité de la solution, avec les interactions faibles entre la membrane et la solution, et avec l'accumulation convective de molécules retenues (colloïdes, macromolécules etc.) à la membrane (Atra et al., 2005; Baldasso et al., 2011; Butylina et al., 2006; Rektor and Vatai, 2004). Avec le temps et le niveau de concentration, l'accumulation de ces molécules conduit à la formation de dépôts (Figure 25). Ceci induit une modification des propriétés de la membrane et une résistance hydraulique supplémentaire qui a pour conséquence une diminution de la densité du flux de perméation  $J$  et ainsi une perte de performance de l'installation.

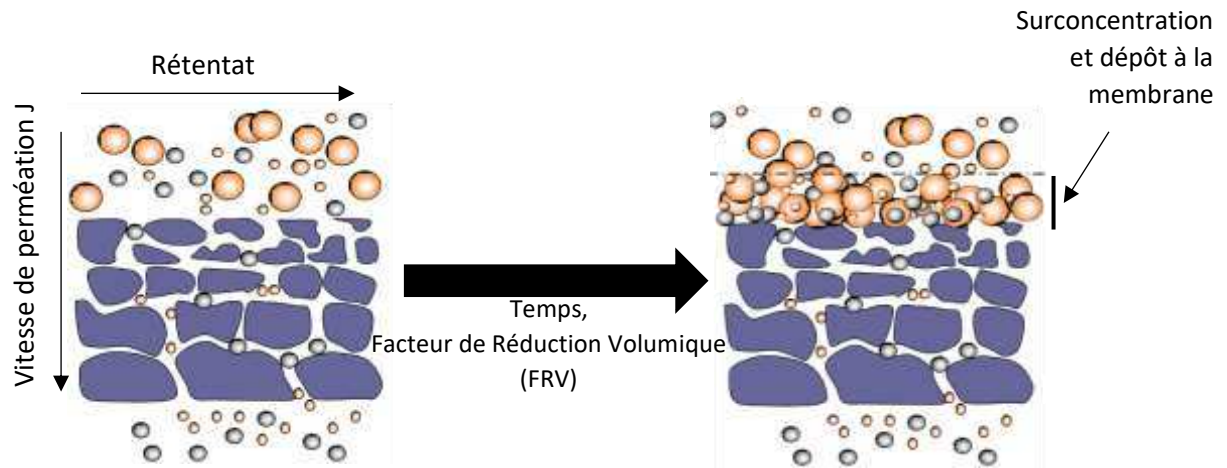


Figure 25 : Principe de surconcentration et de dépôt à la membrane en filtration tangentielle. (Jeantet 2011)

L'opération de filtration tangentielle se caractérise enfin par le Facteur de Réduction Volumique (*FRV*) qui est le rapport du volume de solution mis en œuvre  $V_{alim}$  ( $m^3$ ) sur le volume de rétentat récupéré  $V_{rétentat}$  ( $m^3$ ) :

$$FRV = \frac{V_{alim}}{V_{rétentat}} \quad (5)$$

## 1.5.2 Séchage par pulvérisation

### 1.5.2.1 Principe

Le séchage par pulvérisation consiste à pulvériser la solution concentrée à sécher en fines gouttelettes en haut d'une tour de séchage. Les gouttes formées tombent par gravité dans un courant d'air sec et chaud. Il s'établit alors d'une part un transfert de chaleur de l'air vers le produit dû à l'écart de température, et d'autre part un transfert d'eau du produit vers l'air dû à l'écart de pression partielle d'eau entre l'air et la surface du produit (Figure 26).

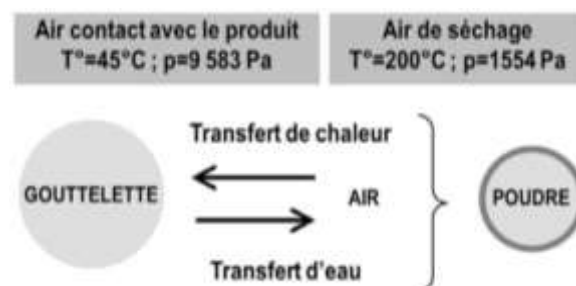


Figure 26 : Transferts couplés de chaleur et d'eau entre une gouttelette et l'air de séchage. (Jeantet et al. 2006).

Après une période transitoire dans laquelle la température de surface de la gouttelette rejoint la température humide de l'air (environ 45°C pour de l'air sec à 200°C), le séchage se déroule d'abord à vitesse constante : à tout moment, l'eau s'évapore du produit en stricte compensation de l'énergie reçue de l'air (séchage isenthalpique aux pertes à la chambre près et rétrécissement constant de la gouttelette), et la température du produit reste égale à la température humide de l'air tant qu'il reste de l'eau faiblement liée en quantité suffisante pour saturer la surface et alimenter ce transfert d'eau. A la fin du séchage, l'évaporation diminue, la température du produit rejoint progressivement la température de l'air en sortie de tour (environ 70-80°C). Finalement, les grains de poudre sont récupérés par cyclonage et refroidis en lit fluidisé.

(Jeantet et al., 2008; Masters, 2002; Mujumdar, 2014; Písecký, 1997; Schuck et al., 2012a) ont décrit les principaux équipements d'une installation de séchage par atomisation (Figure 27).

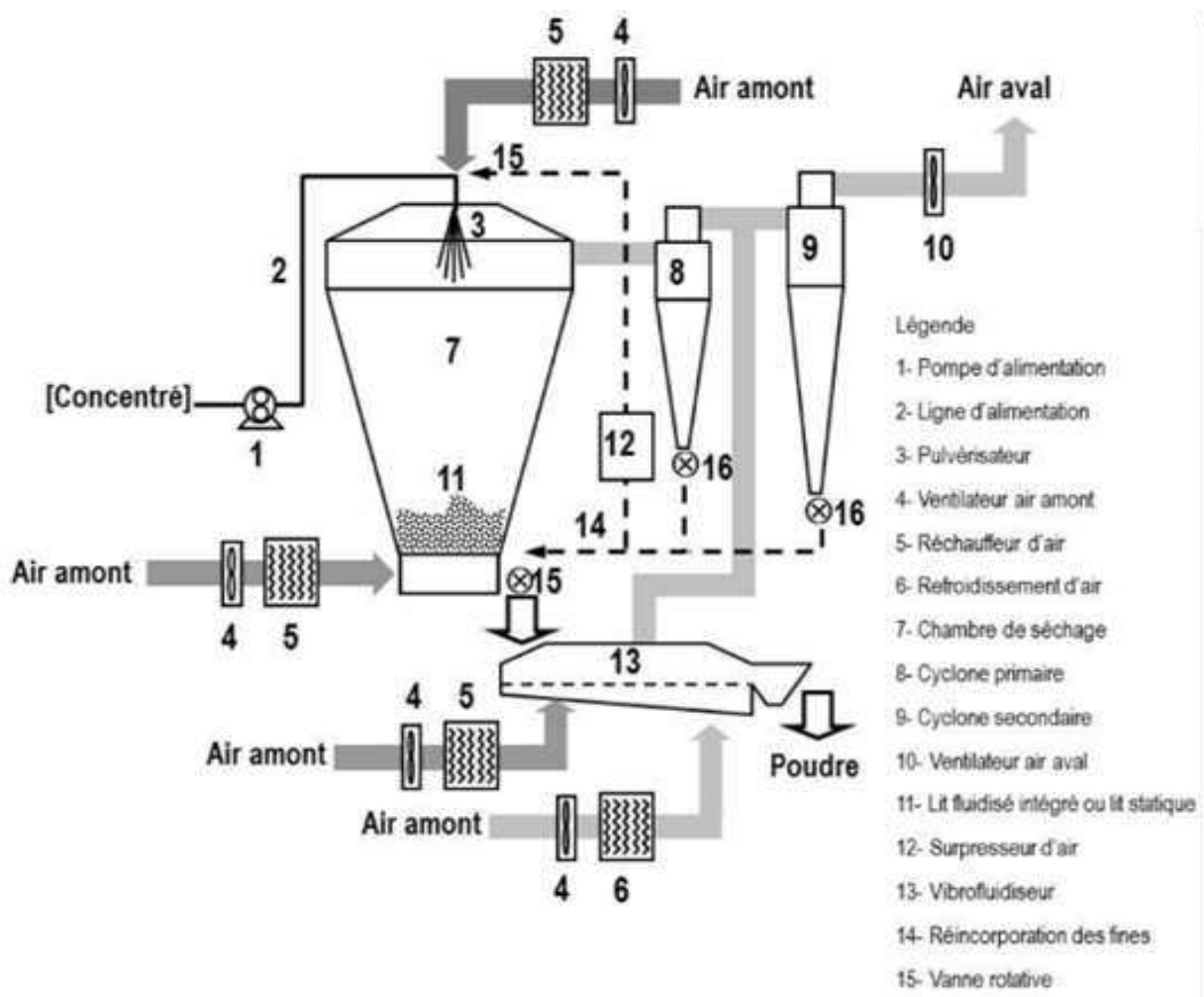


Figure 27 : Installation d'une tour de séchage. (Jeantet et al 2008).

L'air atmosphérique est prélevé à l'extérieur et filtré avant d'être chauffé par chauffage direct (gaz) et/ou chauffage indirect (vapeur, gaz, électricité, huile). La pulvérisation du produit à sécher doit



permettre de former les gouttelettes les plus fines possible pour augmenter la vitesse d'évaporation. Elle se fait grâce à une buse ou turbine centrifuge. L'enceinte de séchage est appelée chambre et est de forme cylindrique. En bas de la chambre, le produit est récupéré mais les fines particules sont entraînées par l'air et en sont séparées grâce à des cyclones. L'air est ensuite lavé grâce à un laveur d'air pour limiter les rejets dans l'atmosphère. Selon les installations, les fines peuvent être réincorporées au niveau d'un lit fluidisé ou au niveau du système de pulvérisation.

Le séchage peut se faire par simple effet ou par multiple effet. Dans le cas d'une unité d'atomisation simple effet, le temps de séjour du produit dans la tour est très court (en moyenne 20 à 60s). A ces temps courts, l'équilibre thermodynamique entre l'humidité de l'air et celle du produit n'est pas atteint complètement. Le séchage multiple effets consiste à augmenter le temps de séjour du produit dans l'installation (plusieurs minutes) pour être plus proche de l'équilibre thermodynamique. A l'équilibre thermodynamique, l'activité d'eau de la poudre est fonction de l'humidité relative de l'air  $H_R$  selon :

$$H_R \# 100. Aw \quad (6)$$

Pour atteindre cet équilibre, un deuxième temps de séchage est intégré à l'aide d'un lit fluidisé interne en bas de chambre (séchage deux effets), voire à l'aide d'un vibrofluidiseur externe (séchage trois effets). Ceci permet d'augmenter le rendement thermique de l'étape de séchage et donc de diminuer son coût. Le séchage multiple effets se traduit par une installation plus encombrante, des rejets atmosphériques diminués et une qualité du produit final améliorée.

### 1.5.2.2 Mécanismes de formation des particules

Le séchage peut affecter les propriétés fonctionnelles des ingrédients : il est donc crucial de comprendre comment la gouttelette d'une solution de protéines devient une particule sèche.

Sadek et al. (2016) se sont intéressés au séchage d'une goutte unique d'une solution de protéines laitières. Ils distinguent trois étapes dans le processus de séchage (Figure 28). Au début, l'évaporation de l'eau libre est contrôlée par la diffusion depuis la surface de la goutte vers l'air ambiant. Dans ce

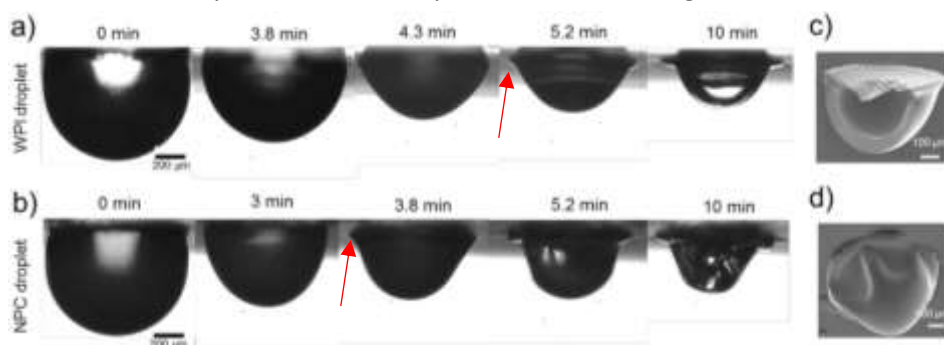


Figure 28 : Images à différents intervalles de temps de séchage pour des gouttelettes de PS (a) et de caséines (b) et images de microscopie à balayage associées (c et d). Les flèches représentent l'apparition de l'instabilité de flambement. (Sadek et al 2016).

cas, la goutte se comporte comme de l'eau pure et le volume de la sphère diminue de façon homogène en gardant une forme sphérique (*pure shrinkage* ou rétrécissement constant). Dans un deuxième temps, l'évaporation continuant, les protéines s'accumulent et se concentrent à l'interface : les propriétés rhéologiques de la surface de la goutte divergent alors de celles du cœur de la goutte, on parle d'instabilité de flambement. La transition sol-gel de l'interface pilotent la formation d'une peau à l'interface liquide-air. L'évaporation de l'eau reste encore possible à travers cette peau poreuse. Enfin, dans un dernier temps, la peau s'épaissit et forme une croûte de protéines et une vacuole se forme à l'intérieur de la goutte séchée.

Selon les propriétés de la protéine séchée (PS ou caséine), la transition sol-gel, et par conséquent, l'instabilité de flambement apparaît à des temps différents (plus tôt pour les caséines). La forme de la particule évolue également différemment, selon les propriétés mécaniques des deux colloïdes : elle adopte une forme sphérique pour les PS, et invaginée pour les caséines. La présence d'une invagination traduit une capacité du matériel à se déformer, ce qui n'est pas sans rappeler les propriétés structurales des caséines micellaires (*sponge-like structure* ; Bouchoux et al. 2010).

La présence d'une forme sphérique résistant à la déformation dans le cas des PS fait au contraire écho à un comportement de sphères dures, que seraient ici les protéines solubles individuelles.

Ces différences de comportement au séchage selon les propriétés du matériel séché sont à mettre en parallèle des différences de comportement à la réhydratation.

### 1.5.3 Réhydratation des poudres

La plupart des ingrédients alimentaires secs doivent être réhydratés avant usage : il est donc essentiel de prendre en compte l'aptitude d'une poudre à se réhydrater pour développer un nouveau produit alimentaire.

Les propriétés de réhydratation des poudres dépendent de la composition de la poudre, de l'affinité qu'ont les composants de la poudre pour l'eau mais aussi de la disponibilité stérique de l'eau.

Forny, Marabi et Palzer (2011) décrivent les différentes étapes de réhydratation d'une poudre (Figure 29). La première étape appelée mouillage consiste en la mise en contact de la poudre et du liquide. Le liquide va pénétrer la poudre par capillarité. La deuxième étape consiste en l'immersion, c'est-à-dire au passage de la poudre à travers la surface du liquide. La troisième étape consiste au gonflement et à la dispersion de la poudre. L'eau entre dans la particule et on observe une libération des particules initiales de la poudre. Enfin la dernière étape consiste à la solubilisation : les particules initiales de la poudre sont dissoutes.

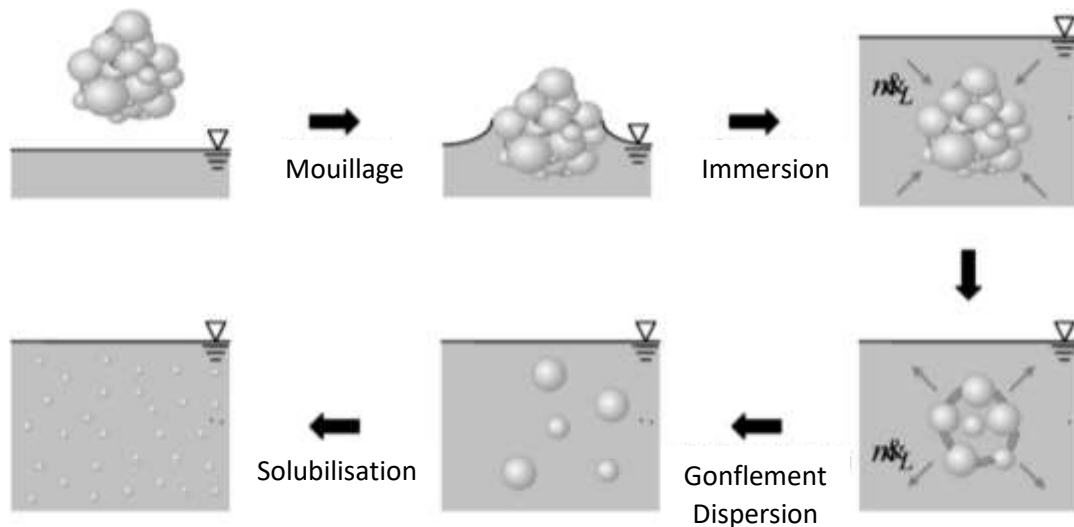


Figure 29 : Etapes de réhydratation d'une poudre. Adapté de Forny, Marabi et Palzer (2011).

Trois indices permettent de caractériser l'aptitude de la poudre à se réhydrater : l'indice de mouillabilité (IM), de dispersibilité (ID) et de solubilité (IS) (Schuck et al., 2012a).

La mouillabilité de la poudre traduit sa capacité à absorber de l'eau à sa surface, à s'immerger et ainsi à gonfler. Effectivement lorsque le grain de poudre absorbe de l'eau, il gonfle progressivement. La composition biochimique, la présence de grosses particules dans la poudre, la taille, la porosité et la capillarité du grain de poudre affectent la mouillabilité. Les poudres riches en protéines sont généralement considérées comme non mouillables ( $IM < 20s$ ).

La dispersibilité de la poudre traduit sa capacité, une fois gonflée, à se dissocier en particules de taille plus réduite. Elle est influencée par la solubilité et la mouillabilité. La teneur en protéines, la taille des grains de poudre et la température de l'air en entrée de tour influencent la dispersibilité d'une poudre. De manière générale, une poudre protéique est peu dispersible ( $ID < 95\%$ ).

La solubilité de la poudre traduit enfin son aptitude à se dissoudre dans l'eau jusqu'à la disparition totale de la structure granulaire. La solubilité peut être affectée par la viscosité du produit à sécher, par l'augmentation des températures de l'air en entrée de tour, par la composition biochimique, par la structure des protéines et par la taille des particules. A titre d'exemple, une poudre de WPI est très soluble (IS = 99,5%) tandis qu'une poudre de caséines micellaire est considérée comme peu soluble au sens de ce critère (IS = 64,6%). Il faut donc appliquer une force mécanique plus importante pour réhydrater une poudre de caséines micellaires ; il sera finalement possible d'atteindre une réhydratation complète de cette poudre si ces conditions sont réunies, ce qui démontre qu'une faible valeur d'IS ne signifie pas nécessairement qu'il y a présence d'insoluble strict.

Au cours du stockage, des changements physico-chimiques peuvent avoir lieu conduisant à une augmentation de la quantité du matériel insoluble. Concernant les poudres de protéines, des modifications de structure, des interactions protéine-protéine, de l'agrégation protéique favorisées par la présence de lactose et la lactosylation d'une partie des protéines, induisent une diminution de la solubilité des poudres (Havea, 2006; Norwood et al., 2016; Thomas et al., 2004).

## CHAPITRE 2 : STRATÉGIE

---

*Les agrégats fractals de protéines solubles ont été étudiés à l'échelle laboratoire et il s'est avéré que selon leur taille, ces agrégats présentaient un potentiel très intéressant pour substituer des additifs texturants et qu'il serait donc intéressant d'en faire un ingrédient laitier. Cependant, ces agrégats sont très réactifs et nous supposons que leur rapprochement physique lors des étapes de concentration et séchage nécessaires à l'obtention d'un ingrédient poudre, risque d'induire certains changements intrinsèques et fonctionnels. Dans ce contexte deux voies de stabilisation des agrégats fractals ont été étudiées. La première consiste à co-produire et stabiliser des agrégats fractals en présence de microgels stables ; et la deuxième consiste à produire et stabiliser des agrégats uniquement fractals.*

*La problématique principale de la thèse est contenue dans ces deux questions : Peut-on obtenir à une échelle significative (semi-industrielle) et de manière continue, les caractéristiques attendues des agrégats (agrégats fractals et microgels vs agrégats fractals seuls)? Est-il possible d'atteindre les propriétés fonctionnelles de texturation souhaitées à partir d'assemblages produits selon ces modalités et stabilisés par concentration-séchage ?*

*La stratégie utilisée s'organise en trois étapes complémentaires répondant à des questions de recherche définies : (i) Est-il possible de produire par un procédé robuste des agrégats de PS (agrégats fractals et microgels vs agrégats fractals seuls) de manière continue et d'en contrôler les propriétés intrinsèques (taille et morphologie) ? (ii) Comment les agrégats produits en continu se comportent-ils lors des opérations de concentration-séchage ? (iii) Quelles sont les propriétés fonctionnelles des agrégats produits en continu ? Ces propriétés s'apparentent-elles à celles déjà étudiées sur des agrégats produits en laboratoire ? Les principaux objectifs de travail abordés dans ce chapitre :*

- Définir le contexte du projet de thèse.*
- Présenter les objectifs et questions de recherche.*
- Expliquer la stratégie employée durant la thèse.*

La problématique de cette thèse s'inscrit dans le projet précompétitif PROFIL dont elle constitue le 11<sup>ème</sup> et dernier financement doctoral. Au cours des thèses déjà achevées dans ce projet, des agrégats ont été produits à l'échelle laboratoire par différents acteurs avec des modes opératoires et des techniques d'analyses variés. L'objectif de cette thèse est de s'appuyer sur ces précédents résultats pour proposer des itinéraires technologiques de production continue d'agrégats qui répondent aux contraintes industrielles, en s'appuyant sur des techniques d'analyses standardisées et en ciblant les fonctionnalités déjà abordées dans les travaux antérieurs. C'est pourquoi cette thèse s'appuie sur des expertises scientifiques et des domaines disciplinaires variés, du génie des procédés à la physico-chimie des protéines en passant par les sciences applicatives de l'aliment.

Nous avons vu dans la littérature que les agrégats fractals présentaient en fonction de leur taille un potentiel très intéressant pour substituer certains additifs texturants au sein de produits laitiers. Pour confirmer ces perspectives et afin de pouvoir les utiliser comme ingrédient à différentes propriétés (texturation de produit laitier, texturation d'émulsions, stabilisation d'émulsion, augmentation de viscosité), il convient de les produire à des tailles différentes et à une échelle semi-industrielle, avant de les stabiliser par concentration et séchage.

Cependant, les agrégats fractals ramifiés sont très réactifs (c'est d'ailleurs ce qui fait leur intérêt fonctionnel) et il est fort probable que leur rapprochement physique par des étapes de concentration et séchage induise certains changements de leurs propriétés intrinsèques et par suite, certains changements fonctionnels.

D'autre part, les agrégats sphériques microgels sont quant à eux inertes, très stables, déjà produits à l'échelle industrielle et commercialisés (ils sont utilisés pour leurs propriétés émulsifiantes) et ont la capacité d'augmenter la teneur en protéines de produits laitiers sans en faire varier la texture.

Basé sur ces éléments,, nous avons voulu explorer une première voie de stabilisation des agrégats fractals qui consiste à co-produire, concentrer et sécher un mélange d'agrégats fractals réactifs en présence de microgels stables (Mélange 1). Elle sera comparée à une seconde voie de stabilisation qui consiste à co-produire, concentrer et sécher des agrégats uniquement fractals (Mélange 2). Ces deux schémas de production ont été travaillés à partir des connaissances générées dans les thèses antérieures de PROFIL.

La problématique principale de cette thèse est ainsi contenue dans les deux questions suivantes :

**Peut-on obtenir à une échelle semi-industrielle)et de manière continue les caractéristiques intrinsèques attendues des agrégats (agrégats fractals et microgels vs agrégats fractals seuls)?**

**Est-il possible d'atteindre les propriétés fonctionnelles de texturation souhaitées à partir d'assemblages produits selon ces modalités et stabilisés par concentration et séchage?**

Pour répondre à ces questions, les assemblages ont été produits, concentrés et séchés à deux échelles différentes au cours de cette thèse, selon les protocoles décrits dans le chapitre Matériels et Méthodes : l'échelle pilote a permis d'explorer un grand nombre de conditions de production, tandis que l'échelle semi-industrielle, plus représentative, a été utilisée pour confirmer les résultats obtenus et valider le concept.

Pour répondre à cette problématique, la thèse a été organisée en trois étapes, répondant chacune à des questions de recherche définies :

- ❖ **Est-il possible de produire par un procédé robuste et de manière continue des agrégats de PS (agrégats fractals et microgels vs agrégats fractals seuls) et d'en contrôler les propriétés intrinsèques (taille et morphologie) ?**

En faisant varier la charge négative globale des entités protéiques, il est possible de produire sélectivement, en conditions de traitement thermique continue, soit un mélange d'agrégats fractals en présence de microgels, soit un mélange d'agrégats fractals seuls. Ces agrégats ont été caractérisés par Fractionnement Asymétrique Flux-Force (A4F) et par Microscopie Electronique à Transmission (MET). Il est également possible de faire varier la taille des agrégats produits en jouant sur les concentrations en protéines et en sel. Ce levier étant limité dans le cadre des agrégats fractals en présence de microgels, l'influence de trois paramètres procédés (régime d'écoulement, temps de montée en température et température de chauffe) a été étudiés dans le but de moduler par un autre type de levier la taille de ces agrégats. L'encrassement induit par la production des agrégats des deux mélanges d'agrégats a été étudié.

- ❖ **Comment les agrégats produits en continu se comportent-ils lors des opérations de concentration-séchage ?**

La concentration des assemblages a été étudiée à différentes échelles : concentration à l'échelle laboratoire en boudin de dialyse et jusqu'à atteinte de l'équilibre thermodynamique ; concentration sélective par filtration tangentielle à différents facteurs de réduction volumique ; concentration rapide par séchage et maintien à l'état sec concentré pendant des temps différents. Le but est de comparer le comportement des différents mélanges d'agrégats (fractals seuls vs agrégats fractals et microgels) au cours de la concentration pour identifier lesquels sont les plus faciles à stabiliser.

❖ **Quelles sont les propriétés fonctionnelles des agrégats produits en continu ? Ces propriétés fonctionnelles s'apparentent-elles à celles déjà étudiées sur des agrégats produits au laboratoire ?**

Des agrégats de grande taille ont été produits et séchés dans le but d'explorer trois fonctionnalités différentes, à savoir la capacité des agrégats à augmenter la viscosité (d'après les travaux de Inthavong et al. (2016)), la capacité des agrégats à former un gel (d'après les travaux de Kharlamova et al. (2018a, 2018b)) et la capacité des agrégats à texturer une émulsion (d'après les travaux de Loiseleux (2018)). Dans chaque cas, la fonctionnalité du mélange purement fractal a été comparée à la fonctionnalité du mélange fractals et microgels. Dans le cas des fonctionnalités d'augmentation de viscosité et de gélification, l'impact de l'augmentation du volume traité lors de l'essai a aussi été étudié et des comparaisons avec des agrégats produits à l'échelle laboratoire ont été réalisées.

Pour répondre à ces multiples questions de recherche, une collaboration avec de nombreux laboratoire a été nécessaire.

- Les pré-essais de production en continu des agrégats ont été réalisés à l'UMR INRA-CNRS-Université de Lille, au laboratoire Unité Matériaux Et Transformations (UMET).
- Les pré-essais de concentration et séchage ainsi que les essais de production en continu, et concentration par ultrafiltration ont eu lieu sur la plateforme technologique du laboratoire Sciences et Technologies du Lait et de l'œuf (STLO) de l'UMR INRAe-Agrocampus Ouest.
- Les essais de séchage à l'échelle industrielle ont eu lieu au laboratoire Bionov.
- La caractérisation de taille des agrégats produits par la technique d'A4F a eu lieu sur la plateforme Toulouse Field-Flow-Fractionation (TFFFC) au laboratoire de l'école d'ingénieurs de Purpan.
- Les analyses microscopiques ainsi que la fonctionnalité de texturation d'émulsions des agrégats ont été réalisées au laboratoire Biopolymères Interactions Assemblages (BIA) de l'UMR INRAe.
- Enfin la fonctionnalité des agrégats en terme de gélification et d'augmentation de viscosité ont eu lieu au laboratoire de l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM) de l'UMR CNRS-Université du Mans.

Pour l'ensemble des expériences le nom des intervenants techniques ainsi que la part d'implication du doctorant sont récapitulés dans le Tableau 3.



Tableau 3 : Collaborations au cours de la thèse

<b>EXPERIENCES</b>	<b>INTERVENANTS TECHNIQUES</b>	<b>PART D'IMPLICATION DU DOCTORANT</b>
<b>PRE-ESSAIS PRODUCTION</b>	Yingying Gu ; Thierry Six ; François Martin ; Domitille de Guibert	Élaboration du plan d'expérience Suivi des essais
<b>PRE-ESSAIS CONCENTRATION ET SECHAGE</b>	Marielle Harel-Oger ; Domitille de Guibert	Élaboration du plan d'expérience Réalisation des essais
<b>ESSAIS DE PRODUCTION, CONCENTRATION, SECHAGE</b>	Marielle Harel-Oger ; Ali Kerjough ; Serge Méjean ; François Martin ; Domitille de Guibert	Élaboration du plan d'expérience Suivi des essais
<b>CARACTERISATION DE TAILLE PAR A4F</b>	Marie Hennetier ; Domitille de Guibert	Préparation des échantillons Traitement des données et interprétation des résultats
<b>ANALYSE MICROSCOPIQUE</b>	Valérie Beaumal ; Domitille de Guibert	Préparation des échantillons Interprétation des résultats
<b>TEXTURATION D'EMULSIONS</b>	Camille Jonchère ; Domitille de Guibert	Élaboration du plan d'expérience Fabrication des émulsions Suivi des essais d'analyses rhéologiques Traitement des données et interprétation des résultats
<b>EXPERIENCES DE GELIFICATION A FROID ET D'AUGMENTATION DE VISCOSITE</b>	Anna Kharlamova ; Domitille de Guibert	Élaboration du plan d'expériences Préparation des échantillons Interprétation des résultats

## CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

*L'objectif de ce chapitre est de répertorier les différents matériels et méthodes utilisés au cours des expérimentations réalisées durant cette thèse. Ce chapitre s'organise selon trois grandes parties. La première partie est consacrée à la description des expérimentations de production des agrégats thermo-induits. La deuxième partie présente les différents outils de concentration et séchage par pulvérisation utilisés au cours de ces travaux. Enfin la dernière partie décrit les outils et méthodes de caractérisation des agrégats en terme de propriétés intrinsèques (taille et morphologie), de propriétés comportementales lors des opérations de concentration-séchage et de propriétés fonctionnelles (capacités des agrégats à augmenter la viscosité, à former un gel et à texturer une émulsion).*

*Le principal objectif de travail abordés dans ce chapitre est de présenter les matériels et méthodes utilisés pour conduire les différentes expérimentations réalisées au cours de cette thèse.*

## TABLE DES MATIÈRES

---

<b>CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>41</b>
3.1 Production des agrégats.....	43
3.1.1 Matière première .....	43
3.1.2 Influence de paramètres matière sur la formation des agrégats.....	43
3.1.3 Mise au point de la ligne de production.....	45
3.1.4 Influence des conditions procédé sur la formation des agrégats .....	48
3.1.5 Choix des paramètres matière et procédé pour une production à l'échelle semi-industrielle.....	56
3.1.6 Etude de l'encrassement induit par les mélanges 1 et 2.....	56
3.2 Concentration et séchage par pulvérisation .....	57
3.2.1 Ultrafiltration.....	57
3.2.2 Séchage par pulvérisation .....	58
3.2.3 Analyses des poudres d'agrégats de protéines solubles.....	60
3.3 Caractérisation des agrégats produits .....	63
3.3.1 Propriétés intrinsèques : taille et morphologie des agrégats .....	63
3.3.2 Propriétés comportementales .....	69
3.3.3 Propriétés fonctionnelles .....	71

### 3.1 Production des agrégats

#### 3.1.1 Matière première

Pour cette étude, nous avons utilisé deux lots de poudre d'isolat de protéines solubles (WPI) produites par un industriel laitier (origine confidentielle). Les caractéristiques des deux lots de poudres, à savoir teneur en protéines, teneur en minéraux, extrait sec, sont présentées dans le Tableau 4. Le ratio molaire de calcium sur protéines solubles (PS) est proche pour les deux lots de poudre et de l'ordre de 2. Il a été calculé en prenant une masse molaire moyenne de  $17,5 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  pour les PS et de  $40,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  pour le calcium. La densité de charge ( $\alpha$ ) des poudres de WPI a été mesurée par titration et est de -6,6.

Tableau 4 : caractéristiques des lots de poudres de WPI utilisés dans l'étude.

	<b>Poudre 1</b>	<b>Poudre 2</b>
Protéines totales (p/p %)	85,10	86,51
Taux de caséines (p/p %) (dosage électrophorèse)	5,10	7,29
Taux Blg (p/p %) (dosage HPLC)	58,95	49,98
Taux Ala (p/p %) (dosage HPLC)	16,25	13,96
Taux BSA (p/p %) (dosage HPLC)	1,94	1,57
[Na] (mg/gWPI)	2,22	1,41
[K] (mg/gWPI)	2,68	2,51
[Mg] (mg/gWPI)	0,64	0,51
[Ca] (mg/gWPI)	3,96	3,73
Extrait sec	0,94	0,94
$R = [\text{CaCl}_2] / [\text{Protéines solubles}]$	2,0	1,9
Densité de charge $\alpha$ à pH 7 (titration)	-6,6	-6,6

#### 3.1.2 Influence de paramètres matière sur la formation des agrégats

Dans la littérature, il est connu qu'il est possible de former des agrégats microgels ou fractals en jouant sur le pH et sur le ratio R de la solution de PS à traiter thermiquement. Il est à noter que, par la suite, de ce travail, ces deux paramètres, pH et R, seront définis selon la terminologie « paramètres matière », par opposition aux paramètres relevant du procédé (Re, temps de montée en température, température).

Les zones de formation des agrégats microgels ou fractals ont déjà été déterminées par Phan-Xuan et al. (2014) et sont présentées sur la Figure 30. Nous nous sommes basés sur ce diagramme pour obtenir

des solutions de PS composées dans un premier cas d'un mélange d'agrégats fractals en présence de microgels (Mélange 1), et dans un deuxième cas d'un mélange d'agrégats purement fractals (Mélange 2).

Pour obtenir spécifiquement les agrégats du mélange 1 (point rouge ; Figure 11), une solution de PS (Sol PS 1) a été préparée comme suit. La poudre de WPI a été dissoute sous agitation mécanique dans de l'eau déionisée à 20°C toute une nuit pour atteindre la concentration en protéines souhaitée (de 4 p/p% à 8 p/p% selon l'essai). Du chlorure de sodium a été ajouté pour atteindre la force ionique désirée (de 0 à 40mM selon l'essai) puis le pH a été ajusté à 7 par ajout de NaOH. Dans ces conditions, la charge globale des agrégats du mélange 1 est équivalente à celle du WPI natif soit -6,6.

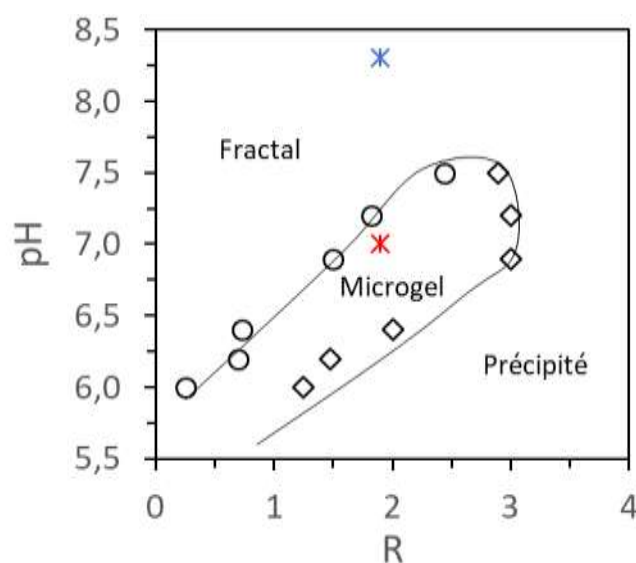


Figure 30 : Zone de formation des agrégats fractals et microgels en fonction des conditions de pH et ratio  $R=[\text{Calcium}]/[\text{PS}]$  à une concentration de  $60\text{g.L}^{-1}$ . Le trait est un guide pour les yeux. Les points rouge et bleu correspondent respectivement aux conditions de formation des mélanges 1 et 2. Adapté de Phan Xuan (2014).

Pour obtenir spécifiquement des agrégats du mélange 2 (point bleu ; Figure 11), la charge négative globale de Sol PS 1 a été augmentée par ajout de 2 molécules de  $\text{OH}^-$  par mole de protéine, ajouté sous forme de d'hydroxyde de sodium pour atteindre un pH de 8,3 et une densité de charge de -8,6. Les différents couples ( $[\text{protéine}]$  ;  $[\text{sel}]$ ) utilisés pour chacun des mélanges sont présentés sur la Figure 31.

La concentration finale en protéines de la solution est contrôlée par analyse spectrophotométrique à 278 nm en utilisant un coefficient d'extinction de  $1,041\text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

### 3.1.3 Mise au point de la ligne de production

#### 3.1.3.1 Matériel utilisé

Le principe de production d'agrégats de PS consiste à chauffer une solution de PS à une température dénaturante. Pour se faire, une ligne de production a été mise au point avec du matériel décrit ci-dessous.

##### 3.1.3.1.1 Tube à passage de courant

Deux tubes à passage de courant Actijoule (Actini, Evian-les-Bains, France) différents et appelé « Actijoule 1 » et « Actijoule 2 » ont été utilisés pour préchauffer ou chauffer la solution de PS. Leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : caractéristiques des tubes à passage de courant utilisés

	<b>Actijoule 1</b>		<b>Actijoule 2</b>	
			<i>Config. 1</i>	<i>Config. 2</i>
<i>Nombre de tubes</i>	12		6	12
<i>Longueur d'un tube (m)</i>	1,4		1,4	1,7
<i>Diamètre interne des tubes (mm)</i>	18		6	22.5
<i>Nombre de coudes de type 1</i>	6		5	11
<i>Longueur d'un coude de type A (m)</i>	0,23		0,14	0,22
<i>Nombre de coudes de type 2</i>	5		0	0
<i>Longueur d'un coude de type B (m)</i>	0,17		-	-
<i>Longueur totale de traitement (m)</i>	19,03		9,1	22,82
<i>Puissance installée (kW)</i>	15		30	
<i>Rugosité (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	0.8		0.7	0.8
<i>Type d'acier</i>	316 L		316 L	
<i>conductivité thermique (<math>\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}</math>)</i>	16,3		16,3	
<i>caractéristiques électriques</i>	U=380V ; P=19 kW ; I=28,9A		U=380V ; P=30 kW ; I=45,6A	

### Principe

Un tube à passage de courant est un échangeur de chaleur dont le principe de fonctionnement est

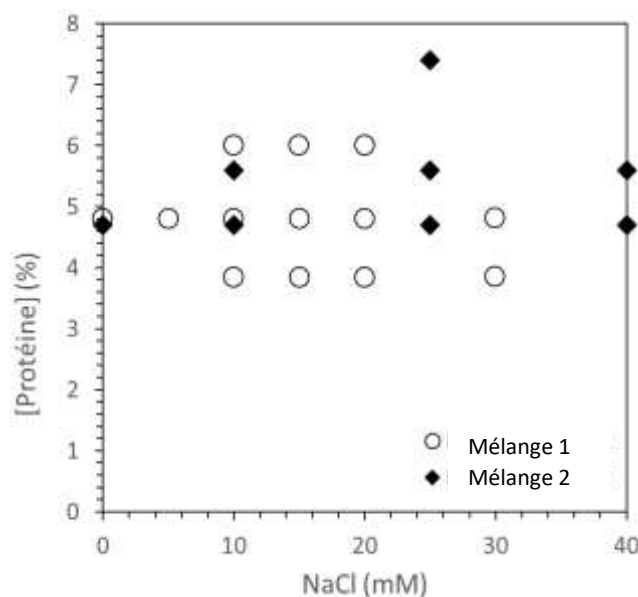


Figure 31 : Concentrations en protéines et en sel testées pour les agrégats des mélanges 1 et 2.

simple : le produit circule dans des tubes en aciers inoxydables alimentés sous basse tension. Ces tubes agissent comme une résistance électrique : ils s'échauffent par effet joule et transmettent ainsi leur énergie au produit par convection. Cette technologie a l'avantage de permettre une montée en température linéaire et d'assurer un chauffage rapide.

#### 3.1.3.1.2 Echangeur tubulaire à double paroi

Trois échangeurs tubulaires à double paroi différents appelés « Echangeur 1 », « Echangeur 2 » ou « Echangeur 3 » ont été utilisés. Leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Caractéristiques des échangeurs utilisés

	Echangeur 1	Echangeur 2	Echangeur 3
Diamètre interne du tube (mm)	30	47	30
Volume (L)	24	4L par tube mis en jeu	9,6
Nombre de tubes mis en jeux	20	Variable selon la durée de traitement voulue	8
Fluide caloporteur à contre courant	Solution chaude d'agrégats	Eau à la température de chauffe des agrégats	Eau glacée

### Principe

Le principe d'un échangeur tubulaire à double paroi consiste à faire passer un fluide à réchauffer dans un tube. Un fluide caloporteur, de température plus élevée, va circuler dans la paroi de ce tube et il va

y avoir un transfert de chaleur du fluide le plus chaud vers le fluide le plus froid, sans échange de matière.

### 3.1.3.2 Montage de la ligne de production d'agrégats

La ligne de production (Figure 32) mise au point pour chauffer la solution de PS dans le but de former des agrégats se compose :

- 1) D'une cuve de lancement avec agitateur contenant la solution de PS.
- 2) D'une section de préchauffage pour atteindre une température non-dénaturante : la solution de PS est soit préchauffée en échangeur tubulaire à contre-courant de la solution d'agrégats chauffés (Echangeur 1) ; soit préchauffée à l'aide d'un tube à passage de courant (Actijoule 1 ou 2)
- 3) D'une section de chauffage dans un tube à passage de courant (Actijoule 1 ou 2) où le produit atteint une température cible de 80°C.
- 4) D'une zone de chambrage tubulaire dynamique d'un volume suffisant pour maintenir le produit à sa température cible pendant 15min (Echangeur 2)
- 5) D'une première section de refroidissement (Echangeur 1) où la solution d'agrégats se refroidit à contre-courant de la solution de PS dans le cas où le préchauffage s'est effectué à l'aide de l'Echangeur 1.
- 6) D'une deuxième section de refroidissement où la solution d'agrégats se refroidit à contre-courant d'eau glacée (Echangeur 3).
- 7) D'une cuve de stockage avec agitateur pour réceptionner la solution d'agrégats refroidie.

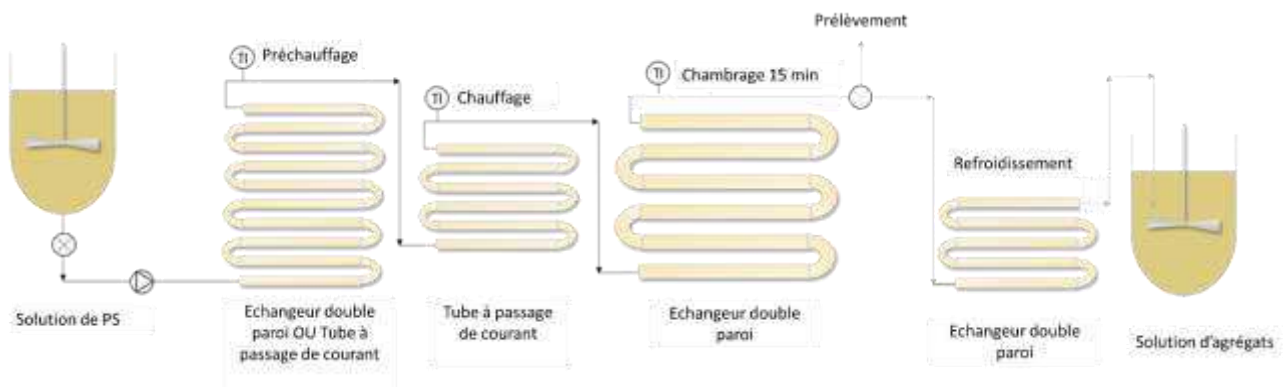


Figure 32 : Représentation schématique de la ligne de production d'agrégats de protéines solubles.

La ligne de production est d'abord équilibrée sur eau au débit de fonctionnement cible pour atteindre les températures cibles. La régulation de température se fait en sortie de zone de préchauffage et en sortie de zone de chauffage à l'aide d'un thermocouple fixé sur la paroi de l'échangeur en sortie. Une sonde de température au cœur du produit est également placée en sortie de zone de chauffe pour contrôler la température du produit. Une valve trois voies permet ensuite de passer sur la solution



protéique. L'arrivée du produit en sortie de circuit est déterminée par conductimétrie, et on laisse s'écouler la solution pendant au moins dix minutes avant de collecter les échantillons. Pour les essais de faible volume, 100L de solutions sont traités contre 400L pour les essais de grand volume.

Le choix d'utiliser un chambrage de 15 minutes a été fait après une série de pré-essais dans lesquels l'influence du temps de chambrage sur la formation des agrégats du mélange 1 a été explorée. Il a été conclu qu'un traitement thermique de 15 minutes suffisait dans la mesure où il conduisait à une dénaturation de 90% des  $\beta$ lg (Figure 33), et où les agrégats du mélange 1 ne variaient plus en terme de taille ou de forme au-delà de 15min. Le nombre de tubes du chambreur a donc été adapté au volume nécessaire en fonction du débit imposé pour atteindre un chambrage de 15 minutes. Le diamètre des tubes de l'Echangeur 2 étant important, le régime d'écoulement dans la zone de chambrage est laminaire.

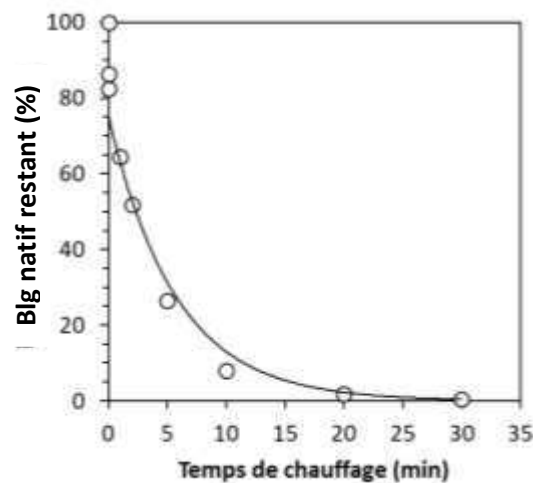


Figure 33 : Impact du temps de chauffage sur la dénaturation-agrégation irréversible des  $\beta$ lg.

### 3.1.4 Influence des conditions du procédé sur la formation des agrégats

#### 3.1.4.1 Influence du régime d'écoulement et du temps de montée en température dans la zone de chauffe

Dans cette étude, nous avons voulu étudier dans un premier temps l'impact de paramètres du procédé sur la fabrication des agrégats du mélange 1 (5% en protéine ; 10mM NaCl). Deux paramètres procédé ont été étudiés le régime d'écoulement dans la zone de chauffe (représenté par le nombre de Reynolds  $Re$ ), et le temps nécessaire pour induire une élévation de température de 30°C dans la zone de chauffe (i.e. le temps nécessaire pour chauffer à 80°C une solution préchauffée à 50°C) ( $RT_h$ ). Afin de contrôler précisément ce temps de montée en température, il a été nécessaire de contrôler la température en sortie de préchauffage. C'est pourquoi pour ces essais, un tube à passage de courant a été utilisé plutôt

qu'un échangeur à contre-courant dans la section de préchauffage. De plus, dans un souci d'alléger l'installation, et comme il n'était pas nécessaire de collecter de grosses fractions d'agrégats (25mL), les échantillons collectés directement en sortie de chambrage ont été refroidis instantanément en bain glacé sans utiliser de zone de refroidissement.

#### 3.1.4.1.1 Diagramme de Moody

Afin d'explorer l'ensemble des régimes d'écoulement (laminaire, intermédiaire ou turbulent) dans la zone de chauffe de l'Actijoule, il est nécessaire de savoir à quelle valeur de Reynolds ont lieu les transitions entre les différents régimes. Pour cela, un diagramme de Moody représentant l'évolution du facteur de frottement ( $f$ ) en fonction du nombre de Reynolds ( $Re$ ) a été réalisé, dans lequel on peut identifier les transitions entre les différents régimes par les différentes ruptures de pentes. C'est grâce à ce diagramme préliminaire que le plan d'expérience présenté sur la Figure 34 a été conçu.

Le facteur de frottement est un nombre adimensionnel qui traduit la dégradation d'énergie due au frottement du fluide sur la paroi du tube. Ce nombre s'écrit :

$$f = \frac{\Delta P \times D}{2 \times L \times \rho \times v^2} \quad (7)$$

Avec  $\rho$  la masse volumique du produit ( $\text{kg.m}^{-3}$ ),  $v$  la vitesse moyenne de passage ( $\text{m.s}^{-1}$ ),  $\frac{\Delta P}{L}$  la perte de pression par unité de longueur ( $\text{Pa.m}^{-1}$ ) et  $D$  le diamètre interne du tube (m)

Le nombre de Reynolds ( $Re$ ) est le rapport des forces d'inertie sur les forces visqueuses. Il s'écrit :

$$Re = \frac{D \times \rho \times v}{\eta} \quad (8)$$

Avec  $\eta$  la viscosité dynamique newtonienne ( $\text{Pa.s}$ ).

Afin d'obtenir un large spectre de nombres de Reynolds (de 50 à 30 000), de l'eau et des solutions de saccharose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) concentrées de 42 p/p % à 66 p/p % ont été utilisées. La concentration précise en saccharose et la masse volumique dans les solutions ont été mesurées grâce à un brimètre à différentes températures. Ces mesures au brimètre nous ont permis d'obtenir la viscosité dynamique des différentes solutions de saccharose aux différentes températures grâce à la table de conversion de l'association Andrew van Hook. La masse volumique et la viscosité diminuant faiblement lorsqu'on augmente la température (une élévation de  $0,05^\circ\text{C}$  entraîne une diminution de la masse volumique de  $0,02 \text{ kg.m}^{-3}$  et une diminution de la viscosité de  $0,09 \text{ mPa.s}^{-1}$ ), les températures en entrée et en sortie de l'Actijoule ont été mesurées grâce à deux sondes de température et prises en compte dans les calculs.

Ces solutions de saccharose ont été mises en circulation dans l'Actijoule à des débits variant entre 50 et  $500 \text{ L.h}^{-1}$  selon leur viscosité (le  $\Delta P$  maximum de consigne étant de 6 bars).

Le débit du fluide dans le système a été mesuré grâce à un débitmètre à induction électromagnétique. La perte de pression entre l'entrée et la sortie de l'Actijoule a été mesurée grâce à un capteur de

pression différentielle Bailey (Bailey ABB group, Zurich, Suisse) (plage de mesure : 0,05 à 6 bars). L'acquisition des données a été faite à l'aide du logiciel Agilent (Agilent Technologies, Californie, États-Unis). Les valeurs de débit, de températures et de perte de pression prises en compte dans les calculs correspondent à une moyenne de 10 valeurs expérimentales consécutives d'une durée de 100 s.

### 3.1.4.1.2 Plan d'expérience

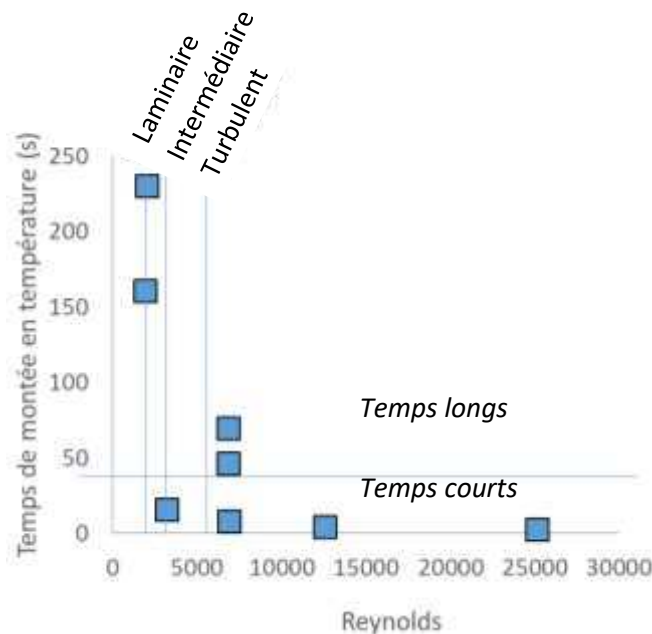


Figure 34 : Essais réalisés en fonction du nombre de Reynolds et du temps de montée en température  $RT_h$ .

Pour faire varier le nombre de Reynolds au sein de la zone de chauffe, il est nécessaire de faire varier le débit d'alimentation. Cependant, en faisant varier le débit, le temps de montée en température varie lui aussi : toutes choses égales par ailleurs, plus le débit augmente, plus on s'approche des régimes turbulents, et plus le temps de séjour dans la zone de montée en température (avant le chambrage) sera faible. Ainsi, pour se placer à une valeur de Reynolds donnée, tout en ayant des temps de montée en température ( $RT_h$ ) différents, il est nécessaire de faire varier le diamètre des tubes. En jouant sur le débit et le diamètre du tube, on peut atteindre des  $RT_h$  différents à un Reynolds fixe, et des Reynolds différents à des  $RT_h$  équivalent (court ou long). Les différents essais conduits pour discriminer l'effet de  $RT_h$  et du régime d'écoulement sur la formation des assemblages sont schématisés sur la Figure 34, et les conditions de procédé utilisées pour la réalisation de chacun de ces essais sont présentées dans le Tableau 7 (conditions 1 à 8 ; Tableau 7).

#### 3.1.4.2 Influence de la température de chauffe

Un troisième paramètre procédé a été exploré : il s'agit de la température de chauffe (T). Pour cela les agrégats ont été traités puis chambrés à des températures de 70 ; 80 ; 85 et 90°C. Les conditions de procédé utilisées pour la réalisation de ces essais sont présentées dans le Tableau 7 (conditions 8 à 11 ; Tableau 7). Pour ces essais, comme précédemment, seules de petites quantité d'agrégats devaient être analysées : celles-ci ont donc été collectés directement en sortie de chambrage et ont été refroidies de façon contrôlée en bain glacé sans utiliser de zone de refroidissement.

Enfin, après avoir observé que le temps de montée en température n'avait pas d'impact sur la formation des agrégats, et dans le but de simplifier le montage de l'installation, un préchauffage à contre-courant de la solution traitée (Echangeur 1) a été utilisé (conditions 12 et 13 ; Tableau 7).

Tableau 7 : Différentes conditions de procédé utilisées dans cette étude.

Condition de procédé	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Débit ( $L.h^{-1}$ )	109	142	60	379	463	473	232	127	127	127	127	127	127
<b>Préchauffage</b>													
Matériel utilisé	Actijoule 2 Config. 1	Actijoule 1	Actijoule 1	Actijoule 2 Config. 1	Actijoule 1	Actijoule 1	Actijoule 1	Actijoule 1	Actijoule 1	Actijoule 1	Actijoule 1	Echangeur 1	Echangeur 1
Température de pré-chauffage ( $^{\circ}C$ )	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	< T° dénaturation	< T° dénaturation
<b>Chauffage</b>													
Matériel utilisé	Actijoule 1	Actijoule 2 Config. 2	Actijoule 2 Config. 1	Actijoule 1	Actijoule 2 Config. 1	Actijoule 2 Config. 2	Actijoule 2 Config. 1	Actijoule 2 Config. 1	Actijoule 2 Config. 1	Actijoule 2 Config. 1	Actijoule 2 Config. 1	Actijoule 2 Config. 1	Actijoule 2 Config. 1
Température de chauffe ( $^{\circ}C$ )	80	80	80	80	80	80	80	80	70	85	90	80	85
Temps de montée en température (s)	160	230	15	46	2	69	4	7	7	7	7	-	-
Valeur de Reynolds dans la zone de chauffe	2000	2000	3200	6900	25000	6900	12600	6900	6900	6900	6900	6900	6900
Régime d'écoulement	Laminaire	Laminaire	Intermédiaire	Turbulent	Turbulent	Turbulent	Turbulent	Turbulent	Turbulent	Turbulent	Turbulent	Turbulent	Turbulent
<b>Chambrage : Echangeur 2</b>													
<b>Refroidissement : Bain glacé</b>													
<b>Refroidissement : Echangeur 1 et 3</b>													

### 3.1.4.3 Analyse statistique

#### 3.1.4.3.1 Analyse de variance ANOVA

L'influence des trois paramètres de procédé ( $Re$ ,  $RT_h$  et  $T$ ) a été testée statistiquement sur différentes variables. Ces variables sont d'abord les fractions massiques ( $Mf_1$ ,  $Mf_2$ ,  $Mf_3$  et  $Mf_4$ ) des différentes populations présentes dans le mélange d'agrégats du mélange 1 et éluées respectivement dans 4 pics différents en A4F (voir 3.3.1.1.3 Interprétation d'un graphe A4F type ; Chapitre 3). On a également pris en variables les rayons de giration ( $Rg_3$  et  $Rg_4$ ) des populations éluées respectivement dans le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> pic en A4F, ainsi que le rayon hydrodynamique ( $Rh_3$ ) de la population éluée dans le 3<sup>ème</sup> pic d'A4F. Il n'a pas été possible de prendre le rayon hydrodynamique de la population éluée dans le 4<sup>ème</sup> pic en A4F car le signal présentait beaucoup d'interférences.

$Re$ ,  $RT_h$  et  $T$  sont considérées comme des variables catégorielles c'est-à-dire qualitatives : ce n'est pas leur valeur numérique qui est considérée ici mais le point de fonctionnement dans lequel elles placent le système (Par exemple la valeur de  $Re$  correspond à un état turbulent, transitoire ou laminaire).

Une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour mesurer les effets significatifs de  $Re$ ,  $RT_h$  ou  $T$  sur les différentes variables explicatives en utilisant le package Rcmdr du logiciel R (version 3.5.3, R development Core Team, 2010). Le premier modèle utilisé examine l'influence de deux variables catégorielles explicatives ( $Re$  et  $RT_h$ ) sur une variable réponse dépendante continue  $Y$ . Les données sont structurées hiérarchiquement avec  $RT_h$  considéré comme facteur imbriqué étant donné qu'il varie avec  $Re$ . Le modèle ANOVA peut ainsi s'écrire comme :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{ji} + \varepsilon_{ijk} \quad (9)$$

Avec  $\mu$ , la réponse moyenne globale,  $\alpha_i$  l'effet dû au  $i$ ème niveau du facteur  $Re$ ,  $b_{ji}$  l'effet dû au  $j$ ème niveau du facteur  $RT_h$  imbriqué dans  $Re$ , et  $\varepsilon_{ijk}$  l'erreur résiduelle.

Le deuxième modèle utilisé examine l'influence de  $T$  sur une variable dépendante continue  $Y$ . Le modèle utilisé pour cette ANOVA peut s'écrire :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i \varepsilon_{ijk} \quad (10)$$

Avec  $\mu$ , la réponse moyenne globale,  $\alpha_i$  l'effet dû au  $i$ ème niveau du facteur  $T$  et  $\varepsilon_{ijk}$  l'erreur résiduelle. L'ensemble des variables et modèles utilisés sont récapitulés Tableau 8.

Seuls les effets significatifs au niveau  $p < 0,05$  ont été pris en compte et seront discutés.

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des variables et modèles utilisés dans l'analyse de variance (ANOVA).

<b>Variable réponse</b>	<b>Variable explicative</b>	<b>Modèle utilisé</b>
Mf1	Re	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{jli} + \epsilon_{ijk}$
	Re:RTh	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{jli} + \epsilon_{ijk}$
	T	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i \epsilon_{ijk}$
Mf2	Re	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{jli} + \epsilon_{ijk}$
	Re:RTh	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{jli} + \epsilon_{ijk}$
	T	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i \epsilon_{ijk}$
Mf3	Re	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{jli} + \epsilon_{ijk}$
	Re:RTh	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{jli} + \epsilon_{ijk}$
	T	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i \epsilon_{ijk}$
Rg3	Re	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{jli} + \epsilon_{ijk}$
	Re:RTh	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{jli} + \epsilon_{ijk}$
	T	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i \epsilon_{ijk}$
Rh3	Re	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{jli} + \epsilon_{ijk}$
	Re:RTh	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{jli} + \epsilon_{ijk}$
Mf4	T	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i \epsilon_{ijk}$
Rg4	T	$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i \epsilon_{ijk}$

### 3.1.4.3.2 Analyse Factorielle de Données Mixes (AFDM)

Une Analyse Factorielle de Données Mixes (AFDM) a été réalisée pour déterminer et représenter de manière visuelle les relations globales entre Re, RT<sub>h</sub>, Rg, Rh, Mf1, Mf2 et Mf3. Cette méthode permet d'analyser des ensembles de données constitués de variables quantitatives (Rg, Rh, Mf1, Mf2 et Mf3) et qualitatives (Re et RT<sub>h</sub>). La méthode peut être comprise comme la combinaison d'une Analyse de Correspondances Multiples (ACM) pour les variables qualitatives (ou catégorielles) et d'une Analyse en Composante Principale (ACP) pour les variables quantitatives. Cette méthode, décrite en détail par Pagès (2004), a été utilisée dans cette étude sur 16 expériences de production d'agrégats (condition 1 ; conditions 2 à 7 réalisées en duplicat, et condition 8 réalisée en triplicat ; Tableau 7). Une classification ascendante hiérarchique (CAH) des composantes principales a été effectuée pour mettre en évidence les liens hiérarchiques entre les individus ou groupes d'individus. On cherche ainsi à ce que les individus regroupés au sein d'une même classe (homogénéité intra-classe) soient les plus semblables possibles tout en ayant des classes les plus différentes possibles (hétérogénéité inter-classe). La méthode classique de Ward a été utilisée pour regrouper des classes ayant des centres de gravité proches, et les parangons, individus les plus proches du centre de chaque classe ont été calculés. L'analyse statistique ainsi que la représentation graphique de l'AFDM ont respectivement été

effectuées à l'aide des packages RCmdr et FactoMineR du logiciel R (version 3.5.3 ; R Development Core Team, 2010).

#### 3.1.4.4 Compréhension des mécanismes impliqués dans la formation des agrégats fractals

##### 3.1.4.4.1 Détermination de l'échelle de Kolmogorov

Dans le but de comparer la taille des structures turbulentes dans la zone de chauffe de notre installation, à celle des agrégats produits, l'échelle de Kolmogorov  $l_k$  a été estimée dans les essais conduits en régime turbulent en utilisant les équations 11 à 14 :

$$l_k = \left( \frac{(\mu/\rho)^3}{E_D} \right)^{1/4} \quad (11)$$

Avec  $l_k$  l'échelle de Kolmogorov (m),  $\mu/\rho$  la viscosité cinématique ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) et  $E_D$  la puissance dissipée par unité de masse de fluide ( $\text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) qui est calculée ainsi :

$$E_D = \frac{Q \times \Delta P}{\rho \times V} \quad (12)$$

Avec  $Q$  le débit volumique du fluide ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $\Delta P$  la perte de pression (Pa) et  $\rho \cdot V$  la masse de fluide (kg). Ici,  $\Delta P$  n'a pas été mesurée, mais a été calculée en utilisant l'équation de Darcy :

$$\Delta P = \frac{Da \cdot v^2 \cdot \rho \cdot L}{2D} \quad (13)$$

Avec  $Da$ , le nombre de Darcy obtenu en appliquant la relation de Blasius quand  $2000 < Re < 10^5$  :

$$Da = 0.316 \cdot Re^{-0.25} \quad (14)$$

##### 3.1.4.4.2 Détermination du niveau de dénaturation des $\beta$ lg et des paramètres cinétiques

Pour déterminer le niveau de dénaturation de la  $\beta$ lg ainsi que les cinétiques de dénaturation-agrégation de la  $\beta$ lg, la méthode développée et décrite en détail par Petit et al. (2011) a été utilisée.

Cette méthode consiste à chauffer à différentes températures et pendant différents temps la solution de PS préparée pour former des agrégats (Sol PS 1), et à doser ensuite pour chaque échantillon les  $\beta$ lg natives présentes. A partir de ces mesures, il est possible de déterminer la constante de la réaction de dénaturation  $k_n$  pour une température donnée en intégrant l'équation suivante puis en faisant une régression linéaire :

$$-\frac{dC}{dt} = k_n C^n \quad (15)$$

Avec  $C$  la concentration en protéines natives (i.e. non agrégées) et  $n$ , l'ordre de réaction fixé à 1,5.



Ces expériences ont été conduites à l'aide d'un système chromatographique HPLC (Waters, Milford, MA, USA) en utilisant de la poudre de  $\beta$ lg lyophilisée (pureté > 90%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) comme standard.

### 3.1.5 Choix des paramètres matière et procédé pour une production à l'échelle semi-industrielle

Beaucoup de conditions de productions différentes ont été testées. Certaines conditions font varier les paramètres matière ([protéine] et [sel] ; Figure 31) et d'autres les paramètres procédé (Re, temps de montée en température, température ; Tableau 7). Dans la suite de l'étude (notamment chapitres 5 et 6), et sauf indication particulière, les paramètres matière et procédé utilisés pour obtenir des agrégats de grande taille des mélanges 1 et 2 sont répertoriés dans le Tableau 9.

Ces paramètres ont été choisis d'une part pour former des agrégats de grande taille, en s'appuyant sur les conditions de production à l'échelle laboratoire précédemment établies par les membres du projet PROFIL, et d'autre part pour répondre le plus possible à des contraintes industrielles (temps de production et nettoyage courts).

Tableau 9 : Paramètres matière et procédé utilisés dans l'étude pour la production des agrégats du mélange 1 et du mélange 2.

	Mélange 1	Mélange 2
[Protéines] (%)	5	6
[NaCl] (mM)	10	25
pH	7	8,3
Température de chauffe (°C)	85	80
Nombre de Reynolds de la zone de chauffe	6900	6900
Temps de montée en température dans la zone de chauffe (s)	7	7
Temps de chambrage (min)	15	15

### 3.1.6 Etude de l'encrassement induit par les mélanges 1 et 2

Le comportement encrassant des deux mélanges a été étudié en suivant l'évolution de la perte de charge au cours de la production. Pour cela, des solutions de PS ont été préparées comme indiqué dans le Tableau 9 et ont été chauffées pour former des agrégats dans le tube à passage de courant Actijoule 2 équipé d'un capteur de pression différentielle (plage de mesure : 0,05 à 6 bars) afin de

mesurer la perte de pression entre l'entrée et la sortie de l'Actijoule. Les essais ont été conduits pendant 4h ou à des temps plus courts en cas d'élévation importante de la perte de charge.

## 3.2 Concentration et séchage par pulvérisation

Les solutions d'agrégats une fois produites, ont été concentrées par ultrafiltration (UF) tangentielle et séchées par pulvérisation.

### 3.2.1 Ultrafiltration

Les solutions d'assemblages protéiques ont été concentrées par ultrafiltration tangentielle sur deux appareils différents dont les caractéristiques membranaires sont similaires et qui retiennent r les protéines tandis que les minéraux, les petites molécules organiques (lactose, azote non protéique) et l'eau peuvent passer la membrane. Cette classe de séparation permet ainsi de concentrer l'ensemble des molécules retenues (ici, les protéines). Le pilote d'UF TAMI (TAMI industries, Nyons, France) de paillasse, muni d'un bac de lancement de faible capacité (40L) et qui a l'avantage d'avoir un faible volume mort (1L) a été utilisé pour les essais de faible volume. Le pilote d'UF Valobab (TIA, Bollène, France) muni d'une cuve externe de capacité plus importante (300L) a été utilisé pour les essais à grand volume traité. Les caractéristiques de ces deux pilotes d'UF sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Caractéristiques des pilotes d'ultrafiltration utilisés.

	UF TAMI	UF Valobab
Volume du bac de lancement (L)	40	300
Volume mort de l'installation (L)	1	27,7
Type de membrane	Minérale	Minérale
Seuil de coupure	8 kDa	
Taille des pores		20 nm
Surface d'échange	1,00 m <sup>2</sup>	1,08 m <sup>2</sup>
Diamètre du canal (mm)	4	6
Composition du perméat	Minéraux et eau	Minéraux et eau

Sur le pilote Valobab, 300L de solution d'agrégats sont pompés à l'aide d'une pompe volumétrique qui a l'avantage de pouvoir davantage pousser un produit visqueux qu'une pompe centrifuge et qui permet de limiter le cisaillement de la solution d'agrégats traitée. La concentration se fait à 50°C sur une membrane minérale (membrane SCT Membralox type P1960, Pall corporation, New York, Etats Unis ; surface d'échange : 1,08 m<sup>2</sup> ; taille des pores : 20 nm) dont le diamètre des canaux est de 6 mm permettant le passage de produit visqueux.

Dans cette étude, différents niveaux de concentration des agrégats, correspondants à différents Facteur de Réduction Volumique (*FRV*) ont été testés. Un *FRV* de 2 a été appliqué pour chacun des mélanges étudiés dans le cadre d'essais de grand volume suivis d'un séchage sur la tour Bionov. Dans ce cas, la pression transmembranaire moyenne appliquée est de  $0,17 \pm 0,03$  MPa, et la densité de flux de perméation évolue au cours de la concentration de 48 à 26  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  pour les agrégats du mélange 1 et de 50 à 12  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  pour les agrégats du mélange 2.

Sur le pilote de laboratoire TAMI, fonctionnant sous air comprimé, 40L de solution d'agrégats sont concentrés à 50°C à différents *FRV* sur une membrane minérale (surface d'échange : 1,00  $\text{m}^2$  ; seuil de coupure 8 kD) dont le diamètre des canaux est de 4 mm. La pression transmembranaire moyenne appliquée est de  $0,23 \pm 0,04$  MPa, et la densité de flux de perméation évolue au cours de la concentration de 65 à 26  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  pour les agrégats du mélange 1.

### 3.2.2 Séchage par pulvérisation

Les solutions concentrées d'assemblages protéiques ont été séchées à deux échelles. Une tour de séchage pilote (Minor) de faible capacité évaporatoire (5 kg d'eau. $\text{h}^{-1}$ ) a été utilisée pour les essais de faible volume, et une tour semi-industrielle, Bionov, de capacité évaporatoire plus significative (70 à 100 kg d'eau. $\text{h}^{-1}$ ) a été utilisée pour les essais de grand volume.

La tour de séchage Minor (Mobile Minor, GEA, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) est présentée Figure 35A. Ce pilote est équipé d'une buse bi-fluide (diamètre d'orifice : 0.80 mm) (Débit d'air comprimé : 16  $\text{kg}\cdot\text{h}^{-1}$ ) et sa capacité évaporatoire maximum est d'environ 5  $\text{kg}$  d'eau. $\text{h}^{-1}$ . La chambre a une hauteur cylindrique de 62 cm et un diamètre de 80 cm, et présente un cône de 60°. Le concentré d'assemblages protéiques est introduit au niveau du toit de la chambre à l'aide d'une pompe péristaltique (Type 520s, Watson-Marlow, Gambais, France) à un débit d'environ 2  $\text{kg}\cdot\text{h}^{-1}$  (Zhu et al. 2011). L'air de séchage prélevé à l'extérieur est d'abord déshumidifié jusqu'à 1-1,5 g d'eau. $\text{kg}^{-1}$  d'air sec par un déshydrateur (Type M210, Munters Europe AB, Sollentuna, Suède). Cet air sec est ensuite chauffé à la température désirée à l'aide de résistances électriques (puissance 7.5 kW) et entre dans la chambre à un débit de 51  $\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ . Le séchage se fait à co-courant, et les poudres sont récupérées dans un récipient après le cyclonage de l'ensemble de l'air de séchage en aval de la chambre. Les poudres obtenues (diamètre moyen de l'ordre de 20  $\mu\text{m}$ ) et les pertes énergétiques (de l'ordre de 25% ; (Zhu et al., 2009) sont sans rapport avec ce qui est observé à l'échelle industrielle (diamètre moyen supérieur ou égal à 50  $\mu\text{m}$  et pertes énergétiques comprises entre 2 et 3%). Ceci rend difficile l'extrapolation des résultats obtenus à cette échelle, tant en ce qui concerne les caractéristiques physiques des poudres que les paramètres de procédé appliqués (températures, rapport débit d'air / débit de concentré, etc.) Pour autant, des travaux antérieurs (Vignolles et al., 2010) ont montré que ce type de résultats obtenus permettent

d'apprécier qualitativement l'influence de paramètres procédé. Les essais menés sur ce pilote, qui est facile à mettre en route et qui requiert de faible quantité de matière, ont donc pour finalité première de tester rapidement un grand nombre de combinaisons [formules / paramètres de séchage].

Le pilote semi-industriel Bionov (Rennes, France) (Figure 35B) est une tour d'atomisation multiple effets (MSD) (Niro Atomizer, GEA, Saint Quentin en Yvelines, France). Elle a une capacité évaporatoire de 70 à 100 kg d'eau.h<sup>-1</sup> (Schuck et al., 1998). Pour les essais réalisés, la tour a été équipée d'une buse sous pression (diamètre d'orifice : 0.63 mm, modèle n°72 divergent 21) et un pointeau à 2 rainures. Après avoir été déshumidifiés jusqu'à 1 g d'eau. Kg<sup>-1</sup> d'air sec par un déshydrateur (Munters, Sollentuna, Suède), les différents airs sont chauffés directement à l'aide de batteries électriques. Contrairement à la tour Minor, les paramètres de séchage et les caractéristiques des poudres obtenues sur la tour Bionov sont naturellement extrapolables à l'échelle industrielle : les premiers sont non significativement différents de ceux obtenus à l'échelle industrielle pour un même rapport [débit de concentré / débit d'air], et les poudres obtenues ont des distributions granulométriques identiques.

Les différents paramètres inhérents à la conduite du séchage sur les deux tours et selon le type d'agrégats séchés sont présentés dans le Tableau 11.

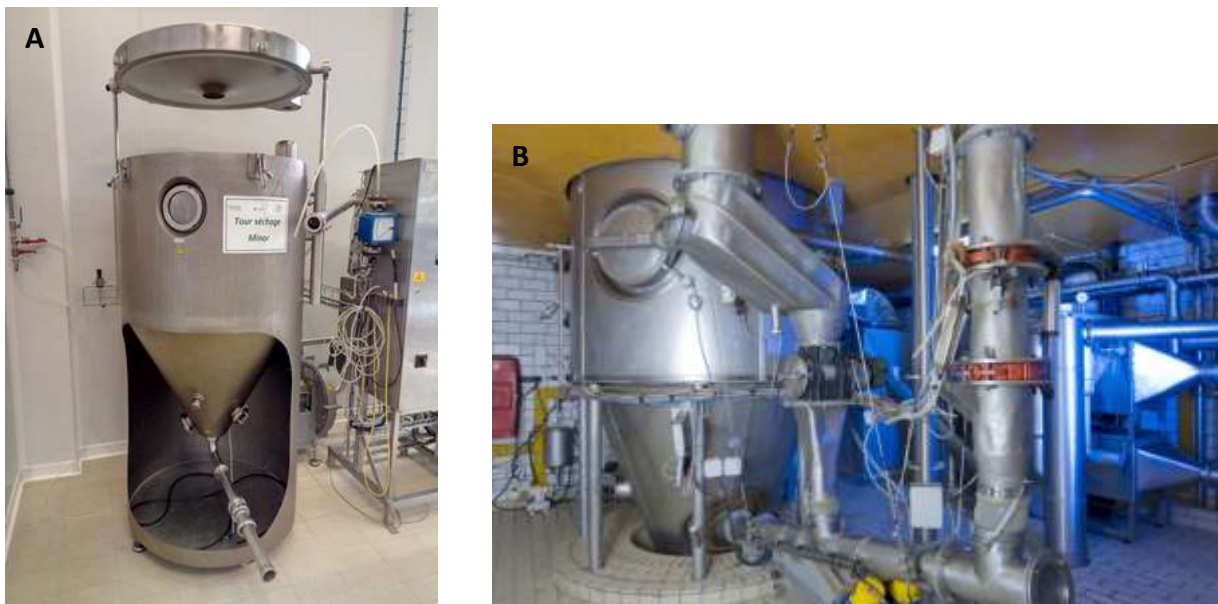


Figure 35 : Tours de séchage Minor (A) et Bionov (B).

Tableau 11: Paramètres de séchage des assemblages protéiques.

Tour de séchage	Type d'agrégats	Débit alimentation (L.h <sup>-1</sup> )	T°C air entrée	T°C air sortie	Vitesse air amont (m.s <sup>-1</sup> )
<b>Minor</b>	Mélange 1	1.8	255	96	8.15
	Mélange 2	1.7	250	98	8.15
<b>Bionov</b>	Mélange 1	100.3	250	94	14.4
	Mélange 2	102	250	93	14.2

La tour Bionov a été configurée en « séchage un temps », (sans granulation de la poudre et sans utilisation de lit fluidisé).

### 3.2.3 Analyses des poudres d'agrégats de protéines solubles

#### 3.2.3.1 Analyse physico-chimiques

Les poudres obtenues ont été caractérisées selon 3 indicateurs physico-chimiques :

- 1) L'extrait sec total (EST) : la mesure d'extrait sec total correspond à l'évaporation de l'eau de la poudre mélangée avec du sable, sous vide après une période de 7h dans une étuve à 102°C (Schuck et al., 2012a) .
- 2) L'activité de l'eau (Aw) était mesurée à 20°C avec un hygromètre (Hygrolab C1, Rotronic, Croissy Beaubourg, France ; (Schuck et al., 2012))
- 3) Granulométrie : la distribution de taille de particules de poudre a été mesurée par diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK) en utilisant le module de dispersion voie sèche. Les indices de réfraction et d'absorption choisis pour les particules d'assemblages fractals étaient respectivement 1,450 et 0,001.

#### 3.2.3.2 Réhydratation des poudres

##### 3.2.3.2.1 Mesure des indices de mouillabilité, dispersibilité et solubilité

Pour évaluer la capacité des poudres produites à se réhydrater, les trois indices de mouillabilité, de dispersibilité et de solubilité ont été mesurés selon les protocoles décrits par Schuck et al. (2012).

Pour mesurer l'indice de mouillabilité (IM) (Figure 36), 10g de poudre sont déposés à la surface libre d'un bécher contenant 100g d'eau distillée à  $t_0$ . L'IM correspond au temps, en secondes, nécessaire pour atteindre le mouillage complet, correspondant à l'état où plus aucune particule n'est visible à la surface du liquide. Un IM inférieur à 120s signifie que la poudre est mouillable, un IM supérieur à 120s correspond à des poudres peu mouillables. (Schuck et al., 2012)

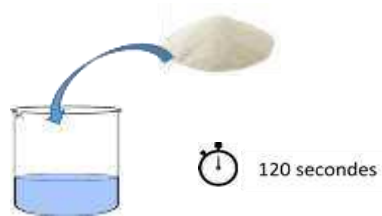


Figure 36 : Représentation schématique du test de mouillabilité.

Pour mesurer l'indice de dispersibilité (ID) (Figure 37), 10g de poudre sont dispersés dans un bécher contenant 100g d'eau. Le mélange est agité à l'aide d'une spatule pendant 15s puis versé sur un tamis d'ouverture de maille de 200  $\mu\text{m}$ . Une mesure d'extrait sec est ensuite réalisée sur le filtrat. L'ID est ensuite calculé comme suit :

$$ID = \frac{(100 + m_{ech}) \cdot X_{MS}}{m_{ech} \cdot \frac{100 - X_{ER}}{100}} \quad (16)$$

Avec  $m_{ech}$  la quantité de poudre utilisée,  $X_{ER}$ , la teneur en eau libre résiduelle dans la poudre (% p/p),  $X_{MS}$ , la matière sèche du filtrat après passage sur le tamis (% p/p). Les poudres dont l'ID est inférieur à 95% sont considérées comme peu dispersibles. (Schuck et al., 2012)

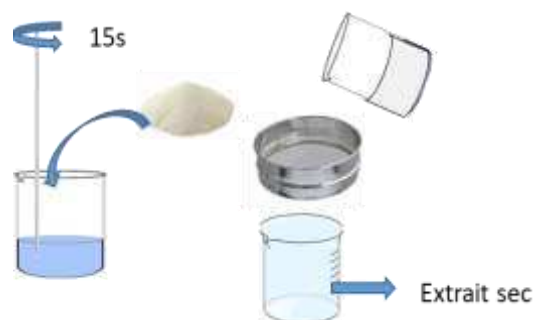


Figure 37 : Représentation schématique du test de dispersibilité.

Pour mesurer l'indice de solubilité (Figure 38), 10g de poudre sont agités en présence de 100g d'eau et de quelques gouttes d'agent antimoussant (Laurate de diglycole (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)) pendant 90s à 4 000 tr.min<sup>-1</sup> dans un Cenco Mixer. Après 15min, 50mL de la solution sont centrifugés pendant 300s à 160g. Le culot est remis en solution dans de l'eau (qsp 50mL) et à nouveau centrifugé 300s à 160g. L'indice d'insolubilité (II) est égal au volume de sédiment (mL) décanté lors de la deuxième centrifugation. L'IS est égal à :

$$IS = 100 - [2 \times II] \quad (17)$$

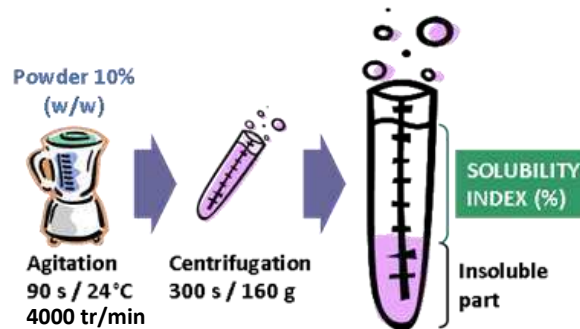


Figure 38 : Représentation schématique du test de solubilité.

Les poudres ayant un indice de solubilité supérieur à 95 % peuvent être considérées comme solubles, alors que celles ayant un indice de solubilité inférieur à 95 % sont peu solubles (Schuck et al., 2012).

### 3.2.3.2.2 Outils de redispersion des poudres

Pour redisperser les poudres produites aux échelles Minor et Bionov, deux conditions différentes ont été utilisées. La première condition correspond à une agitation des échantillons par une pâle 6 bras à 900 tr.min<sup>-1</sup> pendant 3h. Dans ce cas, 20g de poudre sont déposés dans un bécher d'1L contenant une solution saline de sorte que les concentrations en protéines et sel soient identiques à celles de la solution d'agrégats avant concentration-séchage. Le bécher est muni de contre-pâles pour éviter la formation d'un tourbillon lors de l'agitation. La poudre est dans un premier temps pré-mélangée pendant 15s à l'aide d'une spatule puis agitée à l'aide d'une pâle 6 bras à 900 tr.min<sup>-1</sup>.

La seconde condition, plus intensive, consiste à compléter cette étape d'agitation initiale (900 tr.min<sup>-1</sup>, 3h) par une étape d'homogénéisation à l'aide d'un homogénéisateur PANDA Plus 2000 (GEA Niro Soavi, Parme, Italie) générant des taux de cisaillement supérieur. Les pressions mises en œuvre étaient de 600 bar au 1<sup>er</sup> étage et de 120 bar au 2<sup>ème</sup> étage.

### 3.2.3.3 Microscopie confocale

Afin de suivre l'impact du temps passé à l'état poudre, sur la capacité de réhydratation des grains de poudre, des observations en microscopie confocale ont été réalisées (Microscope TE2000-E C1si, Nikon, Champigny sur Marne, France) 4 jours ou 4 mois après la fabrication des poudres. L'objectif X100 immersion huile a été utilisé. Le marqueur de fluorescence Nile Blue a été déposé dans l'échantillon puis excité à 633 nm. Le faisceau émis a été capté à 650 nm. Le logiciel EZ-C1 (Nikon) a été utilisé pour l'acquisition des images, ces dernières ont été prises dans l'échantillon à une profondeur entre 10 et 40  $\mu\text{m}$ .

## 3.3 Caractérisation des agrégats produits

---

### 3.3.1 Propriétés intrinsèques : taille et morphologie des agrégats

#### 3.3.1.1 A4F

La taille et la structure des agrégats a été déterminé par Fractionnement Asymétrique Flux-Force (Asymetrical-Flow-Field-Flow-Fractionation, A4F) couplé à un détecteur à diffusion de lumière multi angle (Multi Angle Light Scattering, MALS), d'un réfractomètre différentiel (DRi) et d'un détecteur à diffusion de lumière quasi-élastique (Quasi-Elastic Light Scattering, QELS) au laboratoire de l'école d'ingénieur de Purpan (Toulouse).

##### 3.3.1.1.1 Principe

En A4F, les molécules sont séparées durant l'élution en fonction de leur coefficient de diffusion, c'est-à-dire en fonction de leur diamètre hydrodynamique. Effectivement, les phénomènes de diffusion sont inversement proportionnels à la taille des particules : les particules de petites tailles ont un coefficient de diffusion élevé tandis que les particules de grande taille ont un coefficient de diffusion inférieur.



L'équipement d'A4F (Figure 39) est composé d'un canal trapézoïdal dont la partie inférieure est une membrane poreuse et dans lequel est injecté l'échantillon qui va être soumis à différents flux.

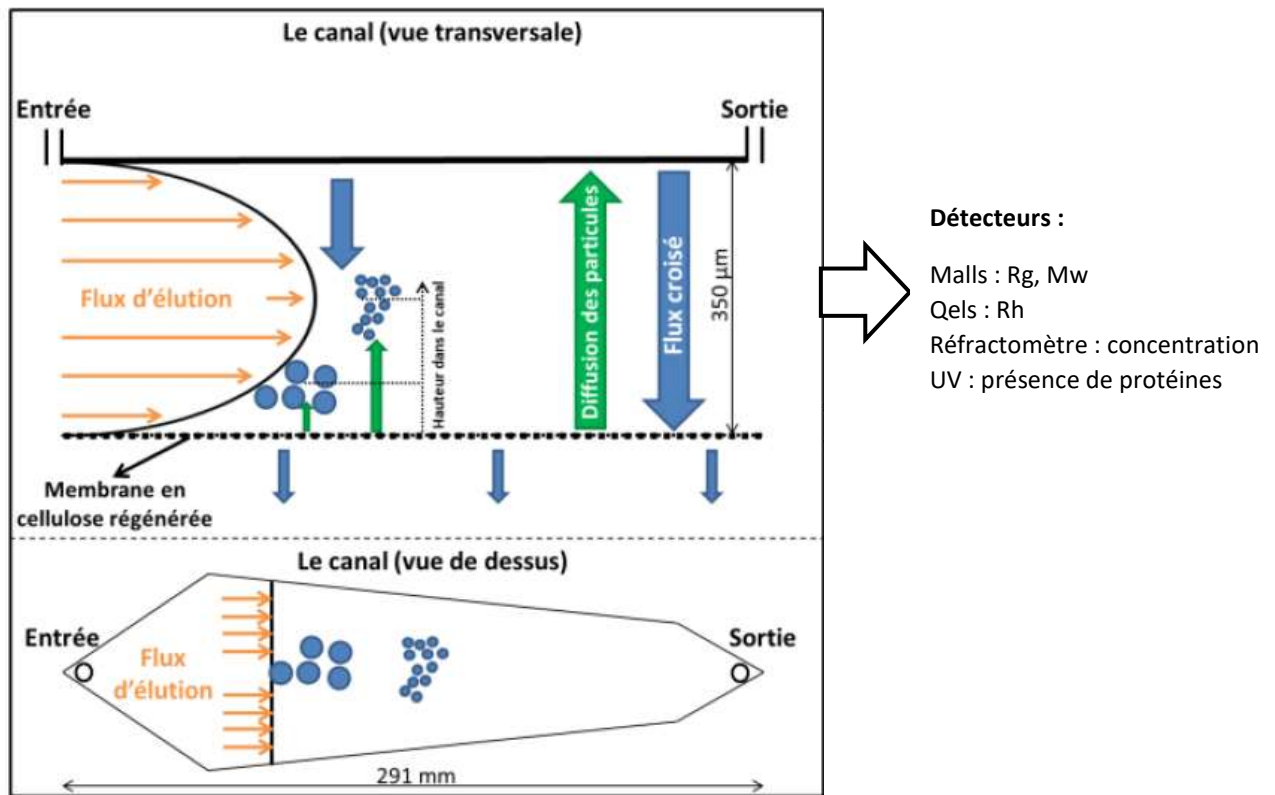


Figure 39 : Principe de fonctionnement de l'A4F

Un flux croisé ( $F_c$ ), perpendiculaire au flux d'élué va permettre de ramener les particules à éluer contre la membrane. Ce  $F_c$  va s'opposer au coefficient de diffusion des particules, et un équilibre va s'établir entre le  $F_c$  et la diffusion des particules. Plus les particules auront un coefficient de diffusion élevé (i.e plus elles seront de petites taille) et plus elles s'opposeront au  $F_c$  et se trouveront positionnées dans la partie haute du canal. A l'inverse, plus les particules auront un coefficient de diffusion faible (i.e plus elles seront de grande taille), et moins elles s'opposeront au  $F_c$  et se trouveront positionnées dans la partie inférieure du canal. Les particules sont ainsi réparties dans le canal en fonction de leur taille. Le flux d'élué parabolique va ensuite permettre de séparer les entités en fonction de leur hauteur dans le canal et ainsi selon leur taille. Les petites particules, positionnées plus haut dans le canal, sont placées en face de vecteurs vitesse plus importants, et seront donc éluées en premier

Les particules éluées passent ensuite dans différents détecteurs. Le détecteur multi-angle permet d'avoir une information sur le Rayon de giration (Rg) des particules ainsi que sur leur masse molaire (Mw) quand il est couplé au réfractomètre. Le détecteur à diffusion de lumière quasi-élastique permet

de connaître le Rayon hydrodynamique (Rh) des particules. Le réfractomètre permet de connaître la concentration des molécules éluées et le détecteur UV-visible permet de vérifier la présence de protéines. Ce dernier n'est pas utilisé pour mesurer la concentration étant donné que les agrégats de grande taille diffusent la lumière, surestimant ainsi l'absorbance et donc la concentration en protéines.

### 3.3.1.1.2 Matériel

L'équipement A4F utilisé est un système de séparation DualTec (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany) muni d'un canal trapézoïdal (longueur : 19,5 cm ; largeur initiale : 1,65 cm ; largeur finale 0,27 cm). Un espaceur Mylar en polyester de 350  $\mu\text{m}$  d'entretoise est positionné entre une membrane d'ultrafiltration en cellulose régénérée de porosité 10kDa (Wyatt Technology, Europe, Dernbach, Allemagne) et une plaque supérieure rigide. Une pompe isocratique Agilent 1260 Infinity II avec un dégazeur en ligne et un passeur d'échantillons en mode flacons 1260 Infinity délivre le flux d'éluant et d'injection de l'échantillon dans le canal A4F. Un filtre en ligne 0,1  $\mu\text{m}$  (VVLV, Millipore, Allemagne) a été installé pour l'éluant entre la pompe et le canal A4F. L'éluant composé d'eau milli-Q avec 45mM de NaCl et 0,02% de  $\text{NaN}_3$  a été filtré sur une membrane de fluorure de polyvinylidène de 100 nm (Millipore Corp, Darmstadt, Allemagne)

Une méthode de fractionnement a été optimisée pour séparer les agrégats fractals (Tableau 12). 60  $\mu\text{L}$  d'échantillon à une concentration de 1  $\text{g.L}^{-1}$  ont été injectés dans le canal avec un flux de 0,2  $\text{mL.min}^{-1}$ .

Tableau 12 : Méthode de fractionnement A4F utilisée pour la caractérisation des agrégats avec  $F_c$  le flux croisé et  $V_d$  le flux d'élution laminaire et parabolique.

Temps (min)	Mode	$F_c$ initial ( $\text{mL.min}^{-1}$ )	$F_c$ final ( $\text{mL.min}^{-1}$ )	$F_c/V_d$
1	elution	0	0	0
2	focus	2	2	4
6	focus+injection	2	2	4
5	elution	2	2	4
10	elution	2	0.3	4
10	elution	0.3	0.12	0.6
58	elution	0.12	0.12	0.24
15	elution	0	0	0
2	elution+rinsing	0	0	0
6	elution	0	0	0

Un détecteur multi-angle (Heleos II, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) a été utilisé à une longueur d'onde de 662 nm, calibré avec une solution de Toluène et normalisé avec un standard de Sérum d'Albumine Bovin. Un module de diffusion dynamique de lumière (DynaPro NanoStar, Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany) a été installé sur l'un des angles (angle 15 ; 126°) du

détecteur multi-angle). Un réfractomètre (OptilabRex, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) a été utilisé à une longueur d'onde de 658 nm.

L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés à l'aide du logiciel ASTRA de Wyatt Technology Corporation (version 7.1.2).  $M_w$  et  $R_g$  (masse molaire et rayon de giration de la ième tranche du fractogramme) ont été obtenus en extrapolant avec le modèle de Berry (2<sup>ème</sup> ordre ; indice de réfraction  $dn/dc = 0,185 \text{ ml.g}^{-1}$ ). Cette méthode est adaptée pour les polymères de grande taille (Aberle et al., 1994). Sept angles (entre  $57^\circ$  and  $117^\circ$ ) ont été utilisés pour calculer les rayons de giration ( $R_g$ ) et masses molaires ( $M_w$ ). Le pourcentage d'erreur est calculé à partir de la différence entre le fit théorique du modèle de Berry et les valeurs expérimentales.

La densité apparente des particules a été calculée selon (Glantz et al., 2010; Loiseleux et al., 2018):

$$d(app) = \frac{M_w}{\frac{4}{3}\pi \cdot R_g \cdot N_a} \quad (18)$$

Avec  $N_a$  le nombre d'Avogadro.

Des informations de structure ont pu être déterminées à partir du facteur de forme  $R_g/R_h$  qui est le ratio du rayon de giration sur le rayon hydrodynamique. Le rayon de giration tient compte de la pondération massique des distances du centre de gravité de chaque point de la molécule, tandis que le rayon hydrodynamique correspond au rayon d'une sphère ayant le même coefficient de diffusion que la particule considérée (Figure 40). Le facteur de forme d'une sphère est de l'ordre de 0,74 tandis que celui d'un agrégat branché de forme étoilée est de l'ordre de 1,4 (Figure 40), et le  $R_g/R_h$  d'un bâtonnet fin est de 2,36 (Adolphi and Kulicke, 1997).

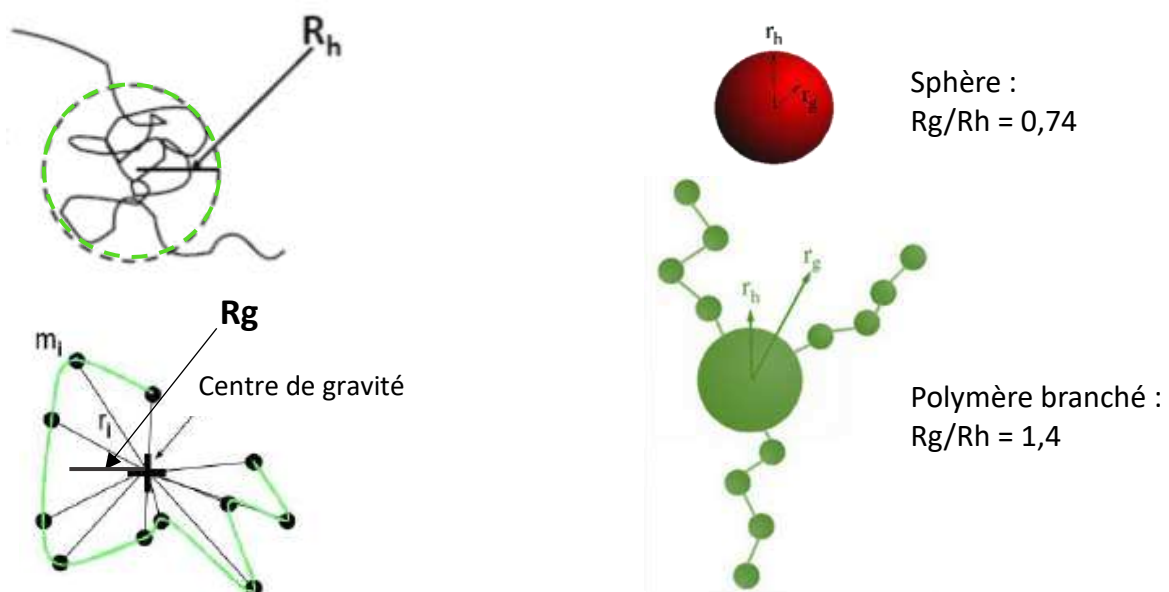


Figure 40 : Représentation schématique de la mesure de facteur de forme  $R_g/R_h$  d'une sphère et d'un polymère branché à partir du rayon de giration  $R_g$  et du rayon hydrodynamique  $R_h$ . Adapté de Wyatt Technology (document interne).

Ce ratio qui rend compte des structures branchées ou linéaires (Ioan et al., 1999) est un bon indicateur de la composition d'un mélange d'assemblages protéiques. En effet les microgels de forme sphérique tirent le  $R_g/R_h$  vers des valeurs de 0,74 tandis que les agrégats fractals de grande taille tirent les valeurs de  $R_g/R_h$  vers des valeurs de 1,4 voire davantage.

La conformation des objets peut également être définie par la dimension fractale  $D_f$  (Equation 19) (Ioan et al., 1999; Loiseleux et al., 2018).

$$R_g = \frac{1}{D_f} \cdot M_w \quad (19)$$

La  $D_f$  est calculée à partir de l'inverse de la pente obtenue sur une décade de la représentation log-log du  $R_g$  en fonction de la  $M_w$  sur le logiciel Astra de Wyatt Technology Corporation (version 7.1.2). Le fait qu'il faille obtenir des valeurs de  $R_g$  et  $M_w$  sur une décade fait que la dimension fractale n'est pas toujours calculable. Aussi dans cette étude la conformation des objets (sphérique ou branchés) sera davantage interprétée par le facteur de forme  $R_g/R_h$ .

### 3.3.1.1.3 Interprétation d'un graphe A4F type

De nombreux fractogrammes A4F seront discutés dans cette étude, aussi ce paragraphe vise à donner les clés de lecture et d'interprétation d'un fractogramme d'A4F type.

Pour un fractionnement A4F, la première chose à considérer est le taux de recouvrement  $T_r$  exprimé en pourcentage :

$$T_r = \frac{m_{inj}}{m_{recup}} \quad (20)$$

Avec  $m_{inj}$ , la quantité d'agrégats injectée (g) et  $m_{recup}$ , la quantité d'agrégats détectée par le réfractomètre (g). Si le taux de recouvrement est faible ( $T_r < 70\%$ ) c'est que la totalité du matériel injecté n'a pas été récupéré et que du matériel de grande taille s'est encrassé sur la membrane. Dans cette étude, les taux de recouvrement des graphes présentés sont supérieurs à 70% sauf indication contraire.

Sur un graphe d'A4F (Figure 41A), on représente sur l'axe de gauche la concentration normalisée par  $m_{recup}$ . Pour cette raison, on prend peu en compte l'aire sous la courbe, car la présence d'une petite quantité d'objets de très grande taille élués à des temps longs aura un impact important sur  $m_{recup}$  ainsi que sur l'aire du pic.

La concentration normalisée des objets détectés est donc représentée en fonction du temps d'élution. Or les objets sont élués dans le temps en fonction de leur coefficient de diffusion, c'est-à-dire en fonction de leur Rh. Les objets élués en premier (temps d'élution courts) ont un Rh faible tandis que les objets élués en dernier (temps d'élution grands) ont un Rh plus important.

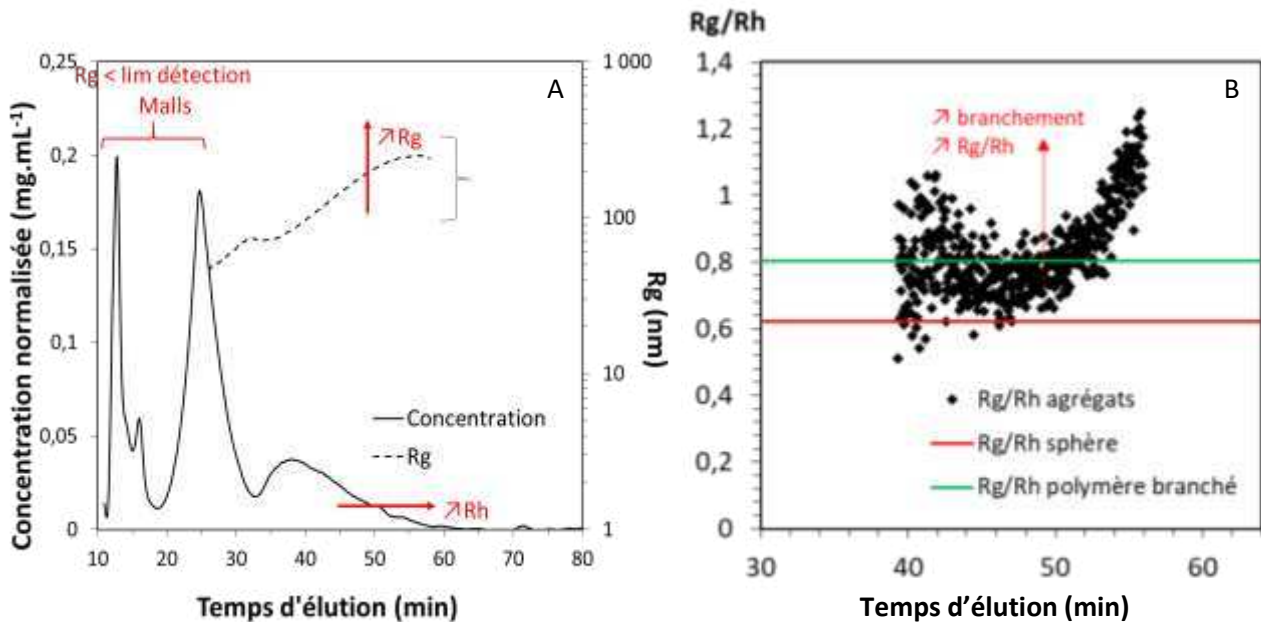


Figure 41 : Fractogramme type A4F (A) et représentation du facteur de forme Rg/Rh (B).

On représente sur un autre axe (axe de droite ; Figure 41A), en échelle logarithmique le Rg des objets élués en fonction de leur temps d'élution. Le Rg est calculé à partir des données collectées par le détecteur multi-angle à chaque temps d'élution. Le détecteur n'est pas suffisamment sensible pour détecter des objets de très petite taille, c'est pourquoi on ne peut avoir les valeurs de Rg (et par conséquent de Df et Rg/Rh) qu'à partir d'un certain temps d'élution. Plus la courbe de Rg est décalée à partir des données A4F on peut également représenter le facteur de forme Rg/Rh en fonction du temps d'élution (Figure 41B). La variation d'un Rg/Rh entre deux échantillons différents se traduira par un décalage du nuage de points vers des objets plus sphériques (trait rouge, Rg/Rh correspondant à celui d'une sphère) ou plus branchés (trait vert, Rg/Rh correspondant à des polymères branchés de forme étoilée). Plutôt que de faire une représentation graphique, on peut également calculer un Rg/Rh moyen d'un pic à partir de ces mêmes données.

### 3.3.1.2 Microscopie Electronique à Transmission

La Microscopie Electronique à Transmission (MET) a été utilisée pour caractériser les mélanges d'agrégats en terme de morphologie.

### 3.3.1.2.1 Principe

L'appareil est constitué d'une source d'électrons (un filament de tungstène), de lentilles électromagnétiques et d'un détecteur d'électrons. Un faisceau d'électrons est produit, accéléré, puis concentré grâce aux lentilles sur un échantillon très mince. En traversant l'échantillon, le faisceau d'électrons interagit avec les atomes constitutifs de l'échantillon, et selon la forme et la nature de l'échantillon, le faisceau est transformé et produit différentes sortes de rayonnements. Les électrons transmis sont alors analysés par le détecteur qui traduit le signal en image contrastée avec une résolution de quelques nanomètres. Pour obtenir un contraste de bonne qualité, l'échantillon subit au préalable une coloration par des sels de métaux lourds comme l'acétate d'uranyle.

### 3.3.1.2.2 Préparation d'échantillon et observation

Afin de se trouver dans les meilleures conditions d'observation, la concentration en protéines a été ajustée à 0,5 g.L<sup>-1</sup>. Un volume de 15 µL d'échantillon a été déposé sur une grille en carbone (200 mailles) et coloré avec une solution d'acétate d'uranyle 2% pendant 2 minutes. Les échantillons sont ensuite rincés deux fois à l'eau milliQ puis séchés pendant 20 minutes à 50°C dans une étuve. Les observations ont été réalisées sur un JEOL JEM-1230 (JEOL, Tokyo, Japon) fonctionnant à 80kV.

## 3.3.2 Propriétés comportementales

### 3.3.2.1 Compression osmotique

Des expériences de compression osmotique ont été conduites pour établir les diagrammes d'état des mélanges d'agrégats à l'équilibre thermodynamique.

#### 3.3.2.1.1 Principe

Le principe de la compression osmotique repose sur le phénomène d'osmose. Soient deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable, laissant passer l'eau mais pas les solutés. Un déséquilibre des potentiels chimiques dans les deux compartiments (par exemple par présence du soluté d'un seul côté de la membrane) entraînera la migration spontanée de l'eau du compartiment dont le potentiel chimique est le plus fort, vers le compartiment dont le potentiel chimique est le plus faible, jusqu'à ce que l'équilibre soit rétabli. La pression osmotique est la pression hydrostatique qu'il faudrait appliquer pour empêcher le passage de l'eau à travers la membrane. Dans notre cas, nous avons utilisé des sacs de dialyse remplis d'une solution d'agrégats et plongés dans une solution de polymères concentrés, du polyéthylène glycol (PEG). La pression osmotique induite par le PEG entraîne

la migration de l'eau hors du sac de dialyse, et la concentration de la solution d'agrégats jusqu'à l'équilibre des potentiels chimiques, et des pressions osmotiques (Figure 42).

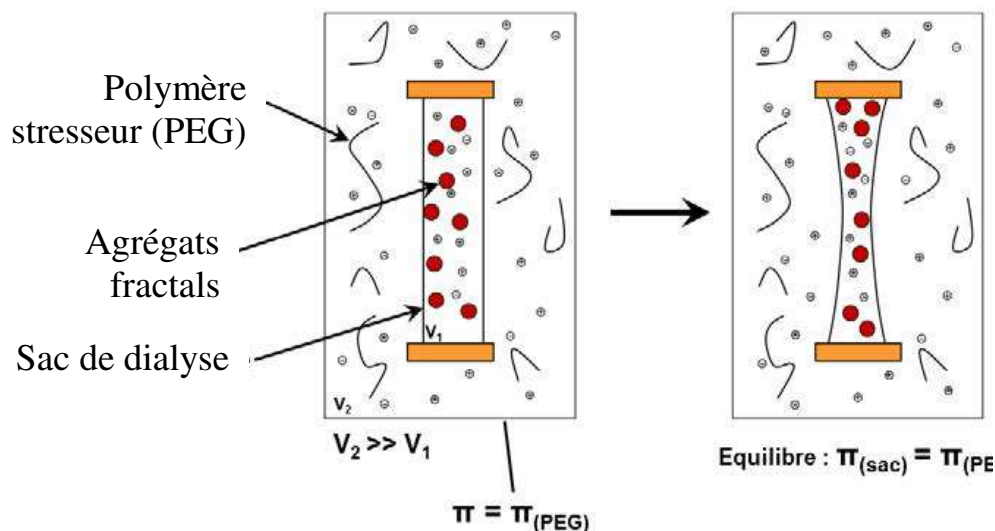


Figure 42 : Représentation schématique de la compression osmotique. (Pasquier 2016).

### 3.3.2.1.2 Matériel

#### Solution de PEG

Les solutions de PEG ont été préparées à partir de PEG à  $20\,000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  fourni par Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), à différentes concentrations pour imposer différentes pressions variant de 0,1 à 10 bar. Effectivement, la relation entre fraction massique du PEG 20 000 et pression osmotique a été déterminée à partir des travaux de Cohen et al. (2009) :

$$\Pi N^{\frac{9}{5}} = \frac{RT}{M_m \bar{v}} \left[ \left( \frac{C}{C_N^*} \right) + \alpha \left( \frac{C}{C_N^*} \right)^{\frac{9}{4}} \right] \quad (21)$$

avec  $\Pi$ , la pression osmotique,  $N$  le nombre de monomères du PEG 20 000,  $M_m$  la masse d'un monomère de PEG 20 000 (44 Da),  $\bar{v}$  le volume spécifique partiel du PEG ( $0,825\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),  $C$  la concentration massique en PEG 20 000,  $\alpha$  « l'indice de recouvrement » (0,49) et  $C_N^*$ , une concentration caractéristique du passage d'un régime dilué à semi-dilué définie comme :

$$C_N^* = \frac{N^{-\frac{4}{5}}}{\bar{v}} \quad (22)$$

La masse molaire réelle du PEG 20 000 a été déterminée à 17 100 Da par chromatographie d'exclusion stérique par Li et al. (2014). Le nombre de monomères  $N$  est donc égal à  $N = \frac{17100}{44} \sim 388,6$ . Un agent microbien, du thiomersal (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) a été ajouté aux solution de PEG en raison de la longue durée des expériences (deux semaines).

### Dialyse à l'équilibre

Des sacs de dialyse de longueur 10 cm, composés de membrane SpectraPor avec un seuil de coupure de 6-8 kDa, un diamètre de 14,6 mm et un rapport volume/longueur de 1,7 mL.cm<sup>-1</sup> (SpectrumLabs, Rancho Dominguez, USA), ont été utilisés. Cette membrane laisse passer l'eau et les ions mais pas les agrégats et protéines étudiés. Les sacs sont trempés 15 minutes dans de l'eau milliQ pour réhydrater et rincer la membrane, puis sont remplis d'une solution d'agrégats. Les sacs de dialyse ainsi préparés sont ensuite plongés dans des bouteilles de 500mL remplies de solution de PEG pendant 15 jours (c'est-à-dire, jusqu'à ce que l'extrait sec de la solution d'agrégats concentrés n'évolue plus sur un délai de 3 jours). Au cours de la compression osmotique, les agrégats se concentrent, et les sacs se vident diluant la solution de PEG qui n'applique alors plus exactement la même pression. Pour y pallier, la solution de PEG est renouvelée à 7 jours.

#### 3.3.2.1.3 Mesure

##### Mesure de la concentration massique des agrégats concentrés

A la fin des 15 jours de compression osmotique, une mesure d'extrait sec est réalisée sur le contenu du sac et la concentration massique ( $C_p$ ) est déterminée.

$$C_p = \frac{m_s}{\frac{m_e}{\rho_e} + m_s \times \bar{v}_s} \quad (23)$$

Avec  $m_s$ , la masse d'agrégats sèche en g ;  $m_e$ , la masse d'eau éliminée par analyse d'extrait sec, en g ;  $\rho_e$ , la masse volumique de l'eau égale à 1 g.mL<sup>-1</sup> ; et  $\bar{v}_s$ , le volume spécifique des protéines estimé à 0,74 mL.g<sup>-1</sup> (Gekko and Noguchi, 1979).

##### Appréciation de la texture des agrégats concentrés

La texture des solutions d'agrégats concentrés par compression osmotique est estimée visuellement. Si la solution s'écoule, on considère que l'échantillon est peu visqueux ; si l'échantillon s'écoule à l'aide d'une pression des doigts sur le sac, on considère que l'échantillon est visqueux. Enfin, si l'échantillon ne s'écoule pas et qu'il est dur, on considère que l'échantillon est gélifié.

#### 3.3.3 Propriétés fonctionnelles

Trois propriétés fonctionnelles des agrégats des mélanges 1 et 2 de grande taille, produits et séchés ont été étudiées. La première propriété étudiée est l'augmentation de la viscosité par les agrégats, la seconde propriété étudiée concerne la capacité des agrégats à gélifier à froid avec l'addition d'acide et enfin la troisième propriété concerne la capacité des solutions d'agrégats à texturer des émulsions.



### 3.3.3.1 Propriétés viscosifiantes

Afin d'évaluer et de comparer la capacité des différents mélanges d'agrégats à occuper l'espace et ainsi à induire une augmentation de la viscosité des solutions, la viscosité dynamique apparente a été mesurée à 20°C sur les suspensions d'agrégats en fonction de la vitesse de cisaillement selon le protocole utilisé par Inthavong et al. (2016). Un rhéomètre (AR2000, TA Instruments) équipé d'une géométrie cône-plan de diamètre 40 mm a été utilisé. La poudre d'agrégats séchés a été redispersée par agitation mécanique pendant 9 h à température ambiante et à des concentrations variées (10 à 100 g.L<sup>-1</sup>). Les suspensions ont ensuite été déposées sur le rhéomètre et pré-mélangées à 100 s<sup>-1</sup> pendant 60 s. Des rampes de vitesse de cisaillement croissantes ont ensuite été appliquées à l'échantillon de 0 à 400 s<sup>-1</sup>.

### 3.3.3.2 Propriété de gélification à froid par addition d'acide

Pour déterminer les propriétés de gélification induite par l'acide, les agrégats séchés sont redispersés par agitation mécanique pendant 9 h à température ambiante à une concentration de 60 g.L<sup>-1</sup> dans de l'eau milliQ. Une solution standard de HCl 0,1 M (Fisher Scientific UK) a été préparée et ajoutée aux suspensions d'agrégats sous agitation de façon à ajouter 2 moles d'H<sup>+</sup> par mole de protéines pour les agrégats du mélange 1, et 4 moles d'H<sup>+</sup> par mole de protéines pour les agrégats du mélange 2 (On considère la masse molaire moyenne du WPI  $M_{WPI}$  égale à 1,75.10<sup>3</sup> g.mol<sup>-1</sup>) selon le protocole défini par Kharlamova et al. (2016). La quantité de moles d'H<sup>+</sup> ajoutée par mole de protéines est choisie de façon à avoir une densité de charge  $\alpha$  équivalente et un pH de l'ordre de 6. Ainsi, pour les agrégats du mélange 1, aucune mole de OH<sup>-</sup> n'a été ajoutée au cours de leur formation : la densité de charge de la solution avant traitement est donc égale à celle du WPI natif, soit  $\alpha = -6,6$ . En ajoutant 2 moles d'H<sup>+</sup> par protéines, on arrive à une densité de charge de -4,6.

Pour les agrégats du mélange 2, 2 moles de OH<sup>-</sup> ont été ajoutés par protéines au cours de leur formation ; la densité de charge de la solution avant traitement est donc égale à -8,6. En ajoutant 4 moles d'H<sup>+</sup> par mole de protéines, on arrive à une densité de charge de -4,6.

Il faut noter que le traitement thermique induisant la dénaturation-agrégation des protéines et la formation d'agrégats fractal ou microgels induit une très légère baisse de la charge négative globale (Kharlamova et al., 2016) : la densité de charge après ajout d'HCl doit donc être légèrement supérieure à -4,6 dans les deux cas.

Dans ces conditions de charge réduite, on se place dans la zone du diagramme d'état ( $c = 60 \text{ g.L}^{-1}$  et  $\alpha = -4,6$ ; Figure 43) où les répulsions électrostatiques entre agrégats sont réduites permettant la formation d'un réseau : des gels d'agrégats sont ainsi formés.

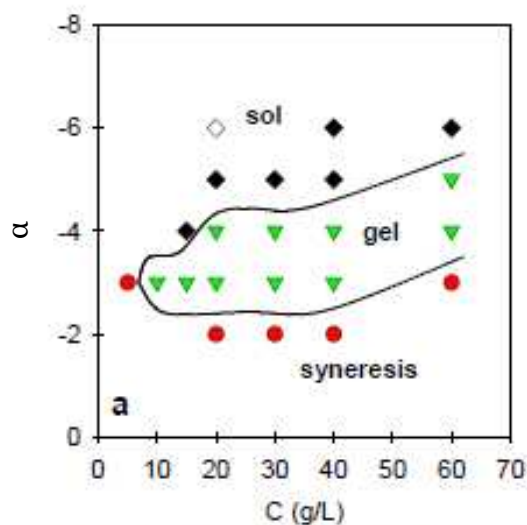


Figure 43 : Diagramme d'état en fonction de la concentration en protéines et densité de charge  $\alpha$ . (Kharlamova et al., 2018).

Les gels ainsi formés ont ensuite été analysés par mesures rhéologiques, effectuées avec un rhéomètre à contrainte imposée (AR2000, TA Instruments) équipé d'une géométrie cône-plan de diamètre 40 mm. La température était contrôlée à 65°C par le système Peltier. Les échantillons ont été placés sur le rhéomètre juste après leur préparation et ont été recouvert d'huile de paraffine pour éviter leur séchage. Les cinétiques de suivi des modules élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) en fonction du temps ont été réalisées à 70°C pendant 160 min dans le domaine linéaire à une fréquence de 0,1 Hz. Les  $G''$  étant dans tous les cas inférieurs aux  $G'$ , seuls les  $G'$  ont été représentés sur les cinétiques.

### 3.3.3.3 Texturation d'émulsions

#### 3.3.3.3.1 Matériel

Le même protocole de fabrication d'émulsion que Loiseleux (2018) a été utilisé pour comparer la fonctionnalité des agrégats produits à l'échelle laboratoire (Loiseleux, 2018), de ceux produits à l'échelle pilote dans cette thèse.

La matière grasse laitière anhydre (MGLA) utilisée pour la préparation d'émulsions a été fournie par l'entreprise Corman (Corman, Limbourg, Belgique). Il s'agit d'un lot de MGLA TREX 32C dont le point de fusion est de 32°C (données fournisseurs). La MGLA est composée d'acides gras saturés (environ 70%), d'acides gras insaturés (environ 28%) et d'acides gras polyinsaturés (environ 2%).

Les émulsions sont composées d'une phase dispersée, dans notre cas de la MGLA à 30%, et d'une phase continue. Cette dernière contient de l'eau ajustée à 80mM (force ionique du lait), des PS natives de WPI, et des agrégats de PS (Mélanges 1 ou 2).

Les PS natives jouent le rôle de tensioactif et permettent de stabiliser l'émulsion, c'est-à-dire d'éviter la floculation ou la coalescence. La concentration limitante en PS natives, c'est-à-dire la concentration à partir de laquelle la taille des gouttelettes de matière grasse ne varie plus avec l'augmentation de la quantité de protéines car l'interface est saturée par les PS, a été déterminée par des essais préliminaires. Dans le cas de nos émulsions, cette concentration est de 0,4 p/p %. Nous avons choisi de nous placer à 0,6 p/p % en PS natives pour éviter les phénomènes de floculation-coalescence.

Des agrégats de PS (Mélanges 1 ou 2) séchés à Bionov et redispersés à leur concentration d'origine ont été rajoutés à 1,2 p/p % dans le but de se placer dans une zone de formation d'émulsions texturées dès la sortie de l'homogénéisateur (émulsion instantanée, Figure 20 ; Chapitre 1). Nous avons réalisé un témoin négatif en remplaçant les agrégats de PS par des PS natives dans les mêmes proportions.

La phase dispersée est placée 10 min à 60°C dans un bain marie afin de faire fondre la MGLA. Les phases aqueuses et dispersées sont pesées et pré-émulsionnées à 60°C à l'aide d'un rotor-stator (SilentCrusher M, Heidolph, Allemagne) pendant 3 min à 14 000 rpm avec une tige d'un diamètre de 18 mm. La pré-émulsion obtenue est ensuite homogénéisée à 60°C à 100 bar à l'aide d'un homogénéisateur haute pression (Panda plus 1000, GEA Niro Saovi, Italie) sous recirculation pendant 1 minute 30. Pour finir, les émulsions sont collectées et leur texture est analysée immédiatement.

### 3.3.3.3.2 Mesure

#### Texture d'émulsion

La texture des émulsions est appréciée par deux moyens. Le premier se fait de manière visuelle et permet de classer l'émulsion en deux catégories : soit l'émulsion s'écoule, soit elle ne s'écoule pas et s'est déjà texturée au cours de l'homogénéisation (on parle de gel instantané). Si l'émulsion coule en sortie d'homogénéisation, l'observation se poursuit sur les deux premières heures à 20°C. Si l'émulsion se texture pendant le stockage, l'émulsion est dite « gel différée » si elle ne se texture pas, on parle de point liquide, instable. La texture est également appréciée par des mesures rhéologiques.

La caractérisation rhéologique des émulsions a été réalisée à l'aide du rhéomètre à déformation imposée ARES (TA instruments, New-Castle, USA) avec une géométrie plan-plan striée (diamètre 40 mm ; entrefer 1-2 mm). Les émulsions sont placées sur le plateau du rhéomètre thermostaté à 60°C dès leur sortie de l'homogénéisateur. Elles sont recouvertes d'huile de paraffine pour éviter le séchage

de l'échantillon. Les cinétiques de suivi des modules élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) en fonction du temps ont été réalisées à  $60^{\circ}\text{C}$  à une fréquence angulaire de  $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  dans le domaine viscoélastique linéaire et en appliquant une déformation de 0,3 %. Les  $G''$  étant dans tous les cas inférieurs aux  $G'$ , seuls les  $G'$  ont été représentés sur les cinétiques de texturation.

### Taille des gouttelettes de matière grasse

La taille des gouttelettes de matière grasse est déterminée par granulométrie laser à l'aide d'un granulomètre Partica LA-960 (Horiba, Japon) utilisant deux lasers monochromatiques de longueur d'onde 405 et 650 nm. Après homogénéisation, quelques  $\mu\text{L}$  d'émulsions sont introduits dans la cuve du granulomètre jusqu'à atteindre une obscurité de 10%. En parallèle, 240  $\mu\text{L}$  d'émulsions sont diluées dans 3mL de SDS 1% et laissés au minimum 1h à  $20^{\circ}\text{C}$ , afin de mettre en évidence des phénomènes de floculation. Effectivement, le SDS (Figure 44) étant chargé négativement, favorise la répulsion des gouttelettes de matière grasse et ainsi leur séparation. Toutes les mesures sont réalisées avec un indice de réfraction de 1,548 pour la phase dispersée (MGLA) et 1,33 pour la phase continue (Eau)

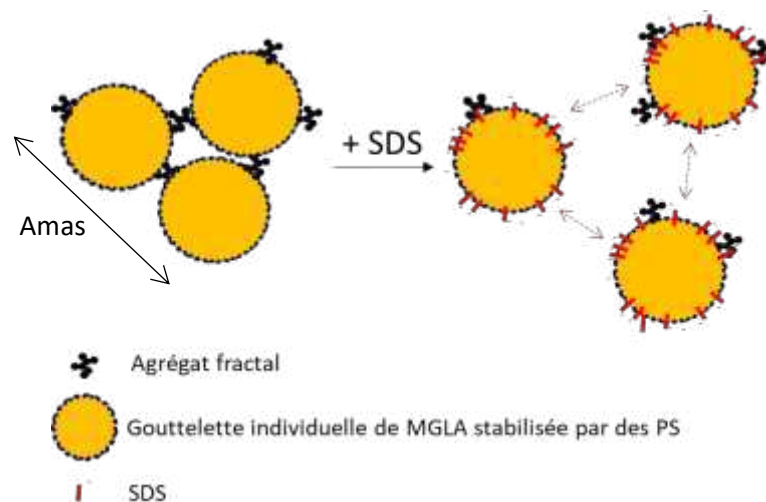


Figure 44 :Schéma explicatif du phénomène de pontage de gouttelettes de matière grasse et d'individualisation des gouttelettes par la présence de SDS

## CHAPITRE 4 : CONTRÔLE DES PROPRIÉTÉS INTRINSÈQUES DE MÉLANGES D'AGRÉGATS PURS FRACTALS ET FRACTALS / MICROGELS PRODUITS A L'ÉCHELLE PILOTE ET DE MANIÈRE CONTINUE

*Dans ce chapitre, nous nous interrogerons sur la possibilité de produire de façon robuste et en mode continu, 2 mélanges d'agrégats de PS différents, à savoir des agrégats purs fractals et un mélange d'agrégats fractals et microgels. Nous analyserons également dans quelle mesure il est possible de faire varier leur taille.*

*Pour contrôler la taille des agrégats purement fractals, il est possible de jouer sur les paramètres matière, à savoir les concentrations en protéines et en sel. Cette approche est moins efficace pour le mélange d'agrégats fractals et microgels en raison d'un risque de gélification. Nous avons donc cherché à moduler la taille des agrégats de ce mélange via des paramètres procédés (régime d'écoulement, temps de montée en température et température de chauffe). En particulier, nous avons montré qu'il était possible d'augmenter la taille des agrégats en imposant un régime intermédiaire dans la phase de montée en température et/ou en ciblant une température de chauffe supérieure à 80°C ; cependant, ces conditions de procédé peuvent induire un encrassement significatif et rapide de la zone de chauffe. Les mécanismes impliqués dans la formation des agrégats ont également été discutés.*

*Les principaux objectifs de travail abordés dans ce chapitre :*

- Produire à l'échelle pilote et en continu et caractériser en termes de morphologie et taille des agrégats purement fractals d'une part, et un mélange d'agrégats fractals et microgels d'autre part.*
- Définir les limites de l'utilisation de leviers matière (concentration en protéines et sel) pour faire varier la taille des agrégats sans gélifier dans l'installation.*
- Explorer le recours à des leviers procédé (régime d'écoulement, temps de montée en température et température de chauffe) pour faire varier la taille des agrégats. Comprendre les mécanismes impliqués.*
- Étudier la robustesse du procédé à travers l'étude de l'encrassement.*

*Ces résultats ont fait l'objet d'une publication acceptée dans « Journal of Food Engineering » (2020) :*

De Guibert D, Martin F, Hennetier M, Gu YY, Le Floch Fouéré C, Delaplace G, Jeantet R. 2020. Flow process and heating conditions modulate the characteristics of whey protein aggregates. *J Food Eng* 264, app.109675 DOI :10.1016/j.jfoodeng.2019.07.022.

## TABLE DES MATIÈRES

---

<b>CHAPITRE 4 : CONTRÔLE DES PROPRIÉTÉS INTRINSÈQUES DE MÉLANGES D'AGRÉGATS PURS FRACTALS ET FRACTALS / MICROGELS PRODUITS A L'ÉCHELLE PILOTE ET DE MANIÈRE CONTINUE.....</b>	<b>76</b>
4.1 Modulation de la forme des agrégats par la mise en œuvre de conditions physicochimiques différentes.....	78
4.1.1 Choix des conditions d'obtention d'agrégats de différentes formes (sphérique vs branchés).....	78
4.1.2 Caractérisation des deux mélanges d'agrégats formés dans des conditions de procédé continu.....	79
4.2 Variation de la taille des agrégats via des leviers matière .....	81
4.3 Variation de la taille des agrégats via des leviers procédé .....	84
4.3.1 Influence du régime d'écoulement et du temps de montée en température.....	85
4.3.2 Influence de la température de chauffe.....	93
4.3.3 Mécanismes impliqués dans la formation d'agrégats par un procédé continu.....	95
4.4 Étude de l'encrassement.....	99

Contrairement à de nombreuses approches en génie des procédés, nous souhaitons ici non pas conserver un point de fonctionnement aux différentes échelles, mais conserver les propriétés d'usage des agrégats produits. Ainsi, l'objectif est de produire, concentrer et sécher d'une part un mélange d'agrégats fractals en présence de microgels, et d'autre part produire, concentrer et sécher un mélange d'agrégats purement fractals. Il est notamment crucial de pouvoir maîtriser la production d'agrégats de morphologies (microgels sphériques ou fractals branchés) et de tailles différentes, et à ces fins de connaître les leviers de contrôle qui ont une influence. Nous avons en effet vu que la taille des agrégats fractals et par conséquent leur morphologie (faiblement ou fortement branché) conditionne leur fonctionnalité.

Comment maîtriser ces propriétés intrinsèques (morphologie et taille) au cours d'un procédé de production en continu ? Trois approches ont été testées dans cette partie :

- La variation de la forme (sphérique vs branché) à travers la modulation des conditions physico-chimiques (2 mélanges différents mis en œuvre) ;
- La variation de la taille via des paramètres matière ;
- Et enfin la variation de la taille via des paramètres procédé (3 paramètres étudiés) dans le cas d'un des deux mélanges d'agrégats étudiés.

## 4.1 Modulation de la forme des agrégats par la mise en œuvre de conditions physico-chimiques différentes.

---

### 4.1.1 Choix des conditions d'obtention d'agrégats de différentes formes (sphérique vs branché)

L'objectif est de produire des agrégats aux propriétés fonctionnelles d'intérêt selon un procédé continu extrapolable à une échelle industrielle, afin de pouvoir *in fine* les incorporer dans des produits laitiers. On a ici voulu produire deux mélanges différents d'agrégats en modulant les conditions physico-chimiques en solution, que nous appellerons dans la suite Mélange 1 et Mélange 2.

Pour former un mélange d'agrégats fractals avec quelques microgels (Mélange 1), on se place à la limite entre la zone de formation des agrégats fractals et des microgels. Le ratio molaire [calcium/protéines] dans la poudre de WPI est  $R_{WPI} = 1,9$  (

	<b>Poudre 1</b>	<b>Poudre 2</b>
Protéines totales (p/p %)	85,10	86,51

Tableau 4 ; Chapitre choisit donc de se charge $\alpha = -6,6$ et pH du mélange 1 (point Pour former un purement fractals augmenter la charge solution. Pour cela, diminuer le ratio R pure ou en enlevant dialyse, soit Nous avons décidé	<i>Taux de caséines (p/p %) (dosage électrophorèse)</i>	5,10	7,29	3). A ce ratio, on placer à densité de 7 pour les conditions rouge, Figure 30). mélange d'agrégats (Mélange 2), il faut globale de la on peut soit en ajoutant de la $\beta$ lg du calcium par augmenter le pH. d'ajouter deux
	<i>Taux Blg (p/p %) (dosage HPLC)</i>	58,95	49,98	
	<i>Taux Ala (p/p %) (dosage HPLC)</i>	16,25	13,96	
	<i>Taux BSA (p/p %) (dosage HPLC)</i>	1,94	1,57	
	<i>[Na] (mg/gWPI)</i>	2,22	1,41	
	<i>[K] (mg/gWPI)</i>	2,68	2,51	
	<i>[Mg] (mg/gWPI)</i>	0,64	0,51	
	<i>[Ca] (mg/gWPI)</i>	3,96	3,73	
	<i>Extrait sec</i>	0,94	0,94	
	<i>R=[CaCl<sub>2</sub>]/[Protéines solubles]</i>	2,0	1,9	
	<i>Densité de charge <math>\alpha</math> à pH 7 (titration)</i>	-6,6	-6,6	

molécules de OH<sup>-</sup> par mole de protéine, sous forme de NaOH, afin d'augmenter la densité de charge négative des protéines à  $\alpha = -8,6$ . Ces conditions identifiées comme mélange 2 conduisent à l'obtention d'un pH supérieur à 8 (point bleu, Figure 30). Les mélanges 1 et 2 sont en accord avec les connaissances disponibles dans la littérature : Kharlamova et al. (2016) forment des agrégats purement fractal à une densité de charge négative de  $\alpha = -8,7$ , et des agrégats microgels de 370nm de Rayon à une densité de charge de -5,2.



#### 4.1.2 Caractérisation des deux mélanges d'agrégats formés dans des conditions de procédé continu

Des agrégats des deux mélanges ont été produits à l'échelle pilote selon un procédé continu avec des conditions de production définies ( $Re = 6900$ , Temps de montée en température  $RT_h = 7s$ , Température =  $80^\circ C$ ). Le profil d'éluion A4F et le Rg des agrégats sont représentés sur la Figure 44. On distingue trois pics différents correspondant à trois populations de protéines ou d'agrégats. Le Tableau 13 indique les caractéristiques de chaque population élue.

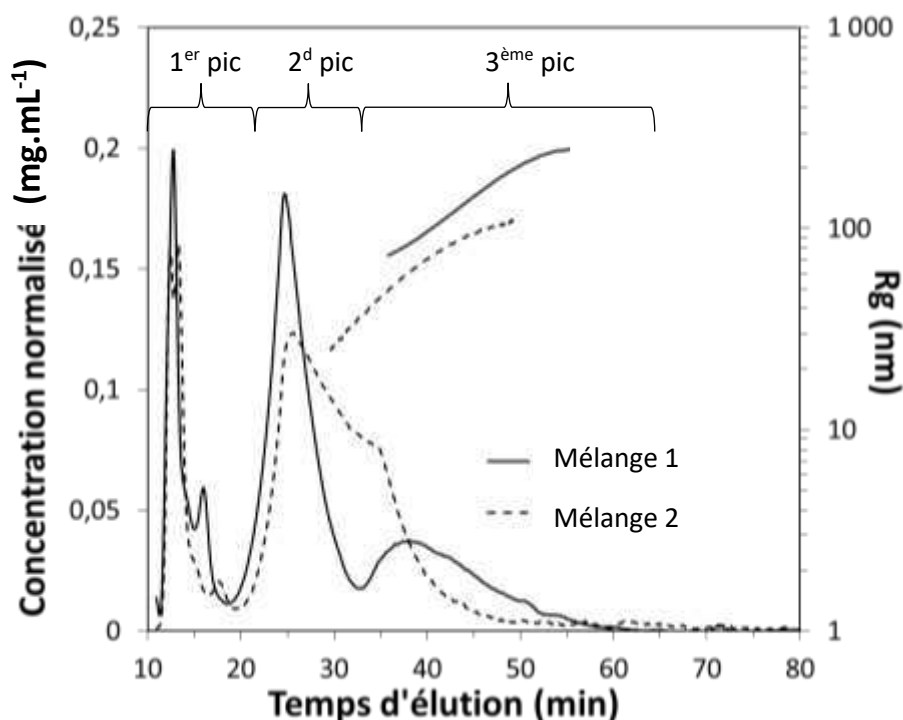


Figure 45 : Eluogrammes d'A4F des solutions d'agrégats des mélanges 1 et 2 représentant la concentration normalisée et le rayon de giration en fonction du temps d'éluion. Le mélange 1 a été produit avec  $50 \text{ g.kg}^{-1}$  de protéine,  $10\text{mM}$  de NaCl, à pH 7,  $Re$  6900,  $RT_h$  7s et à  $80^\circ C$ . Le mélange 2 a été produit avec  $60 \text{ g.kg}^{-1}$  de protéines,  $25\text{mM}$  NaCl,  $2 \text{ OH-}/\text{protéine}$ , à  $Re$  6900,  $RT_h$  7s à  $80^\circ C$ .

La première population élue entre 10 et 18 minutes correspond aux protéines non agrégées (approximativement 11 p/p% des protéines dénaturées-agrégées précipitent à pH 4,6) et aux caséines présentes dans la poudre (7,3 p/p%). La deuxième population élue entre 18 et 33 min est attribuée aux agrégats primaires avec un Rg moyen de 60nm. Enfin, le troisième pic élue entre 33 et 60 min représente les agrégats avec un Rg qui varie de 142 à 183 nm selon le mélange.

Tableau 13 : Caractéristiques des éluogrammes A4F présentés Figure 43 comparant les fractions massiques, Rg/Rh, Rayon de giration moyen et masse volumique apparente ( $\rho_{app}$ ) des deux mélanges.

$1^{er}$ pic	$2^{ème}$ pic	$3^{ème}$ pic
--------------	---------------	---------------

Échantillon	Fraction massique (p/p %)	Fraction massique (p/p %)	Fraction massique (p/p %)	Rg/Rh moy	Rg moy (nm)	$\rho_{app}$ ( $10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ )
Mélange 1	22,6	51,1	26,3	1,0	183,2 (+/- 1,2%)	0,98
Mélange 2	20,6	46,5	32,9	1,4	142,4 (+/-0,02%)	0,19

La masse volumique apparente du 3<sup>ème</sup> pic varie d'un mélange à l'autre et traduit bien le type d'agrégat présent. Effectivement, les agrégats du mélange 1, composés en partie d'agrégats microgels denses, ont une masse volumique apparente plus de 4 fois supérieure à celle des agrégats purs fractals du mélange 2 ( $0,98 \cdot 10^3$  vs  $0,19 \cdot 10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , Tableau 13)

Il est également possible d'évaluer la forme et la conformation des agrégats à l'aide du facteur de forme Rg/Rh. Il n'est pas possible d'évaluer le facteur de forme des premier et second pics avec les données d'A4F car cette méthode n'est pas assez sensible. Le facteur de forme d'une sphère est de l'ordre de 0,74 tandis que celui d'un agrégat branché de forme étoilée est de l'ordre de 1,4 (Figure 40 ; Chapitre 3), et le Rg/Rh d'un bâtonnet fin est de 2,36 (Adolphi and Kulicke, 1997). Ainsi la valeur moyenne de Rg/Rh du mélange 1 égale à 1,0 traduit la présence à la fois d'agrégats sphériques microgels et d'agrégats fractals ramifiés. Le Rg/Rh moyen du mélange 2 est supérieur (1,4), confirmant la présence d'agrégats branchés de type fractals secondaires.

Les observations MET, bien que plus qualitatives, confirment également ces conclusions (Figure 45). Effectivement, dans le cas du mélange 1, on observe des agrégats fractals de différentes tailles ainsi que des microgels. Les observations MET du mélange 2 montrent que des agrégats fractals de différentes tailles sont formés et aucun microgel n'a pu être observé sur les grilles de microscopie.

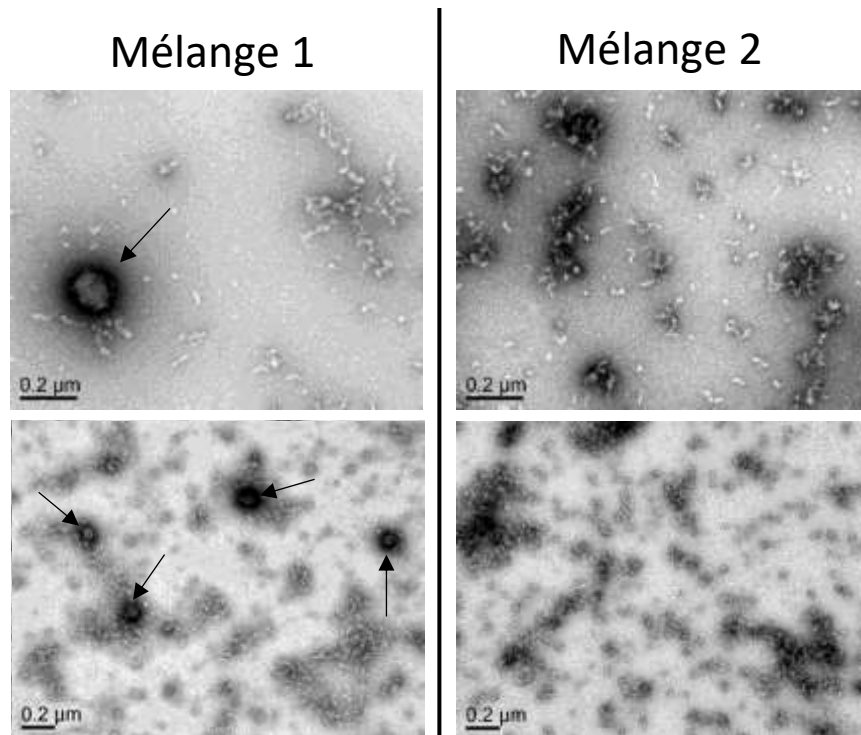


Figure 46 : Observations en MET des solutions d'agrégats des mélanges 1 et 2 correspondant aux agrégats élus de la Figure 2. Les flèches indiquent la présence de microgels dans le mélange 1.

Il est très difficile de quantifier la proportion de microgels présents dans le mélange 1. En effet, on ne peut pas le faire en A4F, où la séparation se fait sur un critère de rayon hydrodynamique. Or les variations de  $R_g/R_h$  sont dues à celle de  $R_g$ , le  $R_h$  des fractals et des microgels étant polydisperse et du même ordre de grandeur. Phan-Xuan et al. (2011) séparent les microgels des fractals par centrifugation à 50000g pendant 1h. Cependant on a pu remarquer qu'en appliquant ces conditions à une solution du mélange 2 (100% fractal, 0% microgels), une partie non négligeable du matériel protéique précipitait également. Enfin, une quantification par observation microscopique est délicate car la proportion des agrégats varie d'un endroit à un autre de la grille. Pour ces raisons, la quantification de microgels présents n'a pas été réalisée et on affirme juste que des microgels sont présents dans les agrégats du mélange 1, en plus des agrégats fractals.

## 4.2 Variation de la taille des agrégats via des paramètres matière

Nous avons déjà vu que pour avoir des fonctionnalités différentes, il était important de faire varier la taille des agrégats fractals (Figure 21 ; Chapitre 1). Pour cela, il est possible de jouer sur les concentrations en protéines et NaCl (Figures 14 et 15 ; Chapitre 1). Ici, différentes concentrations en

protéines et en sel ont été testées pour les deux mélanges à l'échelle pilote afin d'explorer cette faisabilité.

La cartographie des points de fonctionnement est présentée en Figure 46. On remarque que sur toute la gamme de concentrations en protéines (4,6 à 7,6 p/p% en protéines) et en sel testées (0 à 40mM NaCl), aucune gélification n'est observée au sein du pilote pour le mélange 2. En ce qui concerne le mélange 1, l'échantillon gélifie dans le pilote de traitement thermique à partir de couples ([Protéine] ; [NaCl]) critiques : cette limite de gélification est matérialisée par le trait en pointillé sur la Figure 46A.

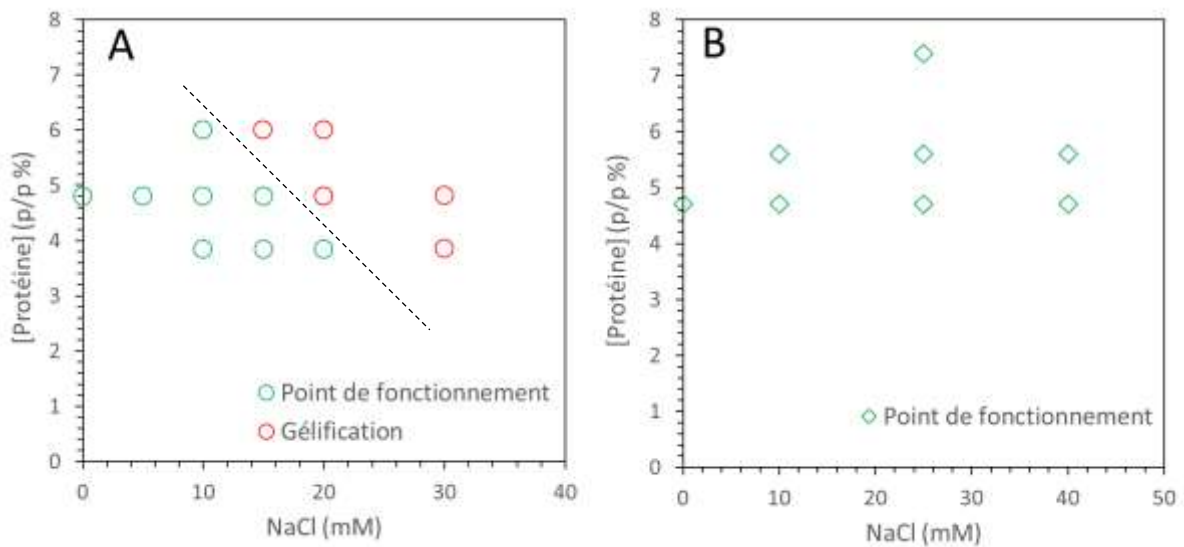


Figure 47 : Cartographie des points de fonctionnement des mélanges 1 (A) et 2 (B). Le trait en pointillé schématise la limite entre points de fonctionnement et gélification.

Les Figure 47A et 47B représentent les élugrammes d'A4F pour les deux types de mélanges étudiés et différents couples ([Protéine] ; [NaCl]). On observe comme attendu un décalage du troisième pic vers des temps d'élution plus élevés lorsque les concentrations en protéines et NaCl augmentent, correspondant à des tailles ( $R_h$ ) d'agrégats plus importantes.

Pour chaque mélange, les agrégats formés à partir du couple ([Protéine] ; [NaCl]) le plus élevé et compris dans la zone de fonctionnement (Figure 46), c'est à dire ne conduisant pas à gélification, ont été analysés en A4F. Le  $R_g$  moyen de l'échantillon global (incluant par conséquent l'ensemble des 3 pics) pour chacun de ces points est présenté dans le Tableau 14. Ainsi pour le mélange 1, la taille moyenne maximale des agrégats que l'on peut former sans risque de gélifier dans le système (couple ([Protéine] ; [NaCl]) inférieur à la limite de gélification) est de 154 nm de  $R_{g, moy}$ . Pour le mélange 2, il est possible de former des agrégats avec un  $R_{g, moy}$  de 293,6 nm sans gélifier avec des concentrations en protéines et sel respectives de 8% et 25mM. Des valeurs plus élevées de concentrations en protéines et sel n'ont pas été testées.

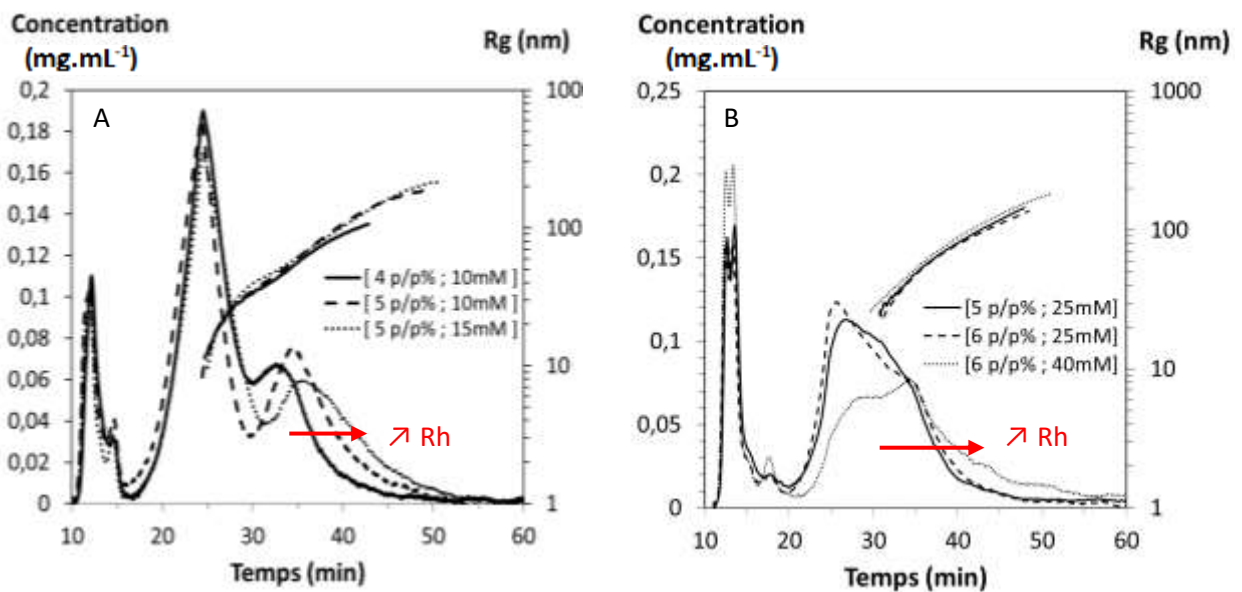


Figure 48 : Elugrammes d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 (A) et du mélange 2 (B) produits à différentes teneurs en protéines et sel [P ; NaCl], indiquées sur la figure.

Tableau 14 : Rayon de giration des agrégats des deux mélanges produits à partir de différentes concentrations en protéines et NaCl.

Mélange 1		Mélange 2	
Couple ([Protéine] ; [NaCl])	$Rg_{moy}$ (nm)	Couple ([Protéine] ; [NaCl])	$Rg_{moy}$ (nm)
4 p/p % ; 20mM	154,0 ± 1,5	5 p/p % ; 40mM	120,7 ± 1,3
5 p/p % ; 15mM	149,5 ± 1,1	6 p/p % ; 40mM	147,4 ± 1,1
6 p/p % ; 10mM	114,5 ± 1,3	8 p/p % ; 25mM	293,6 ± 2,3

L'augmentation de la taille des agrégats du mélange 1 via des leviers matière étant ainsi plus limitée en raison de contraintes de gélification dans le pilote de traitement thermique, nous nous sommes intéressés à d'autres paramètres cette fois-ci liés au procédé, pour moduler la taille des agrégats.

### 4.3 Variation de la taille des agrégats via des paramètres procédé

Afin de moduler la taille des agrégats du mélange 1, l'influence de trois paramètres de procédé a été étudiée : le régime d'écoulement dans la zone de chauffe représenté par le nombre de Reynolds ( $Re$ ), le temps de montée en température ( $RT_n$ ), et enfin la température de chauffe. Nous avons testé ces trois leviers à partir d'une solution de type mélange 1 et pour un couple ([Protéine] ; [NaCl]) égal à (5 p/p% ; 10mM). Dans un premier temps, un diagramme de Moody a été établi sur le tube à passage de courant utilisé afin de déterminer clairement l'influence de la nature du régime d'écoulement sur la formation des agrégats. Le diagramme doit idéalement être établi à partir d'une solution dont le comportement rhéologique est le même que la solution traitée. La première étape consiste donc à caractériser le comportement rhéologique de la solution protéique initiale, avant traitement thermique, ainsi que la dispersion d'agrégats après traitement thermique. Une mesure de la contrainte de cisaillement  $\tau$  (Pa) en fonction du taux de cisaillement  $\dot{\gamma}$  ( $s^{-1}$ ) a été effectuée et est présentée sur la Figure 48. Pour la solution protéique et la dispersion d'agrégats, la courbe est une droite caractéristique d'un comportement Newtonien sur la gamme de 0 à  $120 s^{-1}$  avec des valeurs d'indice de comportement  $n$  de 0,94 ( $\pm 0.076$ ) et 0,97 ( $\pm 0.025$ ) respectivement. Pour établir le diagramme de Moody, une solution de saccharose concentré jusqu'à 66% avec un comportement Newtonien (Ros-

Polski et al., 2014) a été utilisée. La représentation de Moody permet grâce aux différentes ruptures de pentes, d'identifier les zones de transition entre régimes laminaire, intermédiaire et turbulent.

Le diagramme de Moody obtenu est présenté sur la Figure 49 : en dessous de  $Re = 2500$ , le régime est laminaire ; entre des nombres de  $Re$  compris entre 2500 et 5000, le régime est intermédiaire et enfin au-delà de  $Re=5000$ , le régime est turbulent. En se plaçant à  $Re=2000$ ,  $Re=3200$  et  $Re=6900$ , il est possible d'explorer l'effet de l'ensemble des régimes d'écoulement. Pour le régime laminaire, il n'a pas été possible de se placer à un nombre de Reynolds plus faible (i.e. plus éloigné du régime intermédiaire) en raison de limites de fonctionnement de la pompe utilisée (débit trop faible).

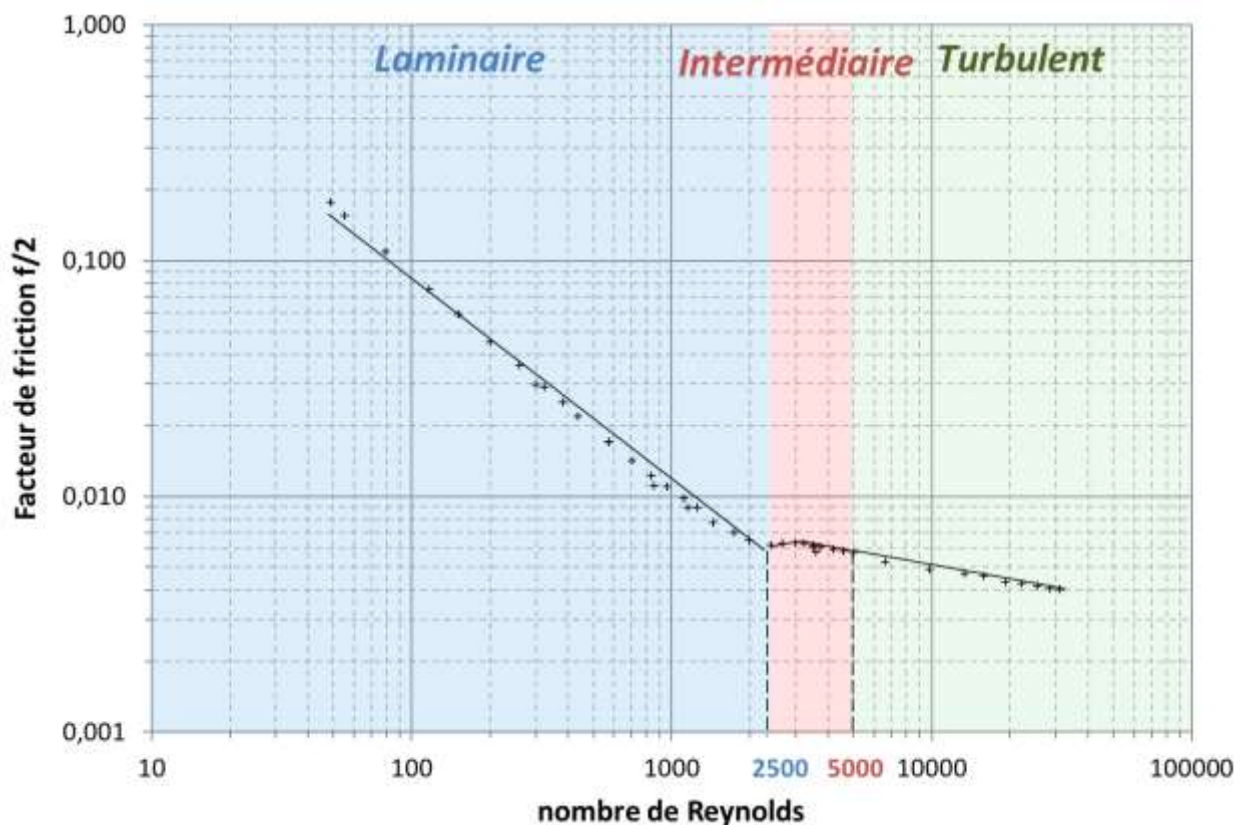


Figure 50 : Diagramme de Moody caractérisant le régime d'écoulement dans l'échangeur tubulaire de type tube à passage de courant utilisé pour la production des agrégats. La zone bleue met en évidence la zone de régime laminaire, la zone rouge, la zone de régime intermédiaire et la zone verte, la zone de régime turbulent.

#### 4.3.1 Influence du régime d'écoulement et du temps de montée en température

Dans un premier temps des agrégats ont été formés à  $80^{\circ}\text{C}$  en faisant varier  $Re$  et  $RT_h$ . Le profil d'élution et ses caractéristiques sont présentés sur la Figure 50 et dans le Tableau 15.

On retrouve les mêmes trois pics attribués aux mêmes trois populations que précédemment, à savoir 1/ protéines non agrégées et caséines, 2/ agrégats primaires et 3/ agrégats secondaires. Le Tableau 15 montre que la fraction massique du premier pic est de 23 p/p%, et que ce taux varie peu d'une



condition de production à l'autre. Les agrégats primaires élués dans le deuxième pic ont un Rg moyen de 60nm. Enfin, les agrégats secondaires élués au troisième pic ont un Rg compris entre 152 et 222 nm selon les conditions procédé utilisées (Tableau 15). Le facteur de forme moyen du troisième pic pour les trois échantillons et de l'ordre de 1,0 à 1,2, caractéristique d'un mélange d'agrégats fractals et microgels. Cette structure est confirmée par la dimension fractale (Df) qui varie de 2,1 à 2,4, en cohérence avec les données disponibles dans la littérature. Loiseleux (2018) et Mahmoudi et al. (2014) trouvent également des Df de 2,1 et 2,15 à 2,19, respectivement, pour des agrégats purement fractals, et Mahmoudi et al. (2014) trouvent des Df de l'ordre de 3 pour des agrégats purement sphériques.

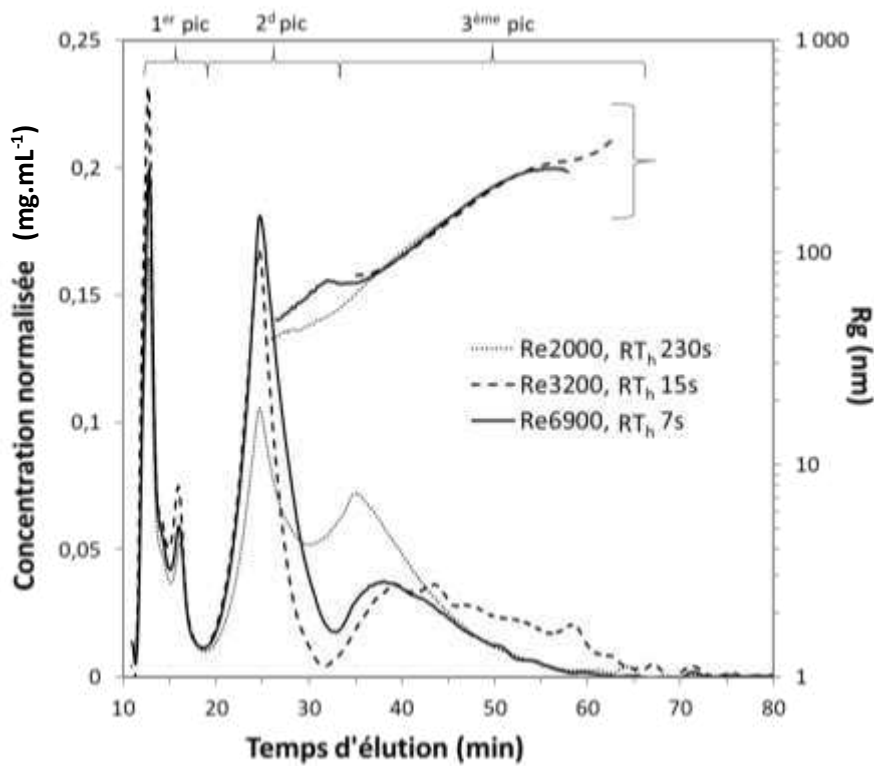


Figure 51 : Eluogrammes d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 produits avec différentes conditions de régime d'écoulement caractérisé par le nombre de Reynold (Re) et le temps de montée en température (RT<sub>h</sub>). Les expériences ont été réalisées en duplicat et ont les mêmes tendances et valeurs moyennes.

Echantillon			1 <sup>er</sup> pic	2 <sup>ème</sup> pic	3 <sup>ème</sup> pic				
Re	RT <sub>h</sub> (s)	l <sub>k</sub> (μm) Protéine native (p/p %) après précipitation à pH 4,6	Fraction massique (p/p %)	Fraction massique (p/p %)	Fraction massique (p/p %)	Rg/Rh	Df	Rg (nm)	ρ <sub>app</sub> (10 <sup>3</sup> kg.m <sup>-3</sup> )



<b>2000</b>	<b>230</b>	-	9,8	20,9	36,7	42,4	1,1	2,4	152,4 (± 1,9%)	0,39
<b>3200</b>	<b>15</b>	-	12,5	25,6	38	36,4	1,2	2,1	222,0 (± 1,1%)	1,14
<b>6900</b>	<b>7</b>	21,8	11,1	22,6	51,1	26,3	1,0	2,3	183,2 (± 1,2%)	0,98

Tableau 15 : Caractéristiques des élugrammes A4F présentés Figure 49 comparant les fractions massiques,  $R_g/R_h$ , Rayon de giration moyen et masse volumique apparente ( $\rho_{app}$ ) du mélange 1 dans différentes conditions de production.  $L_k$  représente la taille des tourbillons selon l'échelle de Kolmogorov.

Comme mentionné plus haut, la fraction massique des protéines non agrégées (1<sup>er</sup> pic) est de 23 p/p% quelles que soient les conditions de production d'agrégat testées. Cela signifie que le taux de dénaturation-agrégation (i.e. la proportion de PS qui s'agrègent pour former des agrégats primaires ou secondaires) est similaire pour chaque condition de  $Re$  et  $RT_h$  testées. Ceci est confirmé par une analyse de variance (Tableau 8 ; Chapitre 3) par laquelle on conclut qu'il n'y a pas d'effet significatif de  $Re$  (p-value 0,59) ou  $RT_h$  (p-value 0,22) sur la fraction massique du premier pic (Tableau 17).

Cependant, la répartition entre agrégats primaires et secondaires varie quantitativement en fonction des conditions de production : plus le nombre de Reynolds est faible et le  $RT_h$  élevé, plus la fraction d'agrégats secondaires (correspondant au 3<sup>ème</sup> pic) est élevée (Tableau 15).

La variation des conditions de production impacte également de façon qualitative les agrégats formés. En effet, en régimes intermédiaire et turbulent, la masse volumique apparente des agrégats est plus importante. Ceci a déjà été reporté par (Kolb and Jullien, 1984)) qui suggèrent que les agrégats formés par agrégation chimique sont plus denses que les agrégats formés par agrégation diffusive étant donné que la probabilité de rencontre entre deux entités augmente avec la turbulence. Pour autant, les agrégats du mélange 1 formés à  $Re$  2000 et  $RT_h$  230s restent plus denses que les agrégats du mélange 2 de par la présence de microgels.

Des agrégats de plus grande taille sont produits à des valeurs de  $RT_h$  et  $Re$  intermédiaires ( $R_g = 222\text{nm}$  à  $Re$  3200 et  $RT_h$  15s) en comparaison aux agrégats produits à des valeurs extrêmes de  $Re$  et  $RT_h$  ( $R_g \leq 183\text{ nm}$  à  $Re$  2000 et  $RT_h$  230s ou à  $Re$  6900 et  $RT_h$  7s ; Tableau 15). Le facteur de forme et la  $D_f$  des agrégats obtenus à valeur intermédiaire de  $Re$  et  $RT_h$  tendent vers une structure plus ouverte. Ceci est en accord avec des études précédentes (Simmons et al., 2007; Wolz et al., 2016) qui montrent dans une expérience menée sur un rhéomètre de type Couette que la taille des agrégats atteint un maximum à des valeurs intermédiaires de taux de cisaillement. Pour autant, d'autres auteurs n'observent pas d'effet du cisaillement ou du régime d'écoulement sur la taille des agrégats formés

((Kerche et al., 2016), ou encore pas d'effet du cisaillement sur la dénaturation et la collision des particules (Erabit et al., 2014).

La valeur du nombre de Re dépend directement de la vitesse du fluide (Equation 8 ; Chapitre 3) qui impacte elle-même le  $RT_h$ . Dans le but de déterminer l'influence respective du régime d'écoulement et du temps de montée en température sur la taille des agrégats formés, des expériences ont été menées sur des tubes de diamètres différents à des débits différents afin de se placer à Re constant et de ne faire varier que le  $RT_h$  à des valeurs courtes (7s), intermédiaires (15s) ou longues (69s). Les résultats sont présentés sur la Figure 51 et dans le Tableau 16.

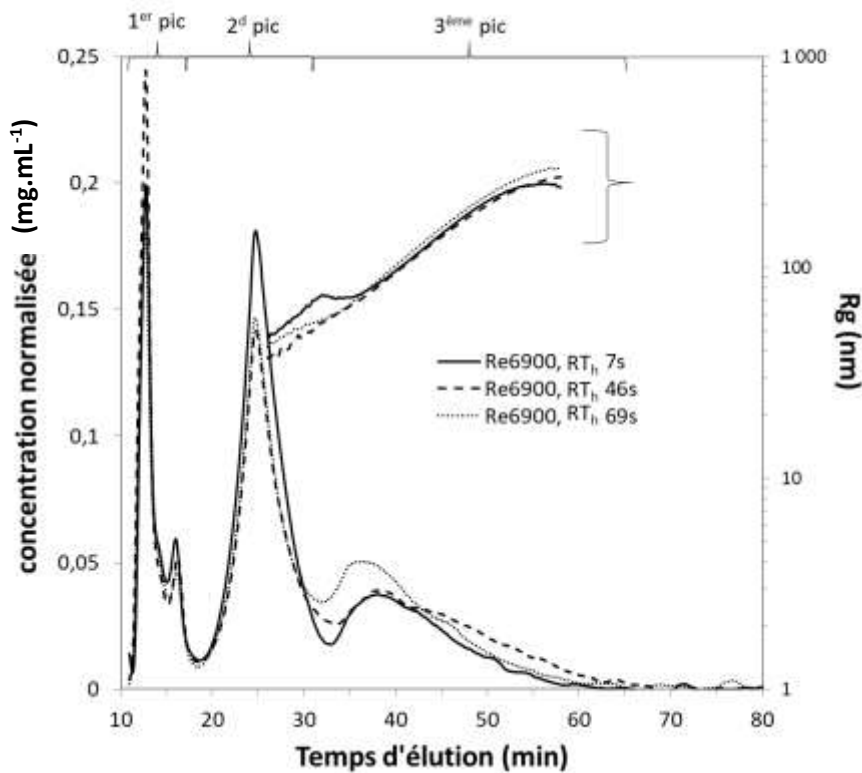


Figure 52 : Eluogramme d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 produits à Reynolds fixe de 6900 et à différents temps de montée en température  $RT_h$  indiqués sur la figure. Les expériences ont été réalisées en duplicat et ont les mêmes tendances et valeurs moyennes.

Tableau 16: Caractéristiques de l'élugramme A4F présenté Figure 10 comparant les fractions massiques,  $R_g/R_h$ , Rayon de giration moyen du mélange 1 dans différentes conditions de production ( $Re$  fixe et  $RT_h$  différents).  $l_k$  représente la taille des tourbillons selon l'échelle de Kolmogorov.

Echantillon			1 <sup>er</sup> pic	2 <sup>eme</sup> pic	3 <sup>ème</sup> pic			
Re	$RT_h$ (s)	$l_k$ ( $\mu\text{m}$ )	Fraction massique (p/p %)	Fraction massique (p/p %)	Fraction massique (p/p %)	$D_f$	$R_g/R_h$	$R_g$ (nm)
6900	7	21,84	2,6	51,1	26,3	2,3	1,0	183,2 ( $\pm 1,2\%$ )
6900	46	65,72	31,3	49,3	19,4	2,2	1,3	196,3 ( $\pm 1,4\%$ )
6900	69	82,18	21,5	41,1	37,4	2,1	1,3	193,9 ( $\pm 1,5\%$ )

Sur la Figure 51, on observe les mêmes trois pics correspondants aux 3 populations de protéines et agrégats présentés précédemment (Figure 50). Quel que soit le  $RT_h$ , on n'observe pas le décalage du troisième pic vers la formation d'agrégats de plus grande taille, et les valeurs de  $R_g$  restent dans la même gamme ( $R_g \leq 196$  nm ; Tableau 16). De même la  $D_f$  ainsi que le facteur de forme ne sont pas influencés par le  $RT_h$ . On observe les mêmes tendances en se plaçant cette fois-ci en régime laminaire à un  $Re$  fixe de 2000 (Figure 52).

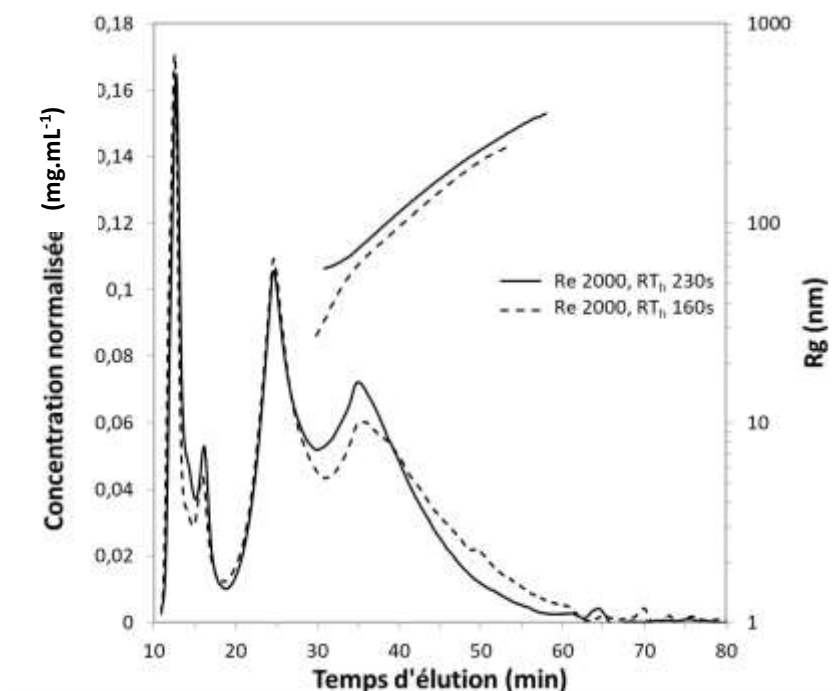


Figure 53 : Elugramme d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 produits à Reynolds fixe de 2000 et à différents temps de montée en température  $RT_h$  indiqués sur la figure. Les expériences ont été réalisées en duplicat et ont les mêmes tendances et valeurs moyennes.

Une analyse de variance a été menée afin d'estimer de façon quantitative les effets de  $Re$  et  $RT_h$  (Tableau 8 ; Chapitre 3) : les résultats sont présentés dans le Tableau 17. La variation de distribution entre agrégats primaires et secondaires est uniquement due à la variation de  $Re$ , qui présente un effet significatif sur la fraction massique du 2<sup>ème</sup> pic (Mf 2 ; p-value = 0,04\*) et sur celle du 3<sup>ème</sup> pic (Mf 3 ; p-value = 0,03\*). A l'inverse,  $RT_h$  n'a pas d'effet significatif sur ces deux fractions massiques (p-value égale à 0,21 et 0,09 pour Mf2 et Mf3, respectivement). De plus, l'augmentation de taille des agrégats produits à valeurs intermédiaires de  $Re$  et  $RT_h$  est uniquement expliquée par l'effet significatif de  $Re$  sur le rayon de giration moyen du 3<sup>ème</sup> pic  $Rg_3$  (p-value : 0,01), ainsi que sur le rayon hydrodynamique du 3<sup>ème</sup> pic  $Rh_3$  (p-value : 0,003).

De plus, une analyse factorielle de données mixtes a été réalisée pour déterminer les tendances générales des relations entre  $Re$ ,  $RT_h$ , Mf1, Mf2, Mf3,  $Rg_3$  et  $Rh_3$  (3.1.4.3.2 Analyse Factorielle de Données Mixtes ; Chapitre 3). Un regroupement hiérarchique des composantes principales a été effectué pour mettre en évidence les similitudes entre les groupes (Figure 53).

Tableau 17 : Résultats d'analyse de variance (Sum Sq, F value et P-value) en fonction des variables réponse et explicative. (\*), (\*\*), (\*\*\*) sont utilisés pour indiquer les réponses qui sont statistiquement significatives au niveau de 5 pour cent, 1 pour cent ou 1 pour mille respectivement.  $RT_h$  est considéré comme facteur imbriqué étant donné qu'il varie avec  $Re$ , il est noté  $Re:RT_h$ .

Variable réponse	Variable explicative	Sum Sq	F value	p-value
Fraction massique du pic 1 : Mf1	Re	29,569	0,7445	0,59
	Re:RT <sub>h</sub>	54,232	1,8205	0,22
Fraction massique du pic 2 : Mf2	Re	353,13	4,2231	0,04*
	Re:RT <sub>h</sub>	117,87	1,8795	0,21
Fraction massique du pic 3 : Mf3	Re	547,83	6,7929	0,01*
	Re:RT <sub>h</sub>	189,6	3,1347	0,09
Rayon de giration du pic 3 : Rg3	Re	11824,5	6,3573	0,01*
	Re:RT <sub>h</sub>	4287,3	3,0734	0,09
Rayon hydrodynamique du pic 3 : Rh3	Re	3967,6	10,5585	0,003**
	Re:RT <sub>h</sub>	950,1	3,3711	0,08

La Figure 53A représente le cercle des corrélations sur lequel 44,1% de la variabilité totale des données a été projetée selon deux dimensions. La première dimension représente 27,5% de la variabilité totale et est corrélée aux fractions massiques des 2<sup>d</sup> et 3<sup>ème</sup> pic. La deuxième dimension représente 16,6% de la variabilité totale et est corrélée au  $Rg$  et  $Rh$  du 3<sup>ème</sup> pic. Aucune information supplémentaire n'est

apportée sur les dimensions 3 et 4. La projection des individus sur le plan factoriel (Figure 53B) permet de les comparer et de les regrouper en fonction de leurs similitudes. La classification ascendante hiérarchique a permis de mettre en évidence les liens hiérarchiques entre les individus et ainsi faire ressortir trois populations principales. Ces trois populations apparaissent en fonction du régime d'écoulement appliqué lors de la production des agrégats. En régime intermédiaire, les  $R_g$  des agrégats sont supérieurs aux  $R_g$  des agrégats obtenus en régime turbulent et les  $R_h$  sont supérieurs aux  $R_h$  des agrégats obtenus en régime laminaire. De plus en régime turbulent, la fraction massique du 2<sup>d</sup> pic est plus élevée qu'en régime turbulent ou laminaire.

**Pour conclure, on peut dire que dans la gamme de  $Re$  et  $RT_h$  testés, le temps de montée en température n'a pas d'impact sur la formation des agrégats alors que le régime d'écoulement dans la zone de chauffe influence la taille des agrégats : en régime intermédiaire, des agrégats de plus grande taille peuvent être obtenus.**

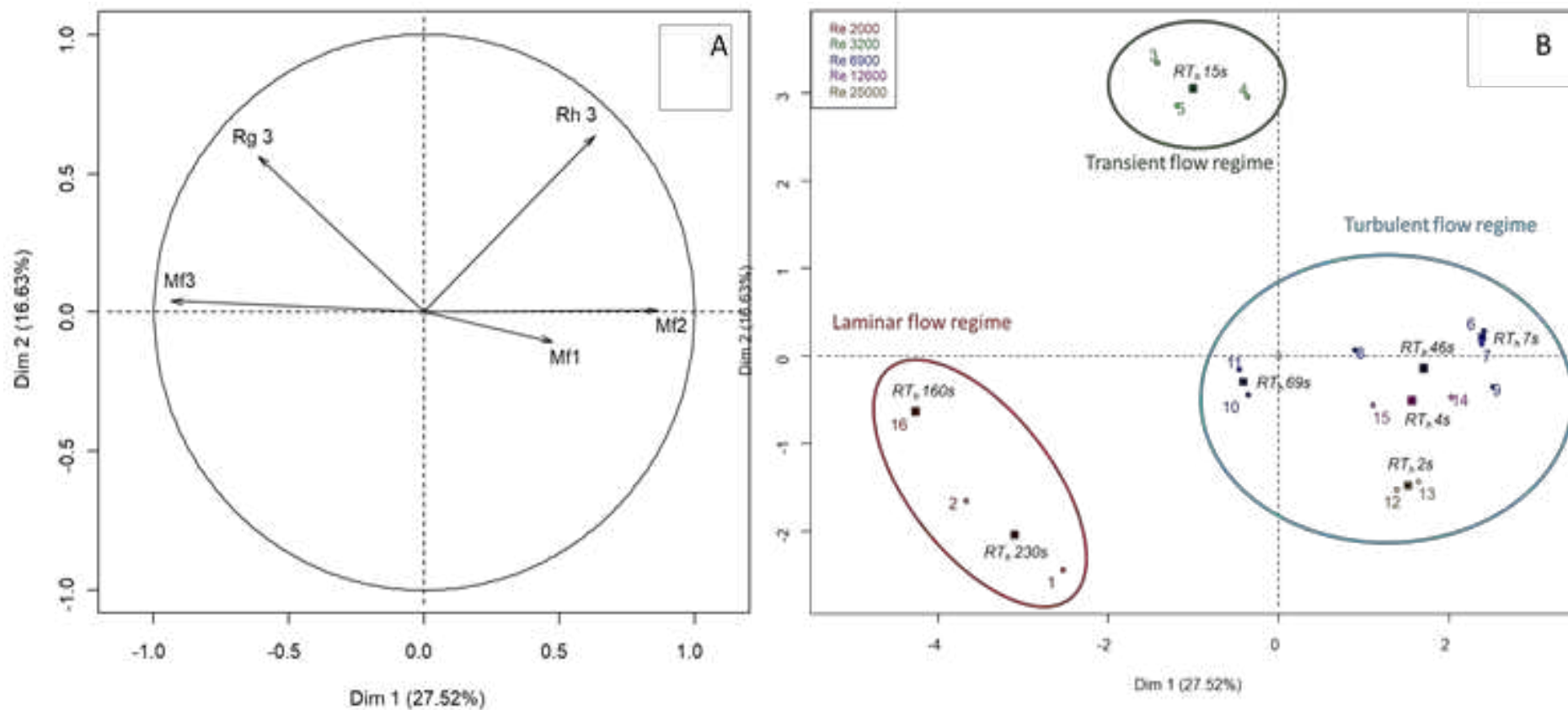


Figure 54: (A) Cercle de corrélation de l'analyse factorielle de donnée mixte (FAMD). La corrélation entre les variables est indiquée par l'angle entre leur projection sur le cercle. (B) Projection des individus (points) sur le premier plan factoriel afin de les comparer et de les regrouper en fonction de leur similitude. Les parangons (individu le plus proche du centre d'une classe) sont aussi projetés (carrés)

### 4.3.2 Influence de la température de chauffe

La Figure 54 représente le profil de concentration et de rayon de giration obtenu pour les agrégats du mélange 1 formés à des températures comprises entre 70 et 90°C, pour des conditions de régime d'écoulement et de temps de montée en température fixes ( $Re = 6900$ ,  $RT_h = 7s$ ). Le Tableau 16 donne les caractéristiques de chaque population éluée.

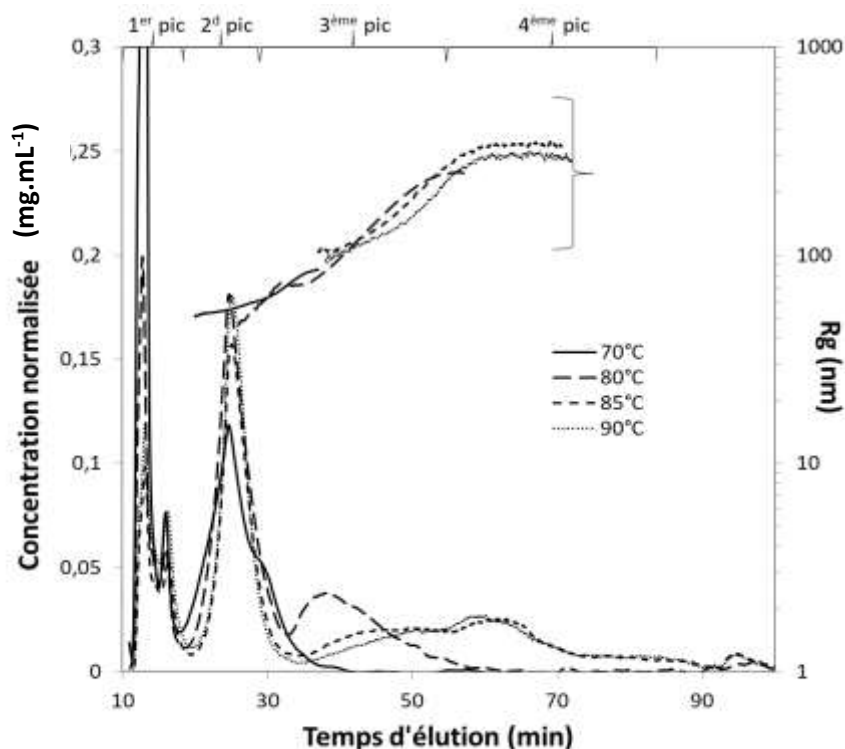


Figure 55 : Eluogrammes d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 produits à Reynolds fixe de 6900 et  $RT_h$  7s, et à différentes températures indiquées sur la figure. Les expériences ont été réalisées en duplicat et ont les mêmes tendances et valeurs moyennes. Le taux de recouvrement pour l'échantillon à 90% est faible (< 70%).

Tableau 18 : Caractéristiques des éluogrammes A4F présentés Figure 53 comparant les fractions massiques,  $D_f$ ,  $R_g/R_h$ , Rayon de giration moyen du mélange 1 à différentes températures de production ( $Re$  et  $RT_h$  fixes).

Echantillon	1 <sup>er</sup> pic	2 <sup>ème</sup> pic	3 <sup>ème</sup> pic				4 <sup>ème</sup> pic			
	fraction massique (p/p %)	fraction massique (p/p %)	Fraction massique (p/p %)	$D_f$	$R_g/R_h$ moy	$R_g$ (nm)	Fraction massique (p/p %)	$D_f$	$R_g/R_h$	$R_g$ (nm)
70	54,4	45,6	0	-	-	-	0	-	-	-
80	22,6	51,1	26,3	2,3	1,0	183,2 (± 1,2%)	0	-	-	-
85	16,8	40,4	20,2	2,6	1,3	219,4 (± 4,1%)	22,6	-	1,4	331,1 (± 3,8%)
90	21	41,2	14,6	-	-	171,5 (± 5,7%)	23,2	-	-	289,7 (± 5,1%)

A 70°C, seulement deux pics sont présents, correspondant aux protéines non-agrégées pour le premier et aux agrégats primaires pour le deuxième. Aucun agrégat secondaire n'a été formé à cette température.

Au-delà de 85°C, une nouvelle et quatrième population d'agrégats de grande taille ( $R_g \geq 289,7$  nm ; Tableau 16) apparaît à des temps d'élution compris entre 50 et 80 min. A 85°C, les agrégats présentent un facteur de forme proche de celui du troisième pic, en accord avec un mélange de structure fractale et sphérique. Il est important de noter que la technique de fractionnement par A4F ne permet pas de séparer correctement les agrégats produits à 90°C. En effet, le taux de recouvrement est faible et le signal du Rh présente beaucoup d'interférences, rendant impossible la mesure du facteur de forme des agrégats générés à cette température. La formation de tels agrégats de grande taille, à une température supérieure à 80°C, est en accord avec les résultats de Mahmoudi et al. (2014). En effet, en se plaçant à 1,5 p/p% et 3mM NaCl, ils montrent une augmentation du  $R_g$  de 35 nm à 70°C, à 100 nm à 100°C, ainsi qu'une évolution de structure vers des agrégats sphériques. Les agrégats formés dans cette étude sont de plus grande taille étant donné que les concentrations en protéines et sel sont supérieures. La même influence de température a été observée en se plaçant en régime intermédiaire ( $Re = 3200$ ,  $RT_h = 15s$  ; résultats non montrés) et l'analyse de variance valide ces conclusions, en particulier l'effet significatif de la température (T) sur la fraction massique du 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> pic (Tableau 16), ainsi que sur le rayon de gyration du 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> pic (Tableau 16). Ceci confirme que la température est un levier plus efficace que le régime d'écoulement étudié précédemment. Cette conclusion est en accord avec Simmons et al. (2007) qui montrent que la dépendance de la taille des agrégats en fonction du cisaillement diminue avec l'augmentation de température.

Tableau 19 : Résultats d'analyse factorielle de données mixtes (Sum Sq, F value et P-value) en fonction des variables réponse et explicative. (\*), (\*\*), (\*\*\*) sont utilisés pour indiquer les réponses qui sont statistiquement significatives au niveau de 5 pour cent, 1 pour cent ou 1 pour mille respectivement.

Variable réponse	Variable explicative	Sum Sq	F value	p-value
Fraction massique du pic 1 : Mf1	T	3053,61	125,88	$1,1 \cdot 10^{-7***}$
Fraction massique du pic 2 : Mf2	T	8,704	0,0951	0,96
Fraction massique du pic 3 : Mf3	T	2164,63	19,43	$9,0 \cdot 10^{-4***}$
Rayon de gyration du pic 3 : Rg3	T	65636	24,169	$4,6 \cdot 10^{-4***}$
Fraction massique du pic 3 : Mf3	T	1128,25	144,37	$1,57 \cdot 10^{-4***}$
Rayon de gyration du pic 4 : Rg4	T	228990	110,57	$2,65 \cdot 10^{-4***}$



#### 4.3.3 Mécanismes impliqués dans la formation d'agrégats par un procédé continu.

Simmons et al. (2007) suggèrent que la taille finale des agrégats dépend de la collision entre particules mais également de la fragmentation des agrégats, c'est-à-dire que les agrégats sont construits pas assemblage de petits agrégats pour former des gros ou bien par fragmentation de gros agrégats en objets de plus petites tailles. La taille des structures turbulentes  $l_k$  présentes lors de la formation des agrégats a été évaluée par l'échelle de Kolmogorov en régime turbulent (Tableau 15 et 14). Les structures turbulentes sont 100 à 400 fois plus grandes que le  $R_g$  des agrégats : cette différence d'échelle conduit à penser que les structures turbulentes ne peuvent fragmenter significativement les agrégats au cours de leur formation, et que ceux-ci sont nucléés et croissent par association plutôt que par fragmentation dans les conditions de procédé continu étudiées.

Comme évoqué dans le Chapitre 1, l'étape d'agrégation implique l'association de matériel réactif (protéine dénaturée/dépliée). Pour les différents mélanges étudiés, un graphe d'Arrhénius a été établi (Figure 55).

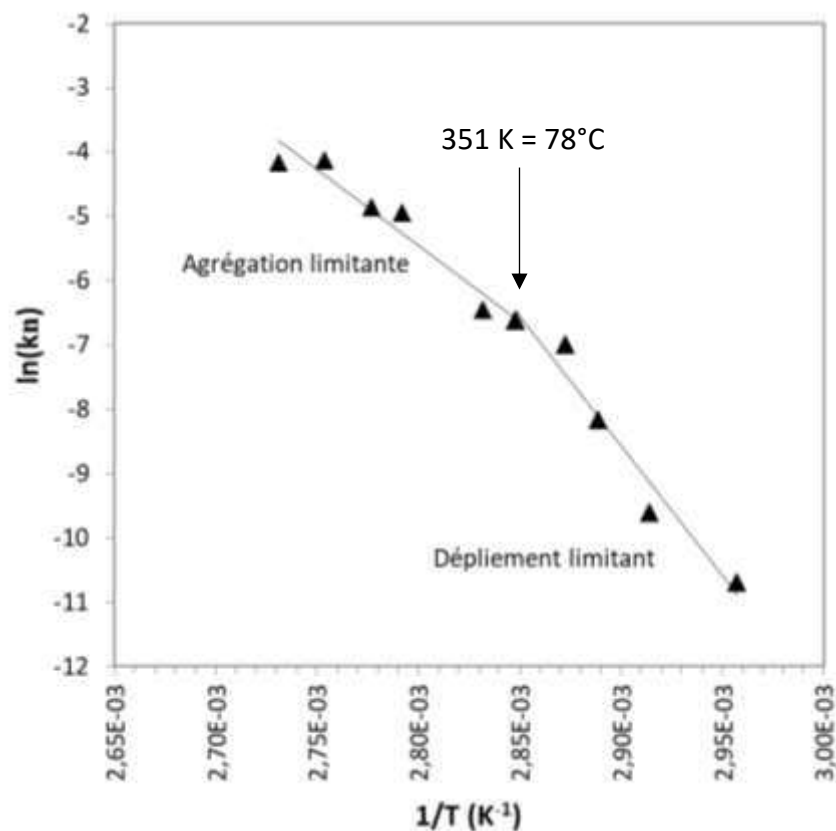


Figure 56 : Représentation d'Arrhénius obtenue en dénaturant la  $\beta$ -lactoglobuline dans des conditions mises en oeuvre représentatives de celles des protéines du WPI utilisées dans cette étude. Les traits sont des guides pour les yeux.

La transition entre régime de dépliection limitant et d'agrégation limitante se fait à 78°C, ce qui est en accord avec les résultats de Petit et al. (2011). En d'autres termes, le dépliection et l'agrégation sont globalement à l'équilibre dans les conditions de production à 80°C. D'autre part, il est possible de

représenter le profil de dénaturation de la  $\beta$ lg durant le traitement thermique pour chaque  $RT_h$  testé en s'appuyant sur la connaissance du profil thermique appliqué et sur les cinétiques d'agrégation et dénaturation de la  $\beta$ lg. La Figure 56 montre ainsi qu'à 80°C, 100% de la  $\beta$ lg est dépliée à la sortie de la zone de chauffe, quel que soit le  $RT_h$  appliqué. Aucun matériel réactif supplémentaire n'est donc attendu en augmentant davantage le  $RT_h$ , ce qui explique sans doute pourquoi le  $RT_h$  n'a pas d'impact sur la taille des agrégats.

Au-dessus de 80°C, le dépliement des  $\beta$ lg réactives est instantané et non limitant (Figure 55) ce qui a pour conséquence la formation d'agrégats de plus grande taille.

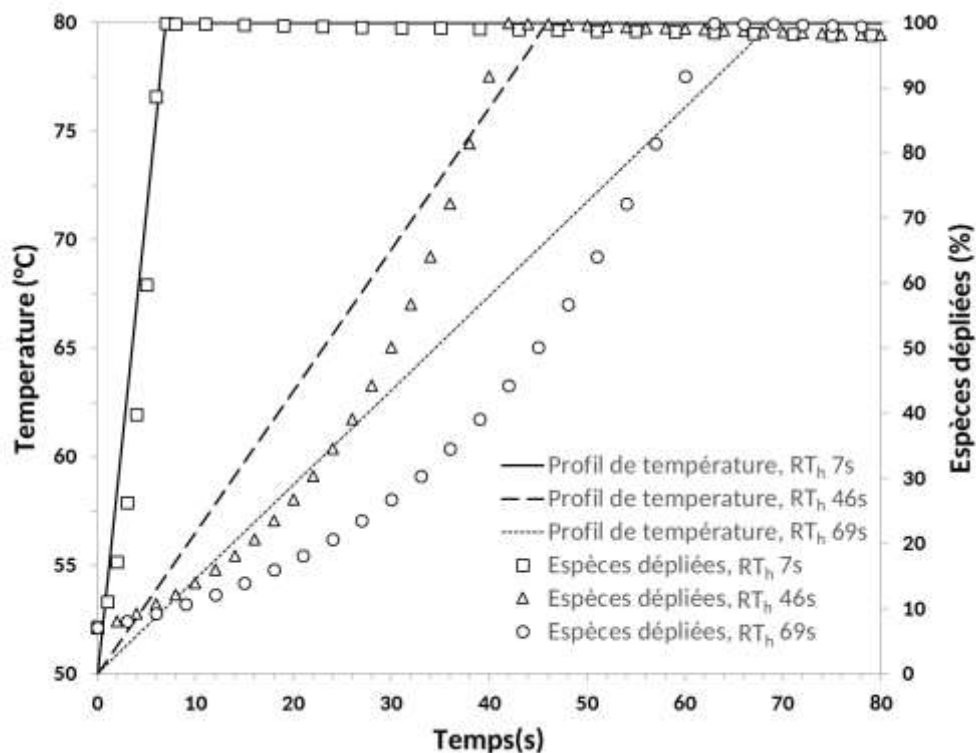


Figure 57 : Impact des profils de montée en température appliqués (fonction de  $RT_h$ ) sur la formation d'espèces dépliées à 80°C.

On a montré que la taille des agrégats augmentait en régime intermédiaire. Pour en comprendre les raisons, on peut faire une analogie avec les expériences de cristallisation menées récemment par Forsyth et al. (2015) et Nappo et al. (2018). Un schéma explicatif est proposé sur la Figure 57.

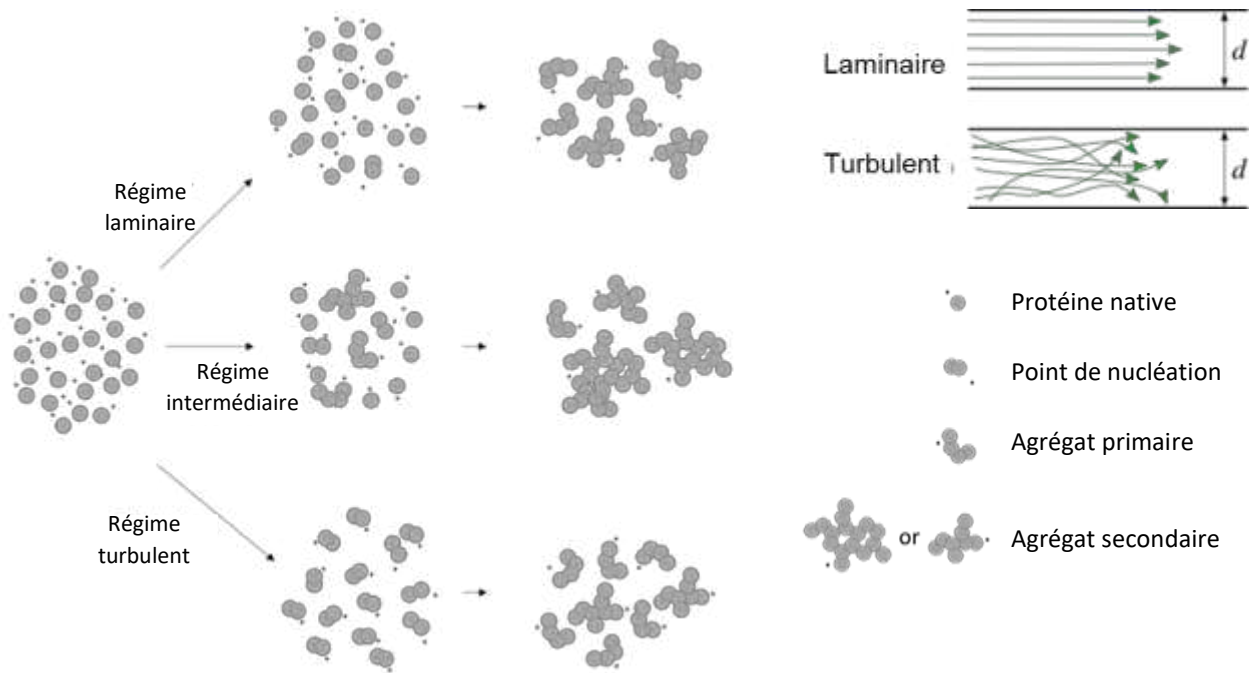


Figure 58 : schéma explicatif qualitatif de l'impact du régime d'écoulement sur la formation d'agrégats du mélange 1.

Effectivement, comme suggéré par Nicolai et al. (2011), on peut comprendre l'agrégation des protéines comme un phénomène intégrant d'abord une formation d'agrégats primaires, assimilables à des points de nucléation, qui alimentent dans un deuxième temps la croissance en taille d'agrégats secondaires dont ils constituent les briques élémentaires. Forsyth et al. (2015) et Nappo et al. (2018) montrent une forte augmentation du taux de nucléation avec l'augmentation du Reynolds. En effet, la rencontre des espèces est limitée par les conditions d'écoulement en régime laminaire (le flux étant divisé en veines liquides qui ne se mélangent pas à  $Re < Re$  critique), et peu de points de nucléation seraient ainsi formés. Le dépliement des  $\beta$ lg étant complet quelles que soient les conditions de régime d'écoulement, la matière réactive s'orienterait autour d'un faible nombre de points de nucléation et la formation d'agrégats secondaires est favorisée (la fraction massique collectée dans le 3<sup>ème</sup> pic est plus importante en régime laminaire ; Tableau 13). De plus, la quantité d'espèces réactives capables de s'agréger serait limitée à celle présente dans le compartiment formé par chaque veine liquide, ce qui expliquerait que les agrégats secondaires soient limités en taille dans ces conditions (Rg des agrégats du 3<sup>ème</sup> pic ; Tableau 13).

A l'inverse, en régime turbulent, les espèces se rencontrent facilement, le taux de nucléation est élevé et ainsi de nombreux points de nucléation sont formés. Le matériel réactif serait fortement distribué lors de la formation de ces points de nucléation, et deviendrait finalement limitant pour la formation d'agrégats secondaires. Dit autrement, beaucoup de points de nucléation conduisent à beaucoup

d'agrégats primaires de petite taille : ainsi, la fraction massique des agrégats primaires représente ici 51 p/p% du total, contre 37 p/p% seulement en régime laminaire (Tableau 13).

Enfin, en régime intermédiaire, la nucléation des agrégats est favorisée par rapport au régime laminaire, mais pas autant qu'en régime turbulent. Le nombre de points de nucléation serait ainsi moindre qu'en régime turbulent, mais à l'inverse le matériel réactif disponible pour former des agrégats secondaires serait supérieur à celui du régime laminaire. Ainsi, en régime intermédiaire, le  $R_g$  du 3<sup>ème</sup> pic est d'environ 220nm, ce qui est plus large que les agrégats obtenus en régime laminaire ou turbulent (Tableau 13).

**Pour conclure, on peut dire que deux leviers de procédé, à savoir le régime d'écoulement et la température de chauffe, peuvent moduler la taille des agrégats du mélange 1 formés.** Ainsi, en régime intermédiaire, des agrégats de plus grande taille peuvent être formés en comparaison aux régimes laminaire et turbulent, dû à un optimum de rencontre entre espèces réactives. Des agrégats de plus grande taille sont obtenus en augmentant la température de chauffe au-delà de 85°C car dans de telles conditions le dépliement-agrégation des PS est contrôlé par l'étape d'agrégation. On suppose que l'augmentation de taille concerne autant les agrégats fractals que les agrégats microgels étant donné que les facteurs de forme n'évoluent pas d'une condition de procédé à l'autre.

La taille moyenne maximale des agrégats du mélange 1 que l'on peut former sans risque de gélifier à l'aide des différents leviers étudiés est synthétisée dans le Tableau 20. On représente dans ce tableau le  $R_g$  moyen de l'échantillon pris dans sa globalité (c'est à dire l'ensemble des 4 pics).

Tableau 20 : Comparaison du rayon de giration moyen maximum obtenus via trois leviers différents.

Levier utilisé	$R_{g_{moy}}$ (nm)
[Protéine] et [NaCl]	154,0 ± 1,5
Régime intermédiaire	203,6 ± 1,4
Température 85°C	312,1 ± 3,8

Pour induire une augmentation de taille des agrégats du mélange 1 sans gélifier dans le pilote de traitement thermique, la température de chauffe est un levier plus efficace que le levier régime d'écoulement (intermédiaire), lui-même plus efficace le levier matière (concentrations en protéines et sel). Il serait intéressant d'étudier la variation de taille à l'aide d'une combinaison de plusieurs de ces leviers. Il serait également intéressant de prolonger les travaux sur l'obtention des agrégats de plus

grande taille par des leviers de procédé. Nous avons vu ici que ceux-ci sont obtenus lorsqu'un optimum de probabilité de rencontre des espèces réactives est atteint via le macromélange en présence non limitante de matériel réactif. Une perspective consisterait ainsi à utiliser des géométries favorisant des trajectoires de nature chaotique dès les faibles valeurs de Reynolds, et par suite la rencontre d'espèces réactives. Il serait notamment judicieux de tester des géométries mettant en œuvre des coudes et des changements de direction qui génèrent des vortex de Dean (Acharya et al., 2001), afin d'explorer s'il est possible dans ce cas d'obtenir des agrégats de plus grande taille à faible valeur de Reynolds.

#### 4.4 Étude de l'encrassement

Dans la continuité de l'étude du procédé d'obtention, nous nous sommes intéressés à l'encrassement provoqués par chacun des deux mélanges lors de la formation des agrégats dans l'échangeur tubulaire. L'encrassement lors du traitement thermique est caractérisé en industrie laitière par la formation d'un dépôt de nature protéique-minérale (Burton, 1968), notamment sur la paroi chaude. Le mécanisme d'encrassement a été très étudié (Petit et al., 2013; Chen et al., 2004; Belmar-Beiny et al., 1993; Santos et al., 2006; Khaldi et al., 2018; Blanpain-Avet et al., 2016; Sadeghinezhad et al., 2013) et est gouverné par la présence de protéines solubles par la  $\beta$ lg sous forme dépliée et donc très réactives (Figure 58) qui s'adsorbent d'abord en une monocouche sur la paroi chaude, puis en couches successives reliées entre elles par des ponts calciques et disulfures.

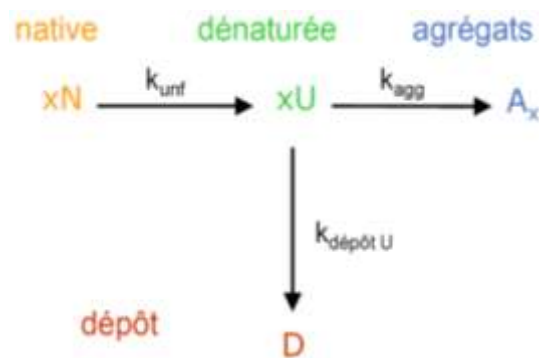


Figure 59 : Principe de dénaturation-agrégation de la  $\beta$ lg et formation des dépôts encrassants.

Khaldi et al. (2018) ont étudié l'encrassement d'une solution de WPI à pH 6,8 dans un échangeur à plaques, et ont montré que plus le ratio molaire Calcium/ $\beta$ lg était élevé, plus la dénaturation de la  $\beta$ lg était importante, et par conséquent, plus la vitesse de dépôt était élevée. On pourrait comprendre le ratio calcium/ $\beta$ lg étudié par Khaldi et al. (2018), en terme de densité de charges négatives portée par les protéines : toutes choses égales par ailleurs, une solution avec un faible ratio calcium/ $\beta$ lg présente des protéines à densité de charge négative plus élevée qu'une solution avec un fort ratio calcium/ $\beta$ lg.

Le comportement encrassant des deux mélanges a ici été étudié de manière préliminaire compte tenu du temps disponible, au moment du passage à l'échelle semi-industrielle du procédé en fin de doctorat. Il s'est fait au travers du suivi de l'évolution de la perte de charge à la zone de chauffe au cours de la production à 85°C (Figure 59), qui qualifie indirectement la cinétique de dépôt encrassant.

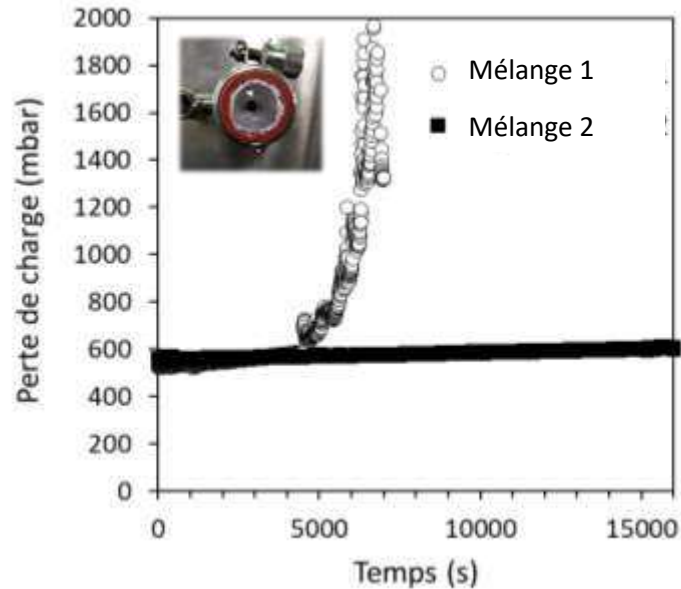


Figure 60 : Evolution de la perte de charge au sein du tube à passage de courant au cours d'une production de grand volume d'agrégats des mélanges 1 et 2.

On observe une augmentation exponentielle de la perte de charge dès 4000 s de production pour le mélange 1. En revanche pour le mélange 2, la perte de charge n'évolue pas ou très peu en 4h de production (15000s). Le mélange 1 génère donc plus d'encrassement, ce qui est à rapprocher des conditions de production des agrégats. En effet, on peut supposer que la dénaturation est plus importante dans le cas du mélange 1, d'une part du fait que les agrégats sont ici formés à densité de charges négatives plus faible que pour le mélange 2, et d'autre part du fait que les agrégats ont été produits à 85°C, c'est-à-dire à une température de dénaturation non limitante (Figure 55). Dans ces conditions, les espèces dépliées réactives ont plus le temps de se déposer et former de l'encrassement. La forte réactivité des espèces dépliées lors de la production d'agrégats du mélange 1 permet ainsi la formation de microgels inertes qui seront moins réactifs lors des opérations de concentration.

## CHAPITRE 5 : IMPACT DES OPÉRATIONS DE CONCENTRATION À DIFFÉRENTES ÉCHELLES SUR LES PROPRIÉTÉS INTRINSÈQUES DES DEUX MÉLANGES D'AGRÉGATS SÉLECTIONNÉS

---

*Dans ce chapitre, différentes échelles de concentration (technique, cinétiques et degré de concentration finale) ont été étudiées, à savoir une concentration sélective lente à l'équilibre thermodynamique par compression osmotique ; une concentration sélective et plus rapide par filtration tangentielle à différents facteurs de réduction volumique ; et une concentration rapide par séchage et maintien à l'état sec et concentré pendant des durées croissantes de stockage. L'étude à ces différentes échelles a permis de mettre en avant que le couple [degré de concentration ; temps passé à l'état concentré] révélait bien le niveau de réactivité des mélanges d'agrégats.*

*Les microgels peu volumineux, non interpénétrables et peu réactifs qui sont présents dans le mélange 1 induisent une augmentation de la concentration limite de gélification et permettent d'éviter une sur-agrégation au cours de l'ultrafiltration et du séchage. La formation de liaisons irréversibles est observée après un temps passé à l'état concentré. Après 4 mois passés à l'état poudre, le grain de poudre conserve sa capacité de réhydratation.*

*A l'inverse, les agrégats du mélange 2 gélifient à des concentrations plus faibles que les agrégats du mélange 1. Très réactifs et interpénétrables, ils sur-agrègent lors des opérations de filtration et séchage. Cette sur-agrégation se poursuit au cours du stockage à l'état concentré par une réticulation favorisée à pH alcalin et impactant la capacité du grain de poudre à être réhydraté.*

*Des différences majeures ont ainsi été observées entre les agrégats du mélange 1 et les agrégats du mélange 2 en ce qui concerne leur capacité à supporter des opérations de concentration-séchage.*

*Principaux objectifs de travail abordés dans ce chapitre :*

- Comprendre le comportement des agrégats lors de leur concentration pour mieux maîtriser les opérations de concentration-séchage-redispersion.*
- Identifier quel mélange d'agrégats (mélange 1 ou mélange 2) est le plus apte à subir des opérations de concentration-séchage.*

## TABLE DES MATIÈRES

---

<b>CHAPITRE 5 : IMPACT DES OPÉRATIONS DE CONCENTRATION À DIFFÉRENTES ÉCHELLES SUR LES PROPRIÉTÉS INTRINSÈQUES DES DEUX MÉLANGES D'AGRÉGATS SÉLECTIONNÉS .....</b>	<b>101</b>
<b>5.1 Résultats .....</b>	<b>103</b>
5.1.1 Compression osmotique.....	103
5.1.2 Ultrafiltration.....	105
5.1.3 Séchage par pulvérisation .....	107
5.1.4 Propriété des poudres et redispersion.....	108
<b>5.2 Discussion .....</b>	<b>112</b>
5.2.1 Mélanges 1 et 2 : des comportements différents en fonction du degré de concentration, liés à une différence de conformation des agrégats. ....	113
5.2.2 Mélanges 1 et 2 : des comportements différents en fonction de la cinétique de concentration et temps passé à l'état concentré, liés à une différence de réactivité des agrégats.....	116



## 5.1 Résultats

### 5.1.1 Compression osmotique

Des expériences de compression osmotique à l'équilibre thermodynamique ont été effectuées et les diagrammes d'état obtenus pour les des deux mélanges sont présentés sur la Figure 60.

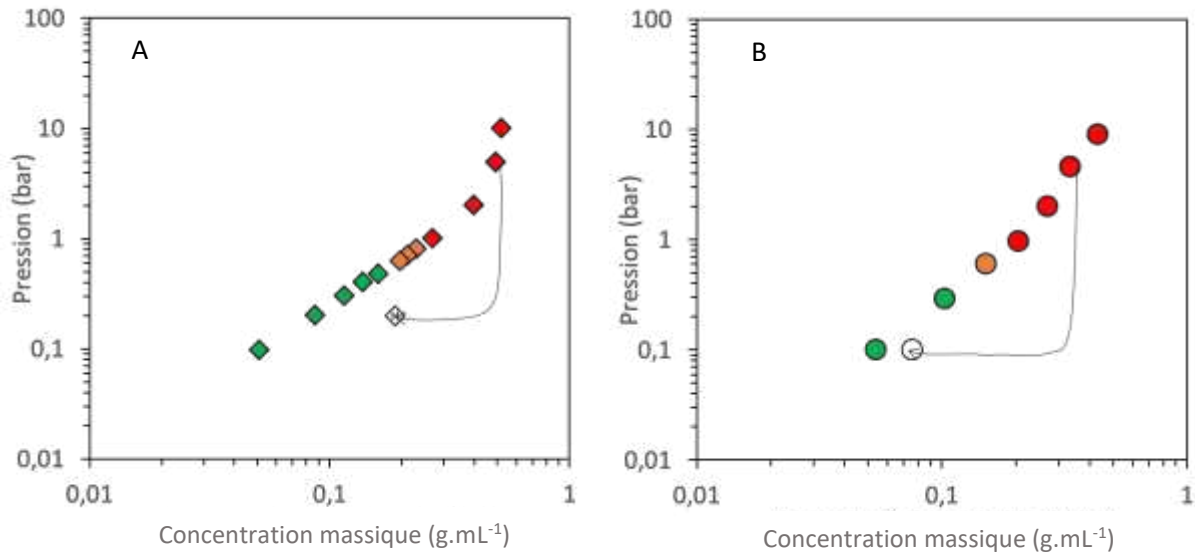


Figure 61 : Diagramme d'état obtenu en compression osmotique pour les agrégats du mélange 1 (A) et du mélange 2 (B). Les flèches symbolisent les décompressions. En vert, échantillon liquide, en orange, échantillon visqueux et en rouge, échantillon gélifié.

On comprime les agrégats du mélange 1 à différentes pressions. Les agrégats comprimés à une pression de 0,2 bar atteignent une concentration de 0,087 g.mL<sup>-1</sup>. Pour une pression imposée inférieure à 0,6 bar, l'échantillon reste peu visqueux et se concentre jusqu'à 0,198 g.mL<sup>-1</sup> (Tableau 21). A des pressions plus élevées, l'échantillon devient plus visqueux, puis gélifie à partir de 1 bar et d'une concentration de 0,269 g.mL<sup>-1</sup> tout en restant transparent. Les agrégats comprimés à 5 bar (zone gélifiée) puis décomprimés à 0,2 bar atteignent une concentration de 0,188 g.mL<sup>-1</sup> et se séparent en deux phases, l'une liquide et contenant des protéines solubles, et l'autre solide.

Tableau 21 : Valeurs caractéristiques du diagramme d'état présenté sur la Figure 59 pour les mélanges 1 et 2.

Echantillon	Compression imposée (bar)	Concentration massique (g/mL)	Etat de l'échantillon	Décompression imposée (bar)	Concentration massique (g/mL)	État de l'échantillon
Mélange 1	5	0,492	Gélinifié	0,2	0,188	2 Phases : solide et liquide
	1	0,269	Gélinifié			
	0,6	0,198	Visqueux			
	0,2	0,087	Liquide			
Mélange 2	5	0,335	Gélinifié	0,1	0,076	2 phases : solide et liquide
	1	0,205	Gélinifié			
	0,6	0,152	Visqueux			
	0,1	0,061	Liquide			

Ces deux phases, liquide et solide, ont été passées séparément en A4F et leur profil d'élution est présenté sur la Figure 61A, en comparaison d'un échantillon avant compression osmotique. On observe que la partie ressolubilisée est composée d'une seule population majoritaire élue entre 10 et 15 min qui correspond au pic des protéines non agrégées et caséines. La partie non ressolubilisée en compression osmotique est en partie remise en solution par agitation mécanique dans de l'eau milliQ, puis filtrée. Le filtrat est enfin analysé en A4F : on retrouve dans ce filtrat les populations correspondant aux agrégats également présents dans l'échantillon avant compression osmotique

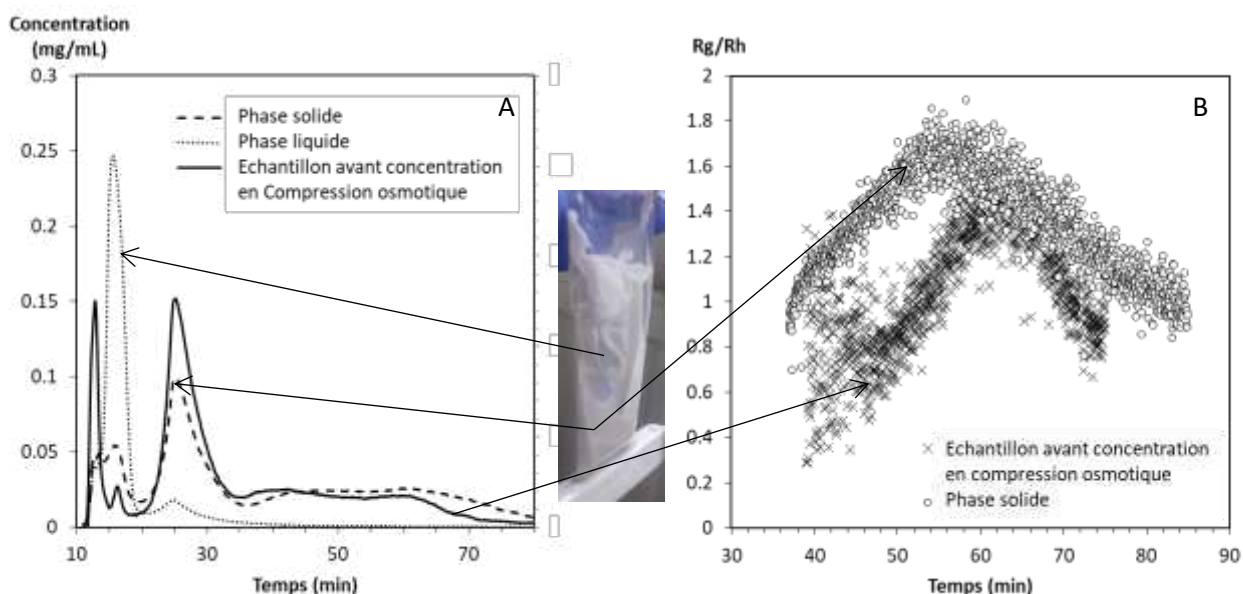


Figure 62 : (A) Elugrammes d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 avant compression osmotique (trait plein), des échantillons de la phase solide obtenue après décompression osmotique (tirets) et de la phase liquide obtenue après décompression osmotique (pointillés); (B) Facteur de forme des échantillons avant compression osmotique (x) et des échantillons de la phase solide obtenue après décompression osmotique (o).

(Figure 61A).

Le facteur de forme de la partie non ressolubilisée est également présenté (Figure 61B) : il apparaît en moyenne plus élevé que le facteur de forme de l'échantillon avant compression osmotique, mis en comparaison sur cette même figure pour des temps d'élution compris entre 40 et 60 min.

De même, les agrégats du mélange 2 ont été comprimés à différentes pressions (Tableau 21 et Figure 60B). On peut distinguer ici les mêmes étapes que pour les agrégats du mélange 1 : aux faibles pressions inférieures à 0,6 bar, l'échantillon reste peu visqueux et se concentre jusqu'à 0,152 g.mL<sup>-1</sup>. La transition de gélification est observée à des pressions et concentrations plus élevées (à partir de 1 bar et 0,205 g.mL<sup>-1</sup>, respectivement), l'échantillon restant transparent. Enfin, les agrégats comprimés à 5 bar (zone gélifiée) puis décomprimés à 0,1 bar atteignent une concentration de 0,076 g.mL<sup>-1</sup> et se séparent en deux phases, l'une liquide et l'autre solide.

### 5.1.2 Ultrafiltration

Des agrégats du mélange 1 et du mélange 2 ont été concentrés par ultrafiltration à des facteurs de réduction volumique allant jusqu'à la gélification du concentré (Tableau 22). Les agrégats du mélange 1 ont commencé à gélifier à partir de 0,216 g.mL<sup>-1</sup> tandis que les agrégats du mélange 2 ont gélifié dès 0,180 g.mL<sup>-1</sup>.

Tableau 22 : Impact de la concentration par ultrafiltration sur la gélification des agrégats des différents mélanges

	Concentration en UF (g.mL <sup>-1</sup> )	FRV	État de l'échantillon en sortir d'UF
<i>Mélange 1</i>	0,052	1	Liquide
	0,102	2	Liquide
	0,155	3	Liquide
	0,213	4	Liquide
	0,216	> 4	Gélifié
<i>Mélange 2</i>	0,064	1	Liquide
	0,122	2	Liquide
	0,180	3	Gélifié

Ensuite, des échantillons du mélange 1 ont été redispersés à leur concentration initiale juste après ultrafiltration pour évaluer si cette étape de concentration avait un impact direct sur les propriétés intrinsèques des agrégats. Le profil A4F de ces solutions concentrées et redispersées ainsi que les facteurs de forme associés sont présentés Figure 62. Les mêmes profils sont observés pour chacun des

échantillons en termes de temps d'élution, de rayon de giration et de facteur de forme. En ce qui concerne le mélange 2, les agrégats du rétentat concentrés à  $120 \text{ g.L}^{-1}$  n'ont pas pu être analysés en A4F après redispersion à cause d'une gélification à J+7.

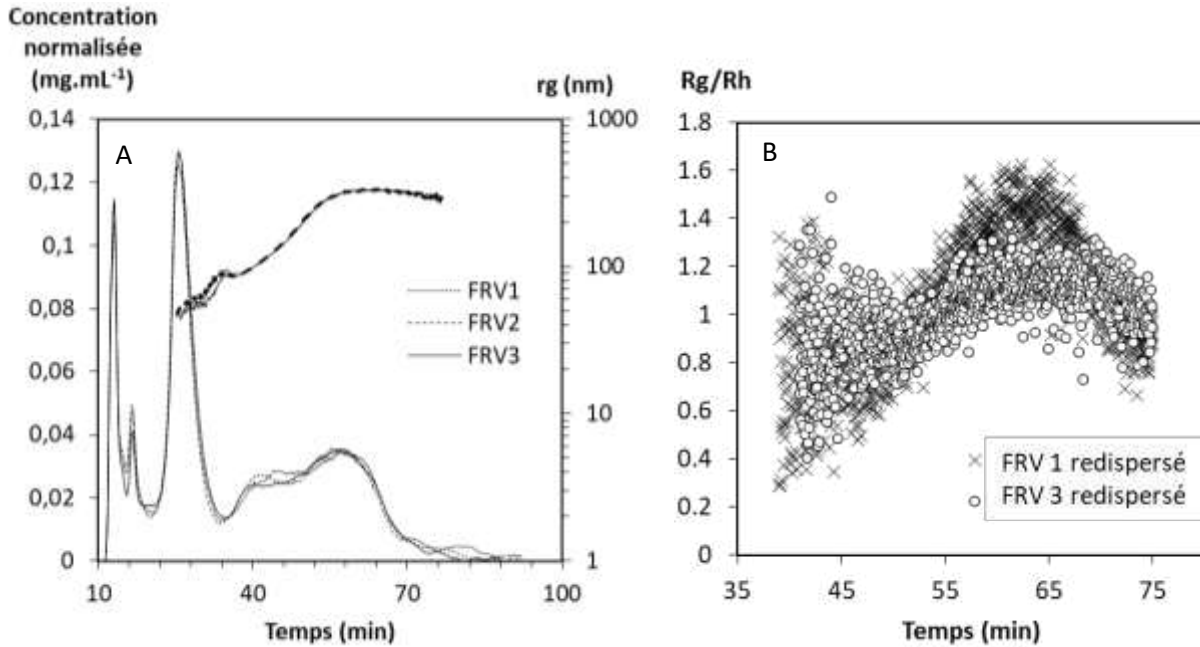


Figure 63 : (A) Elugramme d'A4F et (B) facteur de forme des agrégats du mélange 1 concentrés à différents FRV puis redispersés. Les agrégats du mélange 1 ont été produits à  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de protéine,  $10 \text{ mM}$  de NaCl, pH 7, à Re 6900, RTh 7s et à  $85^\circ \text{C}$ .

### 5.1.3 Séchage par pulvérisation

Les agrégats des deux mélanges ont également été séchés par pulvérisation. Les profils d'A4F et de facteur de forme des échantillons du mélange 1 avant et après séchage sont présentés sur la Figure 63. On observe les mêmes profils d'élution, de rayon de giration ( $R_{g_{moy}} \approx 310$  nm) et de facteur de forme qui varie de 0,6 à 1,2.

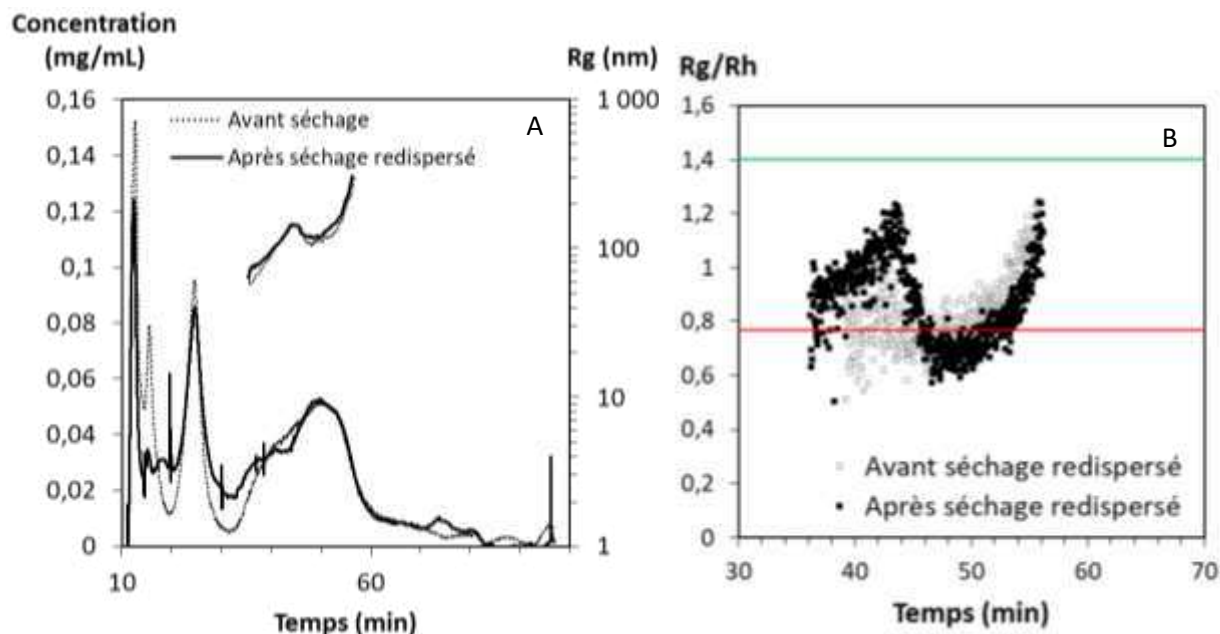


Figure 64 : (A) Eluogrammes d'A4F et (B) facteur de forme des agrégats du mélange 1 avant et après séchage, après redispersion par homogénéisation. Les agrégats du mélange 1 ont été produits à  $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de protéine,  $10\text{mM}$  de NaCl, pH 7, à  $Re$  6900,  $RT_h$  7s et à  $85^\circ\text{C}$ . Les traits rouge et vert représentent respectivement les  $R_g/R_h$  théorique de sphère et agrégats branchés.

Les mêmes profils d'élution, de  $R_g$  et de facteur de forme sont observés quel que soit le niveau de concentration (FRV1, FRV2, FRV3 ou FRV4) avant séchage (Résultats non montrés).

Les profils d'A4F et de facteur de forme des échantillons du mélange 2 avant et après séchage sont présentés sur la Figure 64. On observe une augmentation de  $R_g$  ( $R_{g\text{moy}} = 183 \text{ nm}$  avant séchage et  $R_{g\text{moy}} = 250 \text{ nm}$  après séchage) à des temps d'éluion compris entre 35 et 50 min d'éluion pour les échantillons ayant subi l'étape de séchage. De même le facteur de forme est plus élevé entre 35 et 45 min d'éluion pour les échantillons ayant subi une étape de séchage. Le facteur de forme aux temps d'éluion de 25 à 40 min varie de 0,8 à 1,8 pour les échantillons avant séchage et de 0,8 à 2,3 pour les échantillons après séchage.

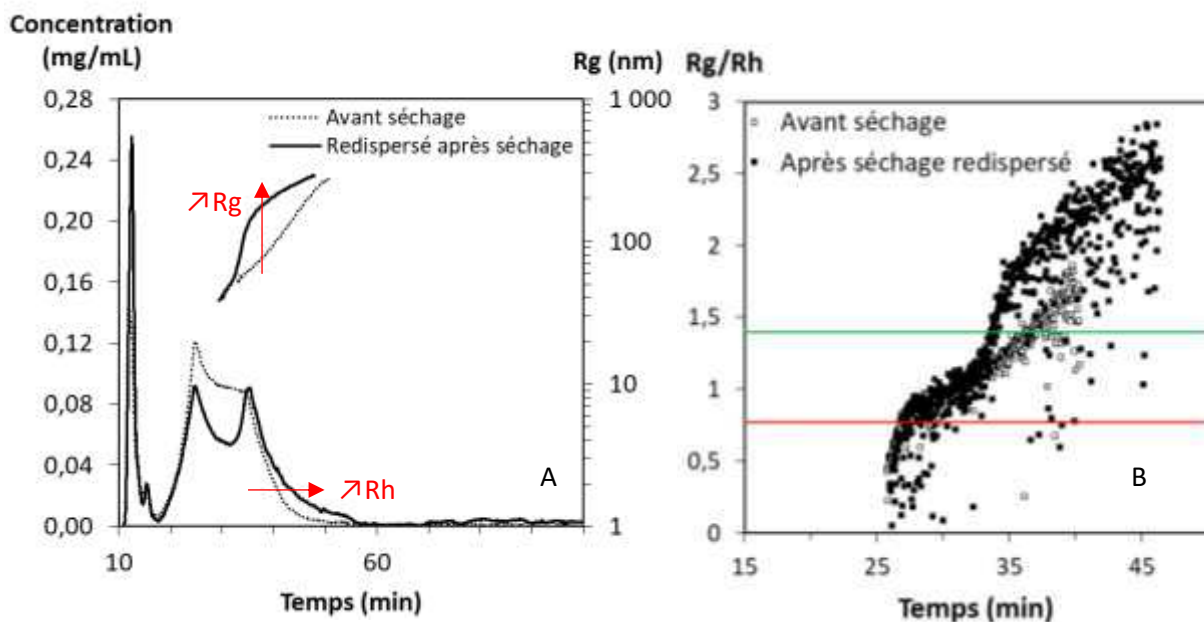


Figure 65 : (A) Eluogrammes d'A4F et (B) facteur de forme des agrégats du mélange 2 avant et après séchage-redispersion à 900  $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$  durant 9h. Les agrégats du mélange 2 ont été produits à  $60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de protéine, 25mM de NaCl, pH 7 + 2OH-/protéine, à  $Re$  6900,  $RT$ , 7s à  $80^\circ\text{C}$ . Les traits rouge et vert représentent respectivement les  $R_g/R_h$  théorique de sphère et agrégats branchés.

#### 5.1.4 Propriété des poudres et redispersion

Les poudres produites aux échelles Minor et Bionov de chacun des mélanges ont été analysées en terme d' $A_w$ , de taille de particule et de comportement à la réhydratation à travers les indices de mouillabilité, dispersibilité et solubilité. Les résultats sont présentés dans le Tableau 23.

L' $A_w$  de la poudre juste après la production (à J+4) est comparable pour chacun des échantillons produits et de l'ordre de 0,2, valeur ciblée lors du séchage. Elle évolue peu après 4 mois de stockage à  $20^\circ\text{C}$ , restant de l'ordre de 0,2.

Tableau 23 : Aw, diamètre de particule, indices de mouillabilité, de dispersibilité et de solubilité des poudres de WPI et d'agrégats des mélanges 1 et 2. Les agrégats du mélange 1 ont été produits à 50 g.L<sup>-1</sup> de protéine, 10mM NaCl, pH 7, Re 6900, RTh 7s et 85°C. Les agrégats du mélange 2 ont été produits à 60 g.L<sup>-1</sup> de protéine, 25mM NaCl, pH 7 + 2OH<sup>-</sup> /protéine, Re 6900, RTh 7s et 80°C.

Échantillon	Séchage	Aw		Diamètre de particules (µm)	Mouillabilité (s)	Dispersibilité (%)	Solubilité (%)
		J+4	M+4				
Mélange 1	Minor	0,210	-	9	> 120	16,3	95,5
	Bionov	0,194	0,208	30	> 120	21,5	96,9
Mélange 2	Minor	0,196	-	18	> 120	38,4	64,5
	Bionov	0,146	0,207	46	> 120	13,5	ND
WPI	-	0,235	-	165	> 120	60,1	99,4

Les poudres produites à l'échelle Bionov ont un diamètre de particule moyen environ trois fois supérieur à celles produites à l'échelle Minor. En effet, l'agglomération (rencontre entre des particules et des gouttelettes au sein de la chambre) est favorisée à cette échelle, même en l'absence de recyclage des fines en haut de tour comme cela a été pratiqué ici. Par ailleurs, le type de pulvérisation bi-fluide, propre à la configuration Minor, conduit à des tailles de gouttelettes et par suite de particules plus petites. Au-delà de ces différences liées au dispositif de séchage, la taille moyenne supérieure des poudres du mélange 2 peut s'expliquer par une viscosité du concentré plus élevée que dans le cas du mélange 1.

Les valeurs d'indices de mouillabilité et de dispersibilité étaient toutes supérieures à 120s et inférieures à 95%, respectivement, ce qui est propre aux poudres riches en protéines, qui sont considérées comme non mouillables et non dispersibles.

L'indice de solubilité est différent entre les deux mélanges. Le mélange 1 présente un indice de solubilité supérieur à 95% tandis que le mélange 2 a un indice de solubilité bien inférieur voire non déterminable tant la solubilité est faible.

Pour redisperser les poudres des deux mélanges obtenues à l'échelle Bionov, deux couples [vitesse / durée] d'agitation ont été utilisés. La première condition correspond à une agitation des échantillons à 900 tr.min<sup>-1</sup> pendant 3h. La seconde, plus intensive consiste à compléter cette étape d'agitation initiale (900 tr.min<sup>-1</sup>, 3h) par une étape d'homogénéisation (1<sup>er</sup> étage 600 bar, 2<sup>ème</sup> étage 120 bar), générant des taux de cisaillement supérieur. L'impact de ces taux de cisaillement croissants sur la ressolubilisation des agrégats a été préalablement testé sur des poudres Minor et est présenté Figure 66 pour le mélange 1 et Figure 65 pour le mélange 2.

Pour le mélange 1, on observe que l'utilisation d'un agitateur ne permet pas de récupérer la totalité des agrégats : effectivement, le taux de recouvrement en A4F n'est que de 55%, ce qui veut dire que des objets de très grande taille sont restés sur la membrane et n'ont pas été élués.



De plus, on observe une augmentation du Rg pour la 4<sup>ème</sup> population associée à une augmentation du facteur de forme. Après homogénéisation, on observe en revanche que les courbes d'A4F sont superposées, et que le taux de recouvrement est correct. Les agrégats redispersés avec cet outil ont un Rg et un facteur de forme identiques aux agrégats avant séchage.

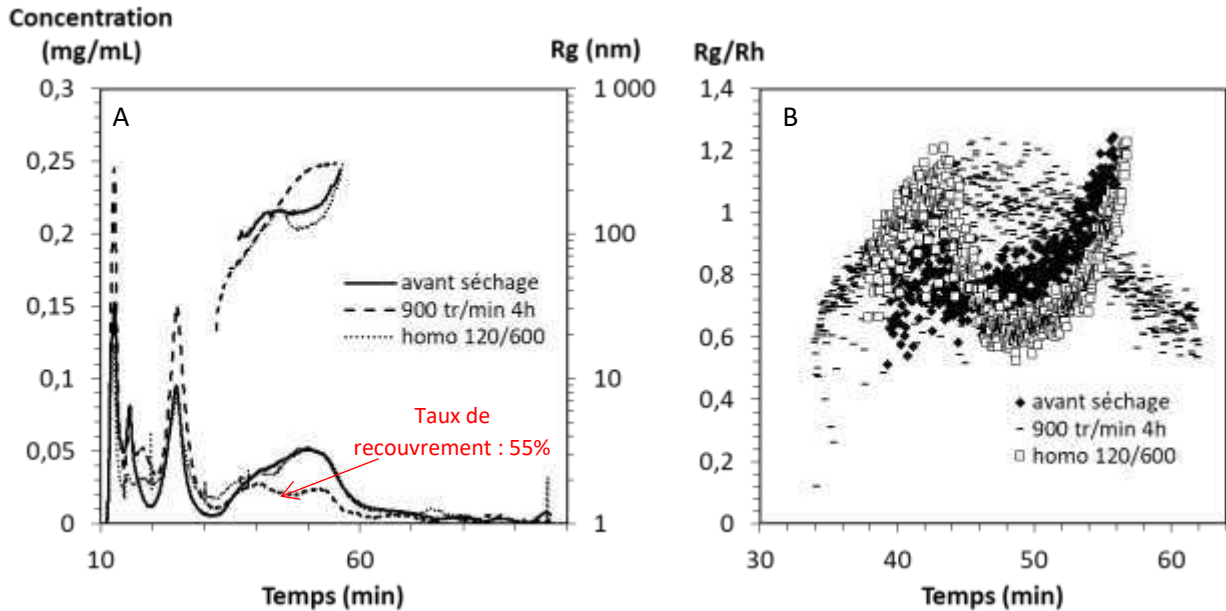


Figure 67 : (A) Elugrammes d'A4F et (B) facteur de forme des agrégats du mélange 1 avant et après séchage-redispersion par agitation à 900tr/min pendant 4h ou après homogénéisation. Les agrégats du mélange 1 ont été produit avec 50g.L<sup>-1</sup> de protéine, 10mM de NaCl, pH 7, à Re 6900 et RT<sub>h</sub> 7s à 85°C.

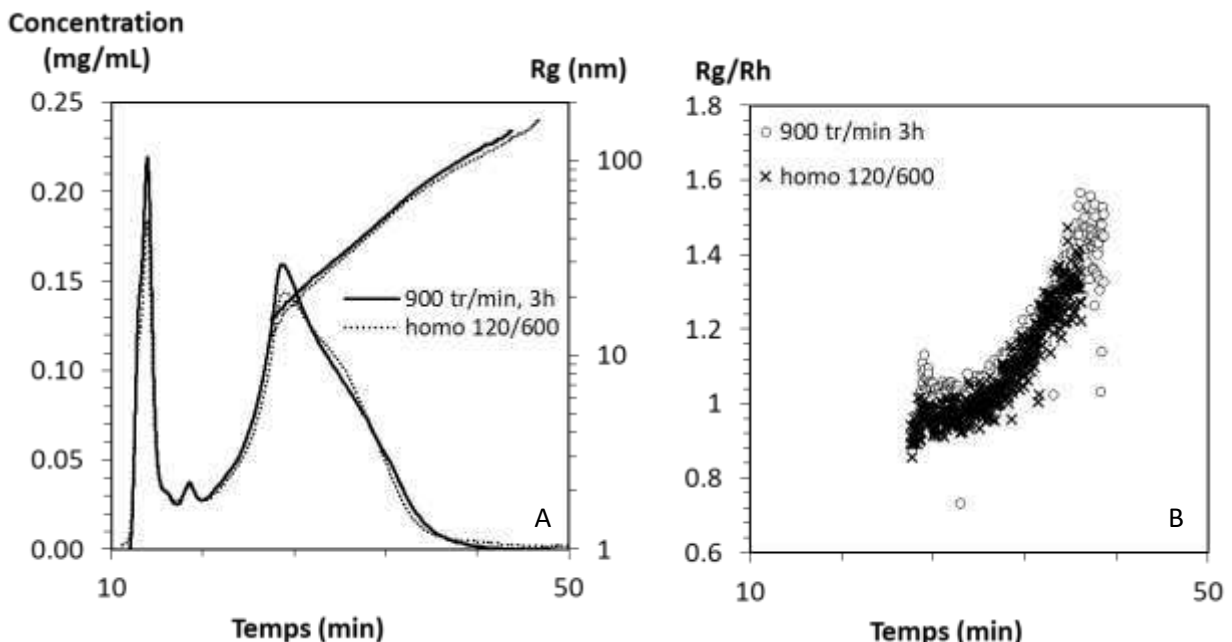


Figure 66 : (A) Elugrammes d'A4F et (B) facteur de forme des agrégats du mélange 2 après séchage-redispersion par agitation à 900tr/min pendant 3h ou après homogénéisation. Les agrégats du mélange 2 ont été produit avec 60g.L<sup>-1</sup> de protéines, 25mM de NaCl, pH 7+ 2OH/protéine, à Re 6900 et RT<sub>h</sub> 7s à 80°C.

Pour le mélange 2 (Figure 65), on observe les mêmes profils A4F et de facteur de forme pour des redispersions faites sous agitation seule ou après agitation et homogénéisation.



Les solutions redispersées sous agitation ou après homogénéisation 4 jours après le séchage (J+4) ou 4 mois après le séchage (M+4) ont été observées en microscopie confocale (Figure 67).

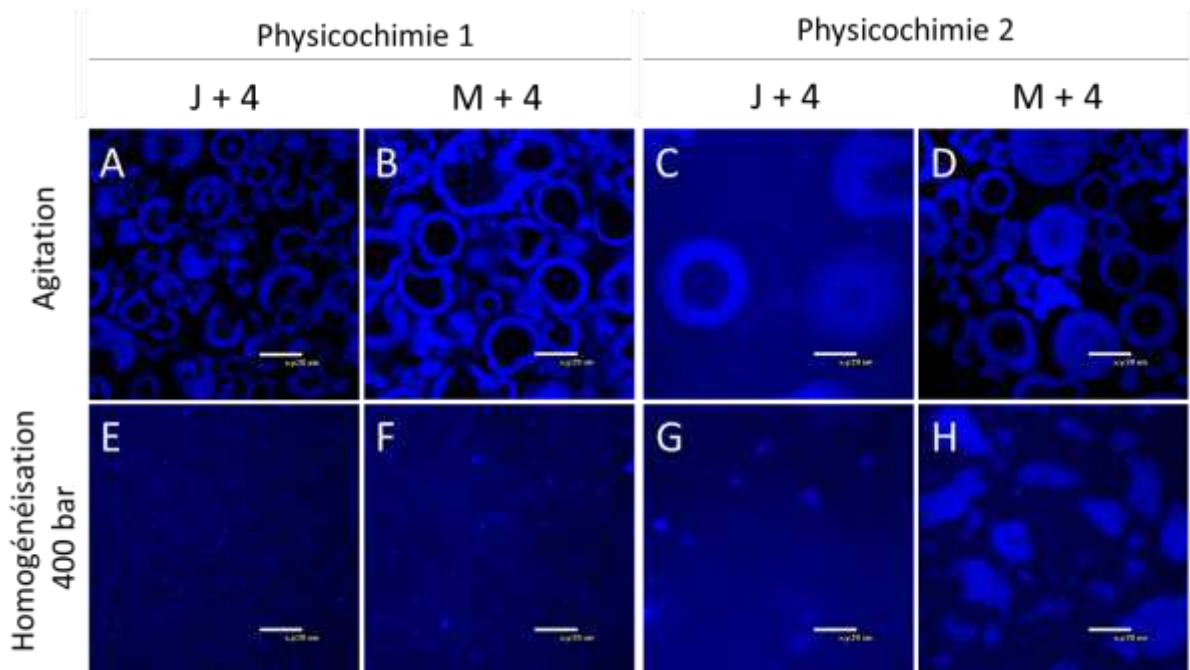


Figure 68 : Observations confocales des agrégats des mélanges 1 et 2 séchés à l'échelle Bionov et redispersés dans différentes conditions (agitation 900tr/min 9h ou homogénéisation 400 bar), quatre jours après production de la poudre (J+4) ou quatre mois après production de la poudre (M+4). Les agrégats du mélange 1 ont été produit avec 50g.L<sup>-1</sup> de protéine, 10mM de NaCl, pH 7, à Re 6900 et RT<sub>h</sub> 7s à 85°C. Les agrégats du mélange 2 ont été produit avec 60g.L<sup>-1</sup> de protéine, 25mM de NaCl, pH 7+ 2OH-/protéine, à Re 6900 et RT<sub>h</sub> 7s à 80°C.

Pour le mélange 1, on observe la persistance de nombreux grains de poudre non ressolubilisés en condition de redispersion par agitation seule, que la poudre soit âgée de 4 jours ou de 4 mois (Figure 67A et B). Pour des taux de cisaillement plus intensifs (agitation et homogénéisation) la ressolubilisation des grains de poudre est plus complète : le fond est bleu et on ne perçoit pas de morceaux de grains, quel que soit l'âge de la poudre (Figure 67 E et F).

Pour le mélange 2, à J+4 la poudre se ressolubilise sous agitation (fond bleu), mais quelques grains de poudres ne sont pas dissouts (Figure 67C). L'étape d'homogénéisation permet alors de casser ces grains en un ensemble de petits fragments (Figure 67G). A M+4, un comportement différent est observé. De nombreux grains de poudre non ressolubilisés persistent après agitation et peu de protéines sont présentes dans le liquide interstitiel (fond noir) (Figure 67D). L'étape d'homogénéisation consécutive permet de redissoudre une partie d'entre eux mais on observe la persistance de gros morceaux non ressolubilisés (Figure 67H).

## 5.2 Discussion

Selon le mode de concentration mis en œuvre, on observe donc un comportement différent des assemblages. Les modes de concentration considérés dans cette étude (concentration par compression osmotique, par filtration tangentielle et séchage par pulvérisation) se distinguent par leur sélectivité, leur cinétique et leur étendue (degré de concentration finalement atteint).

En effet la concentration se fait de manière sélective en compression osmotique (seuil de coupure 6-8kD) et en ultrafiltration (taille des pores 20nm), c'est-à-dire que seuls les agrégats sont concentrés tandis que l'eau et les entités moléculaires présentes dans la phase soluble (ions diffusifs, petites molécules organiques) traversent la membrane. En séchage en revanche, seule l'eau est évaporée et toute la matière sèche est concentrée.

Par ailleurs, ces trois modes de concentration diffèrent par leur cinétique et leur étendue. Ainsi, la cinétique de concentration est lente en compression osmotique (15 jours), se déroule sur quelques heures en ultrafiltration et est quasiment instantanée en séchage par pulvérisation, l'élimination d'eau se faisant dans ce cas en quelques secondes. Par ailleurs, le degré de concentration final est fonction du mode de concentration considéré : en filtration tangentielle on ne peut concentrer le produit au-delà d'une concentration limite (ici  $\sim 0,2 \text{ g.mL}^{-1}$ ; Tableau 22) à partir de laquelle sa viscosité dynamique et les pertes de charge associées à son écoulement sont limitantes. En revanche, il est possible de pousser la concentration au-delà de la gélification du produit (ici compression jusqu'à des concentrations de  $\sim 0,5 \text{ g.mL}^{-1}$ ; Tableau 21) en compression osmotique. Enfin, le séchage par pulvérisation permet de concentrer le produit jusqu'à un extrait sec de  $\sim 0,95 \text{ g.g}^{-1}$ .

Enfin, l'uniformité et le caractère isotrope de la concentration sont à mettre en parallèle avec le degré de concentration. En effet, en compression osmotique, l'échantillon atteint *in fine* l'équilibre thermodynamique, ce qui revient à dire qu'il est concentré à un même degré en tout point et qu'il n'y a pas dans ce cas de distribution de concentration en son sein. Au contraire, la concentration par filtration tangentielle conduit classiquement au phénomène de concentration de polarisation correspondant à une surconcentration à la membrane (Figure 24 ; Chapitre 1). De même, l'échantillon se concentre précocement en surface de la gouttelette lors du séchage par pulvérisation, conduisant la formation d'une peau / croûte en surface de la particule (Figure 27 ; Chapitre 1). Ceci peut expliquer les concentrations limites de gélification plus basses observées en ultrafiltration par rapport à la compression osmotique pour un même échantillon ( $0,269 \text{ g.mL}^{-1}$  en compression osmotique vs  $0,216 \text{ g.mL}^{-1}$  en UF pour le mélange 1 et  $0,205 \text{ g.mL}^{-1}$  en compression osmotique vs  $0,180 \text{ g.mL}^{-1}$  en UF pour le mélange 2). En effet, la concentration de gélification limite mesurée en ultrafiltration est atteinte en premier lieu à la membrane, pour une concentration moyenne du rétentat inférieure. En comparaison, les concentrations limites de gélification obtenues ici en ultrafiltration sont inférieures aux

concentrations limites atteintes en industrie : effectivement, un WPI est habituellement concentré à  $0,3 \text{ g.mL}^{-1}$  avant séchage.

### 5.2.1 Mélanges 1 et 2 : des comportements différents en fonction du degré de concentration, liés à une différence de conformation des agrégats.

On observe une différence de comportements en compression osmotique entre les agrégats des deux mélanges avec des allures différentes sur le diagramme d'état (Figure 68).

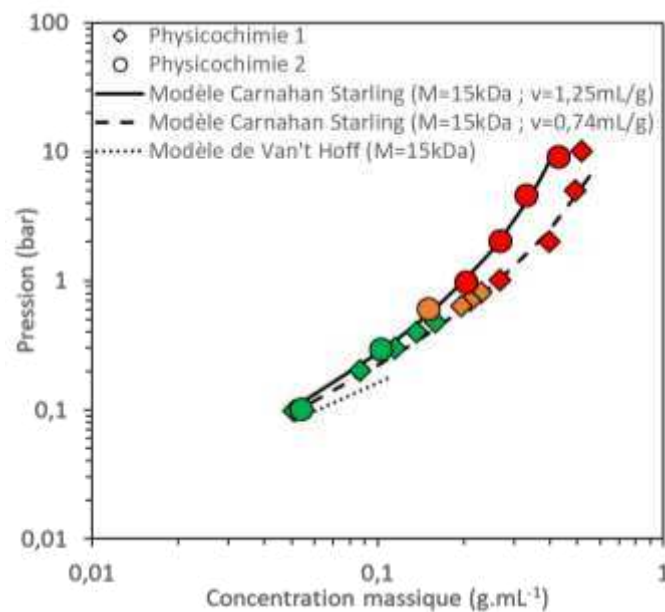


Figure 69 : Diagramme d'état obtenu en compression osmotique pour les agrégats du mélange 1 (◇) et du mélange 2 (○). En vert, échantillons liquide, en orange, échantillon visqueux et en rouge, échantillon gélifié. Les modèles physiques de Van't Hoff et Carnahan Starling sont représentés.

En régime dilué (concentration massique  $< 0,1 \text{ g.mL}^{-1}$ ), le comportement est gouverné par le nombre des objets tandis qu'en régime concentré, c'est le volume occupé par l'objet qui prédomine. De plus, en régime dilué ce sont les petits objets qui imposent le niveau global de pression. En effet, lorsque l'on fait varier la masse molaire des objets dans le modèle de Van't Hoff (Figure 69A), on se rend compte qu'on décale la courbe d'état modèle vers de plus basses pressions à masse molaire croissante. En revanche, dans un mélange d'objets de tailles différentes (par exemple un mélange de 95% d'objets à 100 kDa et 5% d'objets à 1 kDa), la courbe modèle est majoritairement influencée par la présence des petits objets même en faible nombre et se rapproche plus d'une courbe modèle à 15 kDa que de celle des objets à 100 kDa.

En comparant les deux mélanges (Figure 68), on observe que les solutions d'agrégats ont le même comportement en régime dilué, c'est-à-dire qu'un même nombre d'objets occupe une unité de volume. Cependant, il faut comprendre ici que ce sont les protéines non agrégées (pic 1 ; Figure 44 ; Chapitre 4) plutôt que les agrégats qui sont en nombre équivalent, car on sait que ce sont les petits objets qui imposent la pression osmotique totale. Les petits objets, dans notre cas les protéines non agrégées, sont donc en quantité similaire dans chaque mélange d'agrégats, ce qui est confirmé par les observations A4F.

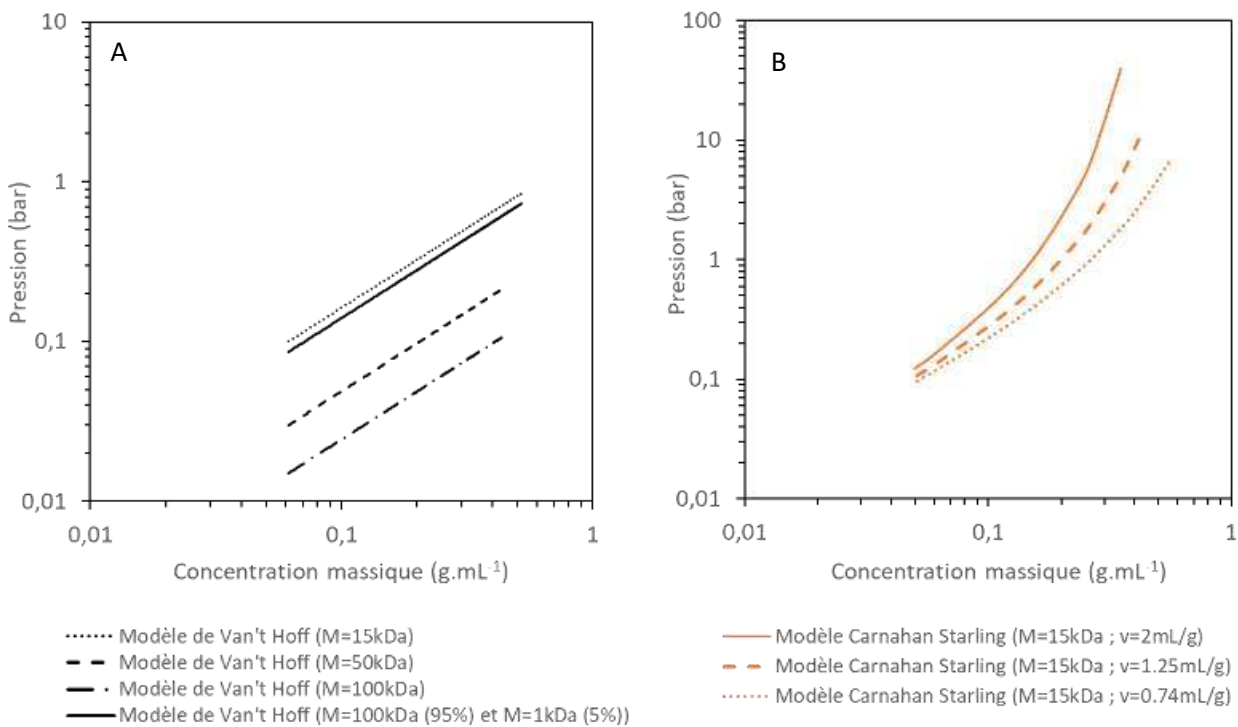


Figure 70 : Evolution des modèle de Van't Hoff (A) et de Carnahan Starling (B) en fonction de la masse molaire des objets présents (M) et de leur volume spécifique (v)

En régime concentré, les courbes des deux mélanges ont des allures différentes. Pour atteindre une même concentration, il faut appliquer une pression plus importante pour les agrégats du mélange 2 que pour les agrégats du mélange 1. Ceci traduit le fait que les agrégats du mélange 2 sont soit plus volumineux et occupent plus d'espace (facteur stérique), soit se repoussent davantage (répulsions électrostatiques) : il est ainsi plus difficile de les rapprocher physiquement et il faut donc apporter une énergie volumique supérieure pour les concentrer. La rigidité des agrégats ainsi que leur compressibilité plus ou moins grande peut également jouer sur ces paramètres.

Pour déterminer quel facteur, du volume ou de la charge, conduit aux différences de comportement observées pour les deux mélanges en compression osmotique, nous avons fait varier le volume

spécifique des objets dans le modèle de Carnahan Starling (Figure 69B). L'augmentation du volume spécifique des objets dans ce modèle induit une variation de la courbure du modèle. Ainsi, en appliquant le modèle aux points expérimentaux, une différence de volume spécifique d'un facteur 1,7 apparaît ( $v = 0,74 \text{ mL.g}^{-1}$  pour les agrégats du mélange 1 et  $v = 1,25 \text{ mL.g}^{-1}$  pour les agrégats du mélange 2). Les agrégats du mélange 2 occupent donc plus d'espace que les agrégats du mélange 1. Nous avons déjà observé des différences de masse volumique entre les agrégats des deux mélanges, élués dans le 3<sup>ème</sup> pic d'A4F (Figure 44 ; Tableau 13 ; Chapitre 4) avec une variation de masse volumique apparente d'un facteur 5,16 ( $\rho_{\text{app}} = 0,98.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$  pour le mélange 1 et  $\rho_{\text{app}} = 0,19.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$  pour le mélange 2). La variation de masse volumique apparente est plus importante que la variation de volume spécifique car cette dernière a été mesurée non pas sur l'ensemble des objets, mais bien uniquement sur les agrégats du 3<sup>ème</sup> pic.

En ce qui concerne la variation de charge des agrégats des deux mélanges, nous savons que les agrégats fractals du mélange 2 sont stabilisés par de fortes répulsions électrostatiques qui leur confèrent une structure ouverte et ramifiée contrairement aux agrégats du mélange 1 (Rg/Rh, Tableau 13). Cependant, il a été montré que des différences d'interactions électrostatiques produisaient également des écarts de pression dès le régime dilué (Pasquier et al., 2016), ce qui n'est pas notre cas. La différence majeure qui explique les différences d'allures observées sur le diagramme d'état des deux mélanges est donc bien le volume occupé.

On observe également une différence de concentration de gélification d'un mélange à l'autre en compression osmotique et en filtration tangentielle : le mélange 2 devient visqueux et gélifie à des concentrations inférieures à celle du mélange 1 (Tableau 21 ; Tableau 22). Ceci est à rapprocher de la différence de volume occupé par les agrégats. On vient de voir que les agrégats du mélange 2 occupaient une fraction volumique plus élevée pour une concentration donnée de par leur structure branchée. La diminution du volume disponible lors de la concentration induirait ainsi une mise en contact des agrégats du mélange 2 à des concentrations plus basses, et leur gélification dès ces concentrations inférieures. Nzé et al. (2015) ont déjà montré que l'augmentation de la viscosité au cours de la concentration était exponentielle pour les polymères souples agrégés en forme d'étoile tels que les agrégats fractals. Le mélange 1 est composée en partie d'agrégats microgels denses qui ne s'interpénètrent pas, ce qui a pour conséquence une augmentation plus limitée de la viscosité avec la concentration. Ceci sera confirmé par l'étude des propriétés fonctionnelles (Chapitre 6).

### 5.2.2 Mélanges 1 et 2 : des comportements différents en fonction de la cinétique de concentration et temps passé à l'état concentré, liés à une différence de réactivité des agrégats.

Les agrégats du mélange 1 et les agrégats du mélange 2 ne sont pas sensibles de la même manière à la cinétique de concentration. Ceci s'explique par le fait que les agrégats du mélange 1 sont plus inertes du fait de leur structure sphérique et repliée, en comparaison aux agrégats du mélange 2 qui ont une structure ouverte réactive, et sont interpénétrables et flexibles. On peut arriver à de telles conclusions en se plaçant aux différentes échelles de concentration (techniques de concentration différentes, cinétiques et degrés de concentration finale différents).

En compression osmotique, des interactions irréversibles peuvent s'établir au cours de la lente concentration des assemblages, quelle que soit le mélange considéré. Effectivement, les échantillons des mélanges 1 et 2 décomprimés ne regagnent pas leur concentration initiale mais reviennent à un niveau plus concentré (Figure 60), une partie restant même à l'état gélifié. Au sein des échantillons, les interactions se forment uniquement entre agrégats qui se sur-agrègent et évoluent ainsi, pour des fractals, vers des structures plus branchées ; les protéines non agrégées et caséines ne sont pas impliquées dans ces liaisons irréversibles (Phase liquide ; Figure 61). Inthavong et al. (2016) ont déjà remarqué la présence d'interactions électrostatiques entre agrégats fractals entraînant une diminution de la compressibilité osmotique aux fortes concentrations.

De telles interactions irréversibles n'auraient pas le temps de s'établir en concentration rapide par ultrafiltration avec le mélange 1 : en effet après dilution du concentré, les profils A4F restent inchangés et la forme des agrégats est préservée (Figure 62). Au-delà des aspects cinétiques, la présence de microgels peu réactifs dans le mélange 1 limite probablement les interactions entre agrégats fractals qui ont besoin d'être en contact plus longtemps et à courte distance pour établir entre eux des interactions irréversibles. En effet, les microgels présents dans le mélange 1 ont une structure dense, fermée et une charge globale limitée due à l'internalisation du calcium et des protons les rendant peu réactifs.

En revanche, des interactions ont probablement lieu lors de la filtration tangentielle de solutions du mélange 2, comme le montre la gélification du concentré redispersé avant même l'analyse A4F. Ceci peut s'expliquer par le nombre et la forte réactivité des agrégats formés dans ces conditions, due à leur structure très ouverte qui s'accompagne probablement d'une accessibilité à certains groupes hydrophobes.

En concentration rapide (séchage par pulvérisation), il est important de distinguer deux échelles : celle de l'agrégat, observée en A4F, et celle du grain de poudre observé en microscopie confocale et granulométrie. Après séchage et redispersion, on n'observe pas de sur-agrégation des assemblages du mélange 1 (Figure 63), contrairement à le mélange 2 (Figure 64) où les agrégats évoluent vers des structures plus branchées. Ces observations confortent celles déjà faites en filtration tangentielle et sont à rapprocher de la structure ouverte et réactive des agrégats du mélange 2 en comparaison de ceux du mélange 1, qui sont en partie denses, sphériques et peu réactifs.

A l'échelle du grain de poudre (Figure 67), une simple agitation à J+4 permet de redisperser les agrégats du mélange 2 ; une opération d'homogénéisation complémentaire est en revanche nécessaire pour redisperser les agrégats du mélange 1. Ceci peut être dû à la différence de conformation et de taille des agrégats : en effet, Gaiani et al. (2007) et Sadek et al. (2016) ont déjà montré que le type de protéine (Caséine micellaire ou WP) et la taille des particules influençaient fortement le phénomène de réhydratation. On peut également attribuer la meilleure aptitude à la réhydratation des poudres du mélange 2 à la charge importante des agrégats qu'elles contiennent. En effet, Hong et al (2014) ont montré dans le cadre de redispersion de poudre de Styrene-butadiene, que de fortes répulsions électrostatiques favorisaient la redispersion du grain de poudre.

Après un temps long (4 mois) à l'état concentré ( $0,95 \text{ g.g}^{-1}$ ), le comportement des grains de poudre à la réhydratation n'évolue pas pour les agrégats du mélange 1 (Figure 67 A, B, E, F). Ce résultat n'était pas attendu car nous avons observé précédemment la formation de liaisons irréversibles entre ces mêmes agrégats lors d'une concentration de 15 jours en compression osmotique jusqu'à  $0,5 \text{ g.mL}^{-1}$ . On peut faire l'hypothèse que des liaisons irréversibles ne sont formées qu'à des cinétiques de concentration lentes, ou bien que des liaisons irréversibles se forment à l'état concentré quelle que soit la cinétique de concentration mais qu'elles ne sont peut-être pas suffisantes (nombre, type, etc.) pour affecter la capacité des grains de poudres à être réhydratés.

Pour le mélange 2 en revanche, les grains de poudres ne se redispersent plus sous simple agitation après 4 mois à l'état concentré ( $0,95 \text{ g.g}^{-1}$  ; Figure 67 D). De même, l'homogénéisation a peu d'effet sur la redispersion des grains, la matière restant présente sous forme de gros morceaux (Figure 67 H). Cet effet de la durée de stockage est probablement aggravé par la taille des grains de poudre observée en granulométrie (Tableau 23), plus élevée pour le mélange 2. L'accroissement du diamètre des poudres, s'il favorise l'étape de mouillage, est en effet défavorable à la dispersion finale de la matière, comme cela a été montré pour des poudres de caséines micellaires (Schuck et al., 2007).

On peut donc penser que de fortes et plus nombreuses interactions se forment à l'état sec concentré et dans le temps entre les agrégats du mélange 2, conduisant à des structures de plus grande taille et

induisant un changement de la capacité de réhydratation du grain de poudre, conformément aux travaux de Gaiani et al. (2007) et Sadek et al. (2016). La formation de ces interactions dans le cas du mélange 2 s'expliquerait par les conditions de pH alcalin (pH 8,3) lors de leur production, de leur séchage et de leur stockage. Effectivement, des phénomènes de réticulation similaires, conduisant à la formation d'agrégats microniques de forme identique, ont été observés à l'échelle du grain de poudre par Famelart et al. (2018) et Schong et Famelart (2018) lors de l'étuvage de poudre de PS à pH alcalin (pH 9,5 uniquement ; pas de réticulation à pH 3,5 ou 6,5). Les auteurs ont également montré qu'une telle réticulation des PS dans la poudre la rendait partiellement insoluble. De même, Liu et al. (1991) rapportent une augmentation de la formation d'agrégats et une diminution de la solubilité lors de l'étuvage de poudre de BSA en augmentant le pH de 5 à 9. Des conditions de pH non alcalin imposées avant séchage pourraient être testées à l'avenir afin d'éviter ces phénomènes de réticulation de ces agrégats à l'état poudre et au stockage, cependant il faut garder à l'esprit que ce sont les répulsions électrostatiques qui participent à la stabilité des agrégats.

**Pour conclure, on peut dire que le couple [degré de concentration ; temps passé à l'état concentré] révèle le niveau de réactivité des agrégats. Pour le mélange 1, les agrégats sont pour partie des microgels inertes et peu réactifs, par conséquent moins sensibles au degré de concentration comme le montre l'absence de sur-agrégation en filtration tangentielle ou séchage. Les agrégats du mélange 1 sont cependant sensibles à la cinétique de concentration et une sur-agrégation est observée dans le temps par compression osmotique à l'équilibre thermodynamique. Les capacités de réhydratation et redispersion ne sont pas affectées par le temps passé à l'état concentré.**

**Pour le mélange 2, les agrégats très réactifs sont sensibles au degré de concentration (stables à 60 g.L<sup>-1</sup> et instables à 240 g.L<sup>-1</sup>) quelle que soit la cinétique de concentration (lente - compression osmotique- ou rapide - filtration tangentielle-). Une sur-agrégation significative est observée au séchage qui semble se poursuivre à l'état concentré par de la réticulation favorisée par le pH alcalin impactant la capacité du grain de poudre à se réhydrater. Afin de comprendre si les différences observées entre les mélanges 1 et 2 sont dues uniquement à un effet concentration en agrégats réactifs, ou si les microgels y apportent également une contribution, il conviendrait d'étudier le comportement des agrégats du mélange 1 en prenant uniquement en compte la concentration en agrégats fractals réactifs plutôt que la concentration en protéines totales.**



## CHAPITRE 6 : PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES MÉLANGES D'AGRÉGATS PRODUITS EN CONTINU, CONCENTRÉS, SÉCHÉS ET REDISPERSÉS

---

*Dans ce chapitre, nous étudierons trois propriétés fonctionnelles des deux mélanges d'agrégats (fractals purs vs fractals et microgels) produits à l'échelle pilote en continu, séchés et redispersés, en comparaison aux propriétés des agrégats produits au laboratoire. Dans un premier temps nous regarderons la capacité des agrégats à former des gels, puis nous mesurerons leur capacité à augmenter la viscosité et enfin nous nous intéresserons à leur capacité à texturer des émulsions.*

*Les résultats montreront que les agrégats purement fractals produits sur des essais de faibles volumes traités ont des propriétés proches de celles des agrégats fractals de laboratoire, tandis que le mélange d'agrégats fractals et microgels a des propriétés intermédiaires entre celles des microgels et celles des fractals purs.*

*Nous verrons cependant que les agrégats purement fractals sont sensibles à la durée de production et qu'ils se sur-agrègent lorsque le volume traité est plus important au cours des essais, impactant négativement les propriétés de gélification et d'augmentation de viscosité.*

*Principaux objectifs de travail abordés dans ce chapitre :*

- *Etudier la fonctionnalité des deux mélanges d'agrégats (mélange 1 ou mélange 2) en terme de propriétés de gélification, d'augmentation de viscosité, et de texturation d'émulsions.*
- *Comparer la fonctionnalité des deux mélanges entre eux mais également par rapport aux agrégats produits au laboratoire.*

## TABLE DES MATIÈRES

---

<b>CHAPITRE 6 : PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES MÉLANGES D'AGRÉGATS PRODUITS EN CONTINU, CONCENTRÉS, SÉCHÉS ET REDISPERSÉS .....</b>	<b>119</b>
6.1 Propriétés de gélification induite par l'acidité .....	121
6.1.1 Fonctionnalités différentes en fonction du mélange utilisée .....	122
6.1.2 Fonctionnalités différentes des agrégats du mélange 2 en fonction de la durée d'essai.....	124
6.2 Propriétés viscosifiantes des agrégats des mélanges 1 et 2 .....	127
6.2.1 Fonctionnalités différentes des agrégats du mélange 2 en fonction de la durée d'essai.....	127
6.2.2 Fonctionnalités différentes en fonction du mélange utilisée .....	128
6.3 Propriété de texturation d'émulsion .....	130

Pour étudier leur fonctionnalité, des agrégats des deux mélanges ont été produits ici soit sur des essais impliquant un faible volume (100L de solution de PS traitée) suivi d'un séchage Minor (Minor), soit sur des essais impliquant un grand volume (400L de solution de PS traitée) suivi d'un séchage Bionov (Bionov).

Les caractéristiques de taille ( $R_{g,moy}$  et  $R_{h,moy}$ ) de ces agrégats sont présentées dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Caractéristiques des agrégats des deux mélanges produits en continu et séchés, utilisés dans l'étude de la fonctionnalité

	Mélange 1		Mélange 2	
	$R_{g,moy}$ (nm)	$R_{h,moy}$ (nm)	$R_{g,moy}$ (nm)	$R_{h,moy}$ (nm)
Essai faible volume traité et séchage Minor	285,1 ( $\pm 1,4$ )	88,7 ( $\pm 0,1$ )	132,3 ( $\pm 1,8$ )	49,6 ( $\pm 0,1$ )
Essai grand volume traité et séchage Bionov	245,1 ( $\pm 5,9$ )	84,3 ( $\pm 0,1$ )	249,7 ( $\pm 1,4$ )	53,6 ( $\pm 0,1$ )

### 6.1 Propriétés de gélification induite par l'acidité

La capacité de gélifier à froid est une propriété importante pour certaines applications alimentaires (produit frais, préservation des vitamines qui pourraient être dénaturées à chaud, etc.).

Pour induire un gel à partir des agrégats séchés redispersés, on se place dans des conditions de  $\alpha \approx 4,6$  ;  $pH = 6,0$  et  $C = 60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  par ajout d'une certaine quantité de protons sous forme d'HCl, détaillée dans le chapitre 3. Dans ces conditions de charge réduite, on se place dans la zone du diagramme d'état établi par Kharlamova et al. (2018) où les répulsions électrostatiques entre agrégats sont réduites

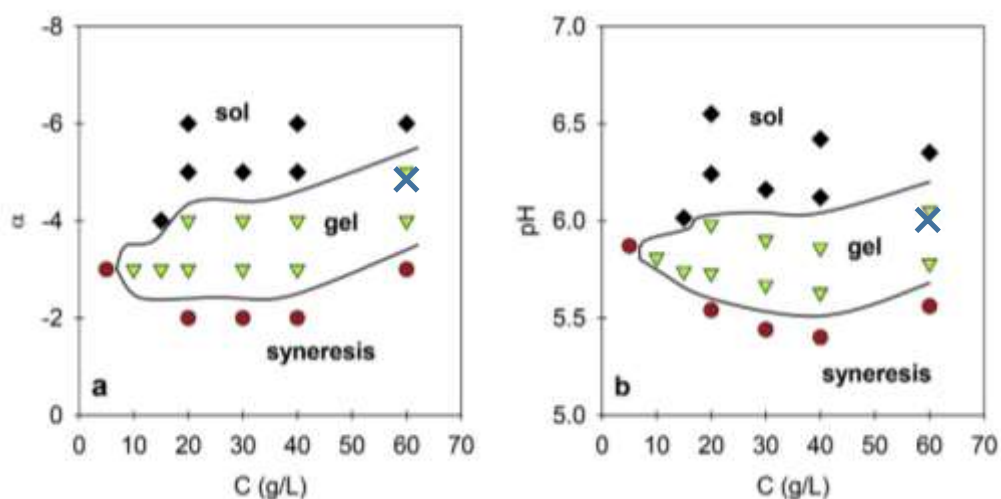
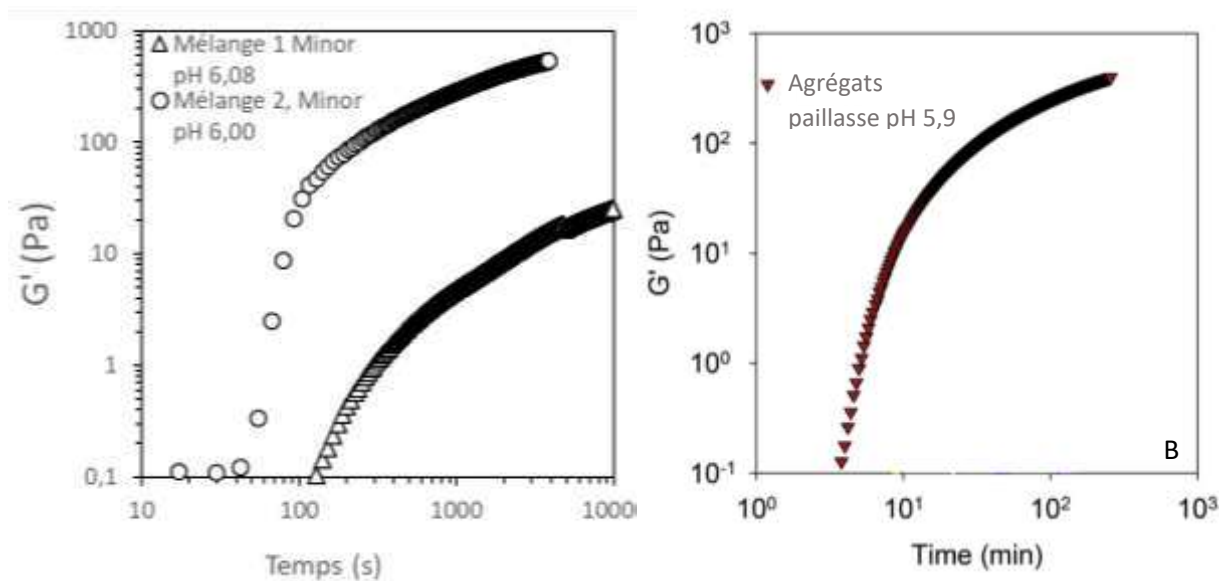


Figure 71 : Diagramme d'état d'une solution d'agrégats ( $R_h = 77\text{nm}$ ) chauffée à  $80^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes représentant la densité de charge ou le  $pH$  en fonction de la concentration en protéines. Les losanges noirs indiquent la zone dans laquelle le système reste liquide ; les triangles verts, la zone dans laquelle le système gélifie ; les ronds rouges, la zone dans laquelle le système synérèse. (Kharlamova et al. 2018) La croix bleue indique les conditions dans lesquelles on se place dans cette expérience.

permettant la formation d'un réseau stabilisé par des interactions et ainsi d'un gel d'agrégat (croix bleue ; Figure 70). Une fois le gel formé, on compare la capacité des agrégats à gélifier à froid en mesurant la rigidité du gel formé par analyse rhéologique.

### 6.1.1 Fonctionnalités différentes en fonction du mélange utilisé

Les profils rhéologiques des gels réalisés à partir des deux mélanges produits lors d'essai impliquant un petit volume traité et séché sur le pilote Minor sont comparés sur la Figure 71A. Sur ce graphe, le module conservatif ( $G'$ ) des gels formés à partir des agrégats est représenté en configuration log-log en fonction du temps. Parallèlement, le profil rhéologique des gels produits à partir d'agrégats fractals de  $R_h = 35$  nm formés à l'échelle laboratoire par Kharlamova et al. (2018) est présenté sur la Figure 71B. On sait que la taille des agrégats n'a pas d'impact sur la force du gel formé et n'en a que très peu sur la vitesse de gélification (Kharlamova et al., 2018a). Les conditions de formation de ces gels à partir d'agrégats produits au laboratoire sont similaires à celles utilisées pour les agrégats pilote à savoir, une concentration en agrégats de  $60 \text{ g.L}^{-1}$ , une densité de charge  $\alpha = 4,5$  avec un pH correspondant de 5,9, une température de chauffage de  $65^\circ\text{C}$ .



Le module conservatif du gel produit à partir des agrégats du mélange 1 augmente fortement à partir de 140 s jusqu'à atteindre un niveau  $G' = 24 \text{ Pa}$  après 10 000s. Pour les gels produits à partir des agrégats du mélange 2, le module élastique augmente fortement à partir de 30 s jusqu'à atteindre un niveau  $G' = 537 \text{ Pa}$  après 3 500s. Le module élastique des gels formés à partir d'agrégats fractals produits au laboratoire augmente fortement à partir de temps similaires aux gels produits avec les agrégats pilote du mélange 2 et atteint également un  $G'$  final similaire. On peut donc penser que les agrégats

du mélange 2 produits au pilote Minor, séchés et redispersés, ont les mêmes propriétés gélifiantes que les agrégats paillasse. Il conviendrait cependant d'étudier plus en détail la structure des gels par microscopie.

Les agrégats du mélange 2 gélifient plus de quatre fois plus rapidement que les agrégats du mélange 1 et atteignent un  $G'$  final d'un ordre de grandeur 3 fois plus élevé. Ce résultat était attendu (Figure 17 ; Chapitre 1) étant donné que les microgels présents dans le mélange 1, de densité plus élevée que les agrégats fractals de même taille, peuvent occuper moins d'espace. Ceci a déjà été observé par Donato et al. (2011) qui ont travaillé à différents ratios de solutions d'agrégats fractals et microgels produites séparément en paillasse puis reconstituées. Les auteurs observent une diminution de la rigidité du gel en présence de microgels y compris à des ratios de 80% d'agrégats fractals et 20% de microgels. Ce résultat est donc confirmé ici dans le cas d'un mélange fractal et microgel produit directement (sans reconstitution) au pilote Minor, séchés et redispersés.

L'évolution de la tangente delta  $\tan(\delta)$  en fonction du temps (Figure 72) permet de suivre l'évolution du niveau de structuration des mélanges .

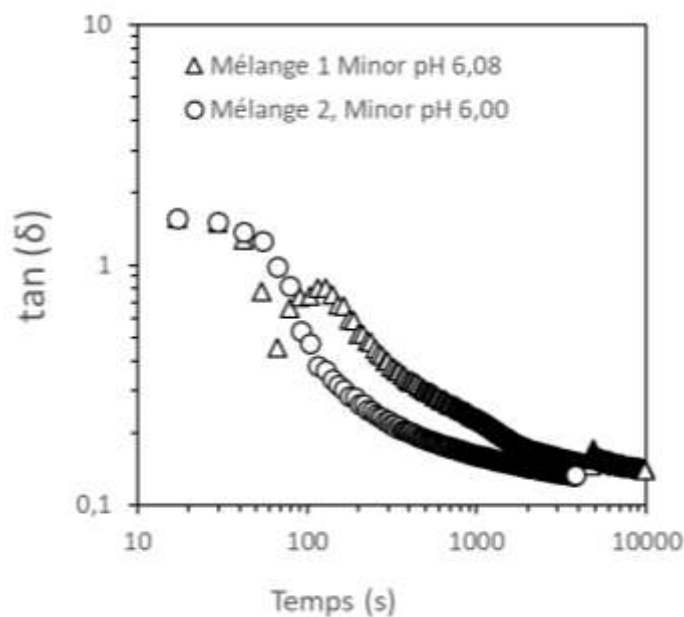


Figure 73 : Evolution de  $\tan(\delta)$  en fonction du temps des gels formés à 65°C par acidification d'une suspension d'agrégats à  $C = 60\text{g.L}^{-1}$  ;  $\alpha \approx 4,5$  et  $\text{pH} \approx 6,0$ , en fonction du temps. Les agrégats des mélanges 1 et 2 sont formés au pilote, séchés sur la tour Minor et redispersés

$\tan(\delta)$  est défini par le ratio du module dissipatif  $G''$  sur le module conservatif  $G'$ , c'est-à-dire le ratio des composantes visqueuses sur les composantes élastiques. On observe sur la Figure 72 une évolution de  $\tan(\delta)$  vers des valeurs inférieures à 1 traduisant l'augmentation du nombre de connexions aux dépens du nombre d'objets mobiles permettant la dissipation de l'énergie, c'est-à-dire, la formation d'un système de plus en plus structuré. Il est important de noter que la valeur 1 de  $\tan(\delta)$  ne définit

pas la valeur de transition sol-gel qui dépend de la fréquence, mais bien la limite de prédominance des composantes visqueuses ou élastiques. Un remarquable décalage dans le temps de la diminution de  $\tan(\delta)$  est cependant à noter pour les gels formés à partir du mélange 2, suggérant que les interactions se mettent en place plus lentement que pour les gels formés à partir des agrégats du mélange 1. Enfin, les valeurs finales de  $\tan(\delta)$  sont proches, quel que soit le mélange utilisé pour former les gels, ce qui indique que les interactions ont des niveaux de structuration similaires. Les interactions sont sans doute plus nombreuses dans le cas du gel formé à partir des agrégats du mélange 2 expliquant la différence de fermeté de gel. Pour confirmer ces hypothèses, il faudrait comparer le temps de relaxation des objets.

### 6.1.2 Fonctionnalités différentes des agrégats du mélange 2 en fonction du volume traité lors de l'essai

Le module de stockage ( $G'$ ) des gels formés à partir des agrégats séchés redispersés est représenté en configuration log-log en fonction du temps en Figure 73. Les gels formés à partir des agrégats des mélanges 1 et 2 sont respectivement représentés sur les Figure 73A et Figure 73B.

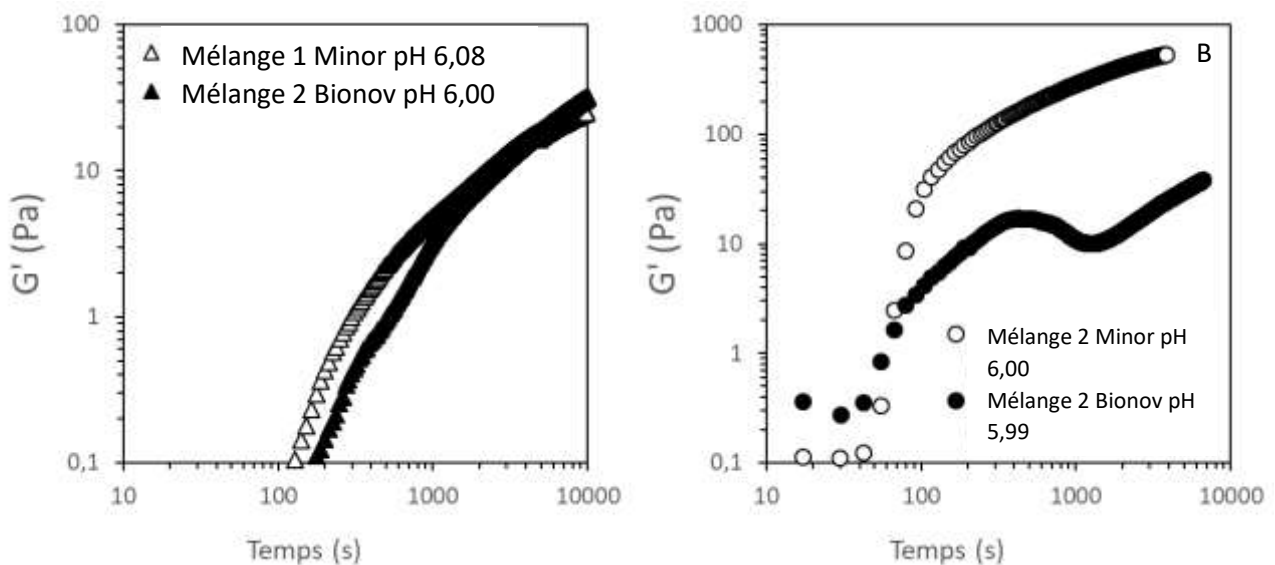


Figure 74 : Module élastique des gels formés à 65°C par acidification d'une suspension d'agrégats à  $C=60\text{g.L}^{-1}$  ;  $\alpha \approx 4,5$  et  $\text{pH} \approx 6,0$ , en fonction du temps. Les agrégats des mélanges 1 et 2 produits au pilote, séchés soit sur la tour Minor soit sur la tour Bionov sont respectivement représentés en (A) et (B).

Les agrégats du mélange 1 provenant d'essais Minor ou Bionov (Figure 73A) ont une vitesse de gélification d'un même ordre de grandeur ( $G'$  équivalent à un temps donné) et forment des gels de modèle conservatif proche ( $G' = 24,45$  Pa et  $G' = 27,78$  Pa respectivement). Les gels produits à partir des agrégats du mélange 2 provenant d'essais Minor ou Bionov (Figure 73B) ont des comportements

différents. Le module élastique du gel produit à partir des agrégats Minor augmente fortement et continuellement jusqu'à atteindre une force finale  $G' = 537,03$  Pa. En revanche, pour les gels produits à partir des agrégats Bionov, la forte augmentation initiale du module élastique est suivie d'une diminution caractéristique d'une synérèse.

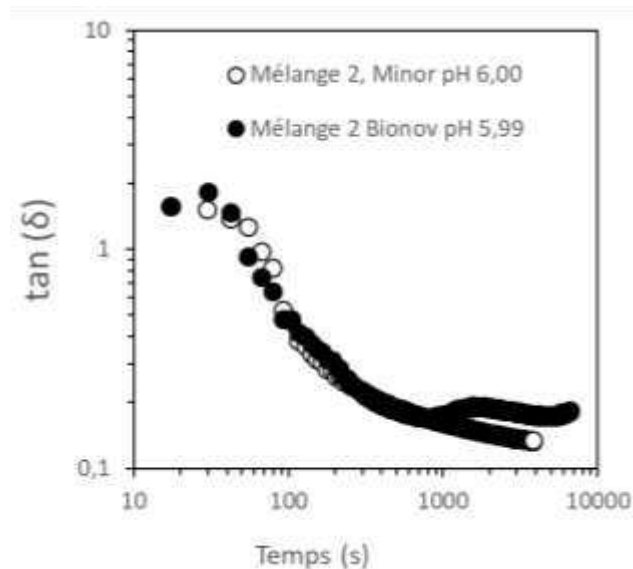


Figure 75 : Evolution de  $\tan(\delta)$  en fonction du temps des gels formés à 65°C par acidification d'une suspension d'agrégats à  $C = 60\text{g.L}^{-1}$  ;  $\alpha \approx 4,5$  et  $\text{pH} \approx 6,0$ , en fonction du temps. Les agrégats du mélange 2 sont séchés sur la tour Minor ou la tour Bionov puis redispersés

Si on s'intéresse à l'évolution de  $\tan(\delta)$  en fonction du temps (Figure 74), on observe que les valeurs de  $\tan(\delta)$  sont inférieures à 1 traduisant des propriétés à dominantes élastiques. Cependant dans le cas des essais sur la tour de séchage Bionov, une augmentation de  $\tan(\delta)$  à partir de 1000s traduit bien un système un peu moins structuré.

Pour expliquer l'apparition de synérèse (fragilisation du gel avec apparition de poches de sérum) lors des essais Bionov, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'augmentation du volume traité au cours des essais sur la taille des agrégats.

Quand on augmente le volume traité (essai faible volume traité : 100L ; essai grand volume traité : 400L), tout en appliquant un même temps de traitement thermique de 15 min, on n'observe pas de variation de taille des agrégats pour les agrégats du mélange 1. Quand on augmente le volume traité pour les agrégats du mélange 2, on observe une sur-agrégation des agrégats avec une augmentation du  $R_g$  (Figure 75). On peut expliquer cette augmentation du  $R_g$  par le fait qu'en augmentant le volume traité, on collecte une fraction à temps de séjour plus élevé qu'on ne collectait pas lors des essais de faible volume traité (Figure 76). Quels que soient les essais, la distribution du temps de séjour est identique, mais la durée de collecte et ainsi le risque de détachement d'agrégats en provenance des parois du tube encrassé augmente avec le volume traité au cours de l'essai. En effet quand on applique

un traitement thermique de 15 min, le temps de séjour se répartit selon une gaussienne centrée sur 15 min, mais une fraction d'agrégats subit un temps de séjour plus long. Cette augmentation du temps de traitement semble avoir une influence sur la formation des agrégats du mélange 2 qui n'auraient pas atteints leur état de stabilité. Ceci rejoint les travaux de Inthavong et al. (2016) ; Kharlamova et al. (2016) ; Mehalebi et al. (2008) et Phan-Xuan et al. (2011) qui utilisent des temps de traitement thermiques supérieurs à 10h pour atteindre un état stable.

L'augmentation de taille des agrégats du mélange 2 liée à l'augmentation du volume traité (et donc de la durée de collecte) peut ainsi expliquer l'apparition de synérèse dans le cas des gels formés à partir des agrégats du mélange 2 Bionov (Figure 73B). Kharlamova et al. (2018) ont effectivement montré que les gels formés à partir des agrégats de très grande taille ( $R_h > 500\text{nm}$ ) étaient davantage sujets à la synérèse et rendaient de l'eau à des concentrations en agrégats plus faibles.

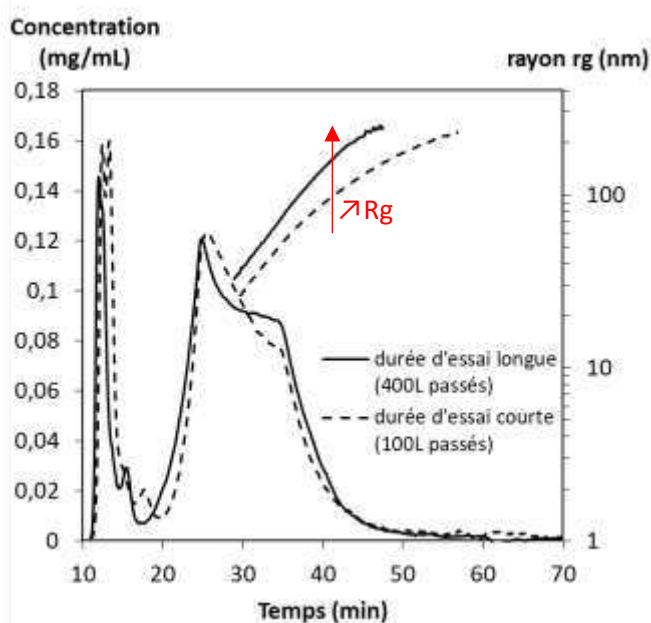


Figure 77 : Factogrammes des agrégats du mélange 2 produits à des volumes traités faibles ou grands en voie liquide.

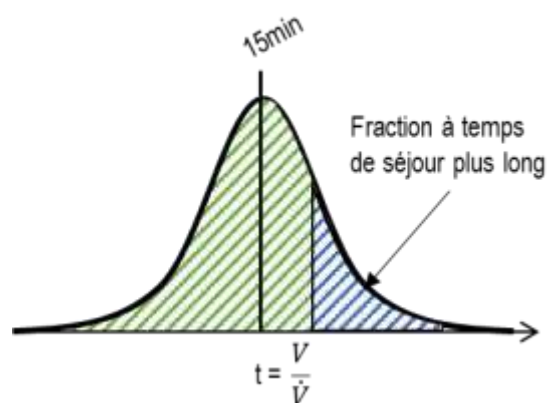


Figure 76 : Représentation schématique de l'impact de l'augmentation du volume traité sur la collecte d'une fraction à temps de séjour plus long. En vert, ce qui est collecté pour les essais de faible volume traité ; en bleu ce qui est collecté après des essais de grand volume traité.

Ainsi, les agrégats du mélange 2 formés dans les conditions de 6% en protéine, 25mM en NaCl et produits sur de grands volumes traités subissent une sur-agrégation lors de leur production (Figure 75) mais également lors du séchage (Figure 64 ; Chapitre 5) qui a pour impact une fragilisation du gel attribuée à la formation de poche de sérum appelée synérèse. Pour confirmer ces hypothèses, il conviendrait bien évidemment de compléter l'étude des gels formés par une observation microscopique pour en voir l'hétérogénéité. Il conviendrait de se placer à des concentrations en protéines et sel inférieures pour former des agrégats de plus petite taille et d'augmenter la durée de traitement thermique lors de leur formation pour atteindre un état de stabilité et ainsi éviter les phénomènes de sur-agrégation observés.



Pour conclure sur la fonctionnalité gélifiante, on peut dire que la présence d'une fraction de microgels dans les agrégats du mélange 1 a pour conséquence, du fait de leur densité élevée, une diminution de leur capacité à former un réseau remplissant tout l'espace et ainsi une diminution de la force du gel induit par l'acidité. Ceci avait été montré à l'échelle paillasse, et est maintenant confirmé pour les agrégats produits à l'échelle pilote, séchés et redispersés.

Contrairement aux agrégats du mélange 1, une sur-agrégation des agrégats fractals du mélange 2 est observée lors de l'augmentation du volume traité et lors du séchage qui a pour conséquence l'apparition de synérèse non désirable.

Il convient de poursuivre les investigations afin de savoir dans quelle mesure la différence de propriété rhéologique des gels pour les deux types de mélanges a un impact réel en bouche avec des matrices alimentaires plus complexes.

## 6.2 Propriétés viscosifiantes des agrégats des mélanges 1 et 2

---

En complément des propriétés gélifiantes des agrégats, nous avons comparé la capacité des différents mélanges d'agrégats à occuper l'espace et ainsi à induire une augmentation de la viscosité des solutions. Comme précédemment, les agrégats de PS sont issus soit d'essais à faible volume traité (100L de solution de PS traités) suivi d'un séchage Minor (Minor), soit d'essais à grand volume traité (400L de solution de PS traités) suivi d'un séchage Bionov (Bionov). Les agrégats du mélange 1 qui ne présentent pas d'évolution de taille avec l'augmentation du volume traité et le scale-up du séchage n'ont été étudiés ici qu'à l'échelle Minor.

La viscosité dynamique apparente mesurée à 20°C sur les suspensions d'agrégats de différents types concentrés à 70 g.L<sup>-1</sup> est présentée sur la Figure 77A en fonction de la vitesse de cisaillement.

### 6.2.1 Fonctionnalités différentes des agrégats du mélange 2 en fonction du volume de solution traitée

Quand on compare la viscosité dynamique apparente des suspensions d'agrégats du mélange 2 produits aux échelles Minor (durée d'essai courte) ou Bionov (durée d'essai longue), on observe que les agrégats du mélange 2 induisent une viscosité plus faible d'un ordre de grandeur de 4 aux faibles cisaillements dans le cas des essais longue durée par rapport aux essais courte durée. (Figure 7577). Les agrégats du mélange 2 produits à Bionov induisent une viscosité similaire à celle des agrégats du mélange 1.

Le comportement rhéologique des agrégats fractals du mélange 2 est difficile à expliquer. Effectivement, Inthavong et al. (2016) ont montré que les agrégats fractals de grande taille pouvaient

plus facilement remplir l'espace et ainsi davantage augmenter la viscosité que les agrégats fractals de petite taille. Ici les agrégats fractals du mélange 2 Bionov sont de plus grande taille que les agrégats du mélange 2 Minor et pour autant ils induisent une viscosité inférieure.

On pourrait supposer que pour les agrégats du mélange 2 Bionov, et malgré la présence de forte répulsions électrostatiques entre agrégats, un gel faible se forme tout de même et que celui-ci décante induisant une diminution de la viscosité mesurée. Inthavong et al. (2019, 2016) ont déjà constaté la formation de tels gels à concentration en protéines élevée.

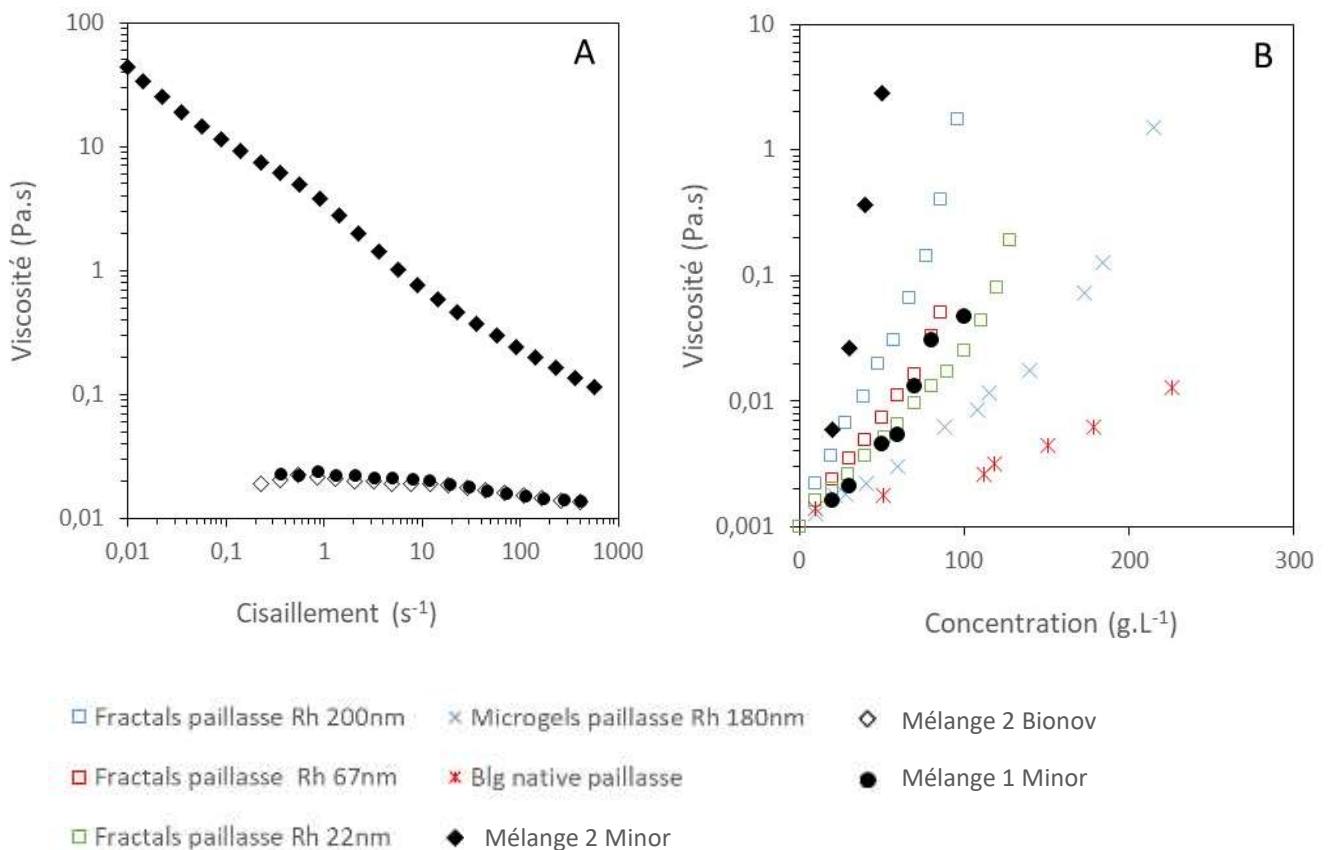


Figure 78 : Propriétés viscosifiantes des poudres à 20°C (Minor et Bionov) des mélanges d'agrégats (Mélanges 1 et 2) Dépendance de la Variation de la viscosité à cisaillement de  $10^{-4}s^{-1}$  en fonction de la concentration. Données des agrégats de paillasse issues de Inthavong et al., (2016).

### 6.2.2 Fonctionnalités différentes en fonction du mélange utilisée

Pour les suspensions constituées d'agrégats préparés à l'échelle Minor, la viscosité augmente d'un ordre de grandeur d'environ 4 pour les suspensions préparées avec les agrégats du mélange 2 comparé aux suspensions préparées avec les agrégats du mélange 1 (7A). On compare ensuite dans un deuxième temps la viscosité à cisaillement faible des différentes suspensions en fonction de la concentration en agrégats, et on confronte ces résultats à ceux de la littérature pour des agrégats produits à l'échelle laboratoire et pour des  $\beta$ lg natives (77B).

La viscosité des solutions d'agrégats du mélange 2 Minor de  $R_g = 247,9$  nm et  $R_h = 53,6$  nm (Tableau 24) augmente plus rapidement avec l'augmentation de la concentration en protéines que les agrégats fractals de laboratoire de  $R_h$  200 nm. On ne peut pas comparer les rayons de giration des agrégats produits dans notre étude avec ceux produits par Inthavong et al. (2016) étant donné que des techniques de mesure de taille différentes ont été utilisées. Dans notre cas le  $R_h$  est mesuré sous un seul angle pour chaque fraction d'échantillon éluée, tandis que Inthavong et al. (2016) mesurent le  $R_h$  sur plusieurs angles sur l'échantillon dans sa globalité ce qui a pour conséquence de surreprésenter les gros objets. Cependant il est possible de comparer la fonctionnalité des agrégats pilote et laboratoire.

Le comportement de agrégats du mélange 1 est différent de celui des agrégats purement microgels produits au laboratoire mais se rapproche en revanche davantage des agrégats fractals de laboratoire de  $R_h$  67nm. Le mélange 1 présente donc une viscosité intermédiaire entre celle induite par des microgels purs, et celle induite par les agrégats du mélange 2 Minor.

Une différence de viscosité est donc observée entre les agrégats des deux mélanges produits en continu, séchés et redispersés. A concentration en protéines équivalente, les agrégats du mélange 1 ont une viscosité moindre que les agrégats du mélange 2. Cette différence, déjà observée sur des agrégats produits au laboratoire (Inthavong et al., 2019) pourrait s'expliquer par la présence des microgels dans le mélange 1 qui sont plus denses et ont ainsi moins la capacité à occuper l'espace que les agrégats fractals. Il faudrait comparer le comportement viscosifiant des mélanges non pas à concentrations en protéines équivalentes mais bien à concentration en agrégats fractals équivalente.

### 6.3 Propriété de texturation d'émulsion

Quels sont les agrégats les plus efficaces pour connecter les gouttelettes d'une émulsion en vue de la texturer ?

Toutes les émulsions ont été fabriquées avec la même quantité de Matière Grasse Laitière Anhydre (MGLA) (30%) et à la même pression d'homogénéisation (100 bar) en présence de PS natives à 0,6 p/p % : concentration en PS natives supérieure à la concentration limitante en PS (0,4 p/p %) pour couvrir l'interface créée dans nos conditions. Dans ces conditions, il y a suffisamment de PS natives pour éviter les phénomènes de floculation et de coalescence. Cela signifie que la taille des gouttelettes individuelles formées est identique et que la distance moyenne inter-gouttelette est elle aussi identique dans chaque émulsion. En plus des PS natives, des agrégats issus des conditions du mélange 1 ou du mélange 2 ont été ajoutés à 1,2 p/p %, le but étant que les agrégats puissent entrer en compétition avec les PS natives, s'adsorber à l'interface et ponter différentes gouttelettes pour texturer l'émulsion. Un témoin négatif a également été produit en remplaçant les agrégats par des PS natives.

Les émulsions fabriquées en présence, uniquement de  $\beta$ lg natives (1,2 + 0,6 p/p %), n'ont pas présentées de texturation en sortie d'homogénéisateur mais sont restées liquides. Par contre, les émulsions fabriquées en présence d'agrégats des deux types, ont présenté un comportement type gel instantané, c'est-à-dire des émulsions qui gélifiaient dès la sortie de l'homogénéisateur (Figure 78). A ces mêmes concentrations d'agrégats, Loiseleux (2018) n'a pas observé de texturation d'émulsion pour les agrégats microgels mais une texturation de type gel instantané en présence d'agrégats fractals (Figure 17 Etat de l'art).

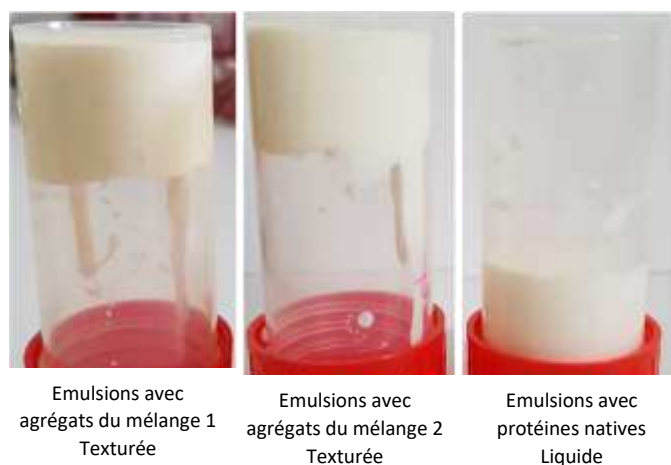


Figure 79 : Photos des émulsions en sortie d'homogénéisateur

La taille des gouttelettes de matière grasse a été analysée pour chacune des émulsions en sortie d'homogénéisation, en présence ou en absence de SDS dans le but de mettre en évidence des phénomènes de pontage de gouttelettes (Figure 799). Pour les émulsions préparées uniquement avec des PS natives, la taille moyenne des gouttelettes est de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$ . En présence de SDS, la taille n'évolue pas significativement qu'il n'y a pas eu de floculation, ou pontage de plusieurs gouttelettes par les PS.

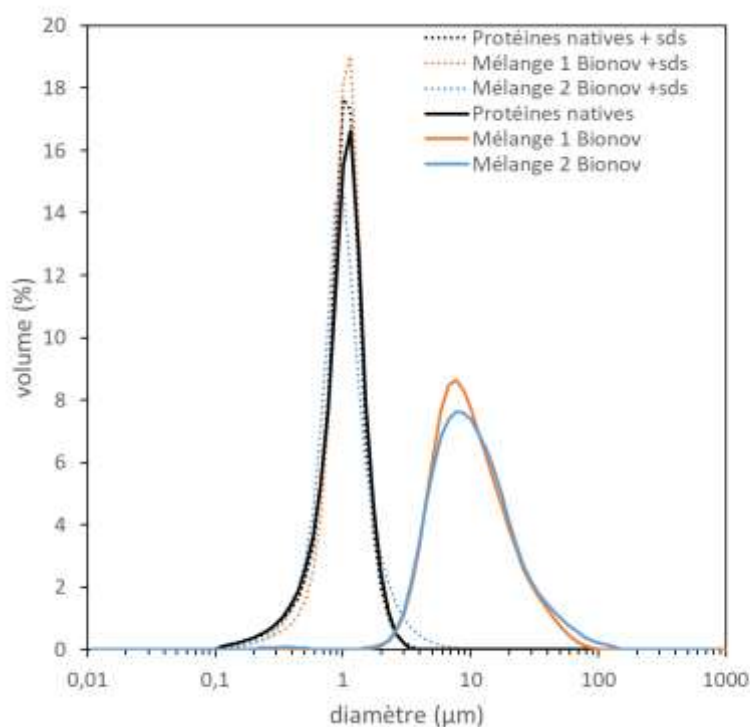


Figure 80 : Distribution de taille des gouttelettes de matière grasse des émulsions produites en présence d'agrégats des deux mélanges. L'émulsion est préparée à 100 bars avec 30% de MGLA. Les expériences ont été faites en triplicat

Pour les émulsions préparées avec des agrégats de PS (Mélange 1 ou 2), les gouttelettes forment des amas autour de 10  $\mu\text{m}$  durant l'étape d'homogénéisation. En présence de SDS, on retrouve la même taille de gouttelettes individualisée (1  $\mu\text{m}$ ) que pour les PS. Ce phénomène observé durant l'homogénéisation est dû à la connexion des gouttelettes de matière grasse par des agrégats de PS (Figure 81). Surel et al. (2014) ont déjà observé une texturation des émulsions dans l'homogénéisateur, par des agrégats de protéines laitières.

Dans nos conditions expérimentales, on peut faire l'hypothèse que des gouttelettes de même taille ont une même composition interfaciale, cependant ceci serait à confirmer par des mesures supplémentaires (mesure de viscosité à l'interface). Dans ce cas, le fait que les amas de gouttelettes soient de taille identique (10  $\mu\text{m}$ ) dans le cas des émulsions préparées avec les deux types d'agrégats montre que des agrégats de taille similaire se placent à l'interface, permettant de ponter à même distance (Figure 81). Or il a déjà été montré que les agrégats microgels se plaçaient moins à l'interface

que les agrégats fractals (Loiseleux, 2018), ce sont donc seulement les agrégats fractals qui se placent à l'interface et qui ont la même taille dans le cas des agrégats issus des deux mélanges 1 et 2. Ceci est un argument supplémentaire pour dire que la distribution de taille en agrégats fractals est la même dans le mélange 1 que dans le mélange 2.

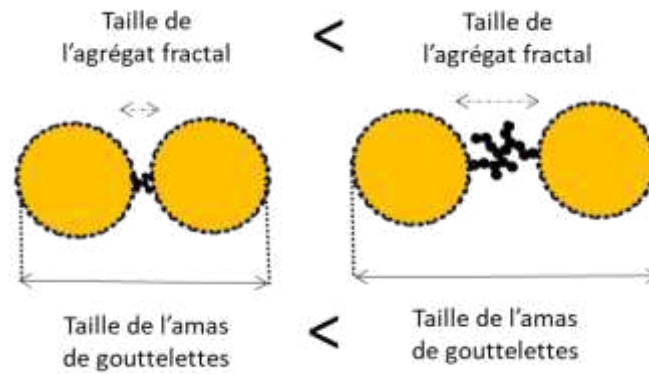


Figure 81 : Schéma explicatif du pontage de gouttelettes de matière grasse par des agrégats fractals de taille différente.

On observe une différence de texture des émulsions produites à partir des agrégats issus des deux mélanges différents. En suivant l'évolution des propriétés rhéologiques des émulsions au cours d'un maintien à 60°C, après leur sortie de l'homogénéisateur, (Figure 828) on observe que les émulsions produites en présence uniquement de  $\beta$ lg natives ne sont pas gélifiées et ont un comportement liquide ( $G'$  faible ; Figure 82), qui n'évolue pas au cours du temps ce qui confirme les observations visuelles. Par contre, les émulsions produites en présence d'agrégats sont gélifiées dès le début et se structurent au cours du temps (augmentation du  $G'$  ; Figure 82). La fermeté initiale des émulsions produites avec les agrégats issus du mélange 2 est supérieure à celle des émulsions produites avec les agrégats issus du mélange 1. Cependant lors du maintien en température, elle augmente moins et les fermetés finales des gels se rapprochent :  $G' = 1083 \pm 16$  (Figure 82) pour les agrégats du mélange 2 et  $G' = 895 \pm 13$  pour les agrégats du mélange 1 (Figure 82).

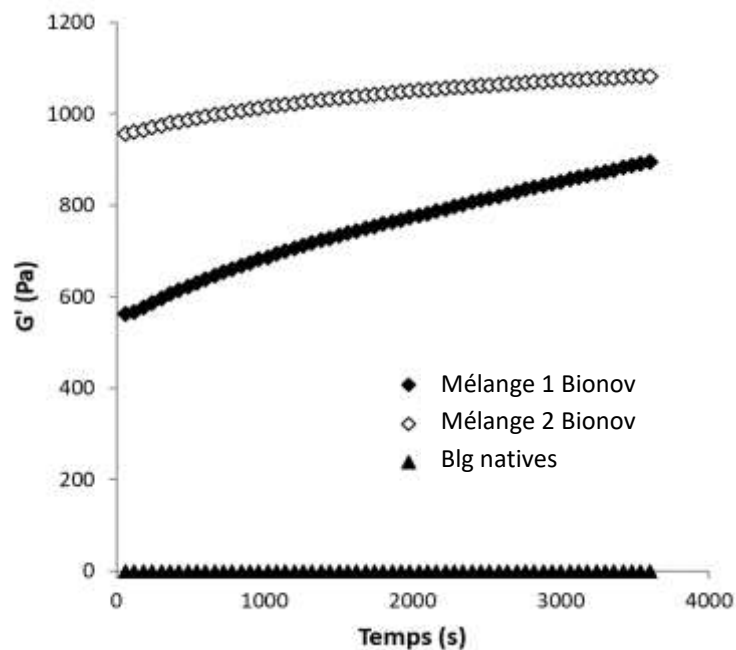


Figure 82 : Evolution du  $G'$  des émulsions produites avec des agrégats de PS ou protéines natives en fonction du temps. Les expériences ont été réalisées en duplicat. à 60°C

Une augmentation de la distance inter-gouttelettes peut diminuer la texture d'une émulsion, étant donné que dans ce cas, il est plus difficile de ponter deux gouttelettes ensemble que quand elles sont proches physiquement. Seulement ici nous avons vu que la distance inter-gouttelettes était identique pour les mélanges 1 et 2 et que des amas de gouttelettes de même taille (10 $\mu$ m) étaient formés : ce paramètre ne peut donc pas expliquer la différence de texture observée.

La différence de texture pourrait s'expliquer par une différence de développement du réseau protéines-lipides. Effectivement, étant donné qu'on travaille déjà à concentration en PS natives supérieure à la concentration limitante, et qu'on ajoute des agrégats de PS, on sait qu'une fraction protéique (PS et agrégats) reste présente dans la phase aqueuse de l'émulsion. Mantovani et al. (2016) ont déjà montré que la formation d'interactions moléculaires entre les entités protéiques participaient à la texturation de l'émulsion. Le réseau protéine-lipide serait plus développé dans les émulsions produites avec le mélange 2 que dans les émulsions produites avec le mélange 1. On a déjà vu que les agrégats fractals étaient de meilleurs viscosifiants que les agrégats microgels de par leur structure branchée et leur faible densité. La présence de microgel dans le mélange 1 induirait donc une diminution de texture de l'émulsion.

On peut également supposer que la différence de texture des émulsions s'explique par le nombre d'amas formés. Effectivement, à concentration équivalente en protéines, les agrégats du mélange 1 ont un moins grand nombre d'agrégats fractals que les agrégats du mélange 2 étant donné que des microgels denses sont formés au détriment des fractals dans le mélange 1. Si moins d'agrégats fractals

sont disponibles pour ponter des gouttelettes dans le mélange 1, alors il y'aura moins d'amas de gouttelettes et une texture moindre. D'après la Figure 79 on remarque que pour les expériences conduites sans SDS en présence d'agrégats, il n'y a plus de gouttelettes individuelles ce qui signifie qu'elles sont toutes dans des amas. Si la taille des amas est identique, il est probable que leurs nombres soient proches. Pour quantifier le nombre d'amas formés, et ainsi lever l'hypothèse d'un plus grand nombre d'amas formés avec le mélange 2, une analyse microscopique couplée à un comptage pourrait être réalisée.

Enfin, on peut également supposer que la différence de texture observée s'explique par la différence du nombre de connexions au sein d'un amas (Figure 83). La présence d'un moins grand nombre d'agrégats fractals dans le mélange 1 induirait une diminution du nombre de connexion dans le gel et diminuerait ainsi la texture de l'émulsion.

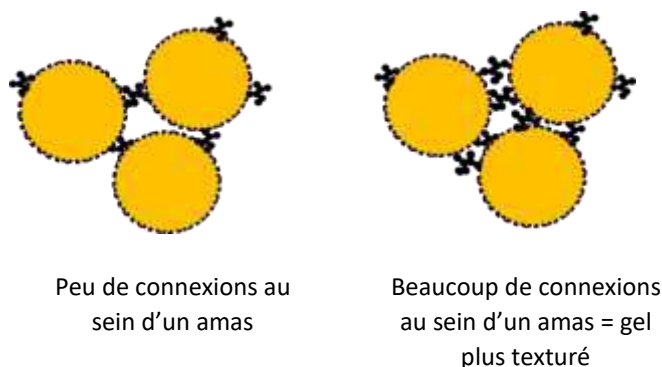


Figure 83 : Représentation schématique du nombre de connexions au sein d'un amas de gouttelettes.

Pour conclure sur les propriétés de texturation d'émulsion, on peut mettre en avant trois niveaux de contributions de texturation que sont la formation d'un réseau de gouttelettes de matière grasse, le renforcement de ce dernier par la contribution des agrégats protéiques formant un réseau protéines-lipides, et enfin l'augmentation de la viscosité voire la gélification de la phase continue par les agrégats présents dans cette phase. Avec les deux mélanges, il est possible de former des émulsions texturées dès la sortie de l'homogénéisateur. Dans ces conditions, la présence de microgels dans le mélange 1 n'empêche donc pas la fonctionnalité de texturation d'émulsion. Cependant, les agrégats issus du mélange 2 permettent de former des émulsions légèrement plus texturées (mesure rhéologique) que les agrégats du mélange 1. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la réduction du nombre de fractals dans le mélange 1 en raison de la présence de microgels qui conduirait à la formation d'un réseau protéine-lipide plus développé dans la phase aqueuse des émulsions produites avec les agrégats du mélange 2. Cela conduirait également à la diminution du nombre d'amas de gouttelette formés qui serait moins important dans le cas du mélange 1 du fait de la présence de microgels qui ne participent pas au pontage des gouttelettes ; ou encore cela conduirait à la diminution du nombre global de



connexions dans le gel. Pour aller plus loin, il serait intéressant de savoir si cette différence de texture mesurée est réellement perceptible en bouche.

## CONCLUSION

---

A l'heure de conclure sur les différentes questions de recherche posées dans ce travail, nous pouvons affirmer qu'il a été possible d'obtenir à une échelle de production significative et en mode continu deux mélanges différents d'agrégats de protéines solubles (PS) en contrôlant l'environnement physico-chimique : un premier mélange composé d'agrégats fractals branchés et d'agrégats microgels sphériques (mélange 1), et un second mélange d'agrégats purement fractals (mélange 2). Pour obtenir ces deux mélanges, nous avons modulé les conditions physico-chimiques : en augmentant le pH de la solution de PS tout en restant à un rapport molaire [calcium]/[protéine] constant dans le cas du mélange 2, on accroît la densité de charges négative et par suite les répulsions protéiques.

Pour faire varier la taille des agrégats fractals produits au pilote, nous avons dans un premier temps utilisé les mêmes leviers matière qu'à l'échelle laboratoire. L'augmentation des concentrations en protéines et NaCl permet d'augmenter la taille des agrégats fractals du mélange 2 sans qu'il n'y ait gélification dans l'installation : des agrégats fractals de rayon de giration moyen  $R_{g_{moy}} = 294$  nm ont ainsi été obtenus dans des conditions de 8 p/p% en protéines et 25mM en NaCl. L'augmentation de la taille des agrégats du mélange 1 par ces mêmes leviers matière est plus limitée dans la mesure où les conditions de gélification dans l'échangeur sont atteintes précocement. Ainsi la taille maximale des agrégats fractals et microgels obtenus est  $R_{g_{moy}} = 154$  nm pour des conditions de 4 p/p% en protéines et 20mM NaCl.

Afin d'augmenter davantage la taille des agrégats fractals et microgels du mélange 1, nous nous sommes intéressés à trois paramètres de procédés : le régime d'écoulement dans la zone de chauffe, le temps de montée en température et la température de chauffe. Parmi ces trois paramètres, deux se sont révélés particulièrement efficaces pour induire une augmentation significative de la taille des agrégats : le régime d'écoulement et la température de chauffe. Ainsi, en régime intermédiaire, des agrégats de plus grande taille ( $R_{g_{moy}} = 204$  nm) ont été formés dans des conditions de 6 p/p % en protéines et 10mM NaCl, en comparaison aux régimes laminaire et turbulent. Cette augmentation de taille a été attribuée à la rencontre optimale des espèces réactives. L'augmentation de la température de chauffe au-delà de 80°C a permis d'obtenir des agrégats d'encore plus grande taille ( $R_{g_{moy}} = 312$  nm) dans des conditions de 6 p/p % en protéines, 10mM NaCl, et 85°C. Effectivement, dans de telles conditions, le dépliement et l'agrégation des PS sont contrôlés par l'étape d'agrégation, ce qui a pour conséquence la formation d'agrégats de plus grande taille. L'augmentation de taille des agrégats du

mélange 1 concerne tant les agrégats fractals que les agrégats microgels qui la composent, la forme des agrégats, déterminée par le facteur de forme  $R_g/R_h$ , restant constante.

L'étude du comportement encrassant des deux mélanges d'agrégats différents a permis de démontrer que le mélange d'agrégats fractals et microgels, particulièrement réactifs au cours de leur production, induit davantage d'encrassement que le mélange de fractal purs. Ces résultats préliminaires doivent toutefois être répétés.

**En conséquence, nous pouvons affirmer qu'il est possible de produire de manière continue des agrégats de PS (agrégats fractals et microgels vs agrégats fractals seuls) et d'en contrôler les propriétés intrinsèques (morphologie et taille).**

Le comportement des deux mélanges d'agrégats lors des opérations de concentration-séchage-redisposition à différentes échelles a également été étudié. Nos résultats montrent que le couple [degré de concentration ; temps passé à l'état concentré] conditionne le déroulement de ces opérations, dépendamment de la réactivité des agrégats.

La présence de microgels inertes et peu réactifs du mélange 1 limite la sensibilité du mélange au degré de concentration. En effet, aucune sur-agrégation n'est observée lors des étapes de filtration tangentielle et de séchage. Les agrégats sont cependant sensibles à la cinétique de concentration et une sur-agrégation est observée dans le temps à l'équilibre thermodynamique. Quel que soit le temps passé à l'état concentré, et dans la limite des conditions de l'étude, la redisposition des poudres n'est pas affectée et il est possible de recouvrer la distribution de taille des agrégats par des étapes d'agitation suivi d'une homogénéisation complémentaire.

Les agrégats purement fractals du mélange 2, de forme ramifiée, interpénétrables et très réactifs n'ont en revanche pas le même comportement à la concentration. Ils sont effectivement sensibles au degré de concentration et gélifient à des concentrations de  $240 \text{ g.L}^{-1}$ , quelle que soit la cinétique de concentration (lente ou rapide). Une sur-agrégation importante est observée au séchage ; cette suragrégation prend un caractère irréversible à l'état concentré sec, impactant négativement la redisposition des poudres. Effectivement, si quelques jours après le séchage des agrégats, une simple agitation permet de redisperser les agrégats fractals, des phénomènes de réticulation au sein du grain de poudre, favorisés par le pH alcalin, empêche la bonne redisposition des agrégats après quatre mois passés à l'état concentré sec.

**Les deux mélanges différents d'agrégats ont donc un comportement différent lors des étapes de concentration-séchage-redisposition. Le mélange d'agrégats fractals et microgels est plus apte que le**

**mélange d'agrégats purement fractals à être stabilisé par concentration-séchage, et à être redispersé après une longue période passée à l'état concentré.**

Les propriétés fonctionnelles des deux mélanges différents d'agrégats de grande taille, produits au pilote, concentrés, séchés et redispersés ont été étudiées en termes de capacité à gélifier, capacité à augmenter la viscosité et capacité à texturer des émulsions. La capacité de gélification à froid induite par l'acidification a été étudiée sur les solutions d'agrégats obtenues à différentes échelles. Dans le cas d'essais de faible volume (Minor), le mélange purement fractal de taille  $R_{g_{moy}} = 132$  nm a des propriétés gélifiantes similaires aux agrégats fractals produits à l'échelle laboratoire, et qui sont plus importantes que celles du mélange d'agrégats fractals et microgels. En effet, le mélange fractals et microgels gélifie moins rapidement et induit un gel plus faible (ordre de grandeur d'un à trois) que les agrégats purement fractals. L'augmentation du volume de solution d'agrégats traitée n'a pas d'impact sur le comportement du mélange fractals et microgels mais elle induit une sur-agrégation des agrégats purement fractals ( $R_{g_{moy}} = 250$  nm). Il en découle une diminution des propriétés de gélification à froid des agrégats fractals avec l'apparition de synérèse.

La capacité des mélanges à augmenter la viscosité des solutions a également été étudiée. Dans le cas d'essais pilote de faible volume, les agrégats purement fractals ont des propriétés viscosifiantes supérieures à celles d'agrégats fractals de  $R_h = 200$  nm produits à l'échelle laboratoire, et supérieures à celles du mélange fractal et microgel produit au pilote. Ce mélange a lui-même des propriétés viscosifiantes supérieures à celles de microgels purs produits à l'échelle laboratoire. Dans le cas d'essais de grand volume, la sur-agrégation des agrégats purement fractals induit une diminution de leurs propriétés viscosifiantes, qui deviennent non significativement différentes de celles du mélange fractal et microgel.

Enfin, la capacité des deux mélanges d'agrégats à texturer une émulsion en sortie d'homogénéisateur a été démontrée. Cependant les agrégats purement fractals induisent une texture légèrement plus importante que le mélange fractals et microgels, ce qui pourrait s'expliquer par la formation d'un réseau protéine-lipide plus développé, par l'augmentation du nombre d'amas de gouttelettes formés ou encore par l'augmentation globale de connexions dans le gel. Des essais complémentaires permettraient de trancher entre ces hypothèses. Il conviendrait également d'objectiver les différences de propriétés texturantes de ces deux mélanges en évaluant l'impact réellement perçu en bouche en matrices alimentaires plus complexes.

**Les propriétés fonctionnelles des deux mélanges d'agrégats ont donc été caractérisées et comparées aux propriétés des agrégats produits à l'échelle laboratoire. Le mélange purement fractal semble**

**avoir de meilleures propriétés fonctionnelles que le mélange fractals et microgels ; et il a des propriétés qui s'apparentent à celles déjà étudiées des agrégats produits à l'échelle laboratoire. En revanche, on observe une diminution des propriétés de gélification et des propriétés texturantes de ce mélange lors de l'augmentation du volume de solution d'agrégats produit.**

Pour conclure plus globalement sur ces travaux, on peut dire qu'il est aisé de faire varier la taille des agrégats purement fractals grâce à des paramètres matières et que leur production se fait sans phénomènes d'encrassement significatifs. Conformément aux mécanismes proposés à l'échelle laboratoire par Nicolai et al (2011), les agrégats fractals primaires s'associent en agrégats secondaires comme le montre leur sur-agrégation avec l'augmentation du volume traité. La réactivité des agrégats fractals se révèle lorsqu'on accroît leur fraction volumique et que l'on force leur rapprochement au-delà de leurs sphères de répulsion électrostatique : les agrégats de grande taille gélifient lors de leur concentration (à partir de  $240 \text{ g.L}^{-1}$ ) et réticulent à l'état poudre ce qui limite la redispersion des particules. En l'absence de sur-agrégation (taille inférieure à XXX), ces agrégats purement fractals, séchés et redispersés ont des propriétés fonctionnelles d'intérêt : ils peuvent augmenter la viscosité, former des gels et texturer des émulsions. La sur-agrégation des agrégats induit cependant une perte des propriétés viscosifiantes et gélifiantes.

Pour faire varier la taille des agrégats du mélange fractals et microgels, l'utilisation de leviers matière est limitée en raison d'un risque de gélification dans le pilote mais l'utilisation de leviers procédés permet d'y pallier. Ces agrégats induisent davantage d'encrassement de l'échangeur TPC que les agrégats purement fractals, car leur réactivité est plus importante lors de leur formation (protéines sous forme dépliée) et décroît après agrégation. Le mélange fractals et microgels est ainsi stable dès 15min de traitement thermique et n'est pas affecté par les étapes de concentration et séchage. La poudre d'agrégats se redisperse sous agitation mécanique avec homogénéisation même après plusieurs mois. Ces agrégats peuvent induire des gels faibles à froid, ont un comportement visqueux intermédiaire entre celui de microgels purs produits à l'échelle laboratoire et celui de fractals purs produits au pilote. Enfin ils peuvent texturer des émulsions comme le mélange purement fractal.

## PERSPECTIVES

---

Les résultats de ces travaux de thèse, et plus généralement les résultats du projet PROFIL, ouvrent un grand nombre de perspectives scientifiques et applicatives.

Néanmoins, plusieurs incertitudes persistent sur le mélange d'agrégats purement fractals :

Nous avons remarqué qu'un traitement thermique de 15 min n'était pas suffisant pour induire une solution stable d'agrégats purement fractals de grande taille étant donné qu'avec l'augmentation de la durée d'essai, une sur-agrégation avait lieu. Cette sur-agrégation conduit à l'obtention d'agrégats de très grande taille, et finalement à une perte de fonctionnalité que ce soit à l'état liquide ou à l'état sec. Dans la littérature, des traitements thermiques de plus de 10h sont appliqués pour atteindre un état stable : ces temps de traitement sont bien sûr trop longs au regard des contraintes industrielles. Il serait donc intéressant de déterminer par la suite un optimum de temps de traitement et de taille finale des agrégats aux propriétés fonctionnelles maintenues. De même, les chambrages réalisés dans cette étude ont été obtenus en mettant en œuvre un tuyau souple de diamètre différent de celui de l'installation TPC, occasionnant une dispersion accrue de temps de séjour. Il serait judicieux de s'affranchir de ces limites à l'avenir.

De plus, nous avons produit des agrégats purement fractals de différentes tailles, mais nous n'avons pu concentrer et sécher que des agrégats fractals de grande taille dans le temps de l'étude. Or les agrégats fractals de petite taille ont également des propriétés fonctionnelles d'intérêt (gélification, stabilisation d'émulsion) d'après les données de la littérature. Il serait donc intéressant d'étudier le comportement à la concentration et au séchage des assemblages de petite taille produits au pilote, et de valider les propriétés fonctionnelles de ces derniers.

Pour éviter les phénomènes de gélification à la concentration observés sur les agrégats purement fractals, il serait également judicieux d'envisager des modalités de concentration des agrégats différentes, en abaissant par exemple le pH de la solution avant concentration ou en co-concentrant les agrégats avec une solution d'autres solutés stables, autres que des microgels.

En ce qui concerne le mélange fractals et microgels, nous avons vu dans ces travaux que des leviers matière ou procédés (température de chauffe et régime d'écoulement) pouvaient être utilisés pour faire varier la taille des agrégats. L'étude s'est limitée ici à l'influence séquentielle de chaque facteur ; Il serait intéressant de faire varier plusieurs de ces leviers en même temps pour identifier d'éventuelles interactions et diminuer au mieux l'encrassement de l'échangeur de chaleur.

Toujours dans le cas du mélange fractal et microgel, il serait intéressant d'étudier les contributions respectives des microgels et agrégats fractals sur les propriétés fonctionnelles étudiées, notamment les propriétés de gélification et de stabilisation des émulsions : il s'agirait d'étudier le comportement du mélange 1 en prenant en compte uniquement la concentration agrégats fractals réactifs plutôt que la concentration en protéines totales. Il serait également intéressant de faire varier les proportions d'agrégats fractals et d'agrégats microgels au sein d'un mélange.

La fonctionnalité des agrégats purement fractals ou du mélange fractals et microgels produits au pilote, séchés et redispersés, a été étudiée sur des matrices simples. Il serait intéressant de les incorporer dans des matrices alimentaires plus complexes de type crème dessert, yaourt, crème UHT en remplacement d'agents de texture habituellement utilisés en industrie laitière (amidons modifiés, caséinate de sodium, carraghénanes, pectines). Nous pourrions ainsi constater l'impact en bouche réel des deux mélanges d'agrégats proposés.

Nous pourrions également, connaissant les propriétés viscosifiantes et gélifiantes des agrégats concevoir des produits alimentaires innovants à destination des séniors (solutions hyper-protéinées de viscosité contrôlée pour faciliter la déglutition), des sportifs (desserts gélifié ou barres hyper-protéinés), des enfants (bonbons laitiers sains à mastiquer).

Pour finir, dans la perspective de destiner ces poudres de mélange d'agrégats à des applications de marché, il paraît indispensable de clarifier à court terme :

- la réglementation à laquelle elles sont soumises, déterminant leur usage potentiel ;
- leur coût de revient industriel et leur surcoût éventuel par rapport à des ingrédients existants, incluant les isolats de protéines natifs ;
- leur comportement au cours du stockage et leur potentiel de vieillissement à propriétés garanties.

## LISTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Acharya, N., Sen, M., Chang, H.-C., 2001. Analysis of heat transfer enhancement in coiled-tube heat exchangers. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 44, 3189–3199. [https://doi.org/10.1016/S0017-9310\(01\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S0017-9310(01)00002-3)
- Adolphi, U., Kulicke, W.-M., 1997. Coil dimensions and conformation of macromolecules in aqueous media from flow field-flow fractionation/multi-angle laser light scattering illustrated by studies on pullulan. *Polymer* 38, 1513–1519. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(96\)00675-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(96)00675-1)
- Apenten, R.K.O., Khokhar, S., Galani, D., 2002. Stability parameters for  $\beta$ -lactoglobulin thermal dissociation and unfolding in phosphate buffer at pH 7.0. *Food Hydrocolloids* 16, 95–103. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00067-4)
- Atra, R., Vatai, G., Bekassy-Molnar, E., Balint, A., 2005. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering* 67, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.035>
- Baldasso, C., Barros, T.C., Tessaro, I.C., 2011. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 278, 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055>
- Baussay, K., Bon, C.L., Nicolai, T., Durand, D., Busnel, J.-P., 2004. Influence of the ionic strength on the heat-induced aggregation of the globular protein  $\beta$ -lactoglobulin at pH 7. *International Journal of Biological Macromolecules* 34, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2003.11.003>
- Belmar-Beiny, M.T., Gotham, S.M., Paterson, W.R., Fryer, P.J., Pritchard, A.M., 1993. The effect of Reynolds number and fluid temperature in whey protein fouling. *Journal of Food Engineering* 19, 119–139. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(93\)90038-L](https://doi.org/10.1016/0260-8774(93)90038-L)
- Blanpain-Avet, P., André, C., Khaldi, M., Bouvier, L., Petit, J., Six, T., Jeantet, R., Croguennec, T., Delaplace, G., 2016. Predicting the distribution of whey protein fouling in a plate heat exchanger using the kinetic parameters of the thermal denaturation reaction of  $\beta$ -lactoglobulin and the bulk temperature profiles. *Journal of Dairy Science* 99, 9611–9630. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10957>
- Bouchoux, A., Gésan-Guiziu, G., Pérez, J., Cabane, B., 2010. How to Squeeze a Sponge: Casein Micelles under Osmotic Stress, a SAXS Study. *Biophysical Journal* 99, 3754–3762. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.019>
- Bryant, C.M., McClements, D.J., 1998. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology* 9, 143–151. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00031-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00031-4)



- Butylina, S., Luque, S., Nyström, M., 2006. Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science* 280, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.01.046>
- Cayot, P., Lorient, D., 1998. Structures et technofonctions des protéines du lait, Tec & Doc. ed.
- Chen, J., Dickinson, E., 1998. Viscoelastic Properties of Heat-Set Whey Protein Emulsion Gels. *Journal of Texture Studies* 29, 285–304. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1998.tb00171.x>
- Chen, X.D., Li, D.X.Y., Lin, S.X.Q., Özkan, N., 2004. On-line fouling/cleaning detection by measuring electric resistance—equipment development and application to milk fouling detection and chemical cleaning monitoring. *Journal of Food Engineering* 61, 181–189. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00085-2)
- Chevallier, M., 2017. Stabilisation des émulsions laitières aux cours des traitements technologiques : action combinée des agrégats de protéines de lactosérum et des caséines.
- Chevallier, M., Riaublanc, A., Lopez, C., Hamon, P., Rousseau, F., Croguennec, T., 2016a. Aggregated whey proteins and trace of caseins synergistically improve the heat stability of whey protein-rich emulsions. *Food Hydrocolloids* 61, 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.009>
- Chevallier, M., Riaublanc, A., Lopez, C., Hamon, P., Rousseau, F., Thevenot, J., Croguennec, T., 2016b. Increasing the heat stability of whey protein-rich emulsions by combining the functional role of WPM and caseins. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.014>
- CNIEL, 2019. Economie laitière en chiffres - Édition 2019 [WWW Document]. calameo.com. URL <https://www.calameo.com/read/0022300516dd96abad95b> (accessed 6.7.19).
- Cohen, J.A., Podgornik, R., Hansen, P.L., Parsegian, V.A., 2009. A Phenomenological One-Parameter Equation of State for Osmotic Pressures of PEG and Other Neutral Flexible Polymers in Good Solvents. *J. Phys. Chem. B* 113, 3709–3714. <https://doi.org/10.1021/jp806893a>
- Considine, T., Patel, H.A., Anema, S.G., Singh, H., Creamer, L.K., 2007. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.08.003>
- Croguennec, T., O’Kennedy, B.T., Mehra, R., 2004. Heat-induced denaturation/aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal* 14, 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.09.005>
- Daufin, G., René, F., Aimar, P., 1998. Les séparations par membrane dans les procédés de l’industrie alimentaire [WWW Document]. Librairie Lavoisier. URL <https://www.lavoisier.fr/livre/agro-alimentaire/les-separations-par-membrane-dans-les-procedes-de-l-industrie-alimentaire/daufin/descriptif-9782743002282> (accessed 11.27.19).

- Dickinson, E., 1996. Les Colloïdes alimentaires (Livre, 1996) [WorldCat.org] [WWW Document]. URL <https://www.worldcat.org/title/colloides-alimentaires/oclc/35147157> (accessed 10.18.19).
- Donato, L., Kolodziejczyk, E., Rouvet, M., 2011. Mixtures of whey protein microgels and soluble aggregates as building blocks to control rheology and structure of acid induced cold-set gels. *Food Hydrocolloids, Food Colloids 2010: On the Road from Interfaces to Consumers* 25, 734–742. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.020>
- Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L., Rouvet, M., 2009. Mechanism of formation of stable heat-induced  $\beta$ -lactoglobulin microgels. *International Dairy Journal* 19, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.11.005>
- Erabit, N., Flick, D., Alvarez, G., 2014. Formation of  $\beta$ -lactoglobulin aggregates during thermomechanical treatments under controlled shear and temperature conditions. *Journal of Food Engineering* 120, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.003>
- Famelart, M.-H., Schong, E., Croguennec, T., 2018. Dry heating a freeze-dried whey protein powder: Formation of microparticles at pH 9.5. *Journal of Food Engineering* 224, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.010>
- Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., Swaisgood, H.E., 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science* 87, 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
- Forny, L., Marabi, A., Palzer, S., 2011. Wetting, disintegration and dissolution of agglomerated water soluble powders. *Powder Technology, 9th International Symposium on Agglomeration and 4th International Granulation Workshop, 2009* 206, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.07.022>
- Forsyth, Carol, Mulheran, P.A., Forsyth, Claire, Haw, M.D., Burns, I.S., Sefcik, J., 2015. Influence of Controlled Fluid Shear on Nucleation Rates in Glycine Aqueous Solutions. *Crystal Growth & Design* 15, 94–102. <https://doi.org/10.1021/cg5008878>
- Gaiani, C., Schuck, P., Scher, J., Desobry, S., Banon, S., 2007. Dairy Powder Rehydration: Influence of Protein State, Incorporation Mode, and Agglomeration. *Journal of Dairy Science* 90, 570–581. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71540-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71540-0)
- Gaucheron, F., 2004. Minéraux et produits laitiers [WWW Document]. URL <https://www.lavoisier.fr/livre/agro-alimentaire/mineraux-et-produits-laitiers/gaucheron/descriptif-9782743006419> (accessed 7.1.19).
- Gekko, Kunihiko., Noguchi, Hajime., 1979. Compressibility of globular proteins in water at 25.degree.C. *J. Phys. Chem.* 83, 2706–2714. <https://doi.org/10.1021/j100484a006>

- Gelebart, P., 2019. Modulation de la texture des gels acides laitiers par addition d'agrégats de protéines laitières.
- Glantz, M., Håkansson, A., Lindmark Månsson, H., Paulsson, M., Nilsson, L., 2010. Revealing the size, conformation, and shape of casein micelles and aggregates with asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering. *Langmuir* 26, 12585–12591. <https://doi.org/10.1021/la101892x>
- Havea, P., 2006. Protein interactions in milk protein concentrate powders. *International Dairy Journal* 16, 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.06.005>
- Hoffmann, M.A.M., van Mil, P.J.J.M., 1999. Heat-Induced Aggregation of  $\beta$ -Lactoglobulin as a Function of pH. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1898–1905. <https://doi.org/10.1021/jf980886e>
- Hong, L., Chen, L., Ladika, M., Li, Y., Kim-Habermehl, L., Bergman, R., 2014. Impact of particle size and surface charge density on redispersibility of spray-dried powders. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 459, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.07.015>
- Inthavong, W., Chassenieux, C., Nicolai, T., 2019. Viscosity of mixtures of protein aggregates with different sizes and morphologies. *Soft Matter* 15, 4682–4688. <https://doi.org/10.1039/C9SM00298G>
- Inthavong, W., Kharlamova, A., Chassenieux, C., Nicolai, T., 2016. Structure and flow of dense suspensions of protein fractal aggregates in comparison with microgels. *Soft Matter* 12, 2785–2793. <https://doi.org/10.1039/c5sm02893k>
- Ioan, C.E., Aberle, T., Burchard, W., 1999. Solution Properties of Glycogen. 1. Dilute Solutions. *Macromolecules* 32, 7444–7453. <https://doi.org/10.1021/ma990600m>
- Jeanet, R., Croguennec, T., Schuck, P., Brulé, G., 2008. *Sciences des Aliments 1- Stabilisation biologique et physico-chimique*. Tec & Doc Lavoisier.
- Jung, J.-M., Savin, G., Pouzot, M., Schmitt, C., Mezzenga, R., 2008. Structure of Heat-Induced  $\beta$ -Lactoglobulin Aggregates and their Complexes with Sodium-Dodecyl Sulfate. *Biomacromolecules* 9, 2477–2486. <https://doi.org/10.1021/bm800502j>
- Kerche, F., Weterings, M., Beyrer, M., 2016. The effect of temperature and shear upon technological properties of whey protein concentrate: Aggregation in a tubular heat exchanger. *International Dairy Journal* 60, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.032>
- Khaldi, M., Croguennec, T., André, C., Ronse, G., Jimenez, M., Bellayer, S., Blanpain-Avet, P., Bouvier, L., Six, T., Bornaz, S., Jeanet, R., Delaplace, G., 2018. Effect of the calcium/protein molar ratio on  $\beta$ -lactoglobulin denaturation kinetics and fouling phenomena. *International Dairy Journal* 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.10.002>

- Kharlamova, A., Chassenieux, C., Nicolai, T., 2018a. Acid-induced gelation of whey protein aggregates: Kinetics, gel structure and rheological properties. *Food Hydrocolloids* 81, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.043>
- Kharlamova, A., Inthavong, W., Nicolai, T., Chassenieux, C., 2016. The effect of aggregation into fractals or microgels on the charge density and the isoionic point of globular proteins. *Food Hydrocolloids* 60, 470–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.013>
- Kharlamova, A., Nicolai, T., Chassenieux, C., 2018b. Calcium-induced gelation of whey protein aggregates: Kinetics, structure and rheological properties. *Food Hydrocolloids* 79, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.049>
- Kharlamova, A., Nicolai, T., Chassenieux, C., 2018c. Mixtures of sodium caseinate and whey protein aggregates: Viscosity and acid- or salt-induced gelation. *International Dairy Journal* 86, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.002>
- Kolb, M., Jullien, R., 1984. Chemically limited versus diffusion limited aggregation. *J. Physique Lett.* 45, 977–981. <https://doi.org/10.1051/jphyslet:019840045020097700>
- Labuza, T.P., Tannenbaum, S.R., Karel, M., 1970. Water content and stability of low-moisture & intermediate-moisture foods. *Food technology*.
- Li, J., Turesson, M., Cabane, B., Sanson, N., Skepö, M., 2014. Equation of state of PEG in water : A combined theoretical and experimental study. Non Publié.
- Liu, W.R., Langer, R., Klibanov, A.M., 1991. Moisture-induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 177–184. <https://doi.org/10.1002/bit.260370210>
- Loiseleux, T., 2018. Compétition interfaciale entre protéines solubles et agrégées : connectivité des goutelettes et texture des émulsions laitières.
- Loiseleux, T., Rolland-Sabaté, A., Garnier, C., Croguennec, T., Guilois, S., Anton, M., Riaublanc, A., 2018. Determination of hydro-colloidal characteristics of milk protein aggregates using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled with Multiangle Laser Light Scattering and Differential Refractometer (AF4-MALLS-DRi). *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.012>
- Mahmoudi, N., Axelos, M.A.V., Riaublanc, A., 2011. Interfacial properties of fractal and spherical whey protein aggregates. *Soft Matter* 7, 7643–7654. <https://doi.org/10.1039/C1SM05262D>
- Mahmoudi, N., Gaillard, C., Boué, F., Axelos, M.A.V., Riaublanc, A., 2010. Self-similar assemblies of globular whey proteins at the air–water interface: Effect of the structure. *Journal of Colloid and Interface Science* 345, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.01.036>

- Mahmoudi, N., Gaillard, C., Riaublanc, A., Boue, F., Axelos, M.A.V., 2014. Transition from fractal to spherical aggregates of globular proteins: Brownian-like activation and/or hydrodynamic stress? *Current topics in medicinal chemistry* 14, 630–9.
- Mahmoudi, N., Mehalebi, S., Nicolai, T., Durand, D., Riaublanc, A., 2007. Light-Scattering Study of the Structure of Aggregates and Gels Formed by Heat-Denatured Whey Protein Isolate and  $\beta$ -Lactoglobulin at Neutral pH. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3104–3111. <https://doi.org/10.1021/jf063029g>
- Mantovani, R.A., Cavallieri, Â.L.F., Cunha, R.L., 2016. Gelation of oil-in-water emulsions stabilized by whey protein. *Journal of Food Engineering* 175, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.12.011>
- Masters, K., 2002. *Spray Drying in Practice*. SprayDryConsult.
- McGann, T.C.A., Donnelly, W.J., Kearney, R.D., Buchhemm, W., 1980. Composition and size distribution of bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 630, 261–270. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(80\)90430-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(80)90430-4)
- McKenzie, 1971. *Milk Proteins V1 - 1st Edition* [WWW Document]. URL <https://www.elsevier.com/books/milk-proteins-v1/mckenzie/978-0-12-485201-3> (accessed 10.15.19).
- Mehalebi, S., Nicolai, T., Durand, D., 2008. Light scattering study of heat-denatured globular protein aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.04.002>
- Moussier, M., Bosc, V., Michon, C., Pistre, V., Chaudemanche, C., Huc-Mathis, D., 2019. Multi-scale understanding of the effects of the solvent and process on whey protein emulsifying properties: Application to dairy emulsion. *Food Hydrocolloids* 87, 869–879. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.052>
- Mujumdar, Arun.S., 2014. *Handbook of Industrial Drying* [WWW Document]. CRC Press. URL <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Industrial-Drying/Mujumdar/p/book/9781466596658> (accessed 11.27.19).
- Murphy, R.W., Farkas, B.E., Jones, O.G., 2016. Dynamic and viscoelastic interfacial behavior of  $\beta$ -lactoglobulin microgels of varying sizes at fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 466, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.12.012>
- Nappo, V., Sullivan, R., Davey, R., Kuhn, S., Gavriilidis, A., Mazzei, L., 2018. Effect of shear rate on primary nucleation of para-amino benzoic acid in solution under different fluid dynamic conditions. *Chemical Engineering Research and Design* 136, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.04.039>

- Nicolai, T., Britten, M., Schmitt, C., 2011.  $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, 25 years of Advances in Food Hydrocolloid Research 25, 1945–1962. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.006>
- Nicolai, T., Durand, D., 2013. Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 18, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.03.001>
- Norwood, E.-A., Pezennec, S., Burgain, J., Briard-Bion, V., Schuck, P., Croguennec, T., Jeantet, R., Le Floch-Fouéré, C., 2016. Crucial role of remaining lactose in whey protein isolate powders during storage. *Journal of Food Engineering* 195, 195. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.10.010>
- Nzé, R.-P., Nicolai, T., Chassenieux, C., Nicol, E., Boye, S., Lederer, A., 2015. Effect of Connectivity on the Structure and the Liquid–Solid Transition of Dense Suspensions of Soft Colloids. *Macromolecules* 48, 7995–8002. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01317>
- Pagès, J., 2004. Analyse factorielle de données mixtes. *Revue de Statistique Appliquée* 52, 93–111.
- Pasquier, C., Beaufils, S., Bouchoux, A., Rigault, S., Cabane, B., Lund, M., Lechevalier, V., Floch-Fouéré, C.L., Pasco, M., Pabœuf, G., Pérez, J., Pezennec, S., 2016. Osmotic pressures of lysozyme solutions from gas-like to crystal states. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 28458–28465. <https://doi.org/10.1039/C6CP03867K>
- Petit, J., Herbig, A.-L., Moreau, A., Delaplace, G., 2011. Influence of calcium on  $\beta$ -lactoglobulin denaturation kinetics: Implications in unfolding and aggregation mechanisms. *Journal of Dairy Science* 94, 5794–5810. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4470>
- Petit, J., Six, T., Moreau, A., Ronse, G., Delaplace, G., 2013.  $\beta$ -lactoglobulin denaturation, aggregation, and fouling in a plate heat exchanger: Pilot-scale experiments and dimensional analysis. *Chemical Engineering Science* 101, 432–450. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.06.045>
- Phan-Xuan, T., Durand, D., Nicolai, T., Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L., 2014. Heat induced formation of beta-lactoglobulin microgels driven by addition of calcium ions. *Food Hydrocolloids, Food Colloids 2012: Creation and Breakdown of Structure* 34, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.09.008>
- Phan-Xuan, T., Durand, D., Nicolai, T., Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L., 2013. Tuning the structure of protein particles and gels with calcium or sodium ions. *Biomacromolecules* 14, 1980–1989. <https://doi.org/10.1021/bm400347d>
- Phan-Xuan, T., Durand, D., Nicolai, T., Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L., 2011. On the Crucial Importance of the pH for the Formation and Self-Stabilization of Protein Microgels and Strands. *Langmuir* 27, 15092–15101. <https://doi.org/10.1021/la203357p>
- Písecký, J., 1997. *Handbook of Milk Powder Manufacture*. GEA Niro.

- Rektor, A., Vatai, G., 2004. Membrane filtration of Mozzarella whey. *Desalination* 162, 279–286. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(04\)00052-9](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(04)00052-9)
- Román, S., Sánchez-Siles, L.M., Siegrist, M., 2017. The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends in Food Science & Technology* 67, 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.010>
- Ros-Polski, V., Schmidt, F.L., Vitali, A.A., Marsaioli, A., Raghavan, V.G.S., 2014. Rheological Analysis of Sucrose Solution at High Temperatures Using a Microwave-Heated Pressurized Capillary Rheometer: Rheological analysis of sucrose solution.... *Journal of Food Science* 79, E540–E545. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12398>
- Sadeghinezhad, E., Kazi, S.N., Badarudin, A., Zubair, M.N.M., Dehkordi, B.L., Oon, C.S., 2013. A review of milk fouling on heat exchanger surfaces. *Reviews in Chemical Engineering* 29, 169–188. <https://doi.org/10.1515/revce-2013-0003>
- Sadek, C., Pauchard, L., Schuck, P., Fallourd, Y., Pradeau, N., Le Floch-Fouéré, C., Jeantet, R., 2016. Mechanical properties of milk protein skins layers after drying: understanding the mechanisms of particle formation from whey protein isolate and native phosphocaseinate. *Food Hydrocolloids* 48, 48. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.014>
- Santos, O., Nylander, T., Schillén, K., Paulsson, M., Trägårdh, C., 2006. Effect of surface and bulk solution properties on the adsorption of whey protein onto steel surfaces at high temperature. *Journal of Food Engineering* 73, 174–189. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.018>
- Schmitt, C., Bovay, C., Vuilliomenet, A.-M., Rouvet, M., Bovetto, L., Barbar, R., Sanchez, C., 2009. Multiscale Characterization of Individualized  $\beta$ -Lactoglobulin Microgels Formed upon Heat Treatment under Narrow pH Range Conditions. *Langmuir* 25, 7899–7909. <https://doi.org/10.1021/la900501n>
- Schmitt, C., Moitzi, C., Bovay, C., Rouvet, M., Bovetto, L., Donato, L., Leser, M.E., Schurtenberger, P., Stradner, A., 2010. Internal structure and colloidal behaviour of covalent whey protein microgels obtained by heat treatment. *Soft Matter* 6, 4876–4884. <https://doi.org/10.1039/C0SM00220H>
- Schong, E., Famelart, M.H., 2018. Dry heating of whey proteins leads to formation of microspheres with useful functional properties. *Food Research International* 113, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.004>
- Schuck, P., Dolivet, A., Jeantet, R., 2012a. Les poudres laitières et alimentaires. *Techniques d'analyse*.
- Schuck, P., Dolivet, A., Jeantet, R., 2012b. Les poudres laitières et alimentaires : *Techniques d'analyse*.
- Schuck, P., Mejean, S., Dolivet, A., Gaiani, C., Banon, S., Scher, J., Jeantet, R., 2007. Water transfer during rehydration of micellar casein powders.

- Schuck, P., Roignant, M., Brulé, G., Davenel, A., Famelart, M.H., Maubois, J.L., 1998. SIMULATION OF WATER TRANSFER IN SPRAY DRYING. *Drying Technology* 16, 1371–1393. <https://doi.org/10.1080/07373939808917466>
- Simmons, M.J.H., Jayaraman, P., Fryer, P.J., 2007. The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implications for milk fouling. *Journal of Food Engineering* 79, 517–528. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.013>
- Smithers, G.W., 2015. Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 7th International Whey Conference 48, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>
- Smithers, G.W., 2008. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold.’ *International Dairy Journal*, MILESTONE ACHIEVEMENTS IN DAIRY SCIENCE RESEARCH AND THEIR CURRENT AND FUTURE INDUSTRIAL APPLICATIONS 18, 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>
- Surel, C., Foucquier, J., Perrot, N., Mackie, A., Garnier, C., Riaublanc, A., Anton, M., 2014. Composition and structure of interface impacts texture of O/W emulsions. *Food Hydrocolloids, Food Colloids 2012: Creation and Breakdown of Structure* 34, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.016>
- Thomas, M.E.C., Scher, J., Desobry-Banon, S., Desobry, S., 2004. Milk powders ageing: effect on physical and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44, 297–322. <https://doi.org/10.1080/10408690490464041>
- Tolkach, A., Kulozik, U., 2007. Reaction kinetic pathway of reversible and irreversible thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. *Le Lait* 87, 301–315. <https://doi.org/10.1051/lait:2007012>
- Tolkach, A., Kulozik, U., 2005. Effect of pH and temperature on the reaction kinetic parameters of the thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin | Request PDF [WWW Document]. ResearchGate. URL [https://www.researchgate.net/publication/279598454\\_Effect\\_of\\_pH\\_and\\_temperature\\_on\\_the\\_reaction\\_kinetic\\_parameters\\_of\\_the\\_thermal\\_denaturation\\_of\\_b-lactoglobulin](https://www.researchgate.net/publication/279598454_Effect_of_pH_and_temperature_on_the_reaction_kinetic_parameters_of_the_thermal_denaturation_of_b-lactoglobulin) (accessed 8.22.19).
- Unterhaslberger, G., 2004. Contrôle de la dénaturation thermique et de l'agrégation de la B-lactoglobuline en présence de co-solutés : conséquences sur les propriétés moussantes (thesis). Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
- Verheul, M., Roefs, S.P.F.M., 1998. Structure of Particulate Whey Protein Gels: Effect of NaCl Concentration, pH, Heating Temperature, and Protein Composition. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4909–4916. <https://doi.org/10.1021/jf981100f>
- Vignolles ML, Lopez C, Le Floch C, Ehrhardt JJ, Méjean S, Jeantet R, Schuck P. 2010. Fat supramolecular structure in fat-filled dairy powders: a tool to adjust drying kinetics. *Dairy Sci Technol.* 90, 287-300



- Wolz, M., Mersch, E., Kulozik, U., 2016. Thermal aggregation of whey proteins under shear stress. *Food Hydrocolloids* 56, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.036>
- Zhu, 2011. Maîtrise du séchage de produits laitiers infantiles par la prise en compte des interactions eau-constituants.
- Zhu, P., Jeantet, R., Dolivet, A., Méjean, S., Schuck, P., 2009. Caractérisation du comportement d'une tour de séchage pilote: bilans massiques et thermiques.
- Zúñiga, R.N., Tolkach, A., Kulozik, U., Aguilera, J.M., 2010. Kinetics of Formation and Physicochemical Characterization of Thermally-Induced  $\beta$ -Lactoglobulin Aggregates. *Journal of Food Science* 75, E261–E268. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01617.x>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Etude bibliométrique sur Web of Science. Nombre de publications répondant au mots clés "Naturalness" (bleu) et "Clean Label" (vert) (A) et proportion de publications répondant au mot clé « dairy » parmi les publications répondant au mot clé « naturalness » (B). .....	5
<b>Figure 2</b> : Critères d'importance de la naturalité des aliments perçus par les consommateurs. Adapté de Romàn, Sanchez-Siles et Siegrist (2017).....	6
<b>Figure 3</b> : Composition du lait bovin. Adapté de Wong et al. (1988).....	7
<b>Figure 4</b> : Cracking du lait. Adapté de Schuck (2002).....	8
<b>Figure 5</b> : Modèle en 4 étapes de dissociation-dénaturation-agrégation-polymérisation de la $\beta$ lg. Adapté de Wijayanti et al. (2019).....	11
<b>Figure 6</b> : Représentation schématique d'Arrhénius. Adapté de Tolkach et Kulozik (2007).....	12
<b>Figure 7</b> : Impact de l'augmentation du pH sur le taux de dénaturation de la Blg en fonction de la température de travail. ....	13
<b>Figure 8</b> : Evolution du taux de dénaturation de $\beta$ lg en fonction de la concentration en NaCl après chauffage à 80°C d'une solution de $\beta$ lg à 10 g.L <sup>-1</sup> à pH 7,0. Adapté de Unterhaslberger (2004).....	14
<b>Figure 9</b> : Influence de la concentration en calcium sur les cinétiques de dépliement et d'agrégation de la $\beta$ lg. (Petit et al 2011). ....	14
<b>Figure 10</b> : Observation microscopique de différents agrégats de $\beta$ lg. Observation TEM de fibrilles (A), microgels (B) fractals (C) (Jung et al.,2008). Observation confocale d'agrégats microniques AMIs (D) (Schong et Famelart.,2018). ....	15
<b>Figure 11</b> : Zone de formation des agrégats fractals et microgels en fonction des conditions de pH et ratio $R=[\text{Calcium}]/[\beta\text{lg}]$ à une concentration de 60g.L <sup>-1</sup> . Les ronds représentent le ratio R limite en-dessous duquel des microgels sont formés, les losanges représentent le ratio limite R en-dessous duquel un précipité apparait. Le trait est un guide pour les yeux. Adapté de Phan Xuan (2004). ....	16
<b>Figure 12</b> : Diagramme d'état sol-gel de solutions de $\beta$ lg après traitement thermique. Adapté de Mehalebi (2008). ....	17
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique du processus de formation des agrégats fractals. Adapté de Nicolai, Britten et Schmitt (2011).....	18
<b>Figure 14</b> : Influence de la concentration en protéines sur la taille et la masse molaire des agrégats fractals. Adapté Kharlamova (2017).....	19
<b>Figure 15</b> : Masse molaire en fonction de la concentration en WPI (carrés) ou $\beta$ lg (ronds) formés en présence de 0.1M NaCl (blancs) ou en absence de sel (noirs). Adapté de Mahmoudi et al. (2007). ...	19

<b>Figure 16</b> : Viscosité en fonction de la concentration en agrégats fractals (symboles ouverts), en microgels (ronds noirs) et en $\beta$ lg (carrés rouges). Adapté de Inthavong (2016). .....	20
<b>Figure 17</b> : $G'$ en fonction du ratio $R = [\text{Calcium}]/[\text{Protéine}]$ et en fonction de la concentration en calcium. Images de microscopie confocale à balayage laser de gels formés à partir d'agrégats fractals ou microgels. Adapté de Kharlamova (2018). .....	21
<b>Figure 18</b> : Impact de la taille des agrégats fractals sur le diagramme d'état. (Kharlamova et al., 2018b). .....	22
<b>Figure 19</b> : Diagramme de texturation d'émulsions fabriquées à partir de WPI natif (PSN-CNM) et d'agrégats de PS (Ag-CNM). Les émulsions sont fabriquées à partir d'agrégats microgels (A) et d'agrégats fractals (B). Loiseleux (2018). .....	23
<b>Figure 20</b> : Stabilité d'émulsions préparées à partir de PS native (PSN) ou d'agrégats de PS présents dans la phase continue. Adapté de Chevallier (2017). .....	24
<b>Figure 21</b> : Schéma récapitulatif des différentes propriétés fonctionnelles des agrégats microgels et fractals représenté sous forme de podiums. ....	26
<b>Figure 22</b> : Représentation de la stabilité des aliments en fonction de l'activité de l'eau. Adapté de Labuza et al (1970). .....	28
<b>Figure 23</b> : Procédé de séparation sélective par filtration tangentielle (Jeantet 2011). .....	29
<b>Figure 24</b> : Principe de surconcentration et de dépôt à la membrane en filtration tangentielle. (Jeantet 2011). .....	30
<b>Figure 25</b> : Transferts couplés de chaleur et d'eau entre une gouttelette et l'air de séchage. (Jeantet et al. 2006). .....	30
<b>Figure 26</b> : Installation d'une tour de séchage. (Jeantet et al 2008). .....	31
<b>Figure 27</b> : Images à différents intervalles de temps de séchage pour des gouttelettes de PS (a) et de caséines (b) et images de microscopie à balayage associées (c et d). Les flèches représentent l'apparition de l'instabilité de flambement. (Sadek et al 2016). .....	32
<b>Figure 28</b> : Etapes de réhydratation d'une poudre. Adapté de Forny, Marabi et Palzer (2011). .....	34
<b>Figure 29</b> : Zone de formation des agrégats fractals et microgels en fonction des conditions de pH et ratio $R = [\text{Calcium}]/[\text{PS}]$ à une concentration de $60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Le trait est un guide pour les yeux. Les points rouge et bleu correspondent respectivement aux conditions de formation des mélanges 1 et 2. Adapté de Phan Xuan (2014). .....	44
<b>Figure 30</b> : Concentrations en protéines et sel testées pour les agrégats du mélange 1 et 2. ....	46
<b>Figure 31</b> : Représentation schématique de la ligne de production d'agrégats de protéines solubles. ....	47
<b>Figure 32</b> : Impact du temps de chauffage sur la dénaturation-agrégation irréversible des $\beta$ lg. ....	48
<b>Figure 33</b> : Essais réalisés en fonction du nombre de Reynolds et du temps de montée en température $RT_h$ . .....	50

<b>Figure 34</b> : Tours de séchage Minor (A) et Bionov (B).....	59
<b>Figure 35</b> : Représentation schématique du test de mouillabilité.....	61
<b>Figure 36</b> : Représentation schématique du test de dispersibilité. ....	61
<b>Figure 37</b> : Représentation schématique du test de solubilité. ....	62
<b>Figure 38</b> : Principe de fonctionnement de l'A4F.....	64
<b>Figure 39</b> : Représentation schématique de la mesure de facteur de forme $R_g/R_h$ d'une sphère et d'un polymère branché à partir du rayon de giration $R_g$ et du rayon hydrodynamique $R_h$ . Adapté de Wyatt Technology (document interne).....	66
<b>Figure 40</b> : Fractogramme type A4F (A) et représentation du facteur de forme $R_g/R_h$ (B). ....	68
<b>Figure 41</b> : Représentation schématique de la compression osmotique.(Pasquier 2016). ....	70
<b>Figure 42</b> : Diagramme d'état en fonction de la concentration en protéines et densité de charge $\alpha$ . (Kharlamova et al., 2018). ....	73
<b>Figure 43</b> : Elugrammes d'A4F des solutions d'agrégats des mélanges 1 et 2 représentant la concentration normalisée et le rayon de giration en fonction du temps d'élution. Le mélange 1 a été produite avec $50 \text{ g.kg}^{-1}$ de protéine, $10\text{mM}$ de $\text{NaCl}$ , à $\text{pH } 7$ , $\text{Re } 6900$ , $\text{RT}_h$ $7\text{s}$ et à $80^\circ\text{C}$ . Le mélange 2 a été produite avec $60 \text{ g.kg}^{-1}$ de protéines, $25\text{mM}$ $\text{NaCl}$ , $2 \text{ OH}^-/\text{protéine}$ , à $\text{Re } 6900$ , $\text{RT}_h$ $7\text{s}$ à $80^\circ\text{C}$ . ....	79
<b>Figure 44</b> : Observations en MET des solutions d'agrégats des mélanges 1 et 2 correspondant aux agrégats élués Figure 2. Les flèches indiquent la présence de microgels dans le mélange 1.....	81
<b>Figure 45</b> : Cartographie des points de fonctionnement des mélanges 1 (A) et 2 (B). Le trait en pointillé schématise la limite entre points de fonctionnement et gélification.....	82
<b>Figure 46</b> : Elugrammes d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 (A) et du mélange 2 (B) produits à différents teneurs en protéines et sel [ $P$ ; $\text{NaCl}$ ], indiquées sur la figure.....	83
<b>Figure 47</b> : Contrainte de cisaillement $\tau$ (mPa) en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) de la solution de PS avant traitement thermique ( $\circ$ ) et de la dispersion d'agrégats après traitement thermique ( $\Delta$ ) .....	85
<b>Figure 48</b> : Diagramme de Moody caractérisant le régime d'écoulement dans l'échangeur tubulaire de type tube à passage de courant utilisé pour la production des agrégats. La zone bleue met en évidence la zone de régime laminaire, la zone rouge, la zone de régime intermédiaire et la zone verte, la zone de régime turbulent.....	85
<b>Figure 49</b> : Elugrammes d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 produits avec différentes conditions de régime d'écoulement caractérisé par le nombre de Reynold ( $\text{Re}$ ) et le temps de montée en température ( $\text{RT}_h$ ). Les expériences ont été réalisées en duplicat et ont les mêmes tendances et valeurs moyennes.....	86

<b>Figure 50</b> : Elugramme d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 produits à Reynolds fixe de 6900 et à différents temps de montée en température $RT_h$ indiqués sur la figure. Les expériences ont été réalisées en duplicat et ont les mêmes tendances et valeurs moyennes. ....	88
<b>Figure 51</b> : Elugramme d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 produits à Reynolds fixe de 2000 et à différents temps de montée en température $RT_h$ indiqués sur la figure. Les expériences ont été réalisées en duplicat et ont les mêmes tendances et valeurs moyennes. ....	89
<b>Figure 52</b> : (A) Cercle de corrélation de l'analyse factorielle de donnée mixtes (FAMD). La corrélation entre les variables est indiquée par l'angle entre leur projection sur le cercle. (B) Projection des individus (points) sur le premier plan factoriel afin de les comparer et de les regrouper en fonction de leur similitude. Les parangons (individu le plus proche du centre d'une classe) sont aussi projetés (carrés).....	92
<b>Figure 53</b> : Elugrammes d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 produits à Reynolds fixe de 6900 et $RTh$ 7s, et à différentes températures indiquées sur la figure. Les expériences ont été réalisées en duplicat et ont les mêmes tendances et valeurs moyennes. Le taux de recouvrement pour l'échantillon à 90% est faible (< 70%). ....	93
<b>Figure 54</b> : Représentation d'Arrhenius de la dénaturation de la $\beta$ -lactoglobuline, représentative de celle des protéines du WPI utilisé dans cette étude. Les traits sont des guides pour les yeux. ....	95
<b>Figure 55</b> : Impact des profils de montée en température appliqués (fonction de $RT_h$ ) sur la formation d'espèces dépliées à 80°C. ....	96
<b>Figure 56</b> : schéma explicatif qualitatif de l'impact du régime d'écoulement sur la formation d'agrégats du mélange 1. ....	97
<b>Figure 57</b> : Principe de dénaturation-agrégation de la $\beta$ lg et formation des dépôts encrassants. ....	99
<b>Figure 58</b> : Evolution de la perte de charge au sein du tube à passage de courant au cours d'une production longue durée d'agrégats des mélanges 1 et 2.....	100
<b>Figure 59</b> : Diagramme d'état obtenu en compression osmotique pour les agrégats du mélange 1 (A) et du mélange 2 (B). Les flèches symbolisent les décompressions. En vert, échantillons liquide, en orange, échantillon visqueux et en rouge, échantillon gélifié. ....	103
<b>Figure 60</b> : (A) Elugrammes d'A4F des solutions d'agrégats du mélange 1 avant compression osmotique (trait plein), des échantillons de la phase solide obtenue après décompression osmotique (tirets) et de la phase liquide obtenue après décompression osmotique (pointillés) ; (B) Facteur de forme des échantillons avant compression osmotique (X) et des échantillons de la phase solide obtenue après décompression osmotique (o). ....	104
<b>Figure 61</b> : (A) Elugramme d'A4F et (B) facteur de forme des agrégats du mélange 1 concentrés à différents FRV puis redispersés. Les agrégats du mélange 1 ont été produits à 50g.L <sup>-1</sup> de protéine, 10mM de NaCl, pH 7, à Re 6900, $RTh$ 7s et à 85°C.....	106

- Figure 62** : (A) Elugrammes d'A4F et (B) facteur de forme des agrégats du mélange 1 avant et après séchage, après redispersion par homogénéisation. Les agrégats du mélange 1 ont été produits à  $50\text{g.L}^{-1}$  de protéine,  $10\text{mM}$  de NaCl, pH 7, à Re 6900,  $RT_h$  7s et à  $85^\circ\text{C}$ . Les traits rouge et vert représentent respectivement les Rg/Rh théorique de sphère et agrégats branchés..... 107
- Figure 63** : (A) Elugrammes d'A4F et (B) facteur de forme des agrégats du mélange 2 avant et après séchage-redispersion à  $900\text{tr.min}^{-1}$  durant 9h. Les agrégats du mélange 2 ont été produits à  $60\text{g.L}^{-1}$  de protéine,  $25\text{mM}$  de NaCl, pH 7 +  $2\text{OH}^-/\text{protéine}$ , à Re 6900,  $RT_h$  7s à  $80^\circ\text{C}$ . Les traits rouge et vert représentent respectivement les Rg/Rh théorique de sphère et agrégats branchés..... 108
- Figure 64** : (A) Elugrammes d'A4F et (B) facteur de forme des agrégats du mélange 1 avant et après séchage-redispersion par agitation à  $900\text{tr}/\text{min}$  pendant 4h ou après homogénéisation. Les agrégats du mélange 1 ont été produit avec  $50\text{g.L}^{-1}$  de protéine,  $10\text{mM}$  de NaCl, pH 7, à Re 6900 et  $RT_h$  7s à  $85^\circ\text{C}$ . ..... 110
- Figure 65** : (A) Elugrammes d'A4F et (B) facteur de forme des agrégats du mélange 2 après séchage-redispersion par agitation à  $900\text{tr}/\text{min}$  pendant 3h ou après homogénéisation. Les agrégats du mélange 2 ont été produit avec  $60\text{g.L}^{-1}$  de protéine,  $25\text{mM}$  de NaCl, pH 7+  $2\text{OH}^-/\text{protéine}$ , à Re 6900 et  $RT_h$  7s à  $80^\circ\text{C}$ ..... 110
- Figure 66** : Observations confocales des agrégats des mélanges 1 et 2 séchés à l'échelle Bionov et redispersés dans différentes conditions (agitation  $900\text{tr}/\text{min}$  9h ou homogénéisation 400 bar), quatre jours après production de la poudre (J+4) ou quatre mois après production de la poudre (M+4). Les agrégats du mélange 1 ont été produit avec  $50\text{g.L}^{-1}$  de protéine,  $10\text{mM}$  de NaCl, pH 7, à Re 6900 et  $RT_h$  7s à  $85^\circ\text{C}$ . Les agrégats du mélange 2 ont été produit avec  $60\text{g.L}^{-1}$  de protéine,  $25\text{mM}$  de NaCl, pH 7+  $2\text{OH}^-/\text{protéine}$ , à Re 6900 et  $RT_h$  7s à  $80^\circ\text{C}$ . ..... 111
- Figure 67** : Diagramme d'état obtenu en compression osmotique pour les agrégats du mélange 1 ( $\diamond$ ) et du mélange 2 (o). En vert, échantillons liquide, en orange, échantillon visqueux et en rouge, échantillon gélifié. Les modèles physiques de Van't Hoff et Carnahan Starling sont représentés..... 113
- Figure 68** : Evolution des modèle de Van't Hoff (A) et de Carnahan Starling (B) en fonction de la masse molaire des objets présents (M) et de leur volume spécifique (v) ..... 114
- Figure 69** : Diagramme d'état d'une solution d'agrégats ( $R_h = 77\text{nm}$ ) chauffée à  $80^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes représentant la densité de charge ou le pH en fonction de la concentration en protéines. Les losanges noirs indiquent la zone dans laquelle le système reste liquide ; les triangles verts, la zone dans laquelle le système gélifie ; les ronds rouges, la zone dans laquelle le système synérèse. (Kharlamova et al. 2018) La croix bleue indique les conditions dans lesquelles on se place dans cette expérience. .... 121
- Figure 70** : Module élastique des gels formés à  $65^\circ\text{C}$  par acidification d'une suspension d'agrégats à  $C = 60\text{g.L}^{-1}$  ;  $\alpha \approx 4,5$  et  $\text{pH} \approx 6,0$ , en fonction du temps. Les agrégats des mélanges 1 et 2 sont formés

au pilote, séchés sur la tour Minor et redispersés (A) ou sont formés à la paillasse selon le protocole de Kharlamova et al.( 2018) avec un $R_h = 35$ nm.....	122
<b>Figure 71</b> : Module élastique des gels formés à 65°C par acidification d'une suspension d'agrégats à $C = 60$ g.L <sup>-1</sup> ; $\alpha \approx 4,5$ et $pH \approx 6,0$ , en fonction du temps. Les agrégats des mélanges 1 et 2 produits au pilote, séchés soit sur la tour Minor soit sur la tour Bionov sont respectivement représentés en (A) et (B). .....	124
<b>Figure 72</b> : Factogrammes des agrégats du mélange 2 produits à des durées d'essais courtes ou longues en voie liquide.....	126
<b>Figure 73</b> : Représentation schématique de l'impact de l'augmentation de la durée d'essai sur la collecte d'une fraction à temps de séjour plus long. En vert, ce qui est collecté pour les essais courte durée ; en bleu ce qui est collecté après des essais longue durée. ....	126
<b>Figure 74</b> : Propriétés viscosifiantes des poudres à 20°C (Minor et Bionov) des mélanges d'agrégats (Mélanges 1 et 2) Dépendance de la Variation de la viscosité à cisaillement de $10^{-4}$ s <sup>-1</sup> en fonction de la concentration. Données des agrégats de paillasse issues de Inthavong et al., (2016). .....	128
<b>Figure 75</b> : Photos des émulsions en sortie d'homogénéisateur .....	130
<b>Figure 76</b> : Distribution de taille des gouttelettes de matière grasse des émulsions produites en présence d'agrégats des deux mélanges. L'émulsion est préparée à 100 bars avec 30%de MGLA. Les expériences ont été faites en triplicat.....	131
<b>Figure 77</b> :Schéma explicatif du phénomène de pontage de gouttelettes de matière grasse et d'individualisation des gouttelettes par la présence de SDS .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 78</b> : Schéma explicatif du pontage de gouttelette de matière grasse par des agrégats fractals de taille différente.....	132
<b>Figure 79</b> : Evolution du $G'$ des emulsions produites avec des agrégats de PS ou protéines natives en fonction du temps. Les expériences ont été réalisées en duplicat.à 60°C.....	133
<b>Figure 80</b> : Représentation schématique du nombre de connexions au sein d'un amas de gouttelettes. ....	134

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Agents de texture les plus fréquemment utilisés en industrie laitière .....	4
<b>Tableau 2</b> : caractéristiques des lots de poudres de WPI utilisés dans l'étude .....	43
<b>Tableau 3</b> : caractéristiques des tubes à passage de courant utilisés .....	45
<b>Tableau 4</b> : Caractéristiques des échangeurs utilisés .....	46
<b>Tableau 5</b> : Différentes conditions de process utilisés dans cette étude. ....	52
<b>Tableau 6</b> : Tableau récapitulatif des variables et modèles utilisés dans l'analyse de variance (ANOVA) .....	54
<b>Tableau 7</b> : Paramètres matière et procédé utilisés dans l'étude pour la production des agrégats du mélange 1 et 2. ....	56
<b>Tableau 8</b> : Caractéristiques des pilotes d'ultrafiltration utilisés.....	57
<b>Tableau 9</b> : Paramètres de séchage des assemblages protéiques.....	60
<b>Tableau 10</b> : Méthode de fractionnement A4F utilisée pour la caractérisation des agrégats avec $V_x$ le flux croisé et $V_d$ le flux d'élution laminaire et parabolique. ....	65
<b>Tableau 11</b> : Caractéristiques de l'élugramme A4F présenté Figure 2 comparant les fractions massiques, $R_g/R_h$ , Rayon de giration moyen et masse volumique apparente ( $\rho_{app}$ ) des deux mélanges. ....	80
<b>Tableau 12</b> : Rayon de giration des agrégats des deux mélanges produits à partir de différentes concentrations en protéines et NaCl.....	84
<b>Tableau 13</b> : Caractéristiques de l'élugramme A4F présenté Figure 7 comparant les fractions massiques, $R_g/R_h$ , Rayon de giration moyen et masse volumique apparente ( $\rho_{app}$ ) du mélange 1 dans différentes conditions de production. ). $lk$ représente la taille des tourbillons selon l'échelle de Kolmogorov. ....	87
<b>Tableau 14</b> : Caractéristiques de l'élugramme A4F présenté Figure 10 comparant les fractions massiques, $R_g/R_h$ , Rayon de giration moyen du mélange 1 dans différentes conditions de production ( $Re$ fixe et $RT_h$ différents). $lk$ représente la taille des tourbillons selon l'échelle de Kolmogorov.....	89
<b>Tableau 15</b> : Résultats d'analyse de variance (Sum Sq, F value et P-value) en fonction des variables réponse et explicative. (*), (**), (***) sont utilisés pour indiquer les réponses qui sont statistiquement significatives au niveau de 5 pour cent, 1 pour cent ou 1 pour mille respectivement. $RT_h$ est considéré comme facteur imbriqué étant donné qu'il varie avec $Re$ , il est noté $Re:RT_h$ . ....	90



<b>Tableau 16</b> : Caractéristiques de l'élugramme A4F présenté Figure 13 comparant les fractions massiques, $D_f$ , $R_g/R_h$ , Rayon de giration moyen du mélange 1 à différentes températures de production ( $Re$ et $RTh$ fixes).....	93
<b>Tableau 17</b> : Résultats d'analyse factorielle de données mixtes (Sum Sq, F value et P-value) en fonction des variables réponse et explicative. (*), (**), (***) sont utilisés pour indiquer les réponses qui sont statistiquement significatives au niveau de 5 pour cent, 1 pour cent ou 1 pour mille respectivement.....	94
<b>Tableau 18</b> : Comparaison du rayon de giration moyen maximum obtenus via trois leviers différents .....	98
<b>Tableau 19</b> : Valeurs caractéristiques du diagramme d'état présenté Figure 17 pour les mélanges 1 et 2.....	104
<b>Tableau 20</b> : Impact de la concentration par ultrafiltration sur la gélification des agrégats des différents mélanges.....	105
<b>Tableau 21</b> : $A_w$ , diamètre de particule, indices de mouillabilité, de dispersibilité et de solubilité des poudres de WPI et d'agrégats des mélanges 1 et 2. Les agrégats du mélange 1 ont été produits à 50 g.L-1 de protéine, 10mM NaCl, pH 7, $Re$ 6900, $RTh$ 7s et 85°C. Les agrégats du mélange 2 ont été produits à 60 g.L-1 de protéine, 25mM NaCl, pH 7 + 2OH- /protéine, $Re$ 6900, $RTh$ 7s et 80°C. ....	109
<b>Tableau 22</b> : Caractéristiques des agrégats des deux mélanges produits en continu et séchés, utilisés dans l'étude de la fonctionnalité.....	121

**Titre :** Conception d'itinéraires technologiques pour la production et la stabilisation par séchage d'assemblages protéiques fractals.

**Mots clés :** Protéines solubles, Agrégats fractals, Microgels, Séchage, Propriétés fonctionnelles

**Résumé :** Les agrégats fractals de protéines solubles thermo-induits ont des propriétés techno-fonctionnelles remarquables qui dépendent de leur taille (propriétés gélifiantes, viscosifiantes, de stabilisation et texturation d'émulsions). Il convient de produire ces agrégats très réactifs à l'échelle pilote, de manière continue et de les stabiliser par séchage en vue d'une application future. Deux solutions d'agrégats ont été produites selon un itinéraire technologique innovant (procédé, physicochimie) : la première est constituée d'un mélange d'agrégats fractals et d'agrégats sphériques peu réactifs (microgels) ; la seconde est constituée exclusivement de fractals. La teneur en protéines et NaCl permet de moduler la taille des agrégats du second mélange. Pour le premier, ces leviers n'ont pu être utilisés par risque de gélification au sein du pilote, et

l'influence de leviers procédés (régime d'écoulement, température de chauffe, temps de montée en température) sur la taille des agrégats a été étudiée. Le comportement et les propriétés des agrégats au cours de la concentration, du séchage et de leur redispersion ont également été étudiés. Si les agrégats du premier mélange restent stables au cours des étapes de concentration et séchage, une sur-agrégation a lieu pour les agrégats du second mélange conduisant à une diminution de leurs propriétés viscosifiantes, gélifiantes et de texturation d'émulsions. Pour conclure, il est difficile de stabiliser par concentration-séchage les agrégats fractals très réactifs. En revanche, la stabilisation d'un mélange d'agrégats fractals et microgels aux propriétés proches des agrégats purement fractals, a été démontrée.

**Title :** Designing innovative technological routes for the production and stabilization by drying of fractal protein aggregates.

**Keywords :** Whey protein, Fractal aggregates, Microgel, Drying, Functionnal properties

**Abstract :** Fractal heat-induced aggregates of whey protein have strong techno-functional properties depending on their size such as gel strengtening, thickening properties and the stabilization of emulsions. These very reactive aggregates need to be produced at a continuous pilot scale and to be stabilised by drying process for future application. Two solutions of aggregates were produced according to an innovative technological route (process, physicochemistry): the first one made up of a mix of fractal aggregates and not very reactive spherical aggregates (microgels), and the second one made up of pure fractals. The protein and NaCl content allow the modulation of second mix aggregates size. For the first one, these levers could not be used because of gelation within the pilot. The influence of process levers

(flow regime, heating residence time, heating temperature) on the aggregates size was studied. Behaviour and properties of the aggregates throughout the concentration, drying, and their redispersion have also been studied. Aggregates of the first mix remain stable during the concentration and drying steps, whereas a post-aggregation occurs for the aggregates of the second mix leading to a slight decrease of their capacity to increase viscosity, to gel and texture emulsions. To conclude, it is difficult to stabilize by concentration-drying the very reactive fractal aggregates. However, the stabilisation of a mix of fractal aggregates and microgels with properties close to the pure fractal aggregates was demonstrated.