



**HAL**  
open science

# Dynamique d'assemblage de protéines végétales et animales sous l'impact de contraintes physiques : influence sur leurs propriétés technofonctionnelles

Abdessalem Beghdadi

## ► To cite this version:

Abdessalem Beghdadi. Dynamique d'assemblage de protéines végétales et animales sous l'impact de contraintes physiques : influence sur leurs propriétés technofonctionnelles. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTG076 . tel-03608505

**HAL Id: tel-03608505**

**<https://theses.hal.science/tel-03608505>**

Submitted on 14 Mar 2022

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences des Aliments / Nutrition  
Biochimie et Physicochimie alimentaire

École doctorale GAIA

Unité de recherche IATE

**Dynamique d'assemblage de protéines végétales et  
animales sous l'impact de contraintes physiques :  
influence sur leurs propriétés techno-fonctionnelles**

Présentée par **Abdessalem BEGHDAI**  
Le 13 Décembre 2021

Sous la direction de  
**Sylvie MARCHESSEAU et Dominique CHEVALIER-LUCIA**

Devant le jury composé de

M. Rémi SAUREL, Professeur, AgroSup Dijon

Mme Marie DE LAMBALLERIE, Professeur, Oniris Nantes

M. Jordane JASNIEWSKI, Maître de conférences, ENSAIA Nancy

M. Attaf DJOULLAH, Chargé de recherches, CRDI Algérie

Mme Sylvie MARCHESSEAU, Professeur, Université de Montpellier

Mme Dominique CHEVALIER-LUCIA, Professeur, Université de Montpellier

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice

Co-directrice



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

## Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'unité mixte de recherche Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes (IATE) sur le site de l'université de Montpellier sous la direction du Pr. Sylvie Marchesseau et du Pr. Dominique Chevalier-Lucia. Cette thèse a bénéficié d'une bourse du gouvernement Algérien.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur le directeur Central de l'Intendance pour m'avoir accordé cette bourse et pour sa confiance m'ayant permis de réaliser cette thèse.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le directeur de la formation ainsi que tout le personnel de la direction Centrale de l'intendance d'Algérie.

Je tiens sincèrement à remercier Marie De Lamballerie, Professeur à Oniris Nantes et Jordane Jasniewski, Maître de Conférence à ENSAIA Nancy pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, au temps consacré à la lecture du manuscrit et aux soins portés à l'évaluation de ce travail. Mes plus vifs remerciements vont à Rémi Saurel, Professeur à AgroSup Dijon et Attaf Djoullah, HDR en Algérie pour avoir accepté d'examiner mes travaux et pour l'expertise apportée à cette thèse.

Les mots manquent pour exprimer ma gratitude envers Sylvie Marchesseau, ma directrice de thèse ainsi que Dominique Chevalier-Lucia, ma co-directrice, tant pour leur appui scientifique à mes travaux que pour leur présence tout au long de ce parcours.

J'exprime ma profonde reconnaissance et un remerciement particulier à mon encadrant Attef Djoullah pour ces encouragements et sa bonne humeur.

Merci également aux membres de l'équipe de recherche, Laetitia Picart-Palmade et Charles Cunault pour leur encadrement et encouragements durant les trois années de thèse.

Je voudrais aussi remercier tous mes collègues de l'équipe DySCo/IATE qui m'ont donné de près ou de loin leur appui et soutien moral et scientifique, plus particulièrement à Hugues Babeur, Claudine Charpentier, Remy Marcouire, Asma Bahri et Ruba Nasri.

Merci également à tous mes collègues en Algérie, ma famille, mes amis d'enfance et ceux que j'ai connu pendant cette expérience.

Un remerciement très particulier pour tout ce que j'ai de plus cher, à mes parents, à ma sœur, à mon beau-frère, à mon épouse et à ma fille Eline pour leur soutien inconditionnel, leur

encouragement et leur affection qui m'ont aidé à arriver à la fin de ce projet... merci à tous d'avoir toujours été là pour moi.

Des remerciements spéciaux à ma belle-famille et surtout à mon beau père à qui je dédie ce travail « repose en paix très cher ».

## Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I.....</b>	<b>7</b>
<b>Etat de l'art.....</b>	<b>7</b>
<b>I.1. Les protéines de pois.....</b>	<b>8</b>
I.1.1. Composition et structure des protéines de pois .....	10
I.1.1.1. Les globulines de pois.....	10
I.1.1.1.1. La légumine 11S.....	11
I.1.1.1.2. La viciline 7S .....	12
I.1.1.1.3. La conviciline 7S.....	13
I.1.1.2. Les albumines 2S de pois .....	13
I.1.1.3. prolamines et les glutélines de pois .....	135
I.1.2. Les procédés d'extraction des protéines de pois .....	16
I.1.2.1. Extraction par voie sèche .....	17
I.1.2.2. Extraction par voie humide .....	18
I.1.2.3. Fractionnement doux .....	19
I.1.3. Les propriétés techno-fonctionnelles des protéines de pois .....	19
I.1.3.1. La solubilité des protéines de pois .....	20
I.1.3.2. La capacité de rétention en eau des protéines de pois.....	25
I.1.3.3. Les propriétés émulsifiantes et moussantes des protéines de pois.....	25
I.1.3.4. Les propriétés de gélification.....	27
<b>I.2. Les protéines du lait bovin.....</b>	<b>48</b>
I.2.1. Composition et structure des protéines du lait.....	48
I.2.1.1. Les caséines et leur auto-assemblage en micelles de caséines.....	48
I.2.1.1.1. Les caséines $\alpha$ s.....	49
I.2.1.1.2. La caséine $\beta$ .....	50
I.2.1.1.3. La caséine $\kappa$ .....	50
I.2.1.1.4. Les micelles de caséines .....	51
I.2.1.2. Les protéines lactosériques .....	52
I.2.1.2.1. La $\beta$ -lactoglobuline .....	53

I.2.1.2.2. L'α-lactalbumine.....	55
I.2.1.2.3. La sérum albumine.....	56
I.2.2. Propriétés techno-fonctionnelles des protéines laitières.....	57
I.2.2.1. Les propriétés émulsifiantes .....	57
I.2.2.2. Les propriétés d'agrégation.....	58
I.2.2.2.1. Impact du traitement thermique sur l'agrégation.....	58
I.2.2.2.2. Impact de la haute pression dynamique (HPD) sur l'agrégation .....	61
I.2.2.3. Les propriétés de gélification.....	62
I.2.2.3.1. La gélification par traitement thermique.....	62
I.2.2.3.2. La gélification par acidification .....	64
I.2.2.3.3. La gélification enzymatique.....	65
I.2.2.3.4. La gélification par des procédés combinés .....	66
<b>I.3. Les interactions entre les protéines de pois et les protéines laitières .....</b>	<b>68</b>
I.3.1. Principaux travaux sur les interactions entre les protéines végétales et les protéines laitières.....	68
I.3.2. Influence des paramètres physico-chimiques sur l'interaction entre les protéines laitières et les protéines de pois.....	71
I.3.3. Fonctionnalisation des mélanges de protéines de lait et de protéines de pois par gélification.....	73
<b>Chapitre II .....</b>	<b>83</b>
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>83</b>
<b>II.1. Matériels.....</b>	<b>84</b>
II.1.1. Les isolats protéiques .....	84
II.1.2. Les produits chimiques utilisés .....	84
II.2. Préparation des dispersions initiales de protéines.....	85
II.2.1. Préparation des dispersions de protéines de pois .....	85
II.2.2. Préparation des dispersions de protéines lactosériques.....	85
II.2.3. Préparation des dispersions de phosphocaséines.....	85
<b>II.3. Procédés de traitement des dispersions de protéines .....</b>	<b>86</b>
II.3.1. Procédé de traitement thermique (TT) .....	86
II.3.2. Procédé de traitement par haute pression dynamique (HPD).....	88
<b>II.4. Analyses biochimiques et physico-chimiques des isolats et des dispersions protéiques .....</b>	<b>91</b>
II.4.1. Détermination de la teneur en matière sèche.....	91

II.4.2. Détermination de la teneur en matière minérale .....	91
II.4.3. Détermination de la teneur en protéines par le dosage de l'azote total .....	91
II.4.4. Détermination de la solubilité des protéines de pois .....	92
II.4.5. Analyse de la composition protéique par électrophorèse PAGE .....	94
II.4.6. Analyse enthalpique différentielle.....	95
II.4.7. Détermination de la taille des particules par spectroscopie par corrélation de photons (PCS) .....	96
II.4.8. Détermination de la charge de surface ou le potentiel Zeta ( $\zeta$ ) des particules .....	98
II.4.9. Détermination de la quantité de groupes sulfhydryles libres (-SH) et de ponts disulfures (SS).....	99
II.4.10. Détermination de l'hydrophobicité de surface des protéines .....	101
<b>II.5. Gélification par acidification chimique de dispersions protéiques et caractérisation des gels obtenus .....</b>	<b>102</b>
II.5.1. Suivi de la cinétique de gélification par acidification chimique .....	102
II.5.2. Caractérisation rhéologique des gels .....	102
II.5.3. Caractérisation de la texture des gels .....	103
II.5.4. Détermination de la capacité de rétention en eau des gels .....	104
II.5.5. Etude de la microstructure des gels par microscopie électronique à balayage .....	104
<b>II.6. Etude de la stabilité des gels .....</b>	<b>105</b>
III.6.1. Etude de la stabilité des gels par ajout d'un agent dissociant .....	105
III.6.2. Etude de la stabilité des gels en fonction du temps.....	106
II.7. Analyse statistique des données .....	106
<b>Chapitre III.....</b>	<b>107</b>
<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>108</b>
<b>III.1. Caractérisation physico-chimique des isolats et des dispersions de protéines et optimisation de la solubilité des protéines de pois .....</b>	<b>109</b>
III.1.1. Caractérisation physico-chimique des isolats de protéines de pois, de protéines lactosériques et de phosphocaséines natives .....	109
III.1.1.1. Composition biochimique des isolats protéiques .....	109
III.1.1.2. Profils PAGE des isolats protéiques.....	111
III.1.1.3. Propriétés thermodynamiques des isolats protéiques .....	113
III.1.1.4. Détermination de la distribution de taille des particules des dispersions protéiques .....	114
III.1.1.5. Analyse de la charge de surface des protéines .....	116

<b>Synthèse .....</b>	<b>118</b>
III.1.2. Optimisation de la solubilité des protéines de l'isolat de pois .....	119
III.1.2.1. Etude de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction du pH.....	121
III.1.2.2. Etude de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction de la concentration en sel NaCl .....	123
III.1.2.3. Etude de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction du milieu de dispersion .....	125
III.1.2.4. Etude de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction de la concentration initiale en protéines.....	126
III.1.2.5. Etude de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction de la vitesse de centrifugation.....	127
<b>Synthèse... .....</b>	<b>131</b>
<b>III.2. Influence des conditions du traitement thermique sur la formation d'interactions micelles de caséines-protéines de pois et micelles de caséines-protéines lactosériques, puis sur la gélification acide de ces assemblages .....</b>	<b>132</b>
III.2.1. Impact du traitement thermique sur les interactions entre protéines et les propriétés de gélification acide d'un système mixte de micelles de caséine et de protéines de pois solubles (Article 1).....	134
<b>1. Introduction.....</b>	<b>135</b>
<b>2. Materials and methods .....</b>	<b>135</b>
2.1. Materials.....	137
2.2. Proximate composition analysis.....	138
2.3. Preparation of single protein dispersions .....	139
2.4. Preparation of heat-treated protein mixtures .....	139
2.5. Particle size distribution by photon correlation spectroscopy.....	140
2.6. Determination of sulfhydryl group content .....	141
2.7. Surface hydrophobicity .....	141
2.8. Polyacrylamide gel electrophoresis.....	142
2.8.1. Native-PAGE.....	142
2.8.2. SDS-PAGE .....	142
2.9. Rheological measurements.....	143
2.10. Texture analysis of gels.....	143
2.11. Gel water-holding capacity .....	143
2.12. Statistical analysis .....	144
<b>3. Results and discussion .....</b>	<b>145</b>

3.1. Effect of the heat treatment protocols on single proteins and protein mixtures properties.....	145
3.1.1. Effect of the heat treatment on single proteins.....	145
3.1.2. Effect of heat treatments on CM-PP and CM-WP mixtures.....	152
3.2. Acid gelation of heat-treated protein mixtures.....	154
3.2.1. Rheological behavior of heat-treated protein mixtures.....	154
3.2.2. Texture and water holding capacity of acid gels.....	157
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>159</b>
III.2.2. Évaluation de la stabilité des gels acides mixtes .....	160
III.2.2.1. Etude de la stabilité des gels par ajout d'un agent dissociant .....	161
III.2.2.2. Etude de la stabilité des gels en fonction du temps.....	166
<b>Synthèse.....</b>	<b>168</b>
<b>III.3. Influence du traitement par haute pression dynamique sur les propriétés physicochimiques des protéines de pois et sur leurs propriétés de gélification dans le mélange micelles de caséines-protéines de pois.....</b>	<b>172</b>
III.3.1. Impact du traitement dynamique à haute pression sur les modifications des protéines globulaires et les propriétés de gélification acide du mélange micelles de caséines-protéines de pois comparé aux micelles de caséines-protéine lactosériques (Article 2).....	174
<b>1. Introduction.....</b>	<b>175</b>
<b>2. Material and methods.....</b>	<b>179</b>
2.1. Materials.....	179
2.2. Globular and casein protein dispersions preparation .....	180
2.3. Dynamic high-pressure processing (DHP) of globular protein dispersions.....	180
2.4. Heat treatment processing .....	181
2.5. Particle size distribution by photon correlation spectroscopy (PCS).....	182
2.6. Determination of sulfhydryl groups (SH) and disulfide bond (SS) .....	182
2.7. Surface hydrophobicity .....	183
2.8. ANS fluorescence analysis.....	183
2.9. Native Polyacrylamide gel electrophoresis .....	184
2.10. Rheological measurements.....	184
2.11. Morphology observation by scanning electron microscopy .....	184
2.12. Statistical analysis .....	185
<b>3. Results and discussion .....</b>	<b>186</b>
3.1. Effect of dynamic high-pressure (DHP) on pea protein dispersion properties ....	186

3.2. Effect of dynamic high-pressure on whey protein dispersion properties.....	191
3.3. Characterization of heat-treated mixtures of pea or whey proteins with casein micelles: effect of dynamic high-pressure pre-treatment of pea and whey dispersions .....	193
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>201</b>
<b>Synthèse.....</b>	<b>203</b>
<b>Conclusions générales et perspectives .....</b>	<b>206</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>210</b>

## Liste des figures

### Figures du chapitre I

<b>Figure I.0.</b> Synthèse des objectifs de la thèse et de l'enchaînement des différentes phases du projet.....	4
<b>Figure I.1.</b> Composition et structure des principales protéines de pois.....	10
<b>Figure I.2.</b> Modèle du monomère de la légumine (11S) de protéines de pois et de son association avec d'autres monomères pour donner la structure quaternaire.....	11
<b>Figure I.3.</b> Modèle de la structure quaternaire du trimère (~ 150 kDa) de la viciline (7S) de pois.....	12
<b>Figure I.4.</b> Schéma de la région d'extension N-terminale hautement chargée (résidus 1-122) présente dans les molécules de conviciline.....	13
<b>Figure I.5.</b> Principales voies d'extraction de protéines de pois jaune .....	16
<b>Figure I.6.</b> Relations entre les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines .....	19
<b>Figure I.7.</b> A: Modèle à structure ouverte de la micelle de caséine ; B: Modèle Hard-sphère.....	52
<b>Figure I.8.</b> Impact du pH et de la température sur la structure et la conformation de la $\beta$ -lactoglobuline.....	54
<b>Figure I.9.</b> Impact du pH et de la température sur la structure et la conformation de l' $\alpha$ -lactalbumine.....	56
<b>Figure I.10.</b> Schéma des différents mécanismes de formation des agrégats de protéines lactosériques et/ou de complexes micellaires dans le lait suite au traitement thermique.....	60
<b>Figure I.11a.</b> Température critique de gélification des mélanges de micelles de caséines à 6% (p/p) et de protéines globulaires en fonction de la teneur de ces dernières, à savoir les protéines lactosériques (WP), des protéines de pois (PP) et des protéines de soja (SP).....	75
<b>Figure I.11b.</b> Augmentation de la température critique de gélification ( $T_c$ ) des micelles de caséines en présence de protéines globulaires.....	75
<b>Figure I.12.</b> Représentation graphique du module de stockage $G'$ en fonction de la température pour les mélanges (a) micelles de caséines-protéines lactosérique (WP), (b) micelles de caséines-protéines de pois (PP), (c) micelles de caséines-protéines de soja (SP).....	76
<b>Figure I.13.</b> Évolution du module de stockage ( $G'$ ) en fonction du pH des gels obtenus par acidification au GDL (0,68 % (p/v) à 25 °C/10h) des dispersions d'agrégats mixtes de globulines de pois et de $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ lg) à une concentration totale de 4 % (p/p).....	79
<b>Figure I.14.</b> Module de stockage ( $G'$ ) en fonction du temps pour les gels obtenus à partir de dispersions de protéines de pois (bleu : 7,4 %, p/p) et (bleu : 14,8 %, p/p), de protéines de lait (marron : 7,4 %, p/p) et (marron : 14,8 %, p/p) et leurs mixtes (vert) suite à (a) des traitements thermiques, (b) des traitements enzymatiques et (c) des traitements acides. La rampe de traitement thermique est représentée en gris.....	81
<b>Figure I.15.</b> Schéma descriptif représentant le comportement de gélification des protéines de pois dans un système mixte avec des protéines lactosériques (sphères oranges) ou des micelles de caséines (sphères noires et blanches) pendant les traitements thermiques et/ou par acidification.....	82

## Figures du chapitre II

<b>Figure II.1.</b> Schéma des deux protocoles de traitement thermique réalisés pour l'étude de l'association des protéines solubles de pois (PP) ou de lactosérum (WP) aux micelles de caséine (CM).....	87
<b>Figure II.2.</b> Homogénéisateur HPD (modèle FPG7400H de Stansted Fluid Power) (a), Schéma du pilote. Le liquide non homogénéisé est pompé vers l'intensificateur haute pression (2), pressurisé (3) et forcé à travers les valves haute pression (5) puis basse pression (6) (b) et schéma de la valve HP Stansted utilisée (c). .....	89
<b>Figure II.3.</b> Schéma du dispositif simplifié du principe de la diffusion dynamique de lumière. ....	97
<b>Figure II.4.</b> Schéma réactionnel de la réduction du DTNB.....	99
<b>Figure II.5.</b> Texturomètre TA-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, Royaume-Uni) (a) sonde type back-extrusion (b) enregistrement de la force en fonction du temps (les paramètres de la texture des gels étudiés sont encadrés en rouge) (c). ....	103

## Figures du chapitre III

<b>Figure III.1.</b> Synthèse des objectifs et de l'organisation des analyses réalisées dans la première partie du travail. ....	108
<b>Figure III.2.</b> Profils électrophorétiques en conditions natives (A : native-PAGE 4-10 %), dénaturantes (B : SDS-PAGE 4-12 %) et dénaturantes et réductrices (C : SDS+Msh-PAGE 4-12 %) des isolats de protéines de pois (PP), de protéines lactosériques (WP) et de phosphocaséines natives (PCN). ....	111
<b>Figure III.3.</b> Thermogrammes de la dispersion de protéines de pois solubles (PP, 1,67 % (p/p)) et de la dispersion de protéines lactosériques (WP, 3 % (p/p)) préparées dans l'eau ultrapure (pH 6,7). Chauffage à 1°C/min. ....	113
<b>Figure III.4.</b> Distribution de la taille des dispersions de protéines solubles de pois (PP), de protéines lactosériques (WP) dans l'eau et de micelles de caséines (CM) dans le SMUF à pH 6,7. Les mesures de tailles ont été réalisées à 25 °C. ....	115
<b>Figure III.5.</b> Potentiel Zêta ( $\xi$ ) des dispersions de protéines solubles de pois, de protéines lactosériques dans l'eau et de micelles de caséines dans du SMUF à pH 6,7. ....	117
<b>Figure III.6.</b> Profil de solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial S85F (4 % (p/p)) dispersées dans l'eau ultrapure en fonction du pH. Une image correspondant à la solubilité des échantillons aux différents pH est représentée sur la figure. ....	122
<b>Figure III.7.</b> Profil de solubilité des dispersions de protéines pois (4 % (p/p)) dans l'eau ultrapure en fonction de la concentration NaCl à pH 7 et 8. ....	123
<b>Figure III.8.</b> Solubilité des dispersions de protéines de pois (4 % (p/p)) en fonction de la nature du milieu de dispersion (tampon phosphate 10 mM, eau ultrapure, SMUF), de la force ionique (0 ou 5 mM de NaCl) et du pH (6,7 ; 7 et 8). a, b, c : différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les échantillons. ....	125
<b>Figure III.9.</b> Fonction linéaire de la concentration des protéines solubles de pois dans l'eau ultrapure en fonction des concentrations de dispersions natives à pH 6,7.....	127
<b>Figure III.10.</b> Profils électrophorétiques en conditions natives (A : native-PAGE 4-10 %), dénaturantes (B : SDS-PAGE 4-12 %) et dénaturantes et réductrices (C : SDS+Msh-PAGE 4-12 %) des fractions solubles d'isolats de	

protéines de pois et de protéines lactosériques (PP1 et WP1) et (PP2 et WP2) respectivement après centrifugations à 12 000 et 149 000 x g.....	129
<b>Figure III.11.</b> Démarche expérimentale adoptée pour l'étude de l'impact du traitement thermique sur l'agrégation mixte et son influence sur la gélification par acidification.....	133
<b>Figure III.12.</b> Schema of the two protocols carried out to study the association of soluble pea (PP) or whey (WP) proteins to casein micelles (CM).....	140
<b>Figure III.13.</b> Particle size distribution curves in light intensity (a, c, e, g) or in particle number frequency (b, d, f, h) of (a, b) untreated dispersions (PP: soluble pea protein dispersed in ultrapure water, WP: whey protein dispersed in ultrapure water, CM: casein micelle dispersed in SMUF at pH 6.7), (c, d) pre-heated dispersions (PP HT: pre-heated soluble pea proteins, WP HT: pre-heated whey proteins, CM HT: pre-heated casein micelles), (e, f) untreated and heated casein micelle-pea protein mixtures at 4% (w/w) total protein concentration and 7.5:2.5 protein ratio.....	147
<b>Figure III.14.</b> Electrophoretic patterns of (a) native PAGE, (b, d) SDS-PAGE in non-reducing condition and (c,e) SDS-PAGE in reducing condition of control and pre-heated PP (PP HT), WP (WP HT), CM (CM HT) dispersions (step 1 protocol 2) and mixtures of PP or WP with CM (2.5:7.5 protein ratio with 4% (w/w) total protein concentration) treated according to protocol 1 or protocol 2.....	150
<b>Figure III.15.</b> Surface thiol groups (a) and disulfide bonds (b) of untreated pea protein (PP), whey protein (WP) and casein micelle (CM), heated (85 °C for 1h) pea protein (PP HT), whey protein (WP HT) and casein micelle (CM HT) and mixtures CM-PP and CM-WP treated by the two heat treatment protocols: protocol 1 (P1) and protocol 2 (P2). Means of triplicate plus standard deviation are shown. Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).....	153
<b>Figure III.16.</b> Surface hydrophobicity of untreated pea protein (PP), whey protein (WP) and casein micelle (CM), heated (85 °C for 1h) pea protein (PP HT), whey protein (WP HT) and casein micelle (CM HT) and mixtures.....	154
<b>Figure III.17.</b> Evolution of $\tan \delta$ ( $G''/G'$ ) as a function of pH during acidification of the different samples. Acidification carried out with 2% (w/w) GDL for 5h at 25 °C.....	156
<b>Figure III.18.</b> Representative acidification kinetics of heat-treated casein micelle (CM HT), casein micelle-pea protein mixture (CM-PP) and casein micelle-whey protein mixture (CM-WP) treated by the two heat treatment protocols.....	156
<b>Figure III.19.</b> Water holding capacity (a), gel firmness (b) and gel viscosity index (c) of acid-induced gels from heat treated casein micelle (CM HT), casein micelle-pea protein mixture (CM-PP) and casein micelle-whey protein mixture (CM-WP) treated by the two heat treatment protocols.....	158
<b>Figure III.20A.</b> Représentation des différents échantillons de mixtes micelles de caséine (CM) et protéines de pois (PP) ou protéines lactosérique (WP) notés CM-PP ou CM-WP, acidifiés à pH 4,6 ou non (pH 6,7), ayant subi ou pas de traitement thermique à 85 °C et pendant 1 h (TT ou non TT).....	162
<b>Figure III.20B.</b> Effet de l'action dissociante (solution de SDS) sur la solubilité des protéines issues de différentes dispersions : impact du traitement thermique et de l'acidification sur la nature des interactions et sur la rigidité des gels.....	163

<b>Figure III.21.</b> Comparaison de la stabilité des gels dans le temps après 1 jour (Gris foncé) et 7 jours (Gris clair) de stockage à 4 °C pour l'étude des propriétés suivantes : (a) : la capacité de rétention d'eau (%), (b) : la fermeté du gel (g) et (c) : l'indice de viscosité du gel (g.s).....	166
<b>Figure III.22.</b> Démarche expérimentale adoptée pour l'étude du double impact de la HPD et du traitement thermique sur l'agrégation mixte et leur influence sur la gélification par acidification.....	173
<b>Figure III.23.</b> Schematic representation of the dynamic high-pressure homogenizer.....	181
<b>Figure III.24.</b> Particle size distribution curves in light intensity frequency (a) or in particle number frequency (b) of PP dispersion (1.7%, w/w, pH 6.7) after DHP at 100–300 MPa (single pass P 300 P1), or at 300 MPa with two or three passes (P 300 P2, P 300 P3) realized by photon correlation spectroscopy at 25 °C. ....	187
<b>Figure III.25.</b> Electrophoretic patterns of native 4–10% PAGE of native pea dispersion (PP) and PP dispersion treated by one single pass at a dynamic high pressure of 100 (P 100), 200 (P 200), 300 (P 300) MPa.....	189
<b>Figure III.26.</b> Temperature measured before the HP valve, at the HP valve outlet and after immediate cooling at the HP valve outlet, (a): during DHP at 100–300 MPa and one pass for PP and (b): during DHP at 300 MPa and recycling at 1–3 passes (P1, P2, P3) for PP and WP.....	191
<b>Figure III.27.</b> Particle size distribution curves in light intensity frequency (a) or in particle number frequency (b) of WP dispersion (10%, w/w, pH 6.7) after DHP at 300 MPa and one, two or three homogenization passes. Measurements were carried out by photon correlation spectroscopy at 25 °C.....	192
<b>Figure III.28.</b> Particle size distribution curves (a–b) for CM dispersion, (CM-P 300 P3) HT and (CM-PP) HT, (c–d) CM dispersion, (CM-W 300 P1) HT and (CM-WP) HT. Measurements were carried out by photon correlation spectroscopy at 25 °C and size distribution curves were given in light intensity frequency (a, c) or in particle number frequency (b, d).....	194
<b>Figure III.29.</b> Scanning electron micrographs of dispersions of: heated CM (control), (a-e) (CM-PP) HT, (b-f) (CM-P 300 P3) HT, (c-g) (CM-WP) HT and (d-h) (CM-W 300 P1) HT at two magnifications 40 000 × and 100 000 ×, respectively.....	196
<b>Figure III.30.</b> (a) Representative acidification kinetics as a function of time (s) of gels.....	198
<b>Figure III.31.</b> Synthèse schématisant les résultats obtenus pour les traitements par haute pression dynamique (HPD) et/ou traitement thermique (TT) des protéines globulaires, des micelles de caséine et des mixtes.....	204

## Liste des tableaux

### Tableaux du chapitre I

<b>Tableau I.1.</b> Caractéristiques biochimiques des différentes familles de protéines de pois jaune. ....	9
<b>Tableau I.2.</b> Composition moyenne en acides aminés des fractions d'albumines, de légumine et de vicilines du pois jaune. ....	15
<b>Tableau I.3.</b> Principaux travaux sur la solubilité d'isolats de protéines de pois. ....	22
<b>Tableau I.4.</b> Synthèse des principaux travaux de recherches sur la gélification (thermique, acide et enzymatique) de protéines de pois. ....	29
<b>Tableau I.5.</b> Propriétés physicochimiques des principales protéines du lait. ....	49
<b>Tableau I.6.</b> Synthèse des travaux portant sur les propriétés d'agrégation et de gélification de systèmes mixtes : protéines laitières-protéines végétales. ....	69
<b>Tableau I.7.</b> Propriétés rhéologiques des gels obtenus par acidification des dispersions d'agrégats mixtes et de mélanges d'agrégats du couple globuline de pois/ $\beta$ -lactoglobuline. ....	79

### Tableaux du chapitre II

<b>Tableau II.1.</b> Composition chimique de l'ultrafiltrat de lait synthétique SMUF. ....	86
--	----

### Tableaux du chapitre III

<b>Tableau III.1.</b> Composition biochimique des isolats de protéines de pois (PPI, S85F, Roquette Frères), de protéines lactosériques (WPI, Prolacta 90, Lactlis) et de phosphocaséines natives (PCN, Promilk 852B, Ingredia). ....	110
<b>Tableau III.3.</b> Récapitulatif des paramètres d'optimisation étudiés pour maximiser la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial S85F. ....	121
<b>Tableau III.4.</b> Solubilité de dispersion de protéines de pois (5 %, p/p) dans l'eau ultrapure à pH 6,7 en comparaison avec celle de la dispersion de protéines lactosériques (3 %, p/p) dans les mêmes conditions en fonction de la vitesse de centrifugation. ....	128
<b>Tableau III.5.</b> Synthèse des conditions de dispersion des protéines de pois sélectionnés afin de maximiser la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial. ....	130
<b>Tableau III.6.</b> Proximate composition of commercial pea isolate (PPI), whey protein isolate (WPI) and native phosphocasein (PCN) powder. ....	138
<b>Tableau III.7.</b> Particle size characteristics of untreated pea protein (PP), whey protein (WP) and casein micelle (CM) dispersions, heated (85 °C for 1h) pea protein (PP HT), whey protein (WP HT) and casein micelle (CM HT) dispersions, the untreated mixtures (CM-PP and CM-WP) and the mixtures obtained by the two heat treatment protocols: protocol 1 (P1) and protocol 2 (P2). ....	148

<b>Tableau III.8.</b> Rheological parameters of acid-induced gelation (2% (w/w) GDL at 25 °C) of heated casein micelle dispersion (CM HT, 3%, (w/w)), (CM-PP) and (CM-WP) mixtures (4 % (w/w) total protein and 7.5:2.5 protein ratio) heat-treated according to the protocol 1 (P1) and protocol 2 (P2).....	157
<b>Tableau III.9.</b> Proximate composition of commercial pea isolate, whey protein isolate and native phosphocasein powder.....	179
<b>Tableau III.10.</b> Particle size characteristics of PP dispersion, their DHP treated samples at 100, 200 or 300 MPa and at 300 MPa for one (P1), two (P2) or three (P3) passes or WP dispersion, their DHP treated samples at 300 MPa for one, two or three homogenization passes.....	187
<b>Tableau III.11.</b> ANS fluorescence, surface hydrophobicity ( $H_0$ ), surface SH and S-S content of PP dispersion after DHP single pass at 100, 200 and 300 MPa, and after DHP at 300 MPa with two or three passes. WP dispersion after DHP at 300 MPa and one pass is also presented..	191
<b>Tableau III.12.</b> Particle size characteristics of CM dispersions, their heat-treated sample and their mixtures with PP or WP dispersions or with DHP-treated PP at 300 MPa and three passes or with DHP-treated WP at 300 MPa and one pass obtained with or without heat treatment protocol. ....	195
<b>Tableau III.13.</b> Rheological parameters of acid-induced gelation of heated pea protein dispersion (PP HT, 1% (w/w)), heated whey protein dispersion (WP HT, 1% (w/w)), heated casein micelle dispersion (CM HT, 3% (w/w)), PP and WP DHP treated dispersions, (CM-PP) and (CM-WP) non-heated and heat-treated mixtures .....	199

## Abréviations

BSA : Albumine sérique bovin

CM : Micelles de caséines

CMG : Concentration minimale de gélification

DSC : Dynamic scanning calorimetry / Analyse enthalpique différentielle

DTT : Dithiothréitol

G' : Module de stockage

GDL : Glucono- $\delta$ -lactone

HPD : Haute pression dynamique

HT : Traitement thermique

Msh: 2-Mercaptoéthanol

M<sub>w</sub>: Poids moléculaire / molecular weight

PCN : Phosphocaséines natives

PCS : Photon correlation spectroscopy

pI : pH isoélectrique

PP : Protéines de pois

PPI : Isolat de protéines de pois

Rpm : Rotations par minute

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis

SMUF : Simulated milk ultrafiltrate / ultrafiltrat de lait simulé

T<sub>d</sub>: Température de dénaturation

T<sub>onset</sub>: Température de début de dénaturation

TGase (ou MTGase) : Transglutaminase ou Microbial Transglutaminase

WP : Protéines lactosériques

WPI : Isolat de protéines lactosériques

$\Delta H_d$ : Enthalpie de dénaturation

# **Introduction générale**

## **Introduction générale**

A ce jour, même si des changements dans les habitudes alimentaires semblent s'installer et que la prise de conscience environnementale est réelle, la proportion des protéines animales consommées dans le cadre de l'alimentation humaine dans les pays occidentaux reste encore en grande majorité d'origine animale. Cette production de protéines animales a un impact négatif sur l'environnement, l'évolution du climat et le bien-être animal. En effet, les élevages ont à la fois besoin de ressources naturelles telles que l'eau et des surfaces arables pour cultiver l'alimentation nécessaire au bétail, mais ont aussi besoin d'énergie qui sont à l'origine d'une forte émission de gaz à effets de serre. De plus, cette consommation de protéines animales en quantités importantes peut avoir un impact négatif sur la santé humaine, dont le développement de maladies telles que l'obésité, les maladies cardiovasculaires, les troubles neurodégénératifs etc.

En conséquence, des politiques nationales et internationales se sont développées afin de réduire la consommation de ces protéines non éco-responsables. Ainsi, pour relever ce défi mais aussi assurer les besoins globaux en protéines en accord avec l'évolution démographique prévue pour les prochaines dizaines d'années, il est nécessaire de favoriser des sources protéiques d'origine végétale caractérisées par une bonne accessibilité, de faibles coûts de production et une plus faible incidence environnementale.

Cependant, en plus de la réticence des consommateurs à adopter des produits à base de protéines végétales dans leur alimentation en raison de leurs propriétés organoleptiques peu attractives et des habitudes ancrées, les principales causes de leur désintéressement sont liées à la faible valeur nutritionnelle des protéines végétales, en particulier leur déficit en acides aminés essentiels et leurs propriétés fonctionnelles limitées. Face à cela, des stratégies sont mises en place pour favoriser le rééquilibrage des apports protéines animales/végétales pour assurer en particulier un apport complet en acides aminés essentiels.

Pour répondre à ce défi, l'association de protéines d'origine végétale à des protéines d'origine animale, telles que les protéines laitières, représente une réelle opportunité pour réduire partiellement la consommation de protéines animales tout en augmentant l'acceptation de la consommation de protéines végétales par les populations. Ce défi permet aujourd'hui d'imaginer de nouveaux ingrédients ou produits alimentaires, énergétiquement viables pour l'environnement, nutritionnellement intéressants et sensoriellement bien acceptés par les populations.

La majorité des recherches développées ces dernières années dans cette optique se sont particulièrement intéressées aux protéines de soja comme principales sources de substitution des protéines du lait, justifiée par leurs hautes valeurs techno-fonctionnelles. Pourtant, cette ressource protéique est connue pour posséder une quantité assez importante de composés antinutritionnels en plus de leurs propriétés allergènes largement documentées. En conséquence, l'attention des chercheurs et des industriels s'est récemment portée sur d'autres sources de protéines végétales telles que les protéines de pois, de colza, de fèves ou encore de pomme de terre. Parmi ces différentes ressources végétales, les protéines de pois se sont rapidement imposées comme les principales protéines alternatives aux protéines de soja en raison de leur équilibre nutritif, leur hypoallergénicité, leur bonne digestibilité. Ainsi, le pois dont le rendement en protéines (20-28 %) est considéré satisfaisant est devenu une légumineuse à destination de l'alimentation humaine largement cultivée en Europe (~ 48 % à l'échelle mondiale avec une production de plus de 5000 milliers de tonnes/an). La France est d'ailleurs le premier producteur de pois dans l'union européenne et le sixième producteur mondial derrière le Canada, la Russie, la Chine, l'Inde et les États-Unis (**FOP, 2015**).

Néanmoins, l'association de protéines de pois à des protéines laitières afin de développer de nouveaux assemblages d'intérêt pour l'industrie agroalimentaire nécessite à l'heure actuelle des travaux de recherche pour mieux comprendre ces systèmes associant protéines végétales et protéines animales. Peu de littérature s'intéresse à la nature des interactions mises en place entre ces deux types de protéines et à leur impact sur les propriétés fonctionnelles de ces assemblages. Bien que les phénomènes d'interaction, d'agrégation et de gélification des protéines laitières et des protéines de pois aient été largement étudiés séparément, peu d'études ont été consacrées au processus d'association des protéines de ces deux sources pour élaborer des complexes mixtes et ensuite les utiliser pour développer des propriétés fonctionnelles ciblées telles que la gélification.

Cette thèse de doctorat a donc pour objectif d'étudier les conditions optimales à appliquer pour fonctionnaliser des protéines laitières avec des protéines de pois afin générer de nouveaux assemblages permettant d'élaborer des gels mixtes aux propriétés fonctionnelles intéressantes. Pour cela, une fraction soluble de protéines de pois issue d'isolat commercial de protéines a été associée à des micelles de caséines en remplacement des protéines solubles de lait, les protéines lactosériques. Ainsi, ce travail a permis d'étudier l'influence de paramètres physiques (traitement thermique, traitement par haute pression dynamique) et physicochimiques (forces ioniques, compositions biochimiques) sur le comportement des

protéines solubles de pois d'une part et sur la capacité et les modalités d'interaction avec les micelles de caséines d'autre part. Les étapes de structuration par acidification de ces agrégats mixtes ont été analysées à plusieurs échelles (moléculaire, microscopique, macroscopique) ainsi que les gels obtenus afin de comprendre les phénomènes mis en jeu lors de cette structuration.

Les objectifs de cette thèse ont été représentés sur la **figure I.0**. Pour les mener à bien, ce travail a été structuré en cinq phases interdépendantes :

1. Caractérisation des matières premières utilisées, à savoir les isolats de protéines de pois, de protéines lactosériques et les phosphocaséines
2. Optimisation de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial
3. Étude de l'impact de deux procédés physiques (traitement thermique et par haute pression dynamique) sur les protéines solubles de pois et les protéines lactosériques
4. Étude de l'impact de ces procédés et de leur combinaison sur la dynamique d'assemblage des protéines solubles de pois avec les micelles de caséines ;
5. Analyse des propriétés viscoélastiques et texturales des gels obtenus par acidification chimique de ces assemblages mixtes.

L'étude de ces cinq phases a été organisée en trois grandes parties structurant la partie résultats et discussion du document de thèse.

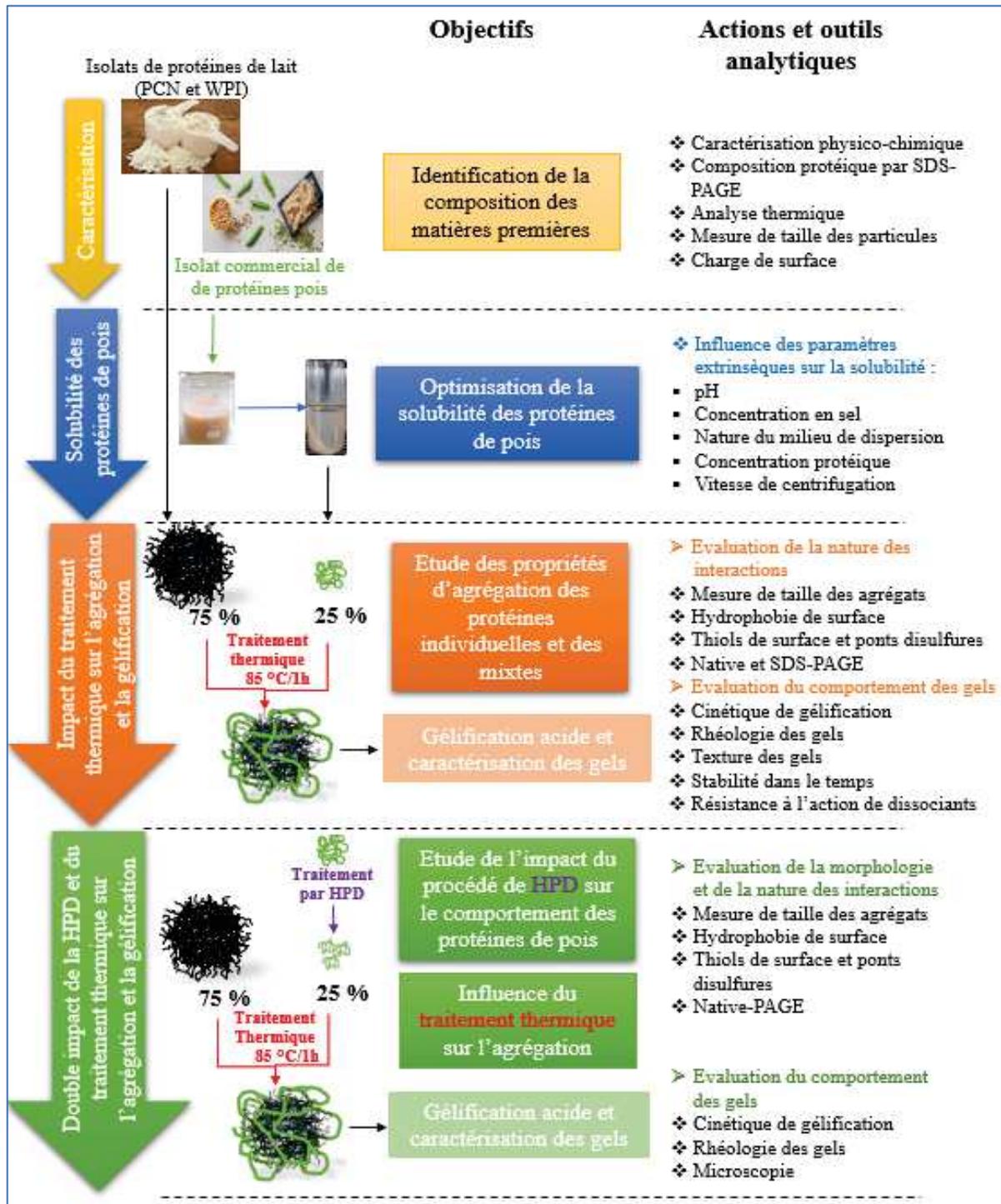


Figure I.0. Synthèse des objectifs de la thèse et de l'enchaînement des différentes phases du projet.

Ainsi, ce document présente de façon classique une synthèse bibliographique portant tout d'abord sur les protéines de pois, leurs compositions, les procédés d'obtention de concentrats et d'isolats et les propriétés techno-fonctionnelles de ces protéines. Dans un deuxième temps, la composition, les propriétés techno-fonctionnelles et d'interactions des

protéines de lait sont développées. Enfin, les propriétés d'association et d'interaction entre les protéines de pois et les protéines laitières, et plus particulièrement les micelles de caséines, mais aussi les avancées technologiques permettant de fonctionnaliser ces protéines pour générer des structures de gels aux propriétés sensorielles intéressantes sont détaillées.

Cette synthèse est suivie de la présentation des outils et méthodes mises en œuvre pour la caractérisation des isolats protéiques étudiées et des dispersions protéiques obtenues (teneur en protéines, en matières sèches, en cendres) ainsi que l'identification (1) des compositions protéiques par électrophorèses, (2) de la taille des particules protéiques par spectroscopie de corrélation de photons, (3) de leurs charges par zêta-métrie, (4) de leurs formes par microscopie électronique à balayage, (5) des types d'interactions mises en jeu entre les différentes fractions et d'agrégats de protéines par des méthodes spectrophotométriques et enfin (6) de la caractérisation des gels obtenus par rhéologie et par analyse de texture. Cette partie comprend aussi une présentation des procédés physiques (traitement thermique, traitement par haute pression dynamique) et des protocoles utilisés pour fonctionnaliser les différents types de protéines seules ou leurs assemblages avec d'autres protéines.

La troisième partie de ce travail représente les résultats obtenus, structurés comme annoncé en trois parties :

La première partie concerne la caractérisation des matières premières utilisées dans ce travail, la description de leur composition biochimique et leurs propriétés thermiques. De plus, l'optimisation de la solubilité des protéines de pois a été réalisée afin de déterminer les paramètres physico-chimiques (pH, concentration en sel, milieu de dispersion, vitesse de centrifugation) permettant d'obtenir une quantité optimisée de protéines solubles.

La deuxième partie est présentée sous forme d'un article scientifique soumis dans le journal *Food Research International* dont le titre est : **Impact of two thermal processing routes on protein interactions and acid gelation properties of casein micelle-pea protein mixture compared to casein micelle-whey protein one**. L'objectif de ce travail consiste à étudier l'impact de deux voies de traitements thermiques sur la formation d'agrégats mixtes de protéines de pois et de micelles de caséines. Les expérimentations menées visaient à expliciter le type d'interactions mises en jeu (covalentes, non-covalentes), la taille et la composition des agrégats formés suite aux traitements thermiques appliqués sur des mélanges de protéines natives ou bien sur des mélanges de protéines prétraités thermiquement. La gélification des complexes formés a ensuite été réalisée par acidification et le comportement et la structure des

gels obtenus ont été caractérisés par différentes techniques (rhéologie, étude de texture, capacité de rétention d'eau). Enfin, une partie de ce chapitre est dédiée à l'évaluation de la stabilité de ces gels dans le temps et de leur résistance à l'action d'agents dissociants afin d'appréhender la nature des interactions structurantes.

La dernière partie est rédigée sous la forme d'un projet d'article qui sera soumis à *Innovative Food Science and Emerging Technologies* intitulé : **Impact of Dynamic high-pressure pre-treatment of soluble pea protein on their interaction with casein micelles after a heat treatment: influence on acid gels properties**. L'objectif de ce travail est d'évaluer d'une part l'influence du procédé de traitement de haute pression dynamique sur la modification des propriétés morphologiques et structurales des protéines globulaires de pois ou protéines lactosériques, et d'autre part du couplage avec un procédé thermique pour fonctionnaliser les micelles de caséines et générer des gels mixtes aux propriétés intéressantes.

Cette partie dédiée aux résultats est suivie d'une discussion générale, puis des conclusions majeures tirées sur ce travail consacré à l'agrégation et la gélification de systèmes mixtes protéines de pois-protéines de lait.

Des perspectives scientifiques sont ensuite proposées pour élargir le champ d'application de ces travaux.

# **Chapitre I**

## **Etat de l'art**

## I.1. Les protéines de pois

Le pois jaune appartient à la famille des Fabacées (légumineuses), au genre *Pisum*, à l'espèce *Pisum sativum* L. et à la sous-espèce *Pisum sativum* L. subsp. *sativum*. Cette sous-espèce comprend trois variétés dont la variété *sativum* correspondant aux pois jaune, pois cassé et petit pois (**Dreyer et al., 2014**). La graine du pois jaune peut être à maturité de couleur vert pâle, blanchâtre, jaune ou bien brune. Elle peut être lisse ou ridée et la grande majorité de ces réserves nutritives sont situées dans les deux cotylédons qui la composent sous une forme de corpuscules protéiques de 2 à 3  $\mu\text{m}$  (**Saurel, 2020**).

La graine du pois jaune est composée en poids humide d'amidon (40 – 50 %), de protéines (20 – 25 %), de fibres (10 – 20 %) et en moindres quantités de lipides (~ 2 %), de vitamines (B1, B2, B3, C), d'acide phytique, de minéraux et de polyphénols (**Lu et al., 2019 ; Saurel, 2020**). Les teneurs en macro- et micro-nutriments varient en fonction du cultivar, des conditions de culture et du stade de maturité du grain au moment de la récolte.

Il existe plusieurs critères de classification des protéines de pois, et plus généralement des protéines végétales (solubilité, teneur en matière protéique végétale, techniques d'extraction et de séparation ...). Classiquement, les protéines de pois sont ainsi classées en fonction de leur solubilité, comme proposé par **Osborne & Campbell (1898)**, selon quatre familles détaillées dans le **tableau I.1** et dans la **figure I.1**:

- les globulines (55 – 65 % des protéines totales) solubles dans des solutions salines,
- les albumines (18 – 25 % des protéines totales) solubles dans l'eau,
- les prolamines (4 – 5 % des protéines totales) solubles dans des solutions hydroalcooliques
- les glutélines (3 – 4 % des protéines totales), fraction insoluble (**Lu et al., 2019**).

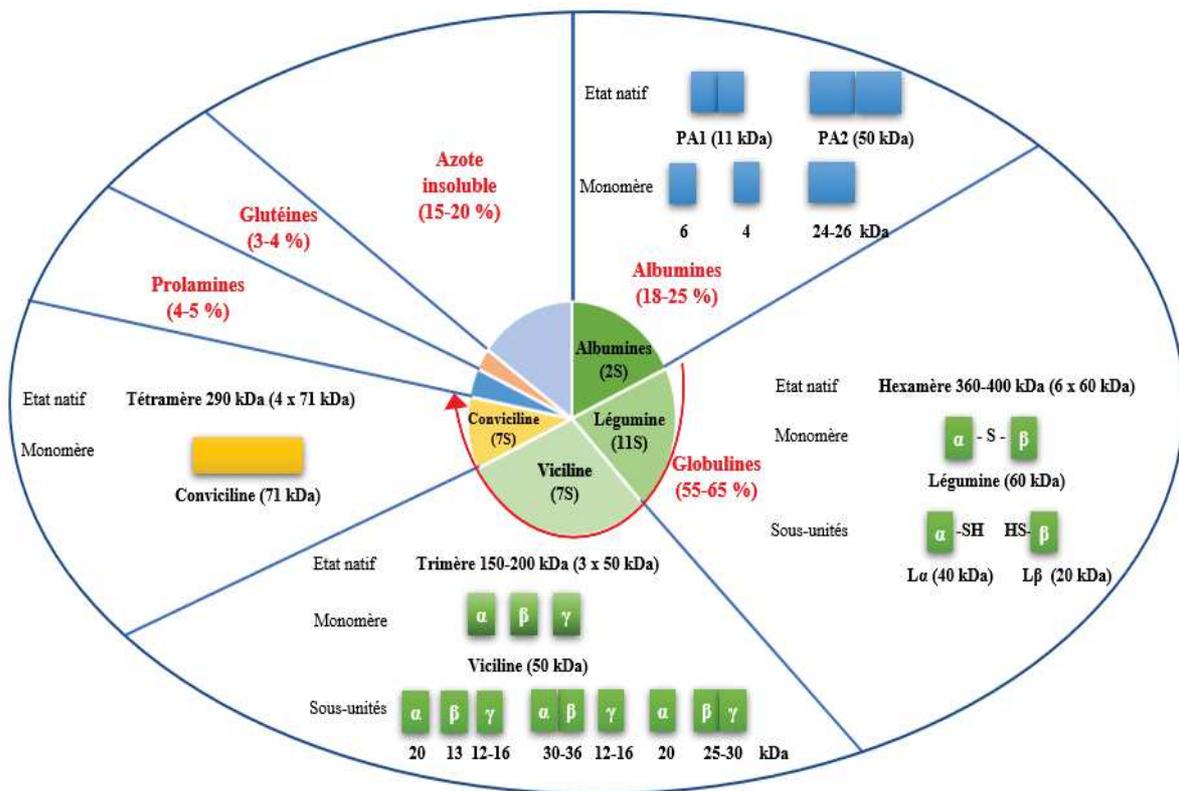
**Tableau I.1.** Caractéristiques biochimiques des différentes familles de protéines de pois jaune.

Famille	% des protéines totales de la graine	Solubilité	Protéines	S*	M <sub>w</sub> (kDa)	Nbre de monomères	M <sub>w</sub> du monomère (kDa)	M <sub>w</sub> de la sous-unité	T <sub>d</sub> (°C)	pI
Globulines	55 - 65	Solution saline	Légumine	11S	360-400	6	60	Acide 40 kDa et basique 20 kDa	77	4,8-4,9
			Viciline	7S	150-200	3	50	20, 13 et 14 kDa (α, β, γ)	72	4,6-4,8
			Convicine	7S	290	4	71	/	78	4,6
Albumines	18 - 25	Eau	PA1	2S	11	2	4 et 6	/	/	9,8 et 5,3
			PA2	2S	52	2	24-26	/	/	5,2
Prolamines	4 - 5	Solution hydro-alcoolique	Prolamine	/	/	/	/	/	/	/
Glutélines	3 - 4	Insoluble	Glutéline	/	/	/	/	/	/	/

T<sub>d</sub> : température de dénaturation thermique d'une protéine. \* S : Coefficient de Sevdberg.

### I.1.1. Composition et structure des protéines de pois

La composition et la structure des principales protéines de pois sont représentées et schématisées dans la **figure I.1**. Chaque famille de protéine est ensuite présentée en détail dans les paragraphes suivants.



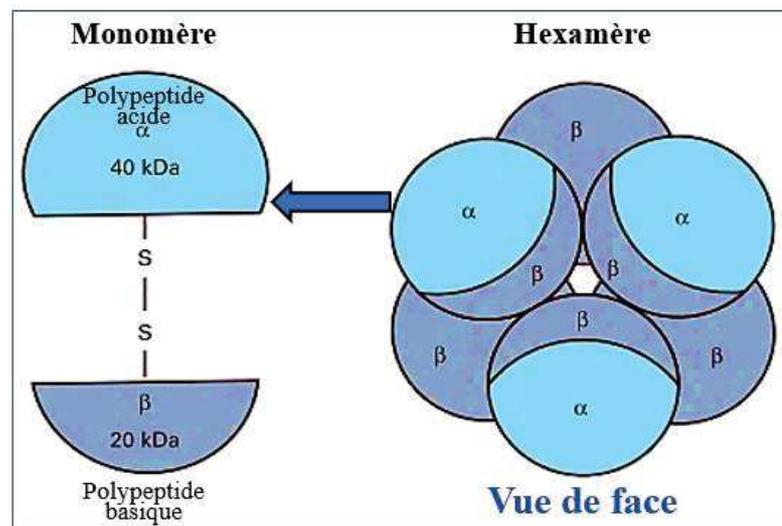
**Figure I.1.** Composition et structure des principales protéines de pois (Lu et al., 2019).

#### I.1.1.1. Les globulines de pois

Les globulines de pois sont des protéines dites de stockage qui apportent à la plantule les éléments nutritifs que sont les acides aminés lors de la germination (Tzitzikas et al., 2006). Ce sont des protéines oligomériques se différenciant par leur coefficient de sédimentation dépendant de leur masse moléculaire. Ainsi, comme le présente le **tableau I.1**, il existe trois types de globulines : les légumines (11S) (10 – 30 % des globulines), les vicilines (20 – 50 % des globulines) et les convicilines (7S) (5 – 10 % des globulines) (Barac et al., 2010). Sachant que la légumine et la viciline sont des protéines dont la quantité présente dans la graine est influencée par des facteurs extrinsèques (environnement, pratiques agronomiques) mais aussi intrinsèques (nature du cultivar et le génotype), le rapport entre ces deux fractions peut varier considérablement d'une récolte à l'autre. Ainsi, le rapport légumine/viciline peut varier de 2 à 4 dans le cas du pois jaune (Tzitzikas et al., 2006).

### I.1.1.1.1. La légumine 11S

La légumine de pois est une protéine caractérisée par une structure quaternaire hexamérique compacte stabilisée par des interactions électrostatiques et hydrophobes dont le poids moléculaire est compris entre 360 et 400 kDa (**Boye, Zare et al., 2010**). Chacun des six monomères est constitué d'une sous-unité polypeptidique acide ( $\alpha$ ) de  $\sim 40$  kDa et d'une sous-unité polypeptidique basique ( $\beta$ ) de  $\sim 20$  kDa, reliées par un pont disulfure (**Gueguen et al., 1988**) (**Figure I.2**). La structure secondaire des monomères comprend 45 % de feuillets  $\beta$  et 15 % d'hélices  $\alpha$  (**Matta et al., 1981**). Les polypeptides acides ont un point isoélectrique (pI) compris entre 4,5 et 5,8 et les polypeptides basiques se caractérisent par un pI compris entre 6,2 et 8,8 (**Heng et al., 2004**). La valeur moyenne du pI des légumines est ainsi de l'ordre de 4,8 - 4,9 (**Chihi, 2016**). Selon **Gueguen et al. (1988)**, les polypeptides basiques de nature hydrophobe sont situés à l'intérieur de la structure quaternaire de la légumine tandis que les polypeptides acides, plutôt hydrophiles, sont orientés vers l'extérieur de l'hexamère (**Figure I.2**).



**Figure I.2.** Modèle du monomère de la légumine (11S) de protéines de pois et de son association avec d'autres monomères pour donner la structure quaternaire (d'après **Marccone et al., 1998**).

En raison de sa structure quaternaire compacte, la légumine est une protéine plutôt thermostable, sa température de dénaturation étant de  $77\text{ °C}$  (**Mession et al., 2015**). Cependant, sa structure quaternaire est sensible aux variations de pH et de force ionique. Ainsi, même si la légumine de pois est présente sous forme d'hexamères non agrégés à pH 7 pour une force ionique supérieure à 0,1 M, pour des pH très acides ou très basiques, elle se dissocie en un

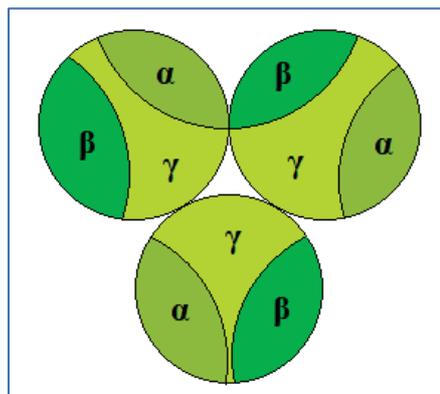
mélange de trimères, de dimères et de monomères selon la force ionique (Gueguen et al., 1988). Elle est, par exemple, entièrement dissociée en monomères à un pH de 2,4 en présence de 0,05 M de NaCl, ce qui provoque une augmentation de son hydrophobie de surface (Gueguen, 1989).

La légumine, contrairement à la viciline, contient pour chaque monomère acido-basique des acides aminés soufrés : 3 à 7 résidus de cystéine et 2 à 4 résidus de méthionine (Shewry et al., 1995). Néanmoins, cette protéine reste riche en acides aminés essentiels hydrophobes tels que la valine, la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine (Tableau I.2).

#### I.1.1.1.2. La viciline 7S

La viciline est une protéine glycosylée trimérique de poids moléculaire compris entre 150 - 200 kDa (Figure I.3). Elle est caractérisée par une teneur élevée en acide glutamique, en acide aspartique et en lysine, une faible teneur en méthionine et une absence de cystéine ne lui permettant pas de participer à la formation de pont disulfure intramoléculaire ou intermoléculaire (Gatehouse et al. 1981 ; Shewry & al., 1995) (Tableau I.2). Chaque monomère (~ 50 kDa) est composé de trois polypeptides ( $\alpha$  ~ 20 kDa,  $\beta$  ~ 13 kDa,  $\gamma$  ~ 12-16 kDa) assemblés par des interactions hydrophobes (Tzitzikas et al., 2006). Par clivage au niveau des sites  $\alpha/\beta$  et  $\beta/\gamma$ , différents fragments polypeptidiques peuvent être obtenus à partir de ce monomère.

Les monomères de viciline se caractérisent par une région interne et une région N-terminale hautement chargées qui rendent cette protéine plus hydrophile que la légumine (Figure I.4). Malgré sa variabilité structurale, le pI de la viciline se situe globalement entre 5,4 et 5,5 (Derbyshire et al., 1976).

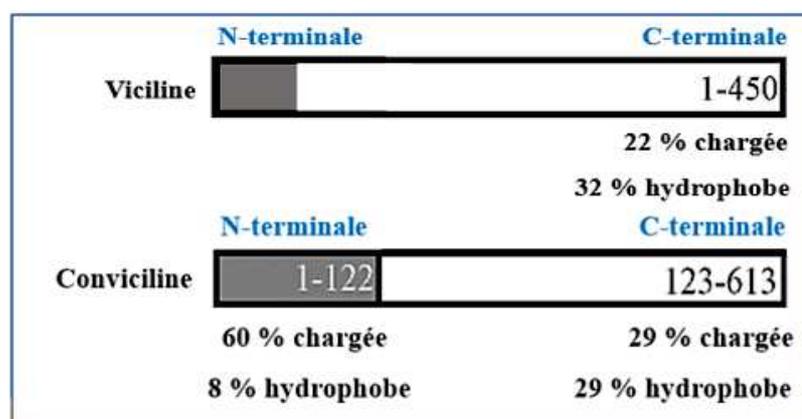


**Figure I.3.** Modèle de la structure quaternaire du trimère (~ 150 kDa) de la viciline (7S) de pois (d'après Marcone et al., 1998).

La température de dénaturation de la viciline est dépendante de la force ionique du milieu ; à une faible force ionique (0,08 M de NaCl), la température de dénaturation est de 71,7 °C, alors qu'elle est de 82,7 °C dans le cas de forces ioniques plus élevées (0,5 M de NaCl) (Kimura et al., 2008).

### I.1.1.1.3. La conviciline 7S

A l'état natif, la conviciline (~ 290 kDa) est formée par l'association de quatre monomères (~ 71 kDa) par des interactions de faibles énergies (O'Kane et al., 2004c). Cette protéine non glycosylée a un profil d'acides aminés presque identique (80 %) à celui de la viciline 7S mais chaque monomère de la conviciline comporte un résidu de méthionine et un résidu de cystéine (Tableau I.2). O'Kane et al. (2004c) et Gueguen & Cerletti (1994) ont noté que le noyau de cette protéine (résidus 123 - 542) présentait une forte homologie avec la viciline. Selon ces auteurs, la conviciline contient une région d'extension N-terminale hydrophile et fortement chargée, constituée de 122 ou 166 résidus. Les homologies de la conviciline et de la viciline sont représentées schématiquement sur la figure I.4. Le pI de la conviciline est de 4,6 alors que sa température de dénaturation thermique est de 78 °C.



**Figure I.4.** Schéma de la région d'extension N-terminale hautement chargée (résidus 1-122) présente dans les molécules de conviciline (Gueguen & Cerletti, 1994 ; O'Kane et al., 2004c).

### I.1.1.2. Les albumines 2S de pois

Les albumines 2S (18 – 25 % des protéines totales) sont des protéines métaboliques hydrosolubles qui contiennent des quantités plus élevées en acides aminés essentiels (tryptophane, lysine, thréonine, méthionine) que les globulines (Tableau I.2) (Lam et al., 2018). Cependant, elles sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur richesse en cystéine.

Les protéines de cette famille ont une composition beaucoup plus hétérogène que celle des globulines et se caractérisent par une masse moléculaire de l'ordre de 6 à 25 kDa (**Boye, Zare et al., 2010**). Les deux albumines les plus présentes sont les albumines PA1 (4 - 7 % des protéines totales) et PA2 (5 - 10 % des protéines totales) auxquelles s'ajoutent des fractions moins importantes telles que la lipoxygénase, des inhibiteurs de protéases et des lectines qui sont impliqués dans des mécanismes de défense de la plante (**Croy et al., 1984**).

Les albumines PA1 de masse moléculaire 10 - 11 kDa sont des dimères formés par l'association non-covalente de deux polypeptides, un de 6 kDa (pI = 5,3 - 5,4) et un de 4 kDa (pI = 9,8) (**Berot et al., 2007**). Les albumines PA1 se caractérisent par une teneur élevée en acides aminés soufrés. Elles ont d'ailleurs comme rôle biologique de stocker l'élément soufre nécessaire lors de la germination de la graine (**Saurel, 2020**).

Les albumines PA2 (50 kDa, pI de 5,2) quant à elles sont constituées de deux sous-unités de 24 - 26 kDa liées par des liaisons non covalentes. Chaque sous-unité contient 3 résidus de cystéine et un groupe sulfhydryle libre (**O'Kane et al., 2004b**).

Les protéines de pois ont l'avantage d'offrir un profil équilibré en acides aminés, contenant tous les acides aminés essentiels comme le montre le **tableau I.2**. Elles répondent ainsi aux exigences conjointes de l'OMS, la FAO et l'ONU en termes d'acides aminés essentiels même si leur teneur en méthionine est tout de même faible (**Gorissen et al., 2018**). Elles ont une teneur élevée en leucine, isoleucine, valine ainsi qu'en lysine, acides aminés à chaîne ramifiée. Leurs faibles teneurs en tryptophane et en acides aminés soufrés (méthionines et cystéine) les différencient des protéines d'origine animale et, particulièrement, des protéines du lait. En plus de leur composition équilibrée en acides aminés, les protéines de pois se caractérisent par une bonne digestibilité (**Dahl et al., 2012 ; Guillin et al., 2019**).

**Tableau I.2.** Composition moyenne en acides aminés des fractions d’albumines, de légumine et de vicilines du pois jaune (d’après <sup>a</sup> : **Gorissen et al., 2018** ; <sup>b</sup> : **Gueguen, 1991** ; <sup>c</sup> : **Derbshyre et al., 1976**, <sup>d</sup> ; **Savage & Deo, 1989**, <sup>e</sup> ; **Jackson et al., 1969** ; <sup>f</sup> : **O’Kane et al., 2004b** ; <sup>g</sup> : **Helmick et al., 2021**).

Acides aminés (g/100 g de matière protéique)	Isolat de protéines de pois <sup>a</sup>	Albumine 2S <sup>b</sup>	Légumine 11S <sup>c,d,e</sup>	Viciline 7S <sup>c,d,f</sup>	Convicine 7S <sup>g</sup>
<b>Essentiels</b>					
Thréonine	2,5	5,6	3,4	3,4	2,87
Valine	2,7	4,4	4,7	5,1	5,73
Méthionine	0,3	1,3	0,6	0,5	0,26
Isoleucine	2,3	4,8	4,8	5,1	5,72
Leucine	5,7	4,8	7,8	9,1	11,98
Phénylalanine	3,7	4,5	4,1	6,1	4,64
Lysine	4,7	9,3	4,8	7,3	7,66
Histidine	1,6	2,6	2,6	2,4	1,82
Tryptophane	-	1,5	0,8	0,1	0,0
<b>Non essentiels</b>					
Arginine	5,9	5,6	1,25	6,9	6,85
Tyrosine	0,6	4,7	2,5	2,7	2,71
Cystéine	0,2	3,1	0,7	0,25	0,26
Proline	3,1	4,4	5	4	4,79
Acide aspartique	-	11,8	12,1	12	4,58
Serine	3,6	5,0	5,9	6,2	7,17
Acide glutamique	12,9	14,9	19,6	18,5	10,12
Glycine		5,9	6,2	3,7	4,64
Alanine	2,8	5,8	5,5	3,7	4,48

### I.1.1.3. Les prolamines et les glutélines de pois

A l’inverse des céréales, les prolamines et les glutélines de la graine de pois jaune constituent des fractions minoritaires des protéines de pois (moins de 10 % des protéines totales). La prolamine est une protéine de stockage et elle est présente en très petites quantités dans les graines de pois (**Adebiyi & Aluko, 2011**). Les acides aminés majoritaires dans les prolamines sont la glutamine et la proline. Cependant, ces protéines ont une faible teneur en acides aminés essentiels tels que la lysine, la thréonine et le tryptophane, ce qui limite leur qualité nutritionnelle. Cette protéine ne s’agrège pas suite à une élévation de la température et ne coagule pas thermiquement. Cependant, elle peut être hydrolysée en libérant de la proline et de l’ammoniac.

Les glutélines quant à elles sont présentes dans l’endosperme de certaines graines de la famille des graminées. Cependant, elles sont très peu présentes dans les graines de pois. Comme les prolamines, ces protéines constituent la principale forme de stockage de l’énergie dans la

graine. Elles sont riches en acides aminés hydrophobes, tels que la tyrosine, la proline, la phénylalanine et la valine.

### I.1.2. Les procédés d'extraction des protéines de pois

Afin de caractériser les protéines de pois mais aussi de les utiliser comme ingrédients fonctionnels en agro-alimentaire, il est nécessaire de pouvoir les extraire. Pour cela, les graines sont tout d'abord prétraitées, puis les protéines sont extraites, soit par voie sèche, soit par voie humide, soit par un fractionnement doux à partir de concentrés obtenus par la voie sèche (Figure I.5).

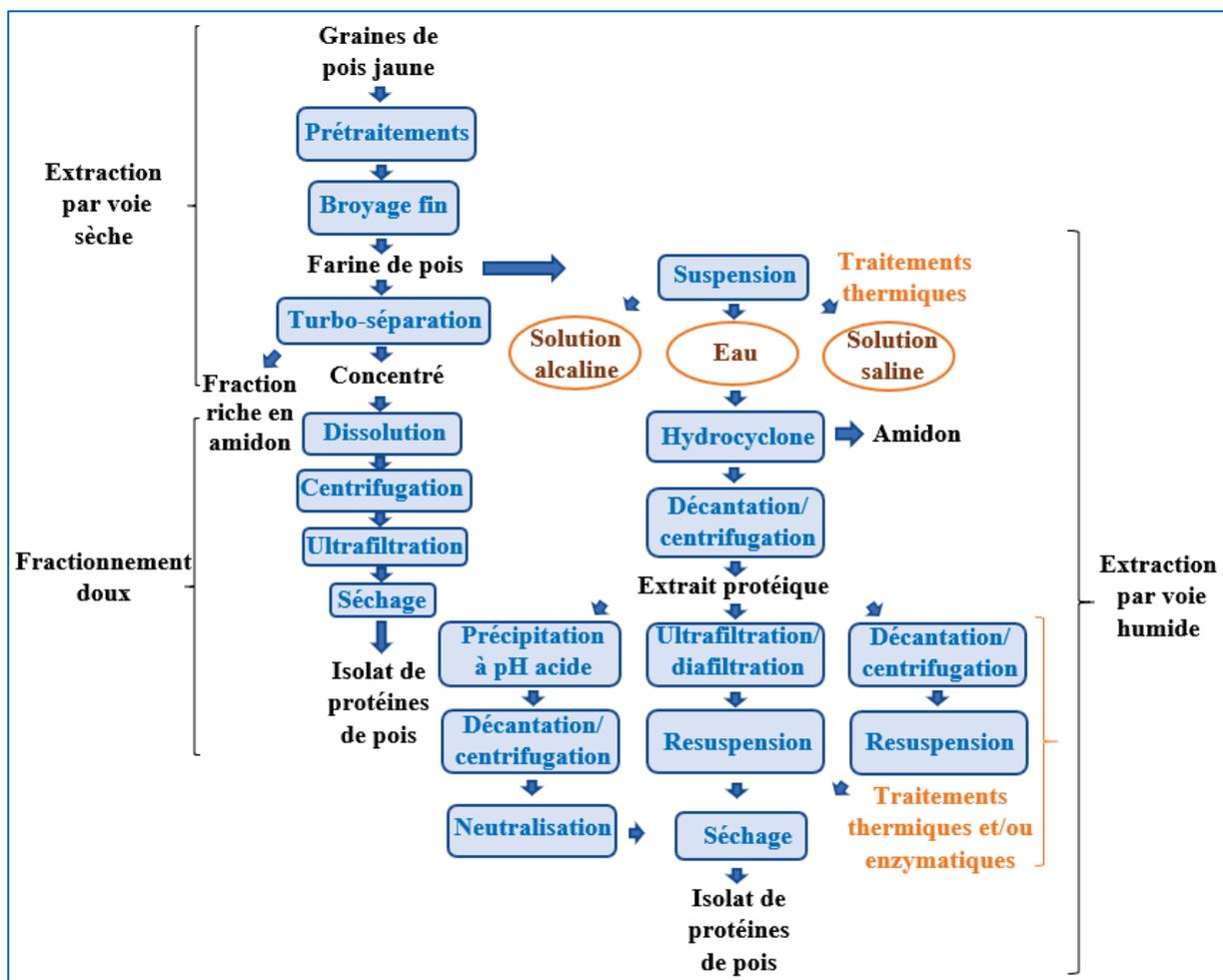


Figure I.5. Principales voies d'extraction de protéines de pois jaune (d'après Boukid et al., 2021 ; Lam et al., 2018 ; Saurel, 2020).

En fonction des techniques d'extraction, les protéines de pois peuvent être préparées sous différentes formes : farines (20 - 50 % de protéines), concentrés (teneur en protéines 50 - 65 %) ou isolats (teneur en protéines 70 - 92 %) (Stone et al., 2015b). A partir des graines,

l'étape d'extraction permet d'éliminer ou de réduire certains constituants non protéiques tels que l'eau, l'amidon, les lipides, les sels minéraux afin d'obtenir des matières protéiques végétales (MPV). Avant l'extraction des protéines, des étapes de prétraitements des graines de pois jaune sont nécessaires pour d'une part augmenter la pureté des matières protéiques finales, et d'autre part pour faciliter leur processus d'extraction sans pour autant affecter leurs propriétés fonctionnelles (Saldanha do Carmo et al., 2020).

### **I.1.2.1. Extraction par voie sèche**

Suite à l'étape de prétraitements des graines de pois, l'extraction par voie sèche des protéines de pois, comme indiqué sur la **figure I.5**, comporte deux étapes clés : le broyage afin de réduire la taille des graines et la turboséparation dans le but de séparer les particules en fonction de la taille. Le broyage consiste donc à casser les graines de pois en petits fragments permettant ainsi de libérer les granules d'amidon (Pelgrom et al., 2015b). Dépendamment de la taille de ces granules, la séparation entre la matrice protéique et l'amidon peut être plus ou moins difficile. A des tailles réduites de granules d'amidon, la séparation par broyage est fortement compliquée à cause de l'endommagement de la structure de ces derniers. D'où la nécessité de bien choisir l'écartement des rouleaux de broyage pour obtenir des tailles homogènes afin de préserver la propriété de collage de l'amidon. La turboséparation quant à elle est une technologie qui consiste à diviser la farine de pois en deux fractions : particules fines (particules riches en protéines de taille 1 - 3  $\mu\text{m}$ ) ou grossières (granules d'amidon de taille 2 - 40  $\mu\text{m}$ ) selon leurs tailles, formes et densités (Boukid et al., 2021). Les concentrés de protéines de pois sont produits à une teneur en protéines de 45 - 55 % (p/p) et les concentrés d'amidon sont produits à 67 % (p/p) (Boye, Zare et al., 2010 ; Gehin et al., 2010 ; Pelgrom et al., 2015a). L'extraction par voie sèche comparée à l'extraction par voie humide permet d'obtenir une teneur assez importante en protéines, mais qui reste nettement inférieure à la teneur en protéines des isolats (> 80 % (p/p) (Pelgrom et al., 2015a). Cependant, cette technique d'extraction est bénéfique pour la préservation de la qualité nutritionnelle et fonctionnelle native des protéines. De plus, elle possède un avantage majeur pour le développement durable grâce à la non-utilisation d'eau, d'effluents ou encore de produits chimiques, et nécessite des besoins réduits en énergie (Rempel et al., 2019 ; Schutyser et al., 2015).

### **I.1.2.2. Extraction par voie humide**

La séparation par voie humide (**Figure I.5**) est un procédé permettant d'augmenter la teneur en protéines de l'extrait. Il est utilisé à l'échelle industrielle pour obtenir des isolats de protéines de pois à une teneur élevée en protéines mais est aussi très étudié dans le cadre de travaux de recherche. Il se base sur les propriétés de solubilité différentielle des protéines et des autres constituants de la graine de pois en fonction du pH et de la force ionique.

Tout d'abord, la farine de pois est dispersée dans de l'eau pour permettre la mise en suspension des particules de protéines et des granules d'amidon. Ensuite, cette suspension passe à travers un hydrocyclone pour permettre la séparation des protéines de l'amidon et l'élimination des fibres colloïdales. Ensuite, plusieurs techniques sont exploitées pour s'adapter à la composition en fractions et aux besoins finaux en type de protéines. Par exemple l'extraction alcaline associée à la précipitation isoélectrique permet d'obtenir des isolats de 80 à 94 % de protéines de pois et qui consiste dans sa première étape à solubiliser la fraction riche en protéines issue de l'hydrocyclone dans des solutions alcalines à pH 8-9 (ajustement de pH avec des solutions d'hydroxyde de sodium, de potassium ou de calcium). Puis, après élimination des résidus insolubles et centrifugation, les protéines de pois du surnageant sont précipitées à leur pH isoélectrique (4,5 - 5,2) après ajout de solutions d'acide hydrochlorique ou sulfurique afin d'éliminer les impuretés dissoutes. Enfin, le précipité est récupéré, lavé, remis en suspension dans l'eau à pH 7 (neutralisé) et séché par des techniques de séchage pour obtenir un isolat de protéines de pois à des concentrations dépassant les 80 % (p/p) en protéines, et cela dépendamment des paramètres d'extractions (pH : 2,5 - 10 ; temps d'extraction : 20 - 80 min et le rapport eau/farine de pois) (**Boukid et al., 2021 ; Boye et al., 2010**). Une deuxième technique d'extraction existe, basée sur l'ultrafiltration et/ou la diafiltration sur membranes avec des seuils de coupures de masses moléculaires spécifiques pour concentrer et purifier les protéines d'intérêt. Cette méthode permet d'obtenir des extraits protéiques avec un degré de nativité plus élevé et des propriétés fonctionnelles qui peuvent être améliorées et des rendements plus importants que ceux de la précipitation isoélectrique (**Mondor et al., 2012**). De plus, il s'est avéré que cette méthode d'extraction était efficace pour réduire les composés antinutritionnels des protéines de l'isolat (**Boye, Zare et al., 2010**).

Ainsi, l'extraction par voie humide permet d'avoir une teneur importante en protéines, ce qui représente un avantage important. Cependant, une de ses limites est la dénaturation partielle ou totale des protéines dans le cas de l'application de températures élevées afin d'améliorer le rendement de la phase initiale de suspension en milieu alcalin (**Hall, 1996**), mais

aussi lors de l'étape de séchage de l'extrait soluble final ce qui peut entraîner la formation d'agrégats insolubles et la perte de la qualité nutritionnelle de l'extrait protéique final (Chao & Aluko, 2018).

### I.1.2.3. Fractionnement doux

Cette technique de fractionnement permet de produire des isolats de protéines de pois à partir de concentrés obtenus par voie sèche (Figure I.5). Comme l'extraction par voie sèche, le fractionnement doux est basé sur la séparation par la taille et la densité de particules de protéines et consiste en la mise en suspension dans l'eau de concentrés, puis à une centrifugation qui permet le fractionnement et la séparation couche par couche de particules de protéines. Ensuite, une ultrafiltration ou une dialyse sont nécessaires pour augmenter la pureté de l'isolat de protéines de pois obtenu après la dernière étape de séchage (Geerts, Nikiforidis, et al., 2017).

### I.1.3. Les propriétés techno-fonctionnelles des protéines de pois

Les propriétés fonctionnelles des protéines, souvent considérées comme les conséquences macroscopiques de leur structure, ont pour origine les propriétés de surface et interfaciales des protéines, et plus précisément de la nature des interactions que peuvent établir les protéines avec leur milieu environnant (solvants, lipides, polysaccharides, protéines...) (Figure I.6).

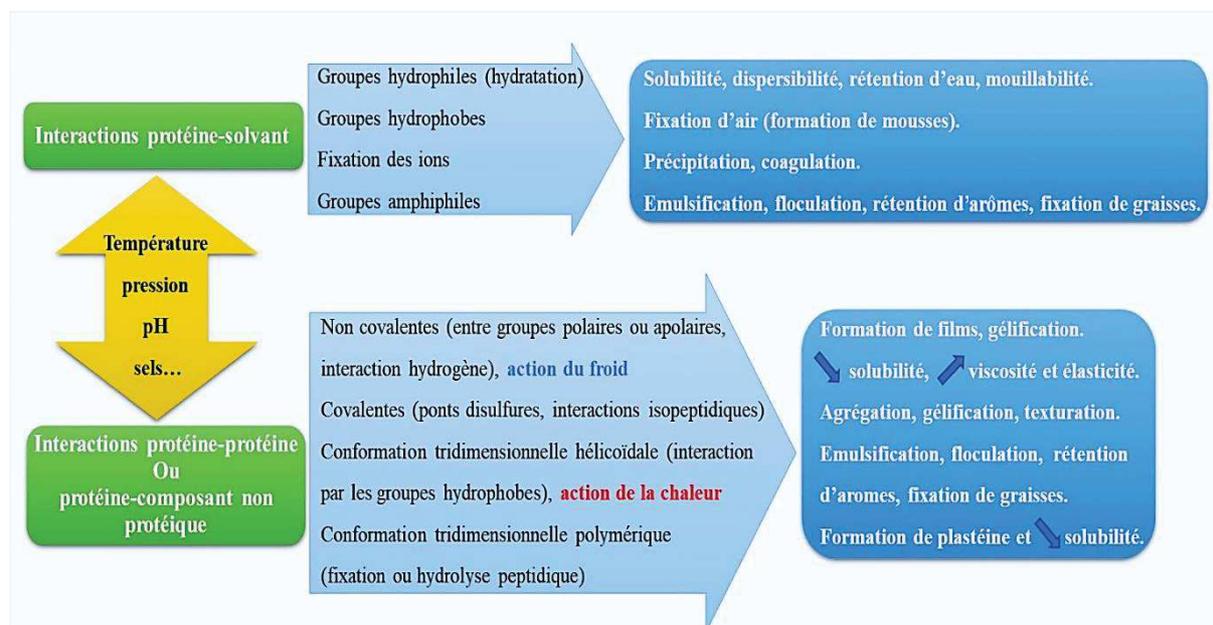


Figure I.6. Relations entre les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines (d'après Cheftel et al., 1982).

En plus de l'intérêt de leur valeur nutritionnelle, les protéines de pois sont mises en avant en raison de leurs propriétés techno-fonctionnelles telles que la solubilité dans différents milieux, la capacité de rétention en eau et en huile, les propriétés émulsifiantes et moussantes et les propriétés de gélification. Ces différentes propriétés expliquent la performance de ces protéines dans de nombreuses applications en agro-alimentaire.

Les propriétés techno-fonctionnelles des extraits de protéines de pois peuvent varier en fonction de leur concentration totale en protéines, de leur concentration dans les différentes familles de protéines, du procédé d'extraction appliqué et des conditions expérimentales mises en œuvre pour la conception du produit alimentaire (pH, température, pression, force ionique...). Les différentes propriétés techno-fonctionnelles des protéines de pois vont être décrites ci-dessous en mettant l'accent sur la solubilité et les propriétés de gélification.

#### **I.1.3.1. La solubilité des protéines de pois**

La solubilité des protéines de pois est une propriété essentielle dans les applications alimentaires dont vont dépendre très souvent les autres propriétés techno-fonctionnelles visées. La solubilité peut être influencée par le génotype, la méthode d'extraction et de purification des protéines ainsi que par plusieurs paramètres tels que le solvant de dispersion, la force ionique le pH, la température ou encore la concentration initiale en protéines (**Stone et al., 2015a**). Ainsi, ces paramètres peuvent entraîner des modifications de la conformation et des propriétés de surface des protéines affectant leur solubilité. Les différentes protéines de pois sont d'ailleurs classées selon leur solubilité dans différents solvants, les albumines étant solubles dans l'eau et les globulines (viciline, convicine et légumine) étant solubles dans des solutions salines (**Adebiyi & Aluko, 2011; McCarthy et al., 2016**). La solubilité des protéines de pois est de plus particulièrement dépendante du pH ; en effet, le profil de solubilité de ces protéines est en "U" et leur solubilité est maximale au-dessous de pH 4 et au-dessus de pH 6 (**Ladjal-Ettoumi et al., 2016 ; Shand et al., 2007 ; Zhang et al., 2020 ; Zhao et al., 2020**). Il est à noter qu'une même méthode d'extraction peut conduire à des isolats ayant une solubilité significativement différente en fonction des cultivars utilisés (**Barac et al., 2010 ; Stone et al., 2015a**). Les différentes étapes du procédé mis en œuvre pour obtenir des concentrés ou des isolats de protéines de pois peuvent aussi influencer la solubilité des protéines en affectant leur hydrophobie de surface, en exposant certains de leurs résidus hydrophobes et en favorisant les interactions hydrophobes intermoléculaires. Par exemple, dans le cas de l'extraction par voie humide à l'échelle industrielle, les protéines de pois extraites peuvent avoir une solubilité plus

faible en raison de la dénaturation, voire de l'agrégation, induite par la chaleur lors de l'étape de séchage (Chao & Aluko, 2018). Le **tableau I.3.** synthétise les principaux travaux publiés portant sur la solubilité des protéines de pois en fonction de la méthode d'extraction utilisée et des conditions physico-chimiques expérimentales appliquées pour évaluer la solubilité.

Dans l'objectif de positionner les isolats de protéines de pois par rapport à d'autres isolats de protéines végétales, plusieurs études ont réalisé des comparaisons en termes de solubilité. Globalement, les isolats de protéines de soja ont montré une meilleure solubilité en comparaison avec les isolats de protéines de pois (Afify et al., 2012 ; Zhao et al., 2020, Kimura et al., 2008). L'étude de Ladjal-Ettoumi et al. (2016) a signalé une solubilité similaire des isolats de protéines de pois avec ceux des protéines de lentilles ou des protéines de pois chiches obtenues à des pHs compris entre 2 et 8. De ce fait, et dépendamment de plusieurs facteurs (cultivar, méthode d'extraction, conditions expérimentales...), il est très difficile de positionner la solubilité des protéines de pois par rapport à la large gamme d'espèces de légumineuses qui existe. Cependant, cette propriété techno-fonctionnelle est importante car elle peut affecter d'autres propriétés de protéines. Elle peut être optimisée grâce à l'utilisation de méthodes d'extraction plus respectueuses de la structure des protéines telles que le fractionnement doux (**Figure I.5**) (Kornet et al., 2021b) ou l'utilisation de la haute pression hydrostatique, associées à des techniques d'amélioration de la solubilité, telles que l'utilisation des ultrasons, des micro-ondes, de la germination, de l'hydrolyse enzymatique, et du le changement de pH (pH-shifting) (Boukid et al., 2021 ; Jiang et al., 2017 ; Zhu et al., 2021).

**Tableau I.3.** Principaux travaux sur la solubilité d'isolats de protéines de pois (d'après **Ge et al., 2020**).

Matière première utilisée	Méthode d'extraction des fractions protéiques étudiées	Conditions d'évaluation de la solubilité	Résultats majeurs	Références
Isolat commercial de protéines de pois (PPI, Nutri-Pea Ltd., Canada)	Extraction séquentielle à partir de PPI dans : <ul style="list-style-type: none"> <li>- eau (WS)</li> <li>- solution saline 2 % NaCl (SS)</li> <li>- solution éthanol 70 % (ES)</li> <li>- une solution alcaline (AS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dispersion 1 % (p/v) dans tampon phosphate 0,01 M</li> <li>- pH : 3 à 8</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sauf pour ES (fraction insoluble dans le tampon étudié), toutes les fractions avaient une meilleure solubilité que le PPI c pour les pHs <math>\geq 7</math></li> <li>- Faible solubilité pour PPI c et SS (<math>\leq 20</math> %) pour les pHs <math>\leq 6</math></li> <li>- Solubilité de WS la plus élevée sur toute la gamme de pH</li> </ul>	<b>Adebiyi &amp; Aluko (2011)</b>
Farines de pois de 12 cultivars différents	Extraction en milieu alcalin, précipitation isoélectrique et séchage par atomisation (et pas pulvérisation)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentration de 1,25 % (p/v) en protéines dans une solution à 0,1 M de NaCl</li> <li>- pH : 4,5 et 7</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pH 4,5 : faible solubilité (&lt; 11 %) pour les extraits de tous les cultivars</li> <li>- pH 7 : solubilité (60-62 %) pour les extraits de tous les cultivars</li> </ul>	<b>Arteaga et al. (2021)</b>
Pois ridés Isolat commercial de soja (SPI, Soyamin 90, Lucas Meyer) Isolat commercial de pois lisses (PPI, Pisane HD, Cosucra)	Extraction par : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Précipitation acide (PA)</li> <li>- Précipitation thermique et acide (PTA)</li> <li>- Ultrafiltration (UF)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 % (p/v) de l'extrait dans l'eau distillée</li> <li>- pH : 2 à 10</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Influence du procédé d'extraction sur la solubilité : UF &gt; PA &gt; PTA (pour tous les pH)</li> <li>- Solubilité minimale entre pH 3 et pH 5</li> <li>- Solubilité pour pH <math>\geq 7</math> : UF &gt; SPI &gt; PA &gt; PTA &gt; PPI c</li> </ul>	<b>Fuhrmeister &amp; Meuser (2003)</b>

Matière première utilisée	Méthode d'extraction des fractions protéiques étudiées	Conditions d'évaluation de la solubilité	Résultats majeurs	Références
Farine de pois Farine de soja Farine de pois chiche Farine de féverole Farine de lentille	- Extraction en milieu alcalin, précipitation isoélectrique (EA/PI) ; - Extraction saline (ES)	- Dispersion 1 % (p/v) de protéines dans 10 mM de tampon phosphate  - pH 7	- Influence du procédé d'extraction sur la solubilité des protéines de pois : EA/PI (61 %) > ES (38 %) - Influence du type de légumineuse sur la solubilité des protéines  Solubilité : EA/PI : soja (97 %) > pois chiche (91 %) > lentille (97 %) > féverole (90 %) > pois (61 %)  ES : Soja (97 %) > Lentille (90 %) > Féverole (53 %) > Pois (38 %) > Pois chiche (29 %)	<b>Can Karaca et al. (2011)</b>
Farine de pois Farine de soja Farine de fève Farine de haricot Farine de niébé (rouge) Farine de niébé (noir)	Extraction puis purification des fractions de viciline (7S) et de légumine (11S)	- Dispersion 0,08 % (p/v) de protéines pH : 2,2 à 9,5 force ionique : 0,5 M de NaCl - Dispersion de 0,08 % (p/v) de protéines pH : 3 à 9 force ionique : 0,08 M de NaCl	Fraction de viciline (7S) - Solubilité du pois inférieure par rapport aux autres légumineuses à pH < 3 et 0,5 M de NaCl - Gamme de pH d'insolubilité (isoélectrique) plus grande pour le pois par rapport au soja à 0,08 M de NaCl  Fraction de légumine (11S) - Solubilité très faible à pH < 6 et 0,5 M de NaCl puis assez soluble à pH 2 - 4,5 < pH isoélectrique < 6,5 à 0,08 M de NaCl	<b>Kimura et al. (2008)</b>

Matière première utilisée	Méthode d'extraction des fractions protéiques étudiées	Conditions d'évaluation de la solubilité	Résultats majeurs	Références
Farine de pois	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isolat (PPI) : extraction en milieu alcalin puis précipitation isoélectrique</li> <li>- Fraction (PV) riche en viciline (7S) purifiée à partir de PPI</li> <li>- Fraction (PL) riche en légumine (11S) purifiée à partir de PPI.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dispersion 1 % (p/v) en protéines dans eau déminéralisée</li> <li>- pH : 2 à 10</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solubilité minimale des 3 fractions entre pH 5 et 6</li> <li>- Solubilité : pH <math>\geq</math> 7 : PL = PV &gt; PPI pH &lt; 5 : PL &gt; PV &gt; PPI</li> </ul>	<b>Liang &amp; Tang (2013)</b>
Farine de trois cultivars de pois Isolat commercial de protéines de pois (PPI c, Propulse, Nutri-Pea)	<p>Extraction à partir de la farine de pois par :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Extraction en milieu alcalin puis précipitation isoélectrique (EA/PI)</li> <li>- Extraction saline (ES)</li> <li>- Précipitation micellaire (PM).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dispersion 1 % (p/v) de protéines dans eau salée (NaCl 0,1 N)</li> <li>- pH 7</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solubilité influencée par la méthode d'extraction : SE &gt; EA/PI &gt; PM</li> <li>- Solubilité identique pour les 3 cultivars pour une même méthode d'extraction</li> <li>- Faible solubilité de l'isolat commercial : SE (89 %) &gt; EA/PI (63 %) &gt; PM (46 %) &gt; PPI c (5 %)</li> </ul>	<b>Stone et al. (2015b)</b>
Farine de pois Isolat commercial de protéines de pois (PPI c, ProPulse, Nutri-Pea Ltd)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extraction dans l'eau, pH 7,5 puis concentration par ultrafiltration (H<sub>2</sub>O/UF)</li> <li>- Extraction dans solution de KCl (0,06 M) puis concentration par ultrafiltration (KCl/UF)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1% de protéines dans l'eau bidistillée</li> <li>- pH : 2 à 9</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solubilité minimale de tous les extraits entre pH 4 et 6</li> <li>- Faible solubilité de PPI c par rapport à H<sub>2</sub>O/UF et KCl/UF</li> </ul>	<b>Taherian et al. (2011)</b>

### **I.1.3.2. La capacité de rétention en eau des protéines de pois**

La capacité de rétention en eau (CRE) est une propriété très recherchée par l'industrie agroalimentaire car elle constitue un lien direct avec les propriétés organoleptiques du produit fini. Elle est définie comme la quantité d'eau qui peut être absorbée par une masse donnée de matière protéique. Plusieurs travaux ont été dédiés à l'étude des facteurs qui peuvent influencer cette propriété fonctionnelle pour les protéines de pois afin de les optimiser. Un des facteurs déterminants de la CRE est la composition en acides aminés des protéines et, plus particulièrement, la présence de groupements polaires, de groupements hydroxyles et de groupements chargés. La méthode mise en œuvre pour extraire les protéines à partir de farine de pois influence significativement leur capacité de rétention en eau (**Boye et al., 2010 ; Fuhrmeister & Meuser, 2003 ; Moreno et al., 2020**). Ainsi, **Stone et al. (2015b)** ont mis en évidence que le procédé d'extraction à partir d'une solution saline, suivi d'une dialyse, permet d'obtenir une meilleure CRE pour les protéines extraites par rapport à un procédé comprenant une extraction à pH alcalin suivie d'une précipitation isoélectrique, et cela à partir de trois farines provenant de cultivars différents. Le procédé d'extraction à partir d'une solution saline, suivi d'une dialyse, favoriserait l'exposition de chaînes latérales et de groupements polaires facilitant l'établissement de liaisons hydrogène (**Stone et al., 2015b**). D'autre part, la CRE est améliorée lorsqu'un traitement thermique est appliqué lors de l'extraction, augmentant le taux de dénaturation des protéines de pois et l'exposition des groupements hydrophiles (**Damodaran et al., 2008**). Par exemple, les travaux de **Swanson (1990)** ont montré qu'un concentré de protéines de pois obtenu par une extraction alcaline et une précipitation isoélectrique par voie humide pouvait avoir une meilleure CRE avec des traitements thermiques modérés lors du procédé d'extraction.

### **I.1.3.3. Les propriétés émulsifiantes et moussantes des protéines de pois**

Grâce à leur nature amphiphile, les protéines de pois possèdent des propriétés émulsifiantes et moussantes intéressantes, même si leur adsorption à l'interface huile/eau ou air/eau se produit lentement en raison de leur taille par rapport à des petites molécules tensio-actives (**Jarzebski et al., 2019 ; McCarthy et al., 2016**).

La capacité d'émulsification des protéines de pois peut être influencée à la fois par des facteurs dépendant directement des protéines (concentration et structure conformationnelle des protéines), des phases à émulsionner (pH, viscosité), mais aussi des procédés d'émulsification mis en œuvre (pression, température, durée) (**Jarzebski et al., 2019 ; McCarthy et al., 2016**).

Concernant l'influence du pH, la capacité d'émulsification des protéines de pois est la plus faible aux valeurs de pH proches de leur pI (~ pH 5) et elle est particulièrement améliorée à pH > 7 et pH < 3 (Chao et al, 2018 ; Jarzebski et al., 2019 ; McCarthy et al., 2016). Comme pour les autres propriétés techno-fonctionnelles, ces propriétés dépendent fortement de la méthode d'extraction des protéines appliquée. Ainsi, il a été montré qu'un isolat de protéines de pois obtenu par une ultrafiltration, suite à des étapes d'extraction par centrifugation, se caractérise par une capacité et une stabilité émulsifiante plus élevées que celles d'isolats obtenus par des précipitations acides, thermiques ou une combinaison des deux techniques (Fuhrmeister & Meuser, 2003). De même, Taherian et al. (2011) ont montré que la capacité émulsifiante est significativement inférieure pour un isolat commercial de protéines de pois par rapport à un isolat obtenu par une extraction saline, puis par des étapes de purification par ultrafiltration et de diafiltration. D'autre part, Can Karaca et al. (2011) ont montré que la capacité d'émulsification est supérieure pour un isolat de protéines de pois extrait en milieu alcalin avant une précipitation isoélectrique par rapport à un isolat obtenu par une extraction saline avant une dialyse. Plusieurs études ont aussi démontré que la capacité et la stabilité émulsifiantes des protéines de pois peuvent être influencées par le cultivar et le génotype du pois dont sont issues ces protéines (Barac et al., 2010 ; Lam et al., 2017 ; Shevkani et al., 2015 ; Stone et al., 2015a). Ainsi, le type de cultivar et le procédé d'extraction appliqué ont un impact sur la composition de l'extrait protéique obtenu ce qui se traduit par des variations des propriétés émulsifiantes des isolats de protéines de pois (Kimura et al., 2008 ; Liang & Tang, 2013). Adebisi & Aluko (2011) ont comparé les propriétés émulsifiantes d'un isolat commercial de protéines de pois (PPI) (Nutri-Pea Ltd., Canada) et des fractions extraites de cet isolat dans l'eau (EE), dans une solution saline (ES) (2 % NaCl), dans une solution alcaline (EA) (0,05 M NaOH) et dans l'éthanol (EL) (70 % éthanol). Des émulsions ont été préparées par ajout d'1 mL d'huile de colza dans 5 mL de chaque dispersion de fractions de protéines extraites par les différentes méthodes à une concentration de 1 % (p/v) dans 0,1 M de tampon phosphate et à pHs 4, 7 et 9. Ces auteurs ont constaté que les émulsions stabilisées par les fractions EE, ES, EL étaient très stables à pH 4, par rapport aux émulsions stabilisées par les fractions PPI et EA. En revanche, les émulsions stabilisées par les fractions PPI et AS ont montré une stabilité émulsifiante accrue à pHs 7 et 9 grâce à la cohésion des protéines interfaciales. Les résultats de ces travaux ont permis de mettre en avant l'influence et l'importance du type de protéine sur la qualité de l'émulsion. Par exemple, une propriété émulsifiante a été retrouvée dans la fraction hydrophobe EL, ce qui a été attribué à la forte interaction des protéines avec la phase lipidique. D'une manière générale, il a bien été démontré

que l'isolat commercial de protéines de pois avait des propriétés émulsifiantes plus faibles qu'un isolat obtenu par des méthodes d'extractions à l'échelle de laboratoire (**Stone et al., 2015b ; Taherian et al., 2011**).

D'autre part, la capacité émulsifiante des protéines peut aussi être évaluée par mesure de la taille et de la stabilité des gouttelettes d'huile pendant les étapes de préparation ou après le stockage. Vu le nombre conséquent de paramètres et de propriétés différentes décrits dans la littérature, un tableau détaillé regroupant les propriétés émulsifiantes des protéines de pois en comparaison avec d'autres protéines d'origine végétale et animale a été proposé par **Ge et al. (2020)**.

Afin d'améliorer les propriétés émulsifiantes des protéines de pois, des études ont été menées pour modifier leur structure par l'application d'un traitement thermique ou d'un traitement par haute pression (**Chao & Aluko, 2018 ; Chao et al., 2018**) ou en complexant les protéines de pois avec des polysaccharides (**Vélez-Erazo et al., 2020**). L'apport de ces procédés ou ajout de polysaccharides représente des solutions prometteuses pour améliorer ces propriétés.

Concernant les propriétés moussantes des protéines de pois, quelques travaux les évaluant ont été publiés récemment (**Chao et al., 2018 ; Stone et al., 2015a ; Xiong et al., 2018**), mais l'étude plus systématique des différents facteurs physico-chimiques pouvant influencer la formation et la stabilité d'une mousse est encore nécessaire (**Boukid et al., 2021**). Les premiers travaux ont cependant mis en évidence une meilleure capacité moussante d'un isolat de protéines de pois à pH 3 en comparaison à des pH  $\geq 5$  (**Chao et al., 2018**). De plus, les isolats de protéines de pois extraits par précipitation saline détiennent de meilleures propriétés moussantes que ceux obtenus par extraction alcaline ou par précipitation micellaire (**Stone et al., 2015**). En comparaison à un isolat commercial de protéines de soja (SPI), un isolat commercial de protéines de pois (PPI) avait une capacité moussante similaire et une stabilité moussante plus élevée (**Zhao et al., 2020**).

#### **I.1.3.4. Les propriétés de gélification**

La capacité de gélification est une propriété fonctionnelle recherchée en ce qui concerne les protéines, et particulièrement dans le cas des protéines végétales, afin de développer des matrices alimentaires aux propriétés texturales et sensorielles spécifiques. Le processus de gélification des protéines est un processus complexe comprenant deux étapes principales, la

dénaturation puis l'agrégation, qui conduisent à la formation d'un réseau protéique tridimensionnel. La gélification peut être induite soit par un procédé physique (traitement thermique, haute pression), soit par un procédé (bio)chimique (acidification chimique ou par ajout de micro-organismes, réticulation enzymatique, ajout de sels) (**Totosaus et al., 2002, Nicolai, 2019**). Les interactions protéines-protéines et protéines-solvant déterminantes lors de l'établissement d'un gel peuvent être influencées par :

- des paramètres extrinsèques liés au procédé de gélification mis en œuvre tels que le pH, la température, la force ionique,

- des paramètres intrinsèques liées aux protéines tels que leur conformation, leur concentration, le cultivar concerné, le procédé ayant permis leur extraction.

Le **tableau I.4** récapitule les travaux publiés concernant la gélification de protéines de pois purifiées ou d'isolats de protéines de pois.

Tableau I.4. Synthèse des principaux travaux de recherches sur la gélification (thermique, acide et enzymatique) de protéines de pois.

Procédé de gélification	Type de protéines de pois	Paramètres physico-chimiques de la dispersion initiale	Paramètres du procédé de gélification appliqué	Principales conclusions	Références
<b>Gélification induite par la chaleur</b>	Trois extraits solubles de pois préparés en laboratoire 1) Extrait riche en globulines 2) Extrait purifié de légumine et extrait purifié de vicilines	1) Tampon Tris-HCl 30 mM pH 7,2 [protéines] entre 10,4 % et 17,4 % 1') Tampon Tris-HCl 30 mM pH entre 5,95 et 8,60 2) Tampon Tris-HCl 30 mM pH 7,1	1) Chauffage à 87 °C entre 0 et 45 min 1' & 2) Chauffage à 87 °C pendant 20 min	1) Augmentation de la force du gel avec la durée du chauffage (force maximale après 20 min de chauffage) quelle que soit la [protéines]. 1') Formation d'un gel pour pH ≥ 6,4 (force maximale à pH 7,1) 2) Seul l'extrait purifié de vicilines gélifie	<b>Bora et al. (1994)</b>
	Deux fractions purifiées : viciline (1) et viciline (2) (contient la convicine) préparées en laboratoire à partir de deux variétés de pois (Solara et Supra)	Tampon phosphate de potassium 75 mM 1) [ protéines ] = 10 % (p/v) pH 6,1 2) [protéines] = 2, 4, 6, 8 et 10 % (p/v) pH 3,8 3) [protéines] = 10 % (p/v) pH 7,6 en présence de 0 à 1 M de NaCl 4) Mélange de légumine/viciline aux ratios 1:0,22, 1:0,57,	Chauffage 100 °C pendant 20 min	1) Formation de gels blancs brillants pour les deux vicilines. 2) Pas de formation de gels à des concentrations < 6 % (p/v) et des gels blancs cassés pour viciline (2) et sensiblement plus blancs pour viciline (1) 3) Gel de viciline (2) transparent de 0 à 0,1 M, turbide à 0,2 M, séparation de phase à 0,5 M et gel lisse et brun à 1 M de NaCl Gel de viciline#1 turbide et opaque de 0 à 1 M de NaCl 4) Gel de légumine opaque	<b>O'Kane et al. (2004a)</b>

<b>Gélification induite par la chaleur</b>		1:1,2 [ protéines totales] = 11 % (p/v) pH 7,6		Pas de gélification après ajout de viciline#2 à la dispersion de légumine pour les ratios 1: 0,57 et 1:1,2 Gélification non impactée par l'ajout de viciline (1) à la dispersion de légumine	
	Fraction purifiée de légumine issue du pois jaune (Solara) Fraction purifiée de glycinine de soja Préparation en laboratoire	1) Concentration minimale de gélification (CMG) : tampon phosphate 75 mM pH 7,6 [protéines] entre 8 et 16 % (p/v) 2) Tampon phosphate 75 mM pH 7,6 [légumine] = 8,4 % [glycinine] = 6,6 %	1) Chauffage 100 °C pendant 30 min  2) Chauffage de 45 à 98 °C puis 98 °C pendant 30 min - refroidissement à 25 °C Influence de la vitesse de chauffage et de refroidissement : 0,5 ou 1 °C/min	1) CMG = 8,4 % pour la légumine de pois et CMG = 6,6 % pour la glycinine de soja 2) Gels de légumine et vicilines plus fermes avec un refroidissement plus lent - Gel moins rigide et gélification améliorée par (mais ne dépend pas) des liaisons disulfures au sein du réseau de gel de légumine par rapport au gel de glycinine qui dépend fortement de la formation des liaisons disulfures	<b>O'Kane et al. (2004b)</b>
	Isolats de protéines de pois préparés en laboratoire (extraction saline puis précipitation isoélectrique) à partir de farines de cinq cultivars de pois (Solara, Supra, Classic, Finale et Espace)	- Tampon phosphate 75 mM pH 7,6 [protéines] = 18 % (p/v)  - Utilisation d'un agent boquant de thiols (N-éthylmaléimide (NEM) 20 mM)	Chauffage de 45 à 98 °C puis 98 °C pendant 30 min - refroidissement à 25 °C  Référence : vitesse de chauffage et de refroidissement : 1 °C/min	1) Pas d'influence de la vitesse de chauffage sur la gélification de tous les cultivars 2) Formation d'un gel plus ferme pour le cultivar Solara, (teneur en légumine la plus élevée) lors d'un refroidissement plus lent - Formation de gels plus fermes pour les cultivars Supra et Classic uniquement en présence de NEM => fermeté du gel réduite par les liaisons disulfures	<b>O'Kane et al. (2005)</b>

<b>Gélification induite par la chaleur</b>			<p>1) Vitesse de chauffage : 0,5 °C/min</p> <p>vitesse de refroidissement : 1 °C/min</p> <p>2) Vitesse de chauffage à 1 °C/min et refroidissement à 0,2 °C/min</p>	<p>- Faible gélification pour les cultivars Finale et Espace (isolat riche en sous-unité <math>\alpha</math> de viciline).</p>	
	<p>Isolat commercial de pois (PPI, Pisane HD, Belgique)</p> <p>Isolat commercial de lupin (LPI) (LPI, LupiE, Allemagne)</p> <p>Isolat commercial de soja (SPI, S974, Pays-Bas)</p>	<p>- Eau déminéralisée pH 5,5</p> <p>[PPI] = 12,5 et 16 %</p> <p>[SPI] = 10 %</p> <p>[LPI] = 16 %</p>	<p>- Chauffage 90 °C pendant 15 min</p>	<p>- Meilleure capacité de gélification, gel plus rigide et des valeurs de paramètres de texture significativement plus élevées pour le SPI par rapport à PPI et LPI malgré une [protéines] plus faible</p> <p>- Pas de différences significatives et de faibles gels de PPI et LPI à la [protéines] de 16 % (p/p)</p> <p>- La gélification de PPI s'est produite lors du chauffage et pas de gélification lors de l'incubation à 5 °C pour les deux concentrations étudiées</p> <p>- Gels plus fermes pour SPI (1,23 N) et PPI (1,34 N) comparés au LPI (0,43 N)</p> <p>- Gel de SPI quasi proche de PPI malgré une [protéines] plus faible</p>	<b>Batista et al. (2005)</b>

<b>Gélication induite par la chaleur</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isolat de protéines de pois (PPI n) extrait au laboratoire à partir d'un concentré par turboséparation</li> <li>- Isolat de protéines de soja (SPI n) extrait au laboratoire à partir de la farine par une extraction alcaline/précipitation isoélectrique</li> <li>- Isolat commercial de protéines de pois (PPI c) (Propulse)</li> <li>- Isolat commercial de protéines de soja (SPI c) (Pro-FAM 982)</li> </ul>	<p>1) Comparaison des gels de PPI c et PPI n</p> <p>Dispersions à 1 % de NaCl dans l'eau déminéralisée [protéines] = 19,6 % (p/p) pour tous les isolats pH 6,5</p> <p>2) Optimisation de la gélication de PPI c</p> <p>Dispersions de 0 à 2 % de NaCl dans l'eau déminéralisée [protéines] = 19,6 % (p/p) pH 7,1</p>	<p>1) Chauffage à 82 ou 92 °C pendant 45 min</p> <p>- Refroidissement et incubation à 4 °C pendant 14 h</p> <p>2) Chauffage à 79, 82, 87, 92 ou 95 °C pendant 25 min</p> <p>- Refroidissement et incubation à 4 °C pendant 14 h</p>	<p>1) Rigidité des gels : PPI c &gt; PPI n</p> <p>Elasticité des gels : PPI n &gt; PPI c pour les deux températures étudiées</p> <p>2) Gels de PPI c plus fermes pour des températures de chauffages plus élevées</p> <p>- Dans les mêmes conditions, les gels de SPI c sont plus rigides et plus élastiques que les gels de PPI c</p>	<b>Shand et al. (2007)</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isolat de protéines de soja (SPI n) extrait au laboratoire à partir de la farine par une extraction alcaline/précipitation isoélectrique</li> </ul>	<p>1) Etude de l'influence de [Transglutaminase] (MTGase, ActivaTM, TG-TI, Ajinomoto) sur PPI c (0 à 0,7 % (p/p)), de la température (22–78</p>	<p>1) Chauffage à 92 °C pendant 45 min</p> <p>- Refroidissement et incubation à 4 °C pendant 14 h</p>	<p>1) Augmentation de la rigidité et de l'élasticité des gels avec :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- L'augmentation de [Transglutaminase]</li> <li>- L'augmentation de la température d'incubation</li> <li>- L'augmentation du temps d'incubation</li> </ul>	<b>Shand et al. (2008)</b>

<b>Géification induite par la chaleur</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isolat commercial de protéines de pois (PPI c) (Propulse)</li> <li>- Isolat commercial de protéines de soja (SPI c) (Pro-FAM 982)</li> </ul>	<p>°C) et du temps d'incubation (10-80 min)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dispersions (1 % NaCl (p/p)) d'eau déminéralisée pHs 6,5 [protéines] = 19,6 % (p/p)</li> </ul> <p>2) Comparaison des gels de PPI c et PPI n</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dispersions dans l'eau déminéralisée pHs 6,5 [protéines] = 10 % (p/p) [Transglutaminase] = 0,6 % (p/p)</li> </ul>	<p>2) Traitement thermique à 50 °C pendant 30 min en présence de MTGase</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Chauffage de 35 à 95 °C avec une vitesse de 2 °C/min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elasticité et rigidité des gels : PPI c ([Transglutaminase] = 0,7 % (p/p)) ≈ SPI c (sans MTGase)</li> </ul> <p>2) Gel plus rigide et élastique à des températures plus basses % aux températures requises pour PPI n en présence de MTGase</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de différences significatives pour les gels de PPI c avec ou sans MTGase</li> </ul>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isolat commercial de protéines de pois (PPI c) (Nutri-Pea Ltd)</li> <li>- Isolat de protéines de pois préparé en laboratoire (extraction saline) (PPI s)</li> </ul>	<p>1) Concentration minimale de géification (CMG) : Dispersions dans 0,3 M NaCl [PPI s] = 4 à 18 % (p/v) [PPI c] = 8 à 20 % (p/v)</p>	<p>1) Chauffage à 95 °C pendant 10 min puis refroidissement et incubation à 4 °C pendant une nuit</p> <p>2) Chauffage de 25 à 95 °C et refroidissement</p>	<p>1) CMG de PPI s = 5,5 % (p/v) CMG de PPI c = 14,5 % (p/v)</p> <p>2) PPI s : Pas d'influence de [protéines] sur le point gel</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesses de chauffage et de refroidissement plus faibles =&gt; rigidité plus élevée</li> </ul>	<b>Sun &amp; Arntfield (2010)</b>

<b>Gélfication induite par la chaleur</b>	<p>- Isolat commercial de protéines de soja (SPI c) (PRO-FAM 974)</p>	<p>2) Point de gels : 0,3 M de NaCl [protéines] = 8 à 18 % (p/v) pH 5,65 à 5,7</p> <p>3) Comparaison PPI s, PPI c et SPI c Dispersions à 0,3 M de NaCl pH 5,7 [protéines] = 14,5 % (p/v)</p>	<p>jusqu'à 25 °C avec vitesses de montées et descentes en température identiques 0,5 ; 1 ; 2 et 4 °C/min</p> <p>3) Chauffage et refroidissement à 2 °C/min</p>	<p>- Point gel dépend de la vitesse de chauffage à 0,5 et 1 °C/min</p> <p>- Point gel ne dépend pas de la vitesse de chauffage à 2 et 4 °C/min</p> <p>3) Rigidité des gels PPI s &gt; SPI c &gt; PPI c</p>	
	<p>- Isolat commercial de protéines de pois (PPI c) (Nutri-Pea Ltd)</p> <p>- Isolat de protéines de pois préparé en laboratoire (extraction saline) (PPI s)</p> <p>- Isolat commercial de protéines de soja (SPI c) (PRO-FAM 974)</p>	<p>1) Impact de la vitesse de chauffage Dispersions à 14,5 % (p/v) dans 0,3 M NaCl</p> <p>1) Impact de la vitesse de refroidissement Dispersions à 14,5 % (p/v) dans 0,3 M NaCl</p> <p>3) Comparaison PPI s, PPI c et SPI c Dispersions à 10,5 % (p/v) dans 0,3 M NaCl</p>	<p>1) 2) Chauffage de 25 à 95 °C puis refroidissement à 25 °C (vitesses de montées et de descentes en température variables : 0,5 ; 1 ; 2 et 4 °C/min)</p> <p>3) Chauffage à 95 °C avec la même vitesse de montée et de descente en température à 2 °C/min</p>	<p>1) Vitesse de chauffage constante (2 °C/min) =&gt; diminution de la rigidité des gels avec l'augmentation de la vitesse de refroidissement + pas d'influence sur la température de gélfication</p> <p>2) Vitesse de refroidissement constante (2 °C/min) =&gt; augmentation de température de gélfication avec l'augmentation de la vitesse de chauffage + pas d'influence sur la rigidité des gels</p> <p>3) Rigidité des gels : SPI c &gt; PPI s &gt; PPI c</p>	<b>Sun &amp; Arntfield (2011a)</b>

<b>Gélication induite par la chaleur</b>	<p>- Isolat commercial de protéines de pois (PPI c) (Nutri-Pea Ltd)</p> <p>- Isolat de protéines de pois préparé en laboratoire (extraction saline) (PPI s)</p> <p>- Isolat commercial de protéines de soja (SPI c) (PRO-FAM 974)</p>	<p>1) Concentration minimale de gélication (CMG) : Dispersions dans 0,3 M NaCl [PPI s] = 2 à 5 % (p/v) en présence de MTGase avec une activité de 10 U/g de protéines</p> <p>2) Influence de MTGase sur la rigidité : Dispersions à 0,3 M de NaCl pH 5,65 à 5,66 [protéines] = 10,5 % (p/v) MTGase avec une activité de 0-30 U/g de protéines</p> <p>3) Comparaison PPI s, PP c et SPI c Dispersions à 10,5 % (p/v) dans 0,3 M NaCl MTGase avec une activité de 10 U/g de protéines</p>	<p>1) Chauffage de PPI s à 95 °C pendant 10 min puis refroidissement et incubation à 4 °C pendant une nuit</p> <p>3) Chauffage de 40 à 95 °C puis refroidissement à 25 °C (vitesses de montées et descentes en température : 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 4 °C/min)</p> <p>3) Chauffage de 40 à 95 °C avec une vitesse de 2 °C/min et refroidissement à 25 °C</p>	<p>1) [CMG] PPI s = 3 % (p/v) en présence de 10 U de MTGase et [CMG] PPI s = 5,5 % (p/v) en absence de MTGase</p> <p>2) Augmentation [MTGase] =&gt; augmentation de la fermeté du gel - [MTGase] constantes =&gt; augmentation de la rigidité du gel avec l'augmentation de [PPI s] - [PPI s] constante =&gt; augmentation de la rigidité des gels lorsque [MTGase] augmente - [MTGase] et [PPI s] constantes =&gt; diminution de la rigidité du gel avec l'augmentation des vitesses de chauffage et de refroidissement</p> <p>3) Rigidité des gels : en présence de MTGase : PPI s &gt; SPI c en absence de MTGase : SPI c &gt; PPI s</p>	<b>Sun &amp; Arntfield (2011b)</b>
--	---	---	--	---	------------------------------------

<b>Gélfication induite par la chaleur</b>					
	<p>- Isolat commercial de protéines de pois (PPI c) (Propulse)</p> <p>- Quatre isolats de protéines de pois (PPI s) préparés en laboratoire par une extraction saline ou une extraction à l'eau puis par ultrafiltration (UF) et diafiltration (DF) sur membranes, différentes combinaisons de pHs de 6 et 7,5 ont été utilisées à chaque étape d'extraction :</p> <p>- PPI s (0,06 M KCl/pH 7,5 : 6 pour UF : DF)</p> <p>- PPI s (0,06 M KCl/pH 7,5 : 7,5 pour UF : DF)</p> <p>- PPIs (H<sub>2</sub>O/pH 7,5: 6 pour UF: DF)</p>	<p>1) Texture des gels : Tampon phosphate pH 6,5 [protéines] = 20 % (p/p)</p> <p>2) Rigidité des gels : Tampon phosphate pH 7 [protéines] 10 % (p/p)</p>	<p>1) Chauffage à 100 °C pendant 60 min (entreposage à 4 °C pendant 24 h)</p> <p>2) Chauffage de 20 à 90 °C avec une vitesse de 10 °C/min</p>	<p>1) Fermeté des gels : (0,06 M KCl/pH 7,5: 6) &gt; (H<sub>2</sub>O/pH 7,5: 6) &gt; (H<sub>2</sub>O/pH 7,5: 7,5) &gt; (0,06 M KCl/pH 7,5: 7,5) &gt; pas de gel PPI c</p> <p>2) - Rigidité des gels : (H<sub>2</sub>O/pH 7,5: 6) &gt; (0,06 M KCl/pH 7,5: 6) &gt; PPIs (H<sub>2</sub>O/pH 7,5: 7,5) &gt; PPI s (0,06 M KCl/pH 7,5: 7,5) &gt; PPI c</p> <p>- Température de gélfication : (0,06 M KCl/pH 7,5: 6) &gt; (H<sub>2</sub>O/pH 7,5: 6) &gt; (H<sub>2</sub>O/pH 7,5: 7,5) &gt; (0,06 M KCl/pH 7,5: 7,5) &gt; pas de gel PPI c</p>	<b>Taherian et al. (2011)</b>

<b>Gélication induite par la chaleur</b>	- PPIs (H <sub>2</sub> O/pH 7,5: 7,5 pour UF: DF)				
	- Isolat de protéines de pois préparé en laboratoire par une extraction saline (PPI s)	<p>1) Etude de l'effet des solutions de Na Dispersions [protéines] = 14,5 % (p/v) dans soit : eau distillée, NaCl 0,3 M, (pH 5,7), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M (pH 5,9), CH<sub>3</sub>COONa 0,3 M (pH 6,3) et NaSCN 0,3 M (pH 6)</p> <p>2) Etude des liaisons non-covalentes contribuant à la gélication par ajout aux dispersions de protéines à 14,6 % et 0,3 M NaCl de : chlorhydrate de guanidine GuHCl = interrompt les ponts hydrogènes et les interactions hydrophobes</p>	<p>Chauffage de 25 à 95 °C puis refroidissement à 25 °C (vitesses de montées et de descentes en température variables : 0,5 ; 1 ; 2 et 4 °C/min)</p>	<p>1) Augmentation de la rigidité des gels en présence de sels % à l'eau : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> &lt; CH<sub>3</sub>COONa &lt; NaCl &lt; NaSCN</p> <p>2) Implication des interactions hydrophobes, électrostatiques et des liaisons hydrogènes dans la formation et la rigidité des gels de protéines de pois</p> <p>3) Non implication des liaisons covalentes dans la formation de gels de pois - Petites contributions des ponts disulfures dans l'amélioration des caractéristiques des gels</p>	<b>Sun &amp; Arntfield (2012)</b>

<b>Gélification induite par la chaleur</b>		<p>urée = interrompt les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes            PG = interrompt les interactions hydrophobes et promouvoit les liaisons hydrogènes et les interactions électrostatiques</p> <p>3) Etude des liaisons covalentes contribuant à la gélification par ajout de :            DTT = interrompt les ponts disulfures            NEM= interrompt les ponts disulfures            β-mercaptoéthanol = interrompt les ponts disulfures</p>			
	Isolats de protéines de pois préparé en laboratoire par une extraction	<p>[protéines] = 15 % (p/v)            pH = 3, 5, 7, 9</p>	<p>Chauffage 95 °C pendant 30 min            refroidissement à 20 °C entreposage 4 °C pendant 1 nuit</p>	<p>- Organisation plus grossière du réseau des gels et gels moins fermes aux pH proches du pI de protéines de pois</p>	<p><b>Munialo et al. (2014b)</b></p>

<b>Gélication induite par la chaleur</b>	saline/précipitation isoélectrique (PPI)	[CaCl <sub>2</sub> ] = 0,01 M ou [CaCl <sub>2</sub> ] = 0,1 M ou [NaCl] = 0,3 M		- Capacité plus élevée des gels à stocker élastiquement l'énergie lorsqu'ils ont une structure moins grossière	
	Isolats de protéines de pois préparés en laboratoire par une extraction saline/précipitation isoélectrique (PPI)	1) pH = 3  [protéines] = 10 à 15 % (p/v)  2) [protéines] = 10 % (p/v)  pH = 3 à 4,2	Chauffage 95 °C pendant 30 min refroidissement à 20 °C entreposage 4 °C pendant 1 nuit	1) Augmentation de la fermeté des gels et pas d'altération significative de la microstructure des gels lorsque [protéines] augmente 2) Augmentation de la fermeté lorsque le pH augmente - [protéines] constante et variation de pH => microstructure différente en fonction du pH - La transition entre les 2 types de structures se produit à pH ~ 3,7	<b>Munialo et al. (2015)</b>
	Une fraction protéique issue d'une farine de pois (Alimex) Une fraction protéique issue de la fraction grossière de la farine de pois Une fraction protéique issue de la fraction fine de la farine de pois	[protéines] = 30 % (p/p)  - Présence ou non de transglutaminase (MTGase/protéine ratio 1 /17,3)	Chauffage de 60 à 90 °C (0,1-6 °C/min) et refroidissement de 90 à 25 °C (0,3 °C/min)	- Fermeté du gel augmentée par la présence d'amidon - Fermeté du gel affaiblie pour des fractions riches en protéines ou en fibres - Influence des vitesses de chauffage et de refroidissement sur la fermeté des gels - MTGase permet de réticuler la protéine issue de la fraction fine de la farine (riche en protéines) => gel plus ferme	<b>Pelgrom et al. (2015a)</b>

<b>Gélicification induite par la chaleur</b>	Isolat commercial de pois (Nutralys F85G)				
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentré commercial de protéines de pois (PPC, Roquette)</li> <li>- Deux hydrolysats obtenus par action de la trypsine pancréatique sur PPC pendant 25 ou 120 min (PPH 25 et PPH 120)</li> </ul>	Dispersion dans l'eau [protéines] = 12 % (p/p) pHs 2 ; 6,5 et 8	- Chauffage de 20 à 90 °C puis 90 °C pendant 30 min et Refroidissement à 20 °C (5 °C/min)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Capacité de gélicification très faible à pH 2.</li> <li>- Gels plus rigides et fermes à pH 6,5 et 8</li> <li>- Réduction de la capacité de gélicification après la procédure d'hydrolyse (dégradation des protéines globulaires)</li> </ul>	<b>Felix et al. (2017)</b>
	Deux isolats commerciaux de protéines de pois : PPI A obtenu par extraction alcaline/précipitation isoélectrique (PEVESA) PPI B obtenu par solubilisation dans l'eau et concentration des protéines solubles après décantation du	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dispersions à (2 % (p/p) de NaCl + 4,5 % (p/p) de caséinate de sodium)</li> <li>[protéines] = 20 à 23 % (p/p)</li> <li>pHs 6,4 et 6,98 respectivement pour PPI A et PPI B</li> <li>Présence ou non de l'enzyme de</li> </ul>	Chauffage à 80 °C pendant 5 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sans MTGase : tous les gels ont une structure composée de regroupements d'agrégats sphériques de globulines</li> <li>- En présence de MTGase : structure plus poreuse et hétérogène (présence de filaments dans PPI A et sphères écrasées dans PPI B)</li> <li>- Gel PPI B plus élastique, cohésif, dur et moins rigide que le PPI A aux deux concentrations étudiées</li> </ul>	<b>Moreno et al. (2020)</b>

Gélfication induite par la chaleur	résidu insoluble (COSUCRA)	réticulation (MTGase 0 ou 5 U/g protéines)			
	Concentré de protéines de pois (PPC) préparé en laboratoire	[protéines] = 12 % (p/p)  Traitement par plasma froid atmosphérique (ACP) puis ajustement pH 6,9	1) Chauffage à 70, 80 et 90 °C pendant 30 min puis refroidissement à 4 °C pendant 24 °C  2) Chauffage de 25 à 90 °C (2 °C/min) puis 90 °C pendant 30 min et refroidissement à 4 °C	1) Augmentation de T° traitement thermique => augmentation de rigidité des gels 2) PPC traité par ACP : Réduction de la température de dénaturation des protéines, augmentation de l'hydrophobie et des groupements thiols de surface => formation d'agrégats fibrillaires => formation de gels solides, élastiques avec une grande capacité de rétention en eau PPC non traité par ACP : pas de formation de gels	<b>Zhang et al. (2021)</b>
	Concentré et isolat de protéines de pois (PPC et PPI) préparés en laboratoire	[protéines] = 15 % (p/p)  pH 7	Chauffage 95 °C, pendant 15 min puis refroidissement à 20 °C	- Plus d'amidon dans les fractions => plus de fermeté des gels - Gel plus ferme et structure plus homogène pour PPC par rapport à PPI (structure de gel hétérogène) - Participation de la teneur en sucres et en cendres dans la capacité de gélfication	<b>Kornet et al. (2021b)</b>
	Concentrés commerciaux (KeyLeaf Life Sciences) de protéines de lentilles (LPC), de pois (PPC) et de féverole	pH 7  [protéines] = 7,5-15 % (p/p)  [NaCl] = 0,5 M ou de [CaCl <sub>2</sub> ] = 0,25 M	1) Concentration minimale de gélfication (CMG) : Chauffage 95 °C pendant 60 min puis	1) CMG plus élevée pour PPC 2) G' plus grand pour les 3 concentrés dans (CaCl <sub>2</sub> > Eau > NaCl) - Structure de gels plus ordonnée et des gels plus fermes et denses pour LPC et FPC par rapport à PPC	<b>Guldiken et al. (2021)</b>

<b>Gélication induite par la chaleur</b>	(FPC) obtenus par extractions alcalines/précipitations isoélectriques puis séchages par atomisation		entreposage à 4 °C pendant une nuit  2) Chauffage de 25 à 95 °C (2 °C/min) puis refroidissement à 25 °C		
	Isolat de protéines de pois (PPI) préparé en laboratoire par une extraction en milieu alcalin, précipitation isoélectrique puis dialyse	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dispersion dans tampon phosphate salin (137 mM NaCl, 10 mM tampon phosphate, 2,7 mM KCl)</li> <li>[protéines] = 17 et 21 % (p/p)</li> <li>- Alcalinisation à pH 12 pendant 1, 24 ou 48 heures puis réajustement à pH 7 (pH-shifting)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chauffage 92 °C pendant 1 ou 2 heures puis refroidissement et entreposage à 4 °C pendant une nuit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Déplieement des protéines à pH 12 avant chauffage + temps d'agrégation pendant le chauffage plus lent =&gt; réseau de type polymère (meilleur qu'un réseau particulière à pH neutre) =&gt; gel plus rigide</li> <li>- Pas d'effet du temps de chauffage sur les propriétés mécaniques des gels</li> <li>- Augmentation du temps d'alcalinisation =&gt; gels plus solides, élastiques et réticulés</li> <li>- Temps d'alcalinisation 24 h + [protéines] = 21 % (p/p) + temps de chauffage 2 h =&gt; Excellentes propriétés mécaniques et capacité de rétention en eau comparable aux gels de certaines protéines animales</li> <li>- Implication des interactions hydrophobes et liaisons hydrogènes dans la formation du gel après alcalinisation</li> <li>- Temps de maintien plus lent =&gt; plus de liaisons hydrogènes pour renforcer les gels</li> </ul>	<b>Zhu et al. (2021)</b>

Procédé de gélification	Type de protéines de pois	Paramètres physico-chimiques de la dispersion initiale	Paramètres du procédé de gélification appliqué	Principales conclusions	Références
<b>Gélification par acidification à froid</b>	- Isolats de protéines de pois et de soja préparés en laboratoire par des extractions alcalines/précipitations isoélectriques (PPI, SPI) - Isolat commercial de protéines lactosériques (WPI) (Bipro)	1) Préparation d'agrégats fibrillaires : dispersions dans l'eau pH 2 [protéines] = 4 % (p/v) 2) Ajustement pH 7 [protéines] = 4 à 16 % (p/v)	1) Chauffage à 85 °C pendant 20 h puis refroidissement et incubation à 4 °C 2) Acidification par [GDL] = 0,3-1 % (p/v) et incubation pendant 15 h T = 25 °C	1) Augmentation de la taille des agrégats fibrillaires des protéines de pois avec l'augmentation de la durée de chauffage - Fibrilles plus ramifiées pour les protéines de pois par rapport aux autres protéines 2) Gels préparés à partir des fibrilles de PPI ou de fibrilles de SPI sont moins fermes que le gel de fibrilles de WPI pour des concentrations respectives de 16, 4 et 2,5 % (p/v)	<b>Munialo et al. (2014a)</b>
	Trois extraits solubles de pois préparés en laboratoire 1) Extrait riche en globulines (PP) 2) Extrait de globulines riches en vicilines (Vic) 3) Extrait de globulines riches en légumine (Leg)	Préparation des agrégats : tampon phosphate pH 7,2 [protéines] = 1, 2, 3,5 ou 4 % (p/p) Chauffage de 40 à 85 °C (1 °C/min), maintenu à 85 °C pendant 1 heure puis refroidissement et incubation à 4 °C	2) Acidification par [GDL] = 0,19, 0,21 ou 0,22 % (p/v)	- Macro-agrégats insolubles de légumine défavorables à la formation de gel - $G' (Vic) > G' (Leg)$ - Prédominance des interactions hydrophobes dans la formation des gels de pois	<b>Mession, Chihi et al. (2015)</b>
	Isolat commercial de protéines de pois (PPI, Shuangta Food Co., Ltd) broyé au laboratoire	Préparation des échantillons : [protéines] = 0,206 % (p/p) Différents temps de broyage des poudres (0, 2,5, 5, 7,5, 10 et 15 min/25 °C) Chauffage à 95 °C pendant 30 min	Acidification par [GDL] = 0,3 % (p/p) à 25 °C pendant 1 h puis incubation à 4 °C pendant 12 h	Augmentation du temps de broyage => amélioration des paramètres rhéologiques et de la capacité de rétention d'eau des gels	<b>Liu et al. (2021)</b>

Procédé de gélification	Type de protéines de pois	Paramètres physico-chimiques de la dispersion initiale	Paramètres du procédé de gélification appliqué	Principales conclusions	Références
Gélification par voie enzymatique	Fractions purifiées de globulines et d'albumines de pois préparées en laboratoire	<p>Trois échantillons différents préparés pour chaque fraction :            [protéines] = 10 % (p/p) 50 mM de tampon phosphate pH 7 + 20 mM NaCl</p> <p>a - Protéines natives (aucun traitement)</p> <p>b - Dénaturation thermique :            Chauffage à 80 °C pendant 1 h (1 °C/min) et refroidissement (1 °C/min)</p> <p>c - Dénaturation chimique : 20 mM dithiothréitol (DTT) pendant 1 nuit</p> <p>1) Rendement de réticulation :            [protéines] = 10 % (p/p) pH 7</p> <p>2) CMG pour les trois échantillons : [protéines] = 1 à 10 % (p/p) pH 7</p> <p>3) Rigidité des gels : [protéines] = 10 % (p/p) pH 7</p>	<p>1) Ajout pour les 3 échantillons MTGase (20 Unités/g de protéine) et incubation à 40 °C pendant 10 à 300 min</p> <p>2) MTGase (20 Unités/g de protéine) et incubation pendant 10 h à 40 °C</p> <p>3) MTGase (20 Unités/g de protéine) à 40 °C</p>	<p>1) Augmentation du rendement de réticulation pour les deux fractions après application des deux traitements + formation de molécules de haut poids moléculaire piégées au sommet des gels</p> <p>2) Fraction albumine : pas de gel pour les deux traitements            Fraction globuline : CMG (DTT) &lt; CMG (native) &lt; CMG (thermique)</p> <p>3) Rigidité des gels :            Fraction albumine : pas de gels            Fraction globuline :            G'(DTT) &lt; G' (native) &lt; G' (thermique)</p>	Djoullah et al. (2018)

Procédé de gélification	Type de protéines de pois	Paramètres physico-chimiques de la dispersion initiale	Paramètres du procédé de gélification appliqué	Principales conclusions	Références
<b>Comparaison de 3 procédés de gélification : par la chaleur, par acidification à froid et par action enzymatique</b>	- Isolats commerciaux de protéines de pois (PPI, NUTRALYS S85F, Roquette) et de poudre de lait écrémé (SMP, Lactalis)	- Dispersions à 1 % de NaCl  pH 7,17  [protéines] = 7,4 ou 14,8 % (p/p) et ratio 1/1	Trois différents traitements appliqués :  - Traitement thermique : Chauffage à 80 ou 90 °C pendant 1 h puis refroidissement à 20 °C  - Traitement acide [GDL] = 1 ou 2 % (p/v) et incubation à 30 °C pendant 20 h  - Traitement enzymatique par : chymosine (0,1 ; 0,5 ; 1 et 2 %), MTGase (0,05 ; 0,1 et 0,3 %) et CaSO <sub>4</sub> (0,3 et 1 %) seules ou combinées	- PPI : G' acide > G' enzymatique > G' thermique  - Gélification plus précoce pour PPI par rapport à SMP pour les traitements thermiques et acide  - Elasticité des gels : Enzymatique > acide > thermique	<b>Ben-Harb et al. (2018)</b>

D'après le **tableau I.4**, plusieurs conclusions peuvent être tirées des travaux portant sur les différentes techniques de gélification des protéines de pois et qui peuvent permettre d'optimiser les différents paramètres de gélification pour générer des structures de gels bien définies avec des caractéristiques rhéologiques et texturales souhaitées. Dans la littérature, il a été constaté que la gélification thermique est la technique la plus utilisée et étudiée pour générer des gels de protéines de pois. Cependant, il a bien été démontré dans tous les travaux que par rapport aux isolats de protéines de pois préparés à l'échelle de laboratoire, l'isolat commercial présentait de mauvaises propriétés gélifiantes après l'application des différentes techniques de gélification, comme une augmentation de la concentration minimale de gélification (CMG) et une diminution du module d'élasticité ( $G'$ ). Cela avait été attribué à une dénaturation des protéines de pois lors de leur production à grande échelle (**Adebiyi & Aluko, 2011; Shand et al., 2007; Sun & Arntfield, 2011c**). Toutefois, les travaux de **Sun & Arntfield (2011c)** ont révélé que la CMG des protéines d'un isolat commercial peut être améliorée par l'ajout d'un sel tel que le NaCl qui peut renforcer les interactions intermoléculaires et réduire les répulsions électrostatiques, améliorant ainsi l'hydratation des molécules protéiques et réduisant la CMG. Des résultats similaires ont été rapportés par **Zhao et al. (2020)**. D'autre part, et comparé à l'isolat de protéines de pois, l'isolat de protéines de soja avait une meilleure capacité de gélification avec des gels plus fermes, plus rigides et des structures plus ordonnées (**Batista et al., 2005 ; Munialo et al., 2014a ; Shand et al., 2007**). Ceci a été attribué à la composition des fractions de ces deux protéines. Pour les protéines de pois par exemple, cette composition peut varier d'un cultivar à un autre induisant ainsi des variations majeures dans les propriétés de gélification (**O'Kane et al., 2005**). Ainsi ces auteurs ont rapporté qu'à partir de cinq isolats de protéines de pois extraits au laboratoire et issus de différents cultivars, des gels plus rigides ont été obtenus par l'isolat contenant la teneur la plus élevée en légumine. En parallèle, il a été constaté que la formation de liaisons disulfures était un facteur qui pouvait empêcher le renforcement du réseau de gel. Ces résultats contradictoires sont en parfait accord avec d'autres travaux qui ont considéré que la viciline est la principale fraction qui permet de renforcer le réseau de gel de protéines de pois grâce à la prédominance des interactions hydrophobes, électrostatiques et liaisons hydrogène (**Bora et al., 1994 ; Messian et al., 2015 ; O'Kane et al., 2004a ; Sun & Arntfield, 2012**). Ainsi, des isolats avec une teneur plus élevée en viciline pourraient être plus appropriés pour la formation de gels (**Barac et al., 2015 ; O'Kane et al., 2005**). Il a aussi été constaté que la présence d'amidon (capacité élevée de rétention d'eau), de sucres et de cendres dans la composition participait à l'augmentation de la fermeté des gels (**Kornet et al., 2021b ; Pelgrom et al., 2015b**).

Ces différentes compositions peuvent résulter de différentes méthodes d'extraction et de fractionnement largement étudiées et comparées. Ce qui est à retenir est que les deux extractions, alcaline puis précipitation isoélectrique et l'extraction saline, peuvent générer des isolats de protéines de pois avec des propriétés gélifiantes intéressantes (**Munialo et al., 2015 ; Sun & Arntfield, 2010 ; Taherian et al., 2011**). De plus, **Kornet et al. (2021b)** ont montré que des extractions et fractionnements limités à partir de concentrés de pois sont préférables pour l'obtention d'un « degré de nativité » des protéines de pois plus élevé, et ainsi de meilleure fermeté et homogénéité de la structure du gel. Par ailleurs, et dans le but d'optimiser les facteurs extrinsèques qui peuvent influencer considérablement la propriété de gélification des protéines de pois, plusieurs études ont portées sur la détermination des conditions idéales de ces gélifications, impliquant les températures de traitement thermiques, les temps et vitesses de chauffage et de refroidissement, la force ionique, le pH, l'ajout d'enzymes de réticulation, pour obtenir des caractéristiques finales des gels de protéines de pois optimisées. Ainsi, il a été prouvé que la capacité de gélification thermique était meilleure aux pHs neutres et alcalins et à des forces ioniques modérées (**Felix et al., 2017 ; Munialo et al., 2014b**). De plus, toutes les températures des traitements thermiques appliqués dépassaient la température de dénaturation des protéines de pois et se situaient entre 85 et 100 °C. Cependant, la force des gels augmentait avec l'augmentation de la durée de chauffage (**Bora et al., 1994**). Par contre, la vitesse de chauffage n'avait pas un impact significatif sur la force des gels (**O'Kane et al., 2005**), et à l'inverse d'une vitesse de refroidissement plus lente a permis dans de nombreuses recherches d'améliorer la rigidité des gels et cela grâce au prolongement du temps de gélification permettant ainsi de faciliter et favoriser les interactions intermoléculaires et le réarrangement structurale qui se poursuit lors du refroidissement (**O'Kane et al., 2004b ; Sun & Arntfield, 2011a**). D'autre part, l'ajout d'enzymes de réticulation telles que la MTGase s'est avéré très efficace pour le renforcement du réseau et l'augmentation de la résistance et de l'élasticité des gels (**Djoullah et al., 2018 ; Shand et al., 2008 ; Sun & Arntfield, 2011b**). Enfin, et pour cerner les différences entre les trois techniques de gélification mentionnées auparavant, **Benharb et al. (2018)** ont comparé les propriétés rhéologiques de ces trois techniques sur un isolat commercial de protéines de pois. Les résultats ont révélé que les gels obtenus par acidification étaient nettement plus fermes grâce aux interactions électrostatiques entre les agrégats de protéines de pois qui avaient un impact majeur sur les propriétés du gel.

## **I.2. Les protéines du lait bovin**

Les protéines laitières sont très utilisées dans l'industrie car elles possèdent des qualités nutritionnelles intéressantes dues à un bon équilibre en acides aminés. De plus, leurs propriétés fonctionnelles (capacités gélifiantes, moussantes, émulsifiantes et de rétention d'eau) sont largement exploitées dans la formulation de nombreux produits alimentaires. Elles sont présentes dans le lait bovin à une concentration entre 23 à 44 g/L avec une moyenne de 34 g/L et sont classées en deux grandes catégories selon leur critère de solubilité : les caséines qui représentent 80 % de la teneur totale en protéines (soit 25 g/L), précipitables à pH 4,6, et les protéines solubles ou protéines lactosériques ( $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine et la sérum albumine principalement) qui représentent 20 % de la concentration totale (soit 6 à 7 g/L) (Walstra et al., 2006).

### **I.2.1. Composition et structure des protéines du lait**

#### **I.2.1.1. Les caséines et leur auto-assemblage en micelles de caséines**

Les caséines, protéines majeures du lait sont des phosphoprotéines associées sous forme de micelle de caséine et classifiées selon 4 types de molécules :  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - et  $\kappa$ -caséines en quantités relatives et respectives de 4 : 1 : 3,5 : 1,5 (Schmidt, 1982). Grâce à la présence de résidus phosphoséryls dans leur séquence et à leur richesse en résidus aspartyls et glutamyls, ionisés au pH natif du lait (Swaisgood, 1993), les caséines laitières sont des protéines acides, chargées négativement dans le lait (charge totale négative à pH 6,7 de -20 mV). Leurs principales propriétés physicochimiques sont présentées dans le **tableau I.5**.

**Tableau I.5.** Propriétés physicochimiques des principales protéines du lait (Walstra et al., 2005).

Propriétés	Caséine $\alpha_{s1}$	Caséine $\alpha_{s2}$	Caséine $\beta$	Caséine $\kappa$	$\beta$ -lactoglobuline	$\alpha$ -lactalbumine	Albumine sérique
Teneur (g/100 g de protéine)	32	8,4	26	9,3	9,8	3,7	1,2
Poids moléculaire (kDa)	23,6	25,2	23,9	19,0	18,3	14,2	66,3
Résidus d'acides aminés/molécule	199	207	209	169	162	123	582
Phosphosérines (par molécule)	8	11	5	1	0	0	0
Cystéines (par molécules)	0	2	0	2	5	8	35
Liaison S-S (par molécule)	0	1	0	-	2	4	17
Hydrophobicité (u.a*)	25	23	29	22	29	28	24
Résidus chargés (% par molécule)	34	36	23	21	30	28	34
pH isoélectrique	4,5	5,0	4,8	5,6	5,2	4,3	4,8
Température de dénaturation (°C)	-	-	-	-	78	62	64

\*u.a : unité arbitraire.

#### I.2.1.1.1. Les caséines $\alpha$ s

##### *La caséine $\alpha_{s1}$*

Avec une concentration autour de 12 g/L (représentant 40 % dans le lait bovin), la caséine  $\alpha_{s1}$  est la caséine majoritaire du lait bovin. Composée de 199 acides aminés, elle possède dans sa séquence primaire trois régions hydrophobes ainsi qu'une zone polaire chargée négativement regroupant la majorité des phosphosérines. Dans son environnement naturel à pH 6,7, cette protéine est en interaction avec les minéraux et particulièrement le calcium (une mole de caséines  $\alpha_{s1}$  associe huit moles de calcium) et possède ainsi des propriétés d'auto-association grâce aux possibilités d'interactions électrostatiques, notamment lorsque la force ionique est élevée (Payens, 1979). D'autre part, cette protéine est connue par sa propriété de « chaperonne moléculaire » dans le sens où elle peut stabiliser d'autres protéines laitières ou végétales contre l'agrégation et la précipitation lors des traitements thermiques (Morgan et al., 2005). Dépendamment des conditions du milieu, la caséine  $\alpha_{s1}$  est capable de former des agrégats amorphes ou fibrillaires et peut interagir et s'associer avec d'autres protéines (telles que les caséines  $\beta$  et  $\kappa$ ) en formant des complexes solubles de haut poids moléculaire dont la taille peut atteindre 1,4 MDa (Trewick, 2012).

### ***La caséine $\alpha_{s2}$***

La caséine  $\alpha_{s2}$ , en proportion plus faible dans le lait (10 %) est caractérisée par une sensibilité importante au calcium, plus élevée que celle de la caséine  $\alpha_{s1}$  (**Walstra & Jenness, 1984**). Considérée comme la plus hydrophile des caséines, cette caséine se démarque par ses trois zones phosphorylées et hydrophiles responsables de la fixation du phosphate de calcium. Contrairement à la caséine  $\alpha_{s1}$ , cette caséine possède 2 cystéines et une capacité à former des ponts disulfures. Elle peut ainsi être présente sous deux formes : monomérique avec la formation de ponts disulfures intramoléculaires ou dimérique grâce à l'association des monomères par des ponts disulfures (**Rasmussen et al., 1992 ; Rasmussen et al., 1994**).

#### **I.2.1.1.2. La caséine $\beta$**

Présente à 35 % dans le lait et contrairement aux caséines  $\alpha_s$ , la caséine  $\beta$  est moins sensible à la précipitation en présence de calcium. La présence de résidus d'acides aminés hydrophobes (29 % de résidus latéraux d'acides aminés apolaires) en quantités importantes (**Aoki, Yamada, & Kako, 1990**) et de proline sur la région C-terminale non chargée lui confère un caractère hydrophobe marqué (**Walstra & Jenness, 1984**). Bien que considérée comme la caséine la plus hydrophobe (Tableau I.3), cette protéine présente des propriétés amphiphiles grâce à la présence de nombreux résidus aspartiques et glutamiques sur sa partie N-terminale hydrophile (**Walstra et al., 2005**). D'autre part, étant principalement liée à la micelle de caséine par des interactions hydrophobes, elle possède la propriété de se dissocier de la micelle de caséine à basses température (par exemple à 4 °C).

#### **I.2.1.1.3. La caséine $\kappa$**

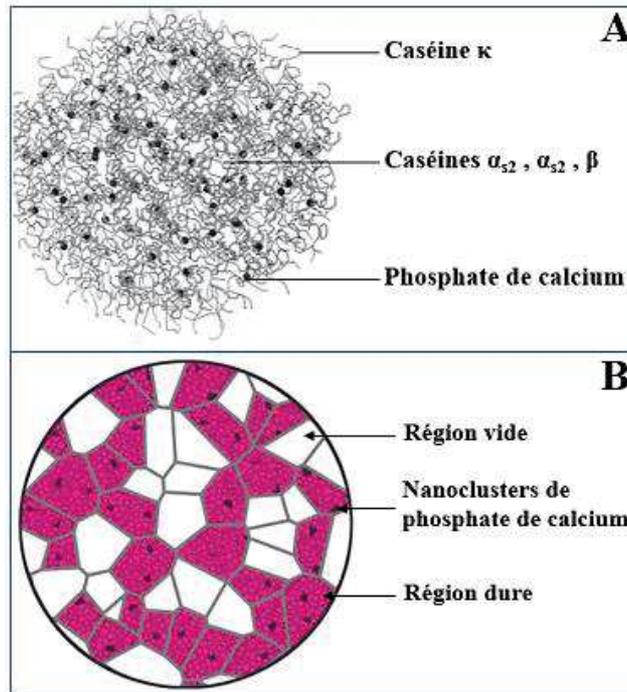
Présente à 12 à 15 % dans le lait, cette protéine, la plus petite des caséines (19 kDa avec 169 résidus d'acides aminés), est présente dans le lait de vache à une concentration de 4-5 g/L. Amphipolaire, elle a la particularité d'être glycosylée sur sa partie C-terminale hydrophile. Cette caséine se retrouve ainsi principalement à la surface de la micelle en interaction forte avec la phase soluble du lait apportant ainsi une hydrophilie de surface et une bonne stabilité micellaire. D'autre part, elle a la particularité de pouvoir être hydrolysée par la chymosine suite à une coupure enzymatique réalisée entre les acides aminés phénylalanine et méthionine en position 105 et 106, hydrolyse qui solubilise ainsi le caséinomacropeptide (7 kDa) et induit la formation de para  $\kappa$ -caséine en surface des micelles, insoluble et hydrophobe (**Wong et al., 1996**). Ce changement de polarité de surface permet ainsi à la micelle de pouvoir s'auto-

associer par des liaisons hydrophobes et être à l'origine de la formation du réseau protéique des caillés fromagers. Après purification, des auteurs (**Talbot & Waugh, 1970**) ont observé que la  $\kappa$ -caséine pouvait être présente sous des formes variées allant du simple monomère à des oligomères constitués de huit monomères ou plus qui interagissent par des liaisons covalentes. De plus, il a été rapporté la présence de deux résidus de cystéine (Cys 32 et Cys 109) dans cette caséine, liés par des ponts disulfures dans les oligomères (**Rasmussen et al., 1992**) et formant une liaison covalente intramoléculaire dans le monomère (**Rasmussen et al., 1994**). Cette caséine est connue pour sa capacité d'agrégation et de formation de complexes lié par des ponts disulfures pendant le traitement thermique, avec elle-même ou avec d'autres protéines telles que les protéines lactosériques.

#### **I.2.1.1.4. Les micelles de caséines**

Les micelles de caséines sont des colloïdes protéiques sphériques et polydisperses, caractérisés par des tailles pouvant aller de 50 à 650 nm avec un diamètre hydrodynamique moyen entre 100 et 200 nm, stabilisés par des minéraux sous forme de phosphate de calcium de 2 nm (**De Kruif et al., 2012**). Ces micelles sont considérées comme étant des systèmes poreux et dynamiques, chargés négativement au pH du lait (-18 à -20 mV). Elles sont au nombre de  $1,14 \times 10^{17}$  micelles par litre de lait. Ces supramolécules sont composées essentiellement de caséines (93 %) et de minéraux (7 %) et sont très hydratées (3,7 g d'eau/g de caséines) (**De Kruif et al., 2012 ; McMahon & Brown, 1984**). Plusieurs études basées sur des techniques d'analyses structurales telles que la microscopie électronique (TEM, SEM, AFM), la diffusion des rayons X et neutrons aux petits angles (SAXS et SANS) ont permis d'approfondir la structure micellaire et la connaissance de sa structure interne (**Bahri et al., 2018 ; Ingham et al., 2015**) et différents modèles structuraux ont été proposés (**Dalgleish, 2011**). On peut citer par exemple le modèle sub-micellaire qui a été modifié par **Walstra (1999)** et qui décrit la micelle comme étant un assemblage de sous-unités protéiques de taille comprise entre 5 et 25 nm. Les sub-micelles sont constituées d'un noyau hydrophobe contenant les caséines  $\alpha$ s et  $\beta$  et d'une couche externe riche en caséine  $\kappa$ . Le modèle décrit par **Holt et al. (2003)** considère la micelle de caséines comme une structure ouverte et suggère que le phosphate de calcium est présent sous forme de « nanoclusters », assurant ainsi la réticulation des caséines pour former le réseau protéine à l'origine des micelles (**Figure I.7, A**). Plus récemment, **Bouchoux et al. (2010)** ont développé le modèle dit de « hard-sphère » qui considère la micelle comme étant une éponge comprenant des espaces vides compressibles et d'autres incompressibles pour former une structure poreuse (**Figure I.7B**). Aujourd'hui, les auteurs convergent vers une

structure formée d'un réseau de caséines stabilisées par des interactions hydrophobes et par les nanoclusters de phosphate de calcium.



**Figure I.7.** A: Modèle à structure ouverte de la micelle de caséine (Holt et al., 2003) ; B: Modèle Hard-sphère (Bouchoux et al, 2010).

### I.2.1.2. Les protéines lactosériques

Ces protéines représentent la fraction soluble des protéines du lait bovin (20 à 25 % (p/p) des protéines totales) et sont composées de trois protéines majeures ( $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine et sérum albumine) dont les propriétés physicochimiques sont présentées dans le **tableau I.5**. Elles présentent de même dans des proportions beaucoup plus faibles des immunoglobulines et de la lactoferrine. Les immunoglobulines sont connues pour leur rôle biologique de neutralisation des substances étrangères. Elles sont présentes à 9 % dans le lactosérum et classées en cinq familles : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE. Leur température de dénaturation est autour de 72 °C avec un pI de 5,5-6,8. La lactoferrine quant à elle est une glycoprotéine de pI de 8,4 - 9, connue pour son effet anti-microbien, anti-oxydant, et anti-inflammatoire.

L'extraction des protéines lactosériques du lait se fait après séparation des caséines réalisée soit par coagulation enzymatique des caséines grâce à la présure, soit par précipitation des caséines à leur pH isoélectrique (pH 4,6). A l'échelle industrielle, deux types de protéines sériques peuvent être préparés : (1) des concentrés de protéines, présentant 30 à 85 % de

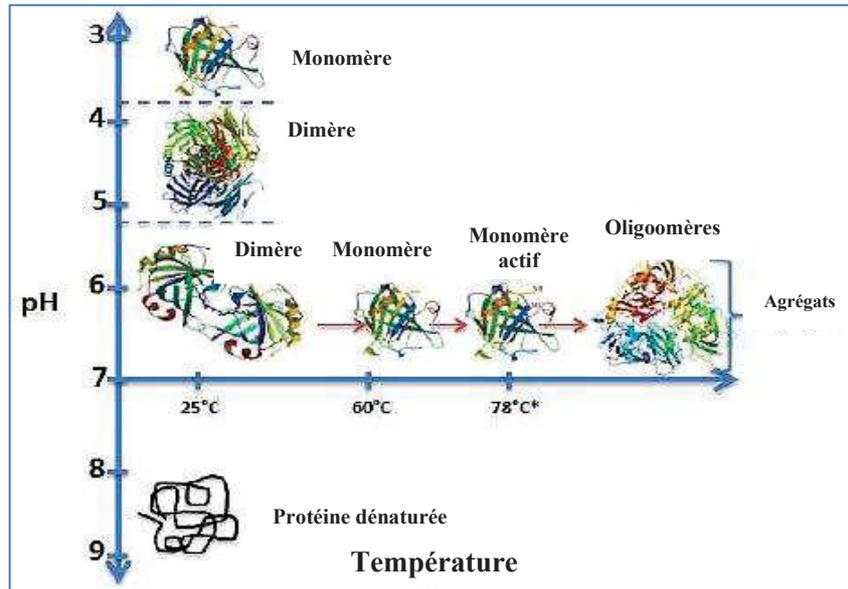
protéines sériques couramment notés WPC (Whey Protein Concentrate) et obtenus par ultrafiltration/diafiltration des caséines suivi d'un séchage par atomisation et (2) des isolats de protéines contenant jusqu'à 95 % de protéines sériques notés WPI (Whey Protein Isolate) obtenus après une séparation par chromatographie échangeuse d'ions et un séchage par atomisation (**Mulvihill & Ennis, 2003**). La composition et les teneurs en fractions protéiques sont bien définies pour le lactosérum du lait bovin, mais différent selon les mammifères et les méthodes d'extractions. Ces protéines sont thermo et barosensibles.

#### **I.2.1.2.1. La $\beta$ -lactoglobuline**

Représentant la fraction majeure (environ 50 % des protéines lactosériques) et 12 % environ du total des protéines du lait bovin, la  $\beta$ -lactoglobuline est une protéine globulaire dont la fonction principale est de transporter les acides gras, le rétinol et les vitamines hydrophobes (A et D) grâce à son cœur hydrophobe (**Akerstrom et al., 2000**). Elle est constituée de 162 résidus d'acides aminés et présente un poids moléculaire de  $\approx 18$  kDa ainsi qu'un pH isoélectrique de  $\approx 5,2$ . Elle contient une mole de cystéine par monomère (thiol libre) ainsi que deux ponts disulfures intramoléculaires et existe sous forme monomérique ou polymérique en fonction du milieu environnant (pH notamment) et de son taux de dénaturation (**Figure I.8**). La  $\beta$ -lactoglobuline peut se présenter sous différentes formes selon le pH : monomérique à pH  $< 3,5$  et  $> 7,5$ , dimérique ( $\approx 36$  kDa) stabilisée par des liaisons hydrogène à pH  $5,5 - 7,5$  (**Gaucheron, 2005**) et sous forme d'octamère de  $\approx 144$  kDa à pH  $3,5 - 5,5$ . Au-delà de pH 8, la protéine se trouve sous une forme dénaturée (**Figure I.8**). La  $\beta$ -lactoglobuline est aussi sensible à la température (Gough & Jenness, 1962) et possède de très bonnes propriétés thermo-gélifiantes. Elle peut former des dimères, des oligomères sous forme d'agrégats solubles (**Figure I.8**), mais aussi des réseaux protéiques à l'origine de gels fromagers de type Ricotta.

La  $\beta$ -lactoglobuline bovine se dénature puis s'agrège à des températures supérieures à  $65$  °C à pH 6,7 (**Gough & Jenness, 1962**). La première étape de dénaturation comprend des changements conformationnels réversibles, ces derniers mettent en avant l'exposition de la cystéine 121 réactive. Ensuite, la protéine dépliée s'associe grâce à des interactions entre les sulfhydryles ou à de lentes interactions hydrophobes inter-chaînes (**Relkin & Launay, 1990**). De plus, la spectroscopie de fluorescence a révélé que lorsque la  $\beta$ -lactoglobuline est chauffée à pH 6,5, l'exposition respectivement de deux résidus tryptophanes enfouis est constatée à  $50$  et  $70$  °C (**Mills, 1976**). Après refroidissement, la position du premier tryptophane exposé est réversible, au contraire de celle du second qui reste irréversible. D'autre part, il a été démontré

que la température de dénaturation de la  $\beta$ -lactoglobuline augmente (75 °C) à un pH de 2,5 (Harwalkar, 1980). D'autres travaux ont montré que cette protéine est très sensible à la chaleur aux pHs proches de 4 et une stabilité maximale a été détectée autour de pH 6.



\*: température de dénaturation.

**Figure I.8.** Impact du pH et de la température sur la structure et la conformation de la  $\beta$ -lactoglobuline (Kazmierski & Corredig, 2003 ; Pessen et al., 1985).

Chauffée dans le lait, elle forme des ponts disulfures avec la caséine  $\kappa$  présente en surface des micelles de caséine, modifiant ainsi les propriétés de surface des micelles et les propriétés fonctionnelles des caillés acides en renforçant leur fermeté (Famelart et al., 2011).

D'autre part, et parmi toutes les protéines lactosériques, il a été observé que la  $\beta$ -lactoglobuline est la plus sensible aux traitements par haute pression (Patel et al., 2005 ; Stapelfeldt et al., 1996). Ceci a été attribué à sa faible teneur en ponts disulfures (deux par exemple comparé à quatre dans l' $\alpha$ -lactalbumine), à l'exposition rapide de ses groupements hydrophobes au solvant et à la dissociation de ces derniers suite à un traitement par haute pression. Il a été observé que la cystéine libre de la  $\beta$ -lactoglobuline est rapidement exposée à des pressions entre 50 et 100 MPa (Tanaka & Kunugi, 1996 ; Moller et al., 1998). Des pressions supérieures, à 300 MPa par exemple, entraînent des modifications irréversibles sur la structure quaternaire et tertiaire.

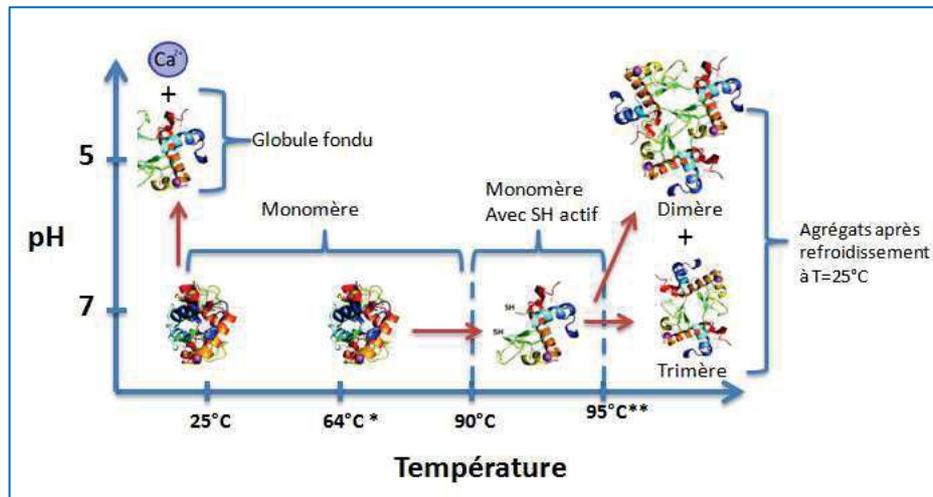
Dans des mélanges obtenus avec l' $\alpha$ -lactalbumine ou l'albumine sérique (BSA), il a été rapporté que la  $\beta$ -lactoglobuline n'interagissait pas avec ces protéines pendant un traitement par des pressions élevées (Patel et al., 2005).

#### **I.2.1.2.2. L' $\alpha$ -lactalbumine**

Deuxième protéine la plus abondante dans le sérum bovin, (représente 20 % des protéines sériques et 3,5 % des protéines du lait bovin), l' $\alpha$ -lactalbumine est une petite protéine de  $\approx 14,2$  kDa de poids moléculaire qui comprend 123 résidus d'acides aminés dont quatre résidus de tryptophanes et huit cystéines liées par quatre ponts disulfures intramoléculaires et qui lui confère une bonne stabilité thermique. C'est une métalloprotéine contenant un  $\text{Ca}^{2+}$  par mole qui contribue à stabiliser sa conformation. Cette forme stable est appelée Holo- $\alpha$ -lactalbumine. Cependant, cette protéine peut subir un changement conformationnel provoqué par la dissociation d'ions de calcium stabilisant sa structure à pHs  $< 5$  (Figure I.9). Cette structure est appelée l'état fondu globulaire et la protéine est ainsi appelée Apo- $\alpha$ -lactalbumine (Zhang et al., 2004 ; Lam & Nickerson, 2015). D'autre part, et malgré sa température de dénaturation de 64 °C, l' $\alpha$ -lactalbumine a une possibilité de retrouver sa structure initiale native à 90 % suite à un refroidissement. Cependant, à des températures supérieures à 90 °C pendant plusieurs minutes, l' $\alpha$ -lactalbumine peut subir des dénaturations irréversibles à cause de la dissociation de ces ponts disulfures intramoléculaires, provoquant ainsi la formation d'oligomères, puis son agrégation (McGuffey et al., 2005). Le pI de l' $\alpha$ -lactalbumine est proche de la valeur de 4,8.

D'autre part, et en présence de  $\beta$ -lactoglobuline ou de BSA possédant chacun une cystéine libre, cette protéine sérique peut s'associer pour former des oligomères mixtes après des traitements thermiques élevés ( $> 85$  °C) (Hong & Creamer, 2002) (Figure I.9).

Par ailleurs, et grâce à sa structure compacte, l' $\alpha$ -lactalbumine est moins sensible aux traitements par hautes pressions comparé à la  $\beta$ -lactoglobuline. Toutefois, elle peut se déplier réversiblement à partir de 200 MPa et perdre sa structure native irréversiblement au-delà de 400 MPa (McGuffey et al., 2005).



**Figure I.9.** Impact du pH et de la température sur la structure et la conformation de l' $\alpha$ -lactalbumine (Chaplin & Lyster, 1986 ; Matsumura et al., 1994 ; McGuffey et al., 2005).

### I.2.1.2.3. La sérum albumine

L'albumine sérique bovine (BSA) constitue 5,5 % des protéines sériques. C'est une protéine globulaire composée de 582 acides aminés et d'un poids moléculaire de  $\approx 66$  kDa. Elle possède de nombreux ponts disulfures, un groupe thiol libre et a une capacité à fixer des métaux tels que le zinc, le cuivre et à transporter des acides gras comme par exemple l'acide arachidonique. En raison de sa faible concentration dans le lait, la BSA a peu d'effet sur les propriétés physico-chimiques des isolats de protéines lactosériques.

L'impact des traitements thermiques sur la BSA a été bien décrit et caractérisé dans la littérature. Il s'avère que cette protéine se dénature à une température de  $65$  °C en formant deux formes de protéines dépliées : l'une est hautement réactive et caractérisée par un taux élevé d'agrégation qui conduit à la formation d'agrégats primaires de  $\sim 20$  nm de diamètre, l'autre est faiblement réactive et contribue à la formation d'agrégats secondaires stables de  $\sim 20$  nm de diamètre. Avec des températures de chauffage élevées ( $> 80$  °C par exemple), ces deux formes de dépliement sont difficilement évaluées à cause de la formation rapide d'agrégats de plus grandes tailles (Borzova et al., 2016).

D'autre part, la BSA est relativement stable aux traitements par haute pression grâce un nombre de ponts disulfures intramoléculaires qui protègent son noyau hydrophobe. Cependant, elle peut subir des modifications de sa structure secondaire, mais qui restent réversibles jusqu'à des pressions de 400 MPa (Patel et al., 2005).

## **I.2.2. Propriétés techno-fonctionnelles des protéines laitières**

Les principales propriétés fonctionnelles des protéines laitières sont bien connues et documentées, cependant, elles dépendent de l'état des protéines (natif, dénaturé, conditions d'extraction...) et des procédés de préparation et de traitements (facteurs extrinsèques : T°, pression...).

### **I.2.2.1. Les propriétés émulsifiantes**

Les émulsions sont produites dans les matrices laitières suite à une homogénéisation des protéines et des gouttelettes d'huiles avec des tailles et des volumes bien ciblés. Une des fonctionnalités très intéressantes des protéines du lait, utilisée dans les produits alimentaires, est leur amphipolarité et leur capacité à stabiliser les émulsions grâce à leur aptitude à s'adsorber à l'interface eau-huile et à diminuer ainsi la tension de surface (**Dickinson & McClements, 1995**). La tension de surface est définie comme étant la quantité de protéines adsorbées à l'interface des gouttelettes par une unité de surface (généralement exprimée en mg/m<sup>2</sup>). Ce paramètre est dépendant de plusieurs facteurs comme le volume d'huile, l'apport énergétique, l'état d'agrégation des protéines et le pH (**Walstra, 1993**). Cette propriété est particulièrement due à leur structure flexible et leur aptitude d'adaptation aux conditions du milieu (agrégation, diversité d'interactions et de formes tridimensionnelles, changement de conformation...).

**Mulvihill & Fox (1989)** ont rapporté que l'ordre croissant d'activité en surface des protéines de lait est classé comme suite :  $\beta$ -lactoglobuline < caséine  $\kappa$  = caséines  $\alpha_s$  <  $\alpha$ -lactalbumine < BSA < caséine  $\beta$ . En raison de leurs structures souples définie comme étant peu structurée, les caséines ont tendance à se déployer plus rapidement que la  $\beta$ -lactoglobuline et à former de larges films allant jusqu'à 10 nm d'épaisseur alors que les protéines lactosériques forment des interfaces de l'ordre de 2 nm (**Dalgleish, 1990 ; Dickinson, 1992**). La nature des émulsions mixtes formées est donc dépendante de la compétitivité entre fractions de protéines dans le mélange et la prédominance de l'adsorption qui est toujours en faveur de la protéine qui arrive en premier à l'interface. Il est à noter aussi que les émulsions peuvent être instables à cause des phénomènes physiques qui peuvent apparaître tels que la coalescence, le crémage et la floculation qui sont globalement dus au réarrangement spatial et à la distribution de taille des gouttelettes d'émulsions (**McClements, 2005**).

D'autre part, et pour une meilleure stabilité des émulsions et une meilleure adsorption des protéines aux interfaces huiles/eau, les protéines de lait peuvent subir des pré- ou post-traitements d'homogénéisation (**Liang et al., 2017**).

### **I.2.2.2. Les propriétés d'agrégation**

Les propriétés d'agrégation et d'association des protéines de lait ont fait l'objet de nombreuses recherches qui ont été décrites dans plusieurs revues, chapitres de livres et articles de recherches (**Cho et al., 1999; Corredig & Dalgleish, 1999; Dalgleish & Corredig, 2012; Guyomarc'h, Law, et al., 2003; Guyomarc'h, Queguiner, et al., 2003; Lucey et al., 1999; Lucey, Tamehana, et al., 1998; Vasbinder et al., 2003**). D'autre part, plusieurs procédés sont utilisés pour transformer les protéines natives en agrégats de protéines pour des applications ciblées à savoir : le traitement thermique, la haute pression, les ultrasons, etc.

Cependant, certains procédés utilisés tels que le traitement thermique peuvent causer des effets indésirables sur la qualité nutritionnelle, organoleptique et texturale sur les composants de protéines de lait (dénaturation irréversible, perte d'acides aminés essentiels...) (**Shanmugam et al., 2012**). Pour cela, d'autres alternatives et technologies émergentes telles que les ultrasons, les micro-ondes, les hautes pressions font l'objet de plusieurs études afin de déterminer leurs effets et leurs limites sur l'agrégation des protéines. Dans cette partie, le point bibliographique sera essentiellement réalisé sur l'impact des traitements thermiques et par haute pression sur l'agrégation protéique.

#### **I.2.2.2.1. Impact du traitement thermique sur l'agrégation**

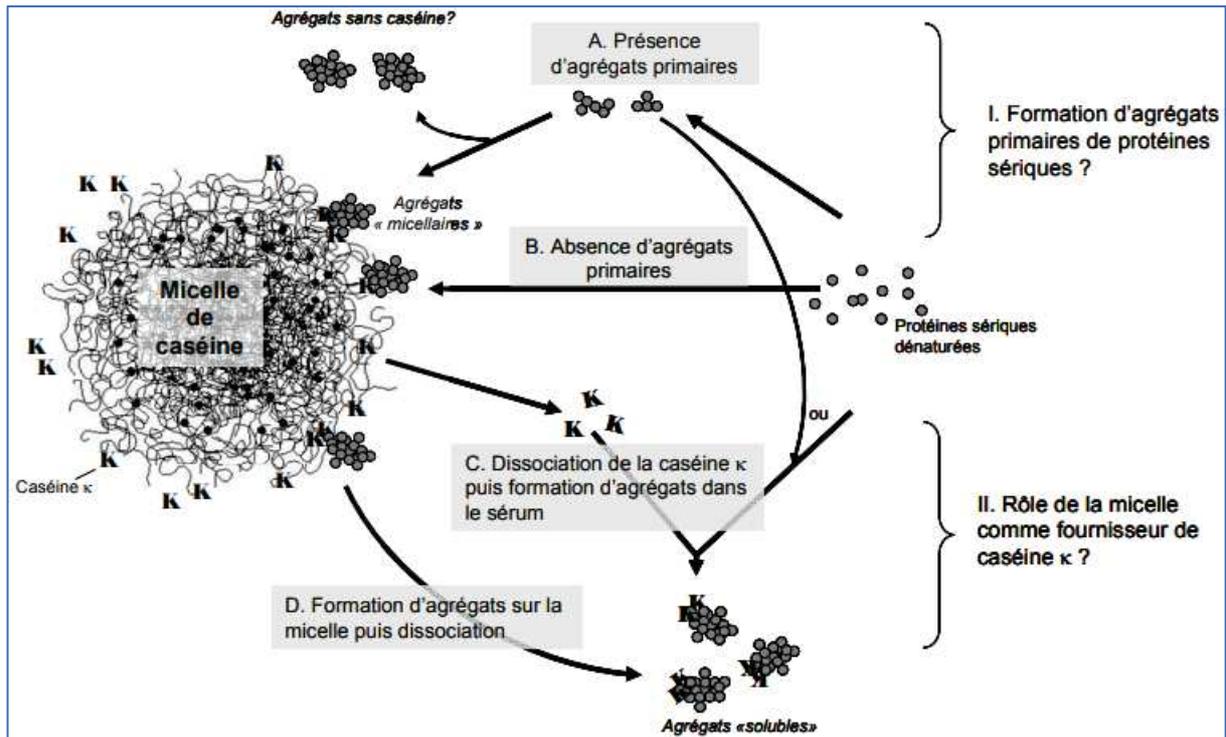
En fonction des conditions physicochimiques telles que la concentration en protéines, le pH, la force ionique, les conditions de traitement thermique (température, temps, vitesse de chauffage), différentes tailles, élasticités, formes, nature des interactions peuvent être obtenues lors de l'agrégation des protéines. Pour les protéines lactosériques par exemple, un chauffage à pH 6,7 à 72 °C pendant 10 min et 90 °C pendant 1 ou 10 min a montré une agrégation des fractions de l' $\alpha$ -lactalbumine et de la  $\beta$ -lactoglobuline suite à la perte de leur structure tertiaire et secondaire (feuillettes  $\beta$  et hélices  $\alpha$ ). Ces changements n'ont pas été constatés lors des conditions de chauffage de 63 °C et 72 °C pendant respectivement 30 min et 15 s (**Qi et al., 2015 ; Sui et al., 2011**). D'autre part, et toujours à pH neutre, certains travaux ont montré que l' $\alpha$ -lactalbumine ne s'agrège pas toute seule, ou du moins beaucoup plus lentement que la  $\beta$ -lactoglobuline grâce à sa stabilité thermique (**Matsudomi et al., 1992 ; Schokker et al., 2000**).

Par contre en présence de  $\beta$ -lactoglobuline, les deux protéines s'agrègent en formant des ponts disulfures et des interactions hydrophobes (**Kavanagh et al., 2000**). Contrairement à l' $\alpha$ -lactalbumine, la BSA s'agrège plus facilement en présence de  $\beta$ -lactoglobuline et contribue avantageusement à améliorer le taux d'agrégation de cette dernière et à renforcer les interactions entre ces deux fractions par des interactions covalentes (**Matsudomi et al., 1991 ; Nicolai, 2019**). D'un autre côté, les mélanges de BSA et d' $\alpha$ -lactalbumine ont été peu référencés dans la littérature. Cependant, certains auteurs ont indiqué que ces deux fractions peuvent s'associer et s'agréger en mélange pendant les traitements thermiques (**Matsudomi et al., 1993**).

Par ailleurs, pour les protéines lactosériques, la structure et la forme des agrégats est fortement liée au pH et à la concentration en sels du milieu à cause des forces électrostatiques (**Nicolai et al., 2011**). Par exemple, des agrégats lactosériques fibrillaires au-dessous du pH isoélectrique (**Nicolai et al., 2011**), des micro-gels au pH proche du point isoélectrique et des agrégats fractals à pH proche de 7.

Concernant les micelles de caséines, et en raison de leur structure stabilisée par des minéraux, il a été mis en évidence qu'elles sont stables aux traitements thermiques modérés (70 - 80 °C) à pH 6,7. Leur équilibre salin peut être réversiblement modifié au-dessous d'un chauffage de 95 °C pendant quelques minutes, mais des traitements thermiques plus sévères (par exemple au-dessus de 120 °C) peuvent conduire à des modifications irréversibles de leur structure, notamment en surface si le traitement se fait en présence des protéines sériques.

En effet, pour les mélanges de protéines lactosériques et de micelles de caséines, il a été rapporté que des chauffages à 70 °C pendant plusieurs minutes induisent la formation de liaisons covalentes entre des protéines lactosériques, particulièrement la  $\beta$ -lactoglobuline, et les micelles de caséines. Ces interactions privilégiées avec la caséine- $\kappa$  génèrent des agrégats à la surface des micelles avec une augmentation de leur taille et une modification leurs propriétés de surface (**Anema & Li, 2003 ; Donato & Guyomarc'h, 2009**). Cette agrégation résulte tout d'abord d'une dénaturation des protéines et de l'exposition des groupements sulfhydriles et hydrophobes, puis d'une association par des interactions de fortes et faibles énergie, dépendantes des conditions du milieu. La **figure I.10** représente les divers mécanismes et voies d'agrégation et de formation de complexes de protéines de lait proposés par **Famelart et al. (2011)**.



**Figure I.10.** Schéma des différents mécanismes de formation des agrégats de protéines lactosériques et/ou de complexes micellaires dans le lait suite au traitement thermique. Deux premières alternatives sont possibles (I), qui reposent sur l'existence ou pas d'agrégats primaires (ou intermédiaires) constitués de protéines sériques uniquement (respectivement les voies A et B). Le mode d'interaction entre la caséine- $\kappa$  et les protéines sériques est également en débat (II), avec une solubilisation préalable de caséine- $\kappa$ , puis des interactions formées en phase sérique (voie C) ou une interaction des protéines lactosériques sur la micelle et une solubilisation ultérieure des agrégats (voie D). (Donato & Guyomarc'h, 2009 ; Famelart et al., 2011).

Selon cette figure, et dépendamment des travaux de Mollé et al. (2006), des agrégats thermo-induits peuvent apparaître dans la phase soluble du lait (Voie A). Cependant, le temps d'action et d'intervention des micelles de caséines dans le processus d'agrégation avec les protéines lactosériques n'est toujours pas défini dans la littérature (Voies B, C et D). Néanmoins, les mécanismes d'interaction de la  $\kappa$ -caséine avec les fractions de protéines lactosériques, comme décrit précédemment, sont largement documentés et représentent des voies de fonctionnalisation des micelles de caséines.

#### **1.2.2.2. Impact de la haute pression dynamique (HPD) sur l'agrégation**

Les effets des traitements par le procédé de la haute pression et particulièrement de la haute pression dynamique sur les protéines de lait ont fait l'objet de nombreuses études dans le domaine de l'agroalimentaire, et cela grâce à leur potentiel important sur la préservation de la qualité des protéines (**Hayes & Kelly, 2003 ; Thiebaud, Dumay, Picart, Guiraud, & Cheftel, 2003**). Mais suite à l'analyse des données de la littérature, il s'est avéré qu'à ce jour aucune recherche n'a été dédiée à la caractérisation de l'impact des procédés de haute pression sur l'assemblage de protéines de différentes origines. Néanmoins, ce procédé physique a été appliqué sur des protéines seules pour améliorer une ou plusieurs de leurs propriétés fonctionnelles. En effet, d'un point de vue structurel, il est bien connu que les traitements à hautes pressions, grâce à l'action de forces mécaniques, sont responsables de la rupture des interactions non covalentes responsables de la stabilité de la structure tertiaire d'une protéine (**Kunugi & Tanaka, 2002**). De plus, à de faibles concentrations en protéines et à basses pressions (< 300 MPa), des dénaturations réversibles sont attendues alors qu'à des pressions élevées (>300 MPa) des effets irréversibles peuvent se produire, induisant des modifications de la techno-fonctionnalité des protéines (**Abd El-Salam et al., 2009**).

Ainsi, il a été démontré que la HPD peut provoquer des changements de la fonctionnalité des protéines sans pour autant dénaturer ces dernières. Par exemple, le traitement de dispersions d'isolats de protéines lactosériques jusqu'à 140 - 200 MPa n'a pas eu d'impact sur la dénaturation des protéines et leur agrégation (**Hayes & Kelly, 2003 ; Paquin, Lacasse, Subirade, & Turgeon, 2003 ; Sandra & Dalglish, 2005**). **Bouaouina, Desrumaux, Loisel, & Legrand (2006)** ont montré qu'un traitement jusqu'à des pressions de 300 MPa à pH 6,7 permet, sans affecter la solubilité, d'augmenter le pouvoir moussant et la stabilité des mousses des isolats de protéines lactosériques. Par ailleurs, d'autres travaux ont révélé que des traitements à HPD de dispersions de protéines lactosériques (10 % (p/p) au-delà de 225 MPa à pH 6,5 provoquent la formation d'agrégats de taille autour de 100 nm, moyennant l'établissement d'interactions hydrophobes qui sont connues comme les principales interactions impactées par ce procédé (**Gracia-Juliá et al., 2008**).

Pour les micelles de caséines, le traitement par HPD (100 - 300 MPa) a permis une dissociation de l'édifice à cause de la rupture des interactions hydrophobes et électrostatiques entre les groupes chargés, et de celles des liaisons ioniques formées *via* le phosphate de calcium (**Dumay, Picart, Regnault, & Thiebaud, 2006**). En effet, il a été indiqué que l'effet de haute

pression pourrait même induire la solubilisation des caséines internes ( $\alpha_{s1}$  et  $\alpha_{s2}$ ) à cause de la rupture des liaisons hydrophobes formant le cœur de la micelle et la déstabilisation de la structure interne. D'autres hypothèses ont aussi été mises en évidence, portant sur la réduction de la taille des micelles suite aux traitements par HPD (**Huppertz et al., 2004, Regnault et al., 2006**).

### **I.2.2.3. Les propriétés de gélification**

La gélification des protéines laitières est un procédé largement utilisé dans la fabrication de produits tels que les fromages et les yaourts. Cette transformation nécessite une mise en interaction des protéines qui peut être réalisée de différentes façons :

- Par l'application de traitements thermiques
- Par acidification
- Par une action enzymatique
- Par l'application de traitements combinés

Cette gélification concerne aussi bien les caséines que les protéines lactosériques. Les paragraphes suivants vont illustrer ces différentes possibilités.

#### **I.2.2.3.1. La gélification par traitement thermique**

Dépendamment des forces attractives et répulsives des milieux de dispersions, il a été constaté que différents types de gels peuvent être formés par les protéines lactosériques. Sachant que ces dernières sont chargées négativement au-dessus de leur pI (~5) et positivement en dessous, à pH neutre par exemple et à de faibles forces ioniques, le traitement thermique induit au-delà d'une certaine température ( $\geq 85$  °C), une dénaturation puis une agrégation. Le mécanisme est bien décrit dans de nombreuses recherches comme étant un dépliement des protéines et l'exposition des groupements hydrophobes (**Mezzenga & Fischer, 2013**). A une concentration suffisante en protéines ( $\geq 6\%$ , p/p), une agrégation progressive de ces protéines dénaturées *via* des interactions hydrophobes favorise la formation de structures tridimensionnelles qui s'associent en brins fins qui peuvent atteindre 20 nm (**Stading & Hermansson, 1991**). Ces nouvelles structures sont l'origine de la formation de gels qui peuvent être translucides (fractals), avec un aspect caoutchouteux et déformable à petite contrainte de rupture (**Stading & Hermansson, 1991**). D'autre part, et avec l'augmentation des forces ioniques ou la baisse du pH permettant la réduction des répulsions intermoléculaires, les protéines lactosériques peuvent former après traitement thermique des gels opaques et particuliers présentant des particules qui peuvent atteindre plusieurs microns. Il a été rapporté

que ce type de gel a de faible capacité de rétention d'eau comparé au gel fractal. Par contre il peut être plus résistant aux contraintes de déformation (**Bottcher & Foegeding, 1994**). En parallèle, et à des pHs acides, les gels formés de types fibrillaires ou filamenteux sont souvent plus rigides et non ramifiés, avec des fibrilles de taille d'environ 1 micromètre de long et 8 nm de large et qui peuvent provenir d'une agrégation linéaire des protéines préalablement dépliées (**Gosal et al., 2004**). Par ailleurs, il a bien été mis en évidence qu'un refroidissement des gels suite à un traitement thermique provoque un renforcement des réseaux de gels grâce à l'implication des liaisons hydrogène.

D'autre part, il est connu que les micelles de caséines peuvent s'agréger dans certaines conditions (pH, concentration) lorsque le chauffage dépasse des 100 °C (**Singh & Fox, 1985**), mais ces édifices protéiques, malgré le traitement thermique appliqué, sont souvent stables dans le lait à pH de 6,7 (pH naturel du lait). Cependant, ces dernières années, plusieurs recherches se sont intéressées à l'influence du changement de pH et de la concentration protéique sur la stabilité thermique des micelles de caséines. Il a donc été démontré récemment que la température de gélification des micelles augmente (40, 50 et 60 °C) proportionnellement à l'augmentation du pH (5,2 ; 5,4 et 5,6) (**Koutina et al., 2014 ; Koutina et al., 2015**). Ce phénomène a été attribué, suite au changement de température, à la modification des concentrations en phosphate de calcium qui stabilise les micelles. D'autres travaux ont observé la même tendance avec une température critique d'agrégation et de gélification des micelles de caséines qui passe de 25 °C à pH 5 à 50 °C à pH 5,4 (**Vasbinder et al., 2003**). De plus, ces auteurs ont constaté que la vitesse de chauffage n'impactait pas la température critique de gélification. La conclusion majeure de ces études est que la diminution du pH à une température fixe n'est pas équivalente à une augmentation de la température à un pH fixe. Afin de compléter l'étude dans la gamme de pH 5,2 et 6,7, **Thomar & Nicolai (2016)** ont investigué la thermocoagulation des micelles de caséine en solution aqueuse à pH fixe pour un intervalle de concentration de 25 à 160 g/L. Ces auteurs ont observé que les micelles de caséines forment des gels autoportants au-dessus des températures critiques de gélification, respectivement de 48, 68 et 80 °C pour des pHs de 5,6, 6 et 6,2. A la concentration de 160 g/L, cette température diminue de 90 °C de pH 6,5 à 30 °C à pH 5,4 et augmente avec la diminution de la concentration en protéines.

Cette thermocoagulation du lait est conditionnée par de nombreux facteurs comme : la dissociation de la  $\kappa$ -caséine, la précipitation du phosphate de calcium, la dénaturation des protéines lactosériques et leur interaction avec la  $\kappa$ -caséine (**McSweeney et al., 2016**). En plus

de ces facteurs et comme annoncé, le pH joue un rôle important dans la stabilisation des micelles de caséines lors du traitement thermique. A de faibles concentrations en protéines du lait et à des valeurs du pH entre 6,6 et 6,7, l'action du calcium est particulièrement élevée et les micelles de caséines traitées thermiquement sont stériquement stabilisées par la  $\kappa$ -caséine qui ne se solubilise pas mais qui interagit avec les protéines lactosériques dénaturées à la surface de la micelle, renforçant l'hydratation de surface et l'interaction avec la phase aqueuse. Par contre, l'augmentation du pH entre 6,9 et 7 et la diminution de l'activité du calcium diminuent la stabilité thermique des micelles en favorisant la dissociation la  $\kappa$ -caséine de la surface de la micelle pour interagir avec les protéines lactosériques dénaturées de la dispersion (**McSweeney et al., 2016**).

Cependant, à de fortes concentrations de protéines du lait, l'agrégation thermique des protéines lactosériques peut déstabiliser la gélification à cause de la formation de réseaux de gels indépendants qui recouvrent les caséines. Ce phénomène a été observé par **Nieuwenhuijse et al. (1991)** à des pHs  $< 6,5$ . Pour des pHs entre 6,5 et 7, le même comportement que dans le lait non concentré a été observé. Par contre, à des pHs  $> 7$ , il a été rapporté que des réseaux de gels composés de protéines lactosériques dénaturées et de  $\kappa$ -caséine se formaient dans la phase soluble du lait.

#### **I.2.2.3.2. La gélification par acidification**

Pour les protéines lactosériques du lait bovin, il est bien connu que l'acidification de ces protéines natives n'induit pas la formation de gels avec des propriétés viscoélastiques intéressantes. Par contre, pour les micelles de caséines, stabilisées au pH du lait par des interactions hydrophobes et une charge de surface négative, l'acidification sera à l'origine de la création de gels acides mous, caractérisant les laits fermentés (ou yaourt). En effet, suite à une acidification (par exemple par ajout de bactéries lactiques ou de l'acide gluconique), le phosphate de calcium micellaire se dissout progressivement jusqu'à atteindre d'une solubilité totale à un pH proche de 5,2 (**Dalgleish & Law, 1989**). Cependant, lorsque l'acidification est contrôlée à des températures  $\geq 25$  °C, il a été constaté que la dissociation des micelles de caséines est faible à ce pH (**Laligant et al., 2003 ; Law & Leaver, 1998**). Lorsque le pH diminue davantage, les charges de surface de la micelle de caséine diminuent, ce qui entraîne la diminution de la charge globale nette jusqu'à l'approche du pH isoélectrique de 4,6 où elle s'annule complètement, favorisant ainsi des attractions électrostatiques, une réduction des répulsions électrostatiques, une augmentation des forces de Van der Waals ainsi que la

dissolution et la précipitation du phosphate de calcium à cause de la rupture des interactions ioniques. Cette déstabilisation induit l'agrégation des micelles de caséines et donc la gélification des caséines autour de ce pH. L'aspect, la microstructure et la rigidité du gel formé sont fortement influencés par la concentration en protéines et la vitesse d'acidification (**Dalgleish, 1992 ; Phadungath, 2005**). Néanmoins, un éventuel pré-traitement thermique du lait au-dessus de 70 °C a révélé un impact majeur sur la gélification acide des micelles de caséine. Ce facteur a provoqué une rigidité supérieure des gels selon les travaux de **Lucey & Singh (1997)**. Ce phénomène a été expliqué par une gélification précoce à un pH plus élevé grâce au préchauffage appliqué.

Pour les protéines de lait en mélange, leur acidification sans un traitement thermique préalable induit des gels faibles. Certains auteurs ont attribué ces caractéristiques mécaniques des gels à la présence des protéines  $\kappa$ -caséine à l'interface entre les micelles de caséines et les protéines lactosériques. Cette  $\kappa$ -caséine, lors de l'acidification, a la propriété d'être fortement hydratée ce qui constitue un obstacle pour la mise en place des interactions attractives entre les micelles et les protéines solubles du lait (**Li & Dalgleish, 2006**). De ce fait, les protéines lactosériques natives en mélange avec les micelles de caséines sans traitement thermique sont considérées comme des charges inertes qui ne contribuent pas au renforcement du réseau de gel lors de l'acidification (**Lucey et al., 1999**). Néanmoins, il a bien été démontré que des traitements thermiques préalables à l'acidification contribuent à l'association des protéines en mélange, induisant un renforcement de la texture des gels (**Lucey et al., 1999**).

#### **I.2.2.3.3. La gélification enzymatique**

La gélification enzymatique du lait est considérée comme l'un des sujets de recherche les plus étudiés dans le domaine des colloïdes alimentaires. Son principe consiste à l'utilisation d'enzymes telles que la chymosine pure (présure) ou en mélange avec la pepsine, capable hydrolyser la couche de  $\kappa$ -caséine à la surface des micelles de caséine (**McSweeney et al., 2016**). Deux phases de coagulation enzymatique sont rapportées dans la littérature : une phase primaire associée à l'hydrolyse de la  $\kappa$ -caséine sous l'action de la présure, induisant la libération de l'extrémité C-terminal hydrophile et hautement chargée de la caséine et la réduction de charge globale des micelles de caséines (**Fox et al., 2017**). La stabilité de ces dernières est fortement réduite par l'hydrolyse progressive des  $\kappa$ -caséines qui maintiennent naturellement la structure des micelles. Lorsque l'hydrolyse atteint ~ 85 %, les micelles de caséines déstabilisées

commencent à s'interagir entre elles pour former un réseau de coagulation à l'origine du gel acide représentant la phase secondaire du processus de gélification.

Plusieurs facteurs peuvent impacter la rigidité, la fermeté et la porosité de gels formés par la presure à savoir, la concentration enzymatique, le pH, la température de gélification, la concentration des protéines de lait, un prétraitement ou non de ces protéines... Par exemple, il a été observé qu'un traitement thermique du lait préalable peut altérer la gélification enzymatique. En effet, l'agrégation des protéines lactosériques et leurs interactions avec la  $\kappa$ -caséine en surface de la micelle diminuent l'accessibilité de l'enzyme au site de coupure, ralentissant, voir empêchant toute agrégation des micelles de caséine (**Vasbinder et al., 2003**).

#### **I.2.2.3.4. La gélification par des procédés combinés**

La combinaison de procédés thermiques (**Guyomarc'h, Queguiner et al., 2003**) ou par haute pression (**Serra et al., 2007**) avec celui de l'acidification a été utilisée pour améliorer la texture de gels de type yaourt. **Serra et al. (2007)** ont démontré par exemple que le traitement par hautes pressions dynamiques (HPD)  $\geq 200$  MPa contribue à réduire la taille des particules du lait, conduisant ainsi à des dispersions protéiques plus fines par rapport aux dispersions traitées par les traitements thermiques conventionnelles du lait (90 °C pendant 90 s). Ce pré-traitement HPD en amont de l'acidification conduit à la formation de gels plus fermes et avec moins de synérèse.

Dans la même optique, **Hayes & Kelly (2003)** ont étudié le comportement de gels préparés par une coagulation enzymatique de dispersions de protéines de lait traitées par HPD. Ces auteurs ont constaté que ce traitement à 200 MPa participait à la réduction du temps de gélification et à l'augmentation la fermeté du gel.

Par ailleurs, d'autres recherches se sont intéressées à la combinaison de plusieurs procédés sur le comportement des gels de protéines de lait dont ceux de Hernandez & Harte (2008). Ces auteurs ont évalué l'impact de plusieurs combinaisons de traitements thermiques et par haute pression dynamique (HPD seule, HPD suivie par traitement thermique (TT), TT suivi par HPD et TT seul) de dispersions protéiques de lait sur les propriétés mécaniques des gels obtenus par acidification. La combinaison optimale pour une meilleure rigidité et capacité de rétention en eau du gel était le traitement par HPD, suivi par un traitement thermique préalablement à l'acidification.

Il a aussi été rapporté qu'une réticulation enzymatique des caséines par la transglutaminase (TGase) préalablement à la gélification par acidification permet une augmentation considérable de la fermeté du gel et de la capacité de rétention en eau des gels (**Færgemand et al., 1999 ; Schorsch et al., 2000**). D'autres travaux ont indiqué que le traitement par la TGase permet la réduction des réarrangements structurels des protéines lors de la gélification et ainsi d'augmenter l'homogénéité et la fermeté des réseaux de gels (**Ercili-Cura et al., 2013**).

### **I.3. Les interactions entre les protéines de pois et les protéines laitières**

#### **I.3.1. Principaux travaux sur les interactions entre les protéines végétales et les protéines laitières**

Afin de diminuer la consommation en protéines animales tout en conservant de bonnes propriétés nutritionnelles, il est intéressant de travailler sur la substitution partielle des protéines animales dans les produits transformés par des protéines végétales. Pour que ce type de substitution partielle soit réalisable, il est important que les protéines animales et végétales puissent interagir entre elles pour former des produits homogènes avec des propriétés fonctionnelles intéressantes.

Dans le domaine laitier, cette association entre protéines laitières et protéines végétales est essentiellement étudiée depuis une vingtaine d'années à l'échelle des protéines individualisées et purifiées (caséine, protéines sériques, isolats de protéines végétales) nécessitant des étapes d'extractions préalables pouvant induire d'éventuelles modifications de structures ou des dénaturations protéiques. Les chapitres précédents ont développé ces impacts, notamment sur l'extraction des protéines végétales qui impose plusieurs étapes dénaturantes, que ce soit lors des extractions par des voies sèches ou par voies humides (cf **Paragraphe I.1.2**, procédés d'extraction des protéines de pois). Ainsi, la perspective d'associer des fractions de protéines végétales moins purifiées mérite d'être approfondie pour éviter ainsi les étapes d'extractions coûteuses en énergie et limiter les modifications de structure protéique ou les dénaturations protéiques non souhaitées. L'optimisation de ces combinaisons de protéines hybrides devrait permettre de générer de nouvelles matrices alimentaires aux propriétés fonctionnelles et nutritionnelles intéressantes.

Jusqu'à présent, peu d'études ont été dédiées à la caractérisation de ces phénomènes d'agrégation et d'association de mélanges de protéines végétales et laitières. Récemment, **Alves & Tavares (2019)** ont précisé dans leur revue les conditions expérimentales nécessaires pour obtenir ces mélanges, notamment de pH (variation entre 7 et 8), de force ionique (5 à 300 mM) mais aussi les conditions de traitements physiques comme les traitements thermiques qui peuvent varier entre 60 à 95 °C pendant 5 à 60 minutes ou les traitements à hautes pressions isostatiques ou dynamiques entre 10 et 800 MPa.

Les premières protéines végétales les plus étudiées pour ces associations avec les protéines laitières ont été les protéines de soja (**Lefaiivre et al., 1972 ; Roefs et al., 1994**) mais récemment, les protéines de pois ont aussi suscité un grand intérêt du fait de leurs bonnes

propriétés fonctionnelles et nutritionnelles (**Burger & Zhang, 2019**). Le **tableau I.6** résume les principaux travaux réalisés sur l'association, la co-agrégation et la gélification de systèmes mixtes formés de protéines de soja ou de protéines de pois et de protéines laitières (caséines, protéines sérique,  $\beta$ -lactoglobuline).

**Tableau I.6.** Synthèse des travaux portant sur les propriétés d'agrégation et de gélification de systèmes mixtes : protéines laitières-protéines végétales (D'après **Alves & Tavares, 2019**)

Propriétés	Protéines de lait	Protéines végétales	Références
Co-agrégation	Protéines lactosériques	Protéines de soja	<b>Roesch &amp; Corredig (2005)</b> <b>Jose, Pouvreau, &amp; Martin (2016)</b>
		Glycine (11S)	<b>Anuradha &amp; Prakash (2009)</b>
	$\beta$ -Lg Caséines	Protéines de pois	<b>Kristensen, Christensen, et al. (2021)</b> <b>Chihi et al. (2016)</b>
			<b>Mession Roustel, &amp; Saurel (2017a)</b>
Gélification et formation de films	Protéines de lait (micelles de caséine + protéines lactosériques)	Protéines de soja	<b>Roesch, Juneja, Monagle, and Corredig (2004)</b> <b>Roesch &amp; Corredig (2006)</b> <b>Lin, Hill, &amp; Corredig (2012)</b> <b>Grygorczyk, Alexander, and Corredig (2013)</b>
	Protéines lactosériques		<b>Comfort &amp; Howell (2002)</b> <b>Roesch &amp; Corredig (2005)</b> <b>Jose et al. (2016)</b> <b>McCann, Guyon, Fischer, et Day (2018)</b>
	Caséines		<b>Beliciu &amp; Moraru (2011)</b> <b>Beliciu &amp; Moraru (2013)</b> <b>Silva, Balakrishnan, Schmitt, Chassenieux, &amp; Nicolai (2018)</b> <b>Silva et al. (2019a)</b> <b>Silva et al. (2019b)</b>
	$\beta$ -Lg Protéines lactosériques Protéines de lait	Protéines de pois	<b>Mession et al. (2017b)</b> <b>Silva et al. (2018)</b> <b>Silva et al. (2019b)</b> <b>Silva et al. (2019a)</b>
			<b>Chihi, Sok, et Saurel (2018)</b>
			<b>Wong et al. (2013)</b> <b>Kornet et al. (2021a)</b>
			<b>Youssef et al. (2016)</b>

Pour les protéines de soja, les travaux de **Roesch & Corredig (2005)** sont intéressants à citer car les auteurs ont caractérisé la formation d'agrégats solubles et d'agrégats insolubles lors de mélanges de concentrés de protéines de soja et d'isolats de protéines lactosériques soumis à un traitement thermique de 90 °C. La teneur totale en protéines était de 1,4 % et

différents ratios de protéines ont été utilisés dans les mixtes. Les résultats ont montré la formation de complexes entre ces protéines, consolidés par des ponts disulfures et des interactions hydrophobes. Les agrégats solubles de haut poids moléculaire ont été formés dans le mélange contenant 70 % de protéines de soja et 30 % de protéines lactosériques. Par contre, ces auteurs ont constaté la formation d'agrégats insolubles principalement obtenus par l'agrégation de la  $\beta$ -conglycinine (7S), la glycinine (11S) et la  $\beta$ -lactoglobuline dans le mélange à forte teneur en protéines lactosériques (70 % pour 30 % de protéines de soja). D'autre part, différentes tailles et comportements des agrégats ont été retrouvés par **Jose et al. (2016)** à un pH 7 suite au traitement thermique de 95 °C pendant 60 min de dispersion contenant des isolats de protéines de soja et de protéines lactosériques (à différents ratios) à une concentration totale de 1 % (p/p) et à des forces ioniques variant de 100 à 300 mM. Ces agrégats formés avaient un diamètre d'environ 65 nm pour le mélange contenant 10 % de protéines de soja et 90 % de protéines lactosériques. De plus, cette étude a révélé que la taille des agrégats diminuait légèrement avec l'augmentation de la proportion de protéines de soja et augmentait avec l'augmentation de la force ionique jusqu'à 300 mM. Les résultats obtenus par ces deux études peuvent être expliqués par la différence de composition des concentrés et des isolats de protéines de soja utilisés, en plus des différences de méthodes d'extractions utilisées. D'autres travaux, dont ceux de **Anuradha & Prakash (2009)**, ont porté sur l'étude des propriétés d'agrégation d'un mélange de  $\beta$ -lactoglobuline et de glycinine (11S) de soja à pH 7,9 à des concentrations totales de 0,3 et 0,5 % (p/p) et à des ratios respectivement pour les deux protéines de 50/50 et de 33/66. Il a été constaté qu'après un traitement thermique, des agrégats solubles se formaient et que leur concentration augmentait avec l'augmentation de la concentration en glycinine (11S) de soja et avec la concentration totale en protéines. Il a également été observé que les agrégats solubles commençaient à se former à une température de 65 °C et que les ponts disulfures et les interactions hydrophobes participaient à la stabilisation des agrégats mixtes.

Pour les protéines de pois, les problématiques d'interaction sont détaillées dans le chapitre suivant.

### **I.3.2. Influence des paramètres physico-chimiques sur l'interaction entre les protéines laitières et les protéines de pois**

Bien que les propriétés fonctionnelles et les comportements des protéines de pois et de protéines laitières aient été largement étudiées séparément, très peu de travaux ont porté sur les dynamiques d'assemblages de ces protéines entre elles et la caractérisation des agrégats obtenus. Dans cette partie du chapitre, nous allons présenter les principales études portant sur l'influence des différents paramètres physico-chimiques sur l'agrégation et l'association de ces protéines.

Il est bien connu que le pH est un facteur très important dans les mécanismes d'association dans le sens où il joue un rôle crucial dans l'ionisation des groupements des chaînes latérales, dans le changement de la charge globale et dans la répartition des forces électrostatiques autour des protéines. Leur solubilité ainsi que leurs températures de dénaturation peuvent changer dépendamment de ce paramètre. Par exemple, la température de thermodénaturation de la  $\beta$ -lactoglobuline est de 74 °C à pH 6,75 alors qu'elle est de 65 °C à pH 8 (Qi et al., 1995). Un autre facteur susceptible d'impacter le changement de conformation des protéines solubilisées dans une dispersion et dans la nature des interactions formées lors de l'agrégation est la force ionique. Par exemple, un ajout modéré de sels permet de réduire les forces de répulsions électrostatiques induisant ainsi une stabilité thermique plus élevée de la protéine. En outre, des interactions hydrophobes sont généralement favorisées à une force ionique élevée (Damodaran, 1996). La forme des agrégats obtenus après des traitements thermiques est donc surtout dépendante de ces deux facteurs physico-chimiques ; Des agrégats sphériques appelés microgels sont attendus lorsque le pH est proche du pH isoélectrique (pI) et à de faibles concentrations en sels. A l'opposé, et lorsque le pH est éloigné du pI et en absence de sels, l'agrégation est souvent retardée ou empêchée par les forces de répulsions. Ces répulsions sont, par contre, favorables au rapprochement des zones hydrophobes qui peuvent former ainsi des agrégats de formes linéaires appelés « agrégats fractals » et filamenteux (Schmitt et al., 2007 ; Gélébart et al., 2019).

Concernant les mécanismes d'association et d'interactions des mélanges formés de protéines laitières et de protéines de pois, l'analyse de la littérature montre clairement que ces systèmes mixtes sont très peu documentés (Tableau I.6). De plus, le seul procédé physique utilisé jusqu'à présent pour fonctionnaliser ces deux protéines en mélange consiste en de simples traitements thermiques pour générer des agrégats mixtes thermo-induits. Les travaux de Messio et al. (2017a) qui ont été dédiés à l'étude du comportement des protéines lors de

l'agrégation suite au traitement thermique d'un système mixte composé de micelles de caséines et de globulines de pois fractionnées en viciline et en légumine. Pour préciser, les mélanges de micelles de caséine/viciline ou de micelles de caséine/légumine ont été préparés à pH 7,1 en absence de sels, à des concentrations totales de 1,8 et 3,6 % (p/p) et à un ratio de 50/50 pour chaque dispersion avant d'être exposés à un traitement thermique de 85 °C pendant 60 min. Ces auteurs ont constaté que la température de dénaturation de la légumine et de la viciline en mélange a augmenté d'environ 4 °C par rapport à celle obtenue pour ces fractions seules. Cette augmentation de la stabilité thermique a été attribuée à l'effet de l'encombrement stérique imposé par la micelle de caséine qui limite la mobilité moléculaire et la flexibilité de la légumine et donc le dépliement de cette protéine. Après chauffage, la solubilité de ces fractions protéiques a été nettement améliorée dans les mélanges. De plus, il a aussi été observé que dans les mélanges, les sous-unités de la légumine acides et basiques ont formé grâce à des ponts disulfures respectivement des agrégats solubles et insolubles avec les micelles de caséines. Par contre, la viciline dénaturée a produit des agrégats mixtes solubles principalement formés par des interactions non covalentes. Enfin, et bien que les interactions entre les protéines du pois induites par la chaleur aient été modifiées en présence de micelles, les caséines n'étaient pas impliquées dans l'agrégation des protéines du pois.

Dans la même optique, **Chihi et al. (2016)** ont caractérisé la formation d'agrégats mixtes thermoinduits (traitement thermique de 85 °C pendant 60 min) de protéines sériques ( $\beta$ -lactoglobuline obtenue par purification d'un isolat commercial de protéines lactosériques) et de pois purifiées (globulines de pois (Glob) obtenues par une précipitation isoélectrique) mélangées à différents ratio (30/70, 50/50 et 70/30). L'étude, réalisée à pH 7,2 en présence de 5 mM de NaCl a révélé la production d'agrégats thermiques mixtes impliquant à la fois la formation de nouvelles liaisons covalentes (ponts disulfures) et des interactions non covalentes entre les sous-unités de  $\beta$ -lactoglobuline et de Glob dénaturées. La majorité des agrégats solubles des mélanges présentaient un poids moléculaire plus élevé et un diamètre plus petit que les agrégats thermiques des Glob seules. De plus, il a été constaté que l'augmentation de la proportion de  $\beta$ -lactoglobuline dans le mélange a également entraîné une réduction de la taille des agrégats solubles obtenus après traitement thermique. Enfin, il a été supposé que l'agrégation thermique de ces protéines dans un mélange soit déclenchée tout d'abord par une dénaturation de la  $\beta$ -lactoglobuline, puis par la formation de complexes stabilisés par des ponts disulfure entre la  $\beta$ -lactoglobuline non-repliée et les sous-unités de la légumine (11S) libérées lors du traitement thermique. Ces complexes formés peuvent s'associer par la suite avec

d'autres globulines de pois (légumine et viciline) *via* des interactions non-covalentes pour générer des agrégats solubles de taille variant entre 90 et 110 nm.

Récemment, **Kristensen, Denon et al. (2021)** ont pu définir les mécanismes à l'origine des interactions protéine-protéine dans un mélange de protéines de pois (PPI) et de protéines lactosérique (WPI) issues de deux isolats commerciaux. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'influence de la formation d'un co-précipité de ces deux protéines de sources différentes sur les propriétés fonctionnelles des mélanges. Ces derniers ont été préparés dans l'eau à une concentration totale de 2 % (p/v) à différents ratios. Puis, les co-précipités ont été obtenus par ajustement du pH à 4,6 puis par récupération des surnageants après centrifugation. Les poudres formées d'assemblages de ces deux protéines ont été ensuite dispersées à différents pHs (3, 7 et 11,5). Il a été constaté que la co-précipitation n'a pas davantage favorisé l'augmentation de la solubilité à cause des agrégats de grandes tailles formés par des interactions entre les deux protéines. De plus, cette étude a montré qu'un simple mélange de ces protéines dans des conditions de pHs neutre ou alcalines peut résulter en une amélioration de la solubilité et des propriétés émulsifiantes et moussantes des protéines en mélange par rapport aux protéines seules.

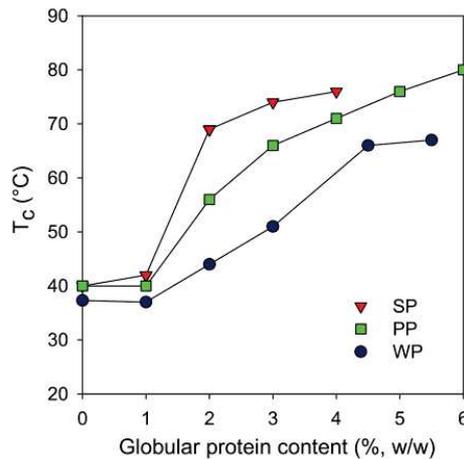
### **I.3.3. Fonctionnalisation des mélanges de protéines de lait et de protéines de pois par gélification**

La gélification est une propriété fonctionnelle intéressante et très recherchée des protéines qui est définie par **Alting et al. (2003)** comme étant une association de particules colloïdales qui s'interagissent entre elles pour former un réseau tridimensionnel remplissant tout le volume de la dispersion initiale. Ces associations nécessitent l'application d'un ou plusieurs facteurs déclencheurs tels que la température, la pression, le pH, des réactions enzymatiques etc. pour exposer les sites d'interactions des protéines responsables du développement et de la stabilité des gels. Cependant, la variation des conditions de traitements appliqués a un impact sur les propriétés de gels et leurs morphologies. Ces conditions sont connues et maîtrisées pour les gels laitiers (type yaourt ou fromage) ou pour les gels obtenus par la gélification de protéines d'origine végétale. Mais les conditions et mécanismes de gélification ont par contre été beaucoup moins étudiés pour les mélanges de protéines végétales et animales.

Certains auteurs (**Ben-Harb et al., 2018 ; Schmitt et al., 2019**) ont constaté que l'introduction de protéines végétales dans des dispersions de protéines laitières diminuait la

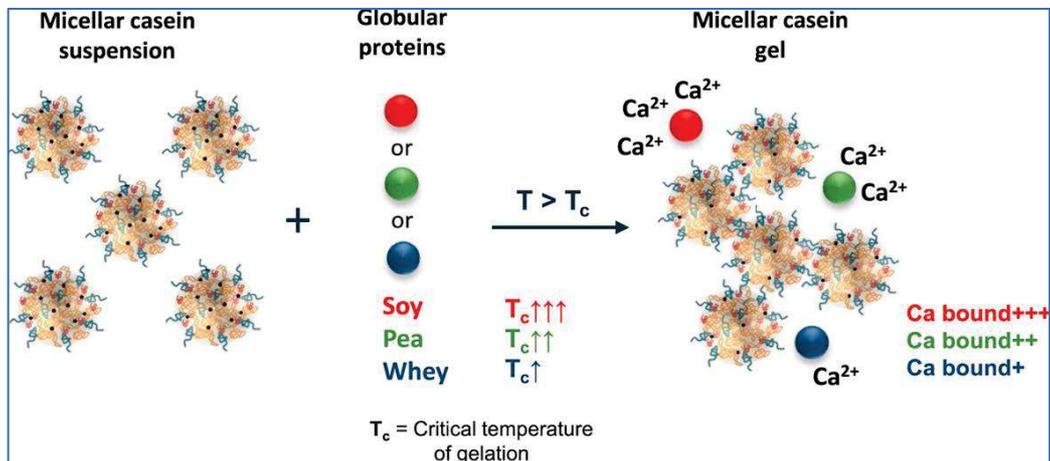
rigidité des gels laitiers. Ceci a été attribué à la formation de gels indépendants dû à la faible affinité des protéines de sources différentes entre elles et à leurs propriétés différentes d'interaction avec le calcium. **Shim & Mulvaney (2001)** ont aussi constaté qu'une vitesse de chauffage plus lente lors de thermocoagulation entraînait la formation de gels plus résistants. Toutefois, plusieurs travaux depuis 2013 (**Kornet et al., 2021a, Wong et al., 2013, Silva et al., 2018**) se sont intéressés aux mécanismes d'interactions et aux phénomènes physicochimiques qui influencent les associations de protéines de pois avec les protéines laitières lors de la gélification. Dans ce contexte, **Wong et al. (2013)** ont étudié la gélification thermique sur une rampe de température allant jusqu'à 92 °C d'un mélange protéique composé de protéines de pois et de protéines lactosériques issues d'isolats commerciaux (PPI et WPI). Ces auteurs ont étudié l'effet de la variation du pH et de la force ionique sur les propriétés rhéologiques et texturales des gels thermiques obtenus après mélanges des protéines préparées à différents ratios et à différentes concentrations totales en protéines. Il a été constaté que l'introduction des protéines lactosériques a amélioré les propriétés de gélification des protéines de pois en augmentant progressivement l'élasticité et la fermeté des co-gels thermiques formés. De plus, de meilleures propriétés rhéologiques et texturales ont été observées à pH 6 par rapport à celles formées aux pH 4 et 8. Cette différence a été attribuée à l'effet des répulsions électrostatiques entre les sous-unités de convicine (7S) lorsque le pH s'éloigne de leur pH isoélectrique qui est proche de 6. D'autre part, ces auteurs ont constaté que les concentrations les plus faibles en NaCl renforçaient l'élasticité et la rigidité des gels mixtes. A noter que les mécanismes impliqués dans l'agrégation thermique et la nature des interactions moléculaires structurant ce système mixte n'ont pas été abordés dans cette étude.

**Silva et al. (2018)** ont montré de leur côté que la gélification thermique d'une dispersion de micelles de caséines est affectée par la nature des protéines globulaires ajoutées et que la température critique de gélification ( $T_c$ ) augmente avec l'augmentation de la concentration des protéines globulaires du mélange dès l'ajout de 2 %, p/p de protéines globulaires (**Figure I.11a**).



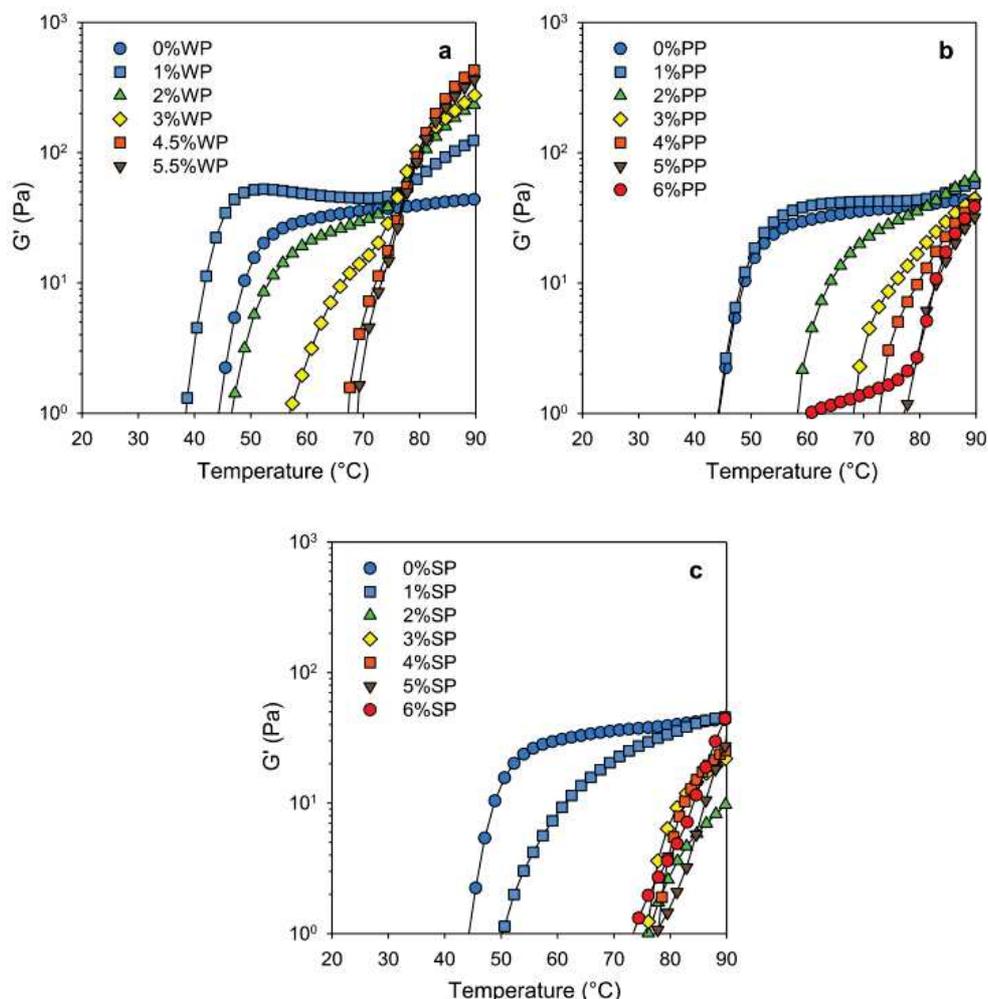
**Figure I.11a.** Température critique de gélification des mélanges de micelles de caséines à 6 % (p/p) et de protéines globulaires en fonction de la teneur de ces dernières, à savoir les protéines lactosériques (WP), des protéines de pois (PP) et des protéines de soja (SP) (Silva et al., 2018).

En effet, les protéines de soja à une concentration de 2 %, p/p nécessitent une température élevée (de l'ordre de 70 °C) pour attendre la  $T_c$  et gélifier, alors que cette  $T_c$  est plus faible pour les protéines de pois (de l'ordre de 56 °C) et pour les lactosériques (45 °C). Les auteurs s'expliquent cette variabilité par une affinité différentes de ces trois protéines vis-à-vis du calcium comme le présente la **figure I.11b**.



**Figure I.11b.** Augmentation de la température critique de gélification ( $T_c$ ) des micelles de caséines en présence de protéines globulaires (lactosérique (whey), pois (pea) ou soja (soy)) expliquée par la différence d'affinité des protéines pour les ions calcium d'après Silva et al. (2018).

En effet, cette température de gélification diminue en présence de  $\text{CaCl}_2$  et augmente en présence de  $\text{NaCl}$ . Ceci s'explique par le rôle structurant que joue le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le pontage des caséines, et à l'inverse par le rôle destructurant que joue le  $\text{Na}^+$  qui favorise la solubilisation des protéines. Ce résultat indique que les protéines globulaires n'ont pas la même capacité à fixer le calcium. Les protéines végétales fixent plus de calcium que les protéines sériques, avec une meilleure affinité des protéines de soja que celles de pois. Cette interaction avec les minéraux structurants diminue ainsi la quantité de calcium soluble nécessaire pour la gélification des micelles de caséines, expliquant ainsi l'augmentation de  $T_c$ . Cette différence d'affinité pour le calcium a un impact direct sur la rigidité des gels acides et l'interactivité des protéines comme le présente la **figure I.12**.



**Figure I.12.** Représentation graphique du module de stockage  $G'$  en fonction de la température pour les mélanges (a) micelles de caséines-protéines lactosérique (WP), (b) micelles de caséines-protéines de pois (PP), (c) micelles de caséines-protéines de soja (SP) (D'après **Silva et al., 2018**).

Ces résultats mettent en lumière la différence importante de comportement rhéologique des co-gels obtenus pour des températures supérieures à 70 °C en fonction de la nature des protéines végétales ajoutées. Le renforcement du réseau et l'augmentation de la rigidité du gel sont beaucoup plus importants lors de l'ajout des protéines lactosériques, connues pour établir des ponts disulfures avec les caséines  $\kappa$  en surface des micelles (Corredig & Dalgleish, 1999). En revanche, l'ajout des deux protéines végétales n'a pas amélioré ces propriétés, prouvant qu'elles n'ont pas interagi avec les micelles de caséines contrairement aux protéines sériques.

Des investigations supplémentaires aux travaux de Silva et al. (2018) ont été réalisés par ces mêmes auteurs (Silva, Cochereau, et al., 2019) pour comprendre comment la gélification induite par la chaleur de mélanges de micelles de caséines et de protéines végétales était affectée par la composition protéique. En faisant varier le ratio micelles de caséines/protéines végétales de 0/100 à 100/0 pour des concentrations totales en protéines de : 4, 6 et 8 % (p/p) à pHs 5,8 et 6,0, cette étude a confirmé d'une part le pouvoir exceptionnel des lactoprotéines à s'associer aux micelles de caséines et à renforcer la force du gel (en formant un co-gel), et d'autre part l'absence d'interaction des protéines végétales globulaires avec les micelles de caséines, que ce soit pour le soja ou pour le pois (Figure I.12,b et c). Cependant, il a été constaté que la rigidité minimale des gels était obtenue lorsque que les micelles étaient remplacées avec 40 % de protéine de soja contre 70 % pour les protéines de pois. Ce résultat confirme que la quantité de calcium nécessaire à la gélification des micelles de caséine est modifiée en fonction de la nature des protéines végétales ajoutées, et que les protéines de pois permettent de remplacer plus de caséines en complexant moins de calcium par rapport aux protéines de soja. Ces différents résultats ont montré que ces deux types de protéines végétales ne s'agrégeaient pas avec les micelles de caséines dans ces conditions expérimentales et qu'elles formaient des gels indépendants pendant la gélification thermique, en favorisant toute fois la formation du gel laitier lorsque leur affinité pour le calcium était réduite.

D'autres types de gélification ont été introduit par Messin et al. (2017b). Ces auteurs ont pu caractériser la gélification induite par acidification à l'aide de l'acide glucono- $\delta$ -lactone de trois mélanges de protéines composés d'une part de micelles de caséines, et d'autre part d'un extrait de protéines de pois non fractionné, de fractions purifiées de viciline 7S et de fractions de légumine 11S. Ces mélanges ont été préparés à une concentration totale de 3,6 % (p/p) à pHs 7,1 et à un rapport pondéral de 1/1. Deux voies de traitements thermiques ont été appliquées avant l'acidification : (1) un traitement thermique direct des mélanges cités et (2) un traitement

thermique des mélanges de caséines et des fractions déjà prétraitées thermiquement. Ces travaux ont révélé que seul le mélange traité thermiquement de viciline-micelles de caséines a conduit à une augmentation importante du module de stockage  $G'$  lors de la gélification. Ceci a été expliqué par une initiation de la formation du réseau de gel par les agrégats solubles et sédimentables de viciline à pH 6,4, puis par un renforcement du réseau grâce aux caséines dissociées suite à la dissolution du phosphate de calcium micellaire à pH < 5. En revanche, la solubilité décroissante et la taille élevée des agrégats formés par le traitement thermique des mélanges de légumine-micelles de caséines ou protéines de pois non fractionnées-micelles de caséines, ont constitué un réel obstacle pour le bon déroulement de la gélification. Les auteurs ont constaté que les mélanges de viciline ou de protéines de pois avec les micelles de caséines ont formé dans un premier temps un réseau de remplissage d'espace (space filling network) qui a été suivi par une structuration du réseau à pH 5. Par contre, une très faible capacité de gélification a été identifiée pour le mélange de légumine-micelle de caséines et cela malgré la présence de cystéine dans cette fraction de protéines de pois. De plus, ces auteurs ont révélé qu'aucune interaction spécifique, y compris la formation de ponts disulfures, n'a été mise en évidence entre les agrégats de légumine et de  $\kappa$ -caséine. Ces auteurs ont suggéré que des investigations supplémentaires étaient nécessaires pour expliquer l'effet du ratio protéines de pois et de protéines de lait sur les propriétés d'agrégation mixtes et sur la gélification acide.

Utilisant la même technique de gélification et le même principe d'agrégation qui repose sur l'étude de l'impact de l'agrégation d'un mélange de protéines différentes comparé à un mélange d'agrégats de ces protéines, **Chihl et al. (2018)** se sont intéressés aux mélanges de globulines de pois et de  $\beta$ -lactoglobuline extraites au laboratoire. Différentes fractions ont été préparées à pH 7,2 dans 10 mM d'un tampon phosphate et 5 mM de NaCl pour des concentrations finales allant de 6 à 9 % (p/p). Ces protéines ont été, soit mélangées puis traitées thermiquement à 85 °C pendant 1 h (agrégats mixtes), soit chauffées et agrégées avant d'être mélangées (mélanges d'agrégats). Après une gélification acide par de l'acide glucono- $\delta$ -lactone (0,4 à 0,97 % (p/v)) à 25 °C, ces auteurs ont observé que les agrégats mixtes formaient des gels plus élastiques et avaient une meilleure capacité de rétention en eau par rapport aux gels contenant des agrégats purs de globulines, ou encore des mélanges d'agrégats de globulines et de  $\beta$ -lactoglobuline (**Figure I.13 et Tableau I.7**). Ces résultats ont été attribués à la structure ordonnée, filamenteuse et parfaitement enchevêtrée du réseau de gels obtenus avec les agrégats mixtes. Au contraire, des gels de mélanges d'agrégats ont présenté une structure poreuse et irrégulière qui altère les propriétés viscoélastiques et la capacité de rétention en eau des gels

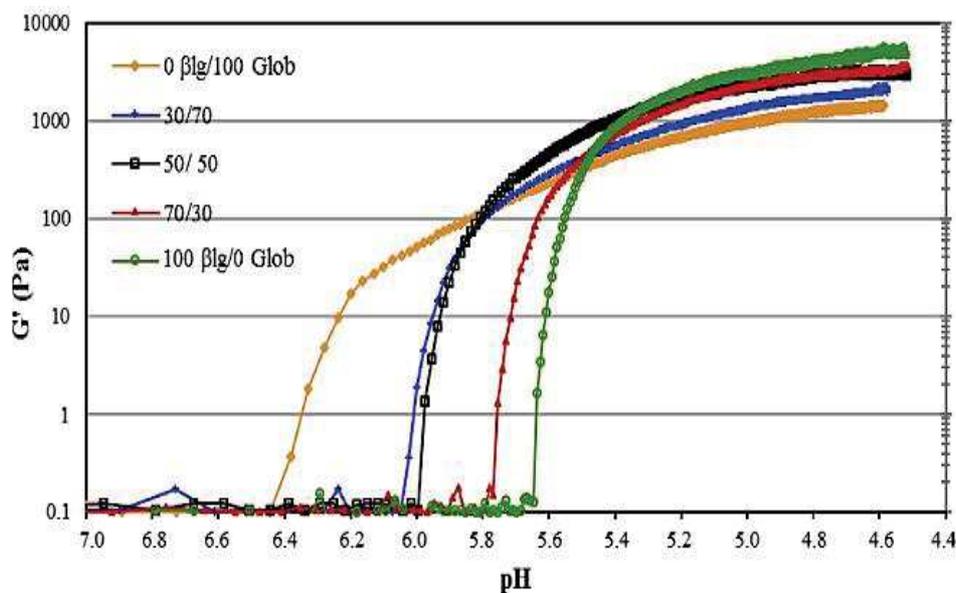
expliqué par la taille élevée des agrégats de  $\beta$ -lactoglobuline après traitement thermique. Ces auteurs ont conclu qu'il serait préférable d'incorporer la fraction de protéines laitières dans les mélanges avec la globuline de pois avant de réaliser un traitement d'agrégation et d'acidification.

**Tableau I.7.** Propriétés rhéologiques des gels obtenus par acidification des dispersions d'agrégats mixtes et de mélanges d'agrégats du couple globuline de pois/ $\beta$ -lactoglobuline

Protéines	Ratios	pH	$\tan \delta$
Globuline de pois	100/0	$6,57 \pm 0,2^a$	$0,22 \pm 0,02^a$
$\beta$ -lactoglobuline	0/100	$5,64 \pm 0,2^c$	$0,14 \pm 0,01^d$
Agrégats mixtes Globuline/ $\beta$ -lactoglobuline	30/70	$5,79 \pm 0,1^{bc}$	$0,15 \pm 0,02^{cd}$
	50/50	$5,98 \pm 0,1^b$	$0,16 \pm 0,01^c$
	70/30	$6,08 \pm 0,1^b$	$0,18 \pm 0,01^b$
Mélange d'agrégats Globuline/ $\beta$ -lactoglobuline	30/70	$5,77 \pm 0,1^{bc}$	$0,20 \pm 0,02^a$
	50/50	$6,00 \pm 0,1^b$	$0,21 \pm 0,02^a$
	70/30	$6,11 \pm 0,1^b$	$0,22 \pm 0,02^a$

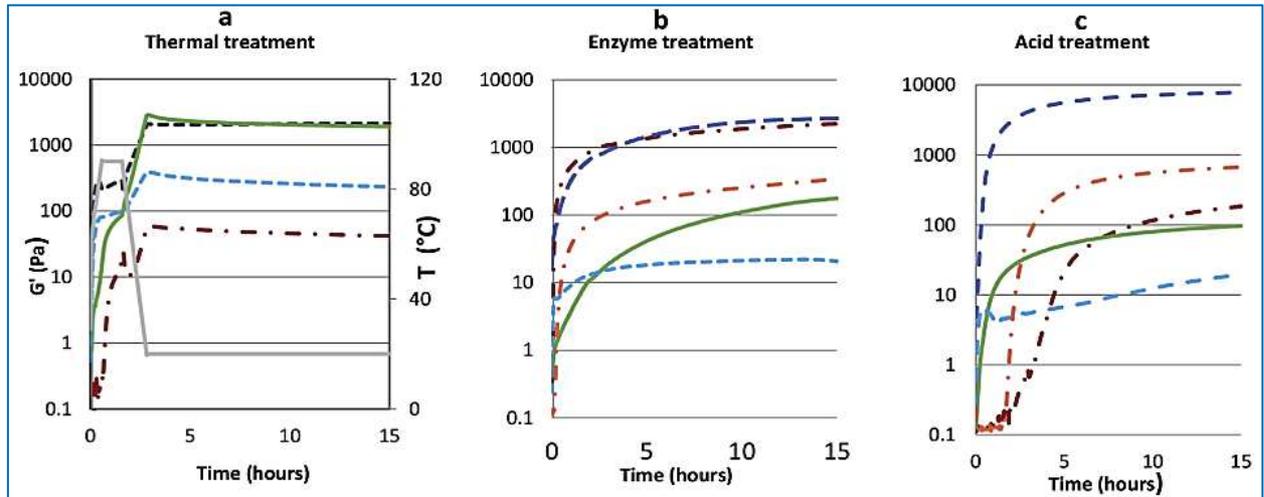
(D'après **Chihi et al., 2018**).

Les lettres différentes en indice dans la même colonne représentent des différences significatives entre les valeurs ( $p < 0,05$ ).



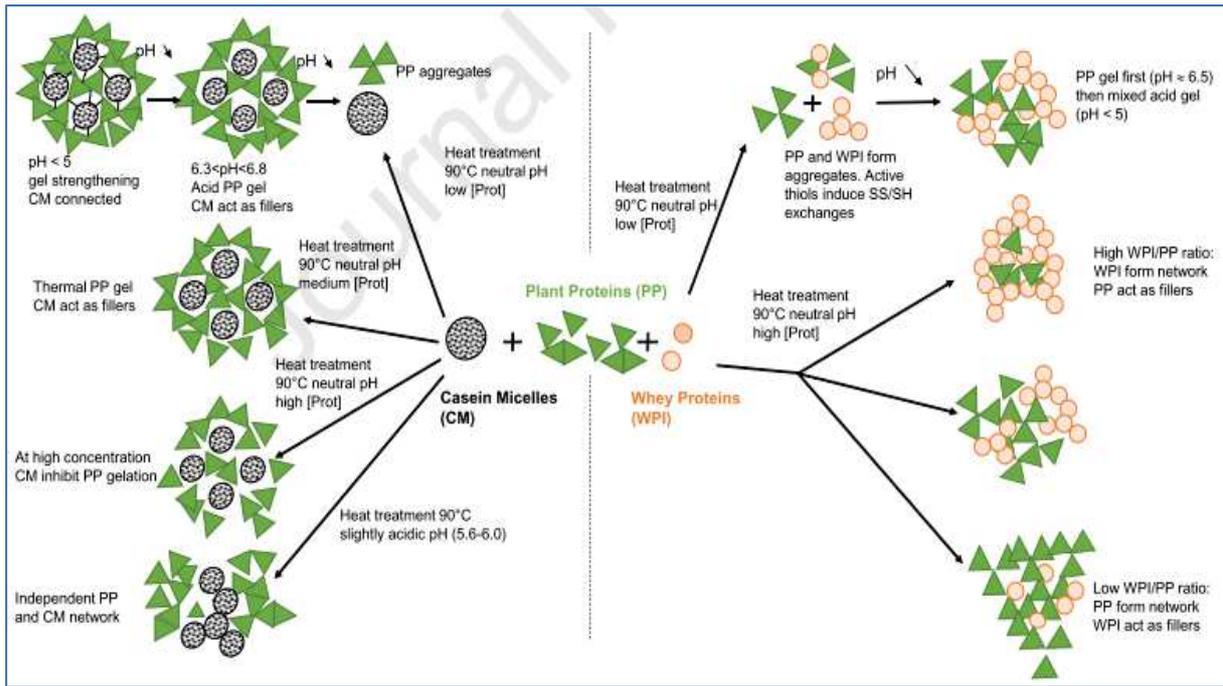
**Figure I.13.** Évolution du module de stockage ( $G'$ ) en fonction du pH des gels obtenus par acidification au GDL (0,68 % (p/v) à 25 °C/10h) des dispersions d'agrégats mixtes de globulines de pois et de  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ lg) à une concentration totale de 4 % (p/p) (D'après **Chihi et al., 2018**).

Afin d'étudier l'impact de trois différentes techniques de gélification : (1) thermique (90 °C/1 h et refroidissement à 20 °C), (2) acidification chimique (2 % (p/v) de glucono- $\delta$ -lactone et incubation à 30 °C/20 h) et (3) enzymatique (0,5 % de chymosine ou 0,3 % de transglutaminase puis incubation à 30 °C/20 h)) sur les propriétés rhéologiques et microstructurelles des gels, Ben-Harb et al. (2018) ont comparé le comportement de gélification de mélanges de protéines de lait (issues d'une poudre de lait écrémé) avec des mélanges de protéines de lait et de protéines de pois (issues d'un isolat commercial) à une concentration totale de 14,8 % (p/p) et un ratio de 1/1. Toutefois, des dispersions de protéines seules à des concentrations de 7,4 et 14,8 % (p/p) ont été préparées pour les deux types de protéines et toutes les protéines ont été dispersées dans une solution de 1 % (p/v) de NaCl. Ces auteurs ont constaté que les propriétés et les microstructures des gels variaient en fonction de la technique de gélification et du type de protéines dans les mélanges (**Figure I.14**). De même, ils ont mis en évidence que les dynamiques d'agrégation et les interactions électrostatiques entre les agrégats de protéines ont eu une influence majeure sur la rigidité des gels finaux. De ce fait, seuls les gels de protéines de pois obtenus par les gélifications acide et enzymatique avaient un module de stockage ( $G'$ ) significativement plus élevés que celui des gels de protéines de lait seul (ou en mélange). Les auteurs ont aussi suggéré l'existence de liaisons covalentes entre les protéines de pois et les protéines de lait lors de la formation des gels mixtes suite à l'observation de propriétés et structures de gels comparables après traitement thermique de protéines de pois seuls et en mélange.



**Figure I.14.** Module de stockage ( $G'$ ) en fonction du temps pour les gels obtenus à partir de dispersions de protéines de pois (bleu : 7,4 %, p/p) et (bleu : 14,8 %, p/p), de protéines de lait (marron : 7,4 %, p/p) et (marron : 14,8 %, p/p) et leurs mixtes (vert) suite à (a) des traitements thermiques, (b) des traitements enzymatiques et (c) des traitements acides. La rampe de traitement thermique est représentée en gris (Ben-Harb et al., 2018).

Enfin, et pour mieux résumer le comportement de gélification des protéines de pois dans un système mixte avec des protéines lactosériques ou des micelles de caséines pendant les traitements thermiques et/ou l'acidification, Hinderink et al. (2021) ont proposé un schéma global qui résume l'impact de ces traitements et l'influence des paramètres extrinsèques (pH, type et [protéines], ratio de protéines, température) sur la nature et la structure des gels mixtes formés (figure I.15).



**Figure I.15.** Schéma descriptif représentant le comportement de gélification des protéines de pois dans un système mixte avec des protéines lactosériques (sphères oranges) ou des micelles de caséines (sphères noires et blanches) pendant les traitements thermiques et/ou par acidification (D'après **Hinderink et al., 2021**).

# **Chapitre II**

## **Matériels et méthodes**

## **II.1. Matériels**

### **II.1.1. Les isolats protéiques**

L'isolat de protéines de pois

L'isolat de protéines de pois S85F (lot W278N) a été fourni par la société Roquette Frères (Lestrem, France). La poudre a été conservée dans des boîtes hermétiques et stockées à 4 °C à l'abri de la lumière.

L'isolat de protéines lactosériques

L'isolat de protéines lactosériques Prolacta 90 (lot R51640) a été obtenu par la société Lactalis (Bourgbarré, France). Les données concernant la composition de l'isolat transmises par le fournisseur sont disponibles dans la partie Résultats et discussion (Tableau I). La poudre a été conservée dans des boîtes hermétiques stockées à 4 °C à l'abri de la lumière.

Les phosphocaséines natives

La poudre de phosphocaséines natives (PCN, Promilk 852B, lot 082156) a été achetée auprès de la société Ingrédia (Arras, France). Elle a été conservée à 4 °C à l'abri de la lumière et de l'humidité. Cette poudre de PCN a été obtenue à l'échelle industrielle par une microfiltration du lait bovin cru écrémé afin d'éliminer les protéines lactosériques suivie par une diafiltration du rétentat et un séchage par atomisation. La composition de cette poudre de protéines selon le fournisseur est présentée dans la partie Résultats et discussion.

### **II.1.2. Les produits chimiques utilisés**

Tous les produits chimiques utilisés dans ce travail étaient de qualité analytique et obtenus auprès des sociétés Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne), Amresco (Solon, Ohio, Etats-Unis), VWR BDH Prolabo (Leuven, Belgique), Sigma (St. Louis, MO, Etats-Unis), Fluka chemicals GmbH (Dublin, Irlande), Merck (Darmstadt, Allemagne). Toutes les solutions et dispersions ont été préparées en utilisant de l'eau Milli-Q (Millipore®).

## II.2. Préparation des dispersions initiales de protéines

### II.2.1. Préparation des dispersions de protéines de pois

La dispersion de protéines de pois a été préparée par ajout d'une quantité de poudre de l'isolat commercial de protéines de pois (PPI) dans de l'eau ultrapure (Millipore) afin d'obtenir une dispersion initiale à la concentration en protéines souhaitée. La dispersion a ensuite été agitée à 300 rpm pendant 20 heures à 4 °C pour permettre l'hydratation complète des protéines. Ensuite, le pH a été ajusté à 6,7 à l'aide de NaOH 1 M ou de HCl 1 M sans affecter la concentration de la dispersion. La dispersion a alors été centrifugée à 12000 x g pendant 20 minutes à 20°C dans une centrifugeuse Optima LE-80k (rotor 70 Ti, Beckman Instruments, Palo Alto, Californie, USA). Le surnageant a été collecté comme la fraction soluble des protéines de pois et a été laissé à température ambiante 1 heure sous agitation douce avant analyse ou a été stockée respectivement à 4 °C ou à -18 °C pour une utilisation après 1 ou plusieurs jours.

### II.2.2. Préparation des dispersions de protéines lactosériques

Les dispersions de protéines lactosériques ont été obtenues par ajout d'une quantité de poudre de protéines lactosériques (WPI) dans de l'eau ultrapure (Millipore) afin d'obtenir des dispersions initiales à la concentration en protéines souhaitée puis agitées à 300 rpm pendant 20 heures à 4 °C. Ensuite, le pH a été ajusté à pH 6,7 et les dispersions ont été laissées à température ambiante sous agitation douce avant analyse ou ont été stockées respectivement à 4 °C ou à -18 °C pour une utilisation après 1 ou plusieurs jours.

### II.2.3. Préparation des dispersions de phosphocaséines

Les dispersions de phosphocaséines natives ont été obtenues par des mises en suspension de quantités de poudre de PCN à des concentrations souhaitées dans de l'ultrafiltrat de lait synthétique SMUF (simulated milk ultrafiltrate, composition décrite dans le **tableau II.1**) préparé à pH 6,7 selon **Jenness & Koops (1962)** afin d'assurer un équilibre ionique proche de celui du lait bovin. Les dispersions ont été mises sous agitation à 300 rpm pendant 20 heures à 4 °C. Par la suite, elles ont été chauffées à 40 °C pendant 1 h pour garantir une hydratation complète de la poudre. Enfin, les dispersions ont été refroidies à 20 °C avant l'analyse pour permettre un retour des caséines- $\beta$  dans la structure micellaire.

**Tableau II.1.** Composition chimique de l'ultrafiltrat de lait synthétique SMUF (Jenness & Koops, 1962).

Composition (mg/100 mL de solution)										
Constituants	Teneur (g/L)	Na	K	Ca	Mg	P	Cl	Citrate	SO <sub>4</sub>	CO <sub>3</sub>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,58		45,4			36				
K <sub>3</sub> citrate, H <sub>2</sub> O	1,20		43,4					70		
Na <sub>3</sub> citrate, 2H <sub>2</sub> O	1,79	42						115		
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,18		8						9,9	
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	1,32			35,9			63,8			
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,65				7,8		22,7			
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,3		17							
KCl	0,6		31,4				28,5			
Total		42	145,2	35,9	7,8	36	115	185	9,9	9,5

### II.3. Procédés de traitement des dispersions de protéines

Dans le but de modifier les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines de pois d'une part et en vue de favoriser l'interaction entre ces protéines et les protéines de lait d'autre part, deux procédés physiques ont été appliqués seuls ou combinés à savoir : le procédé de traitement thermique et le procédé de traitement par haute pression dynamique (UHPH) pour modifier d'abord les propriétés structurales et de surface des protéines, et en conséquence les propriétés organoleptiques du produit final et cela pour une formation de gels mixtes suite à une acidification de deux protéines de sources différentes qui peuvent être assimilés à des gels de yaourts pour une application industrielle.

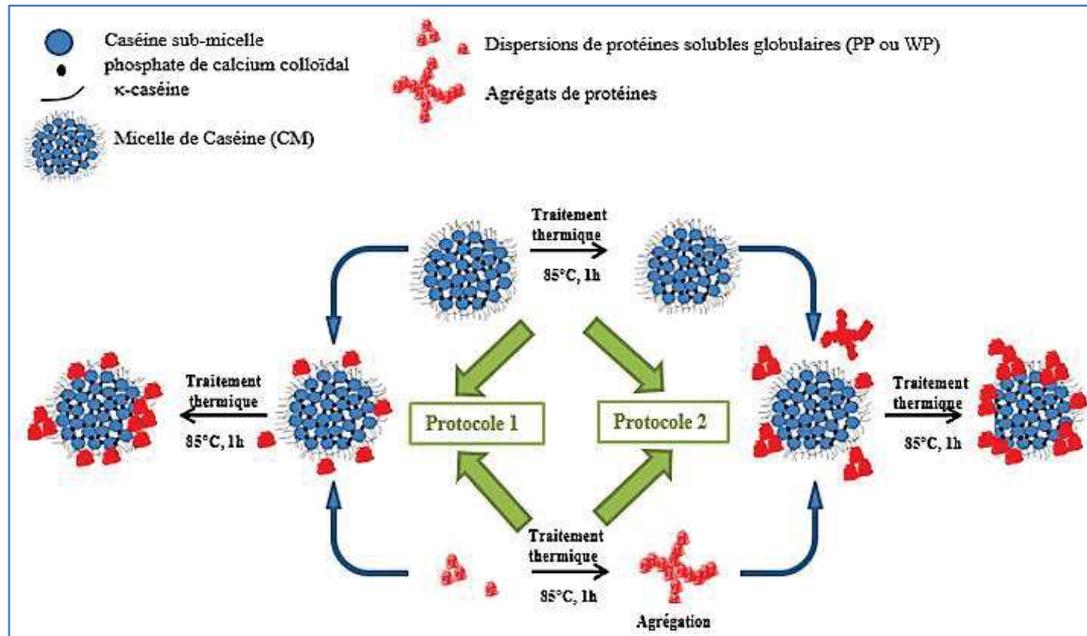
#### II.3.1. Procédé de traitement thermique (TT)

Deux protocoles de traitement thermique ont été réalisés en parallèle comme décrit par la figure II.1.

##### Protocole 1 :

Le premier protocole visait à associer les agrégats natifs de protéines de pois ou les protéines lactosériques natives aux micelles de caséines *via* des interactions de fortes ou de faibles énergie grâce au traitement thermique au-dessus de leurs températures de traitement thermiques. Le second protocole quant à lui ciblait l'association aux micelles de caséines des

agrégats de protéines déjà pré agrégés par un traitement thermique. L'objectif de ces deux protocoles différents était d'étudier l'impact de la taille des protéines et de leurs agrégats générés, des types d'interactions qui peuvent résulter suite au traitement thermique sur la formation de complexes mixtes.



**Figure II.1.** Schéma des deux protocoles de traitement thermique réalisés pour l'étude de l'association des protéines solubles de pois (PP) ou de lactosérum (WP) aux micelles de caséine (CM).

Dans un premier temps, un mélange de protéines a été préparé en associant les dispersions de PCN (respectivement 7,5 et 3,75 % (p/p)) soit à la dispersion de protéines de pois solubles (1,67 %, p/p), soit à la dispersion de protéines lactosériques (5 %, p/p) selon un rapport massique en protéines de 7,5/2,5 et une concentration en protéines totale de 4 % (p/p). Cette teneur en protéines totale ainsi que ce rapport massique entre les deux types de protéines associées ont été choisis afin de reproduire la concentration en protéines totale ainsi que le rapport micelles de caséines/protéines lactosériques du lait bovin (Walstra & al., 1999). Le mélange de protéines a ensuite été agité à 300 rpm pendant 30 minutes à 20 °C puis un volume de 45 mL de la dispersion a été transvasé dans des tubes coniques de 50 ml en polypropylène hermétiquement fermés (Falcon, Corning, New York, États-Unis). Ces tubes ont été placés dans un bain marie initialement thermostaté à 40 °C. Il est important de signaler qu'un enregistrement de la température d'un échantillon témoin a été nécessaire afin de contrôler le décalage de température entre le bain marie et l'échantillon. La température des échantillons a été alors augmentée à la vitesse de 1 °C/min puis maintenue à 85 °C pendant 1 h avant un

refroidissement rapide des échantillons à 20 °C dans un bain de glace. Ces mélanges de protéines traités thermiquement ont été nommés (CM-PP) P1 pour le mélange PCN et protéines solubles de pois traités thermiquement et (CM-WP) P1 pour le mélange PCN et protéines lactosériques traités thermiquement. Les échantillons ont ensuite été stockés à 4 °C et ramenés à 20 °C avant d'être analysés ou mis en œuvre pour la préparation de gels acides.

### **Protocole 2 :**

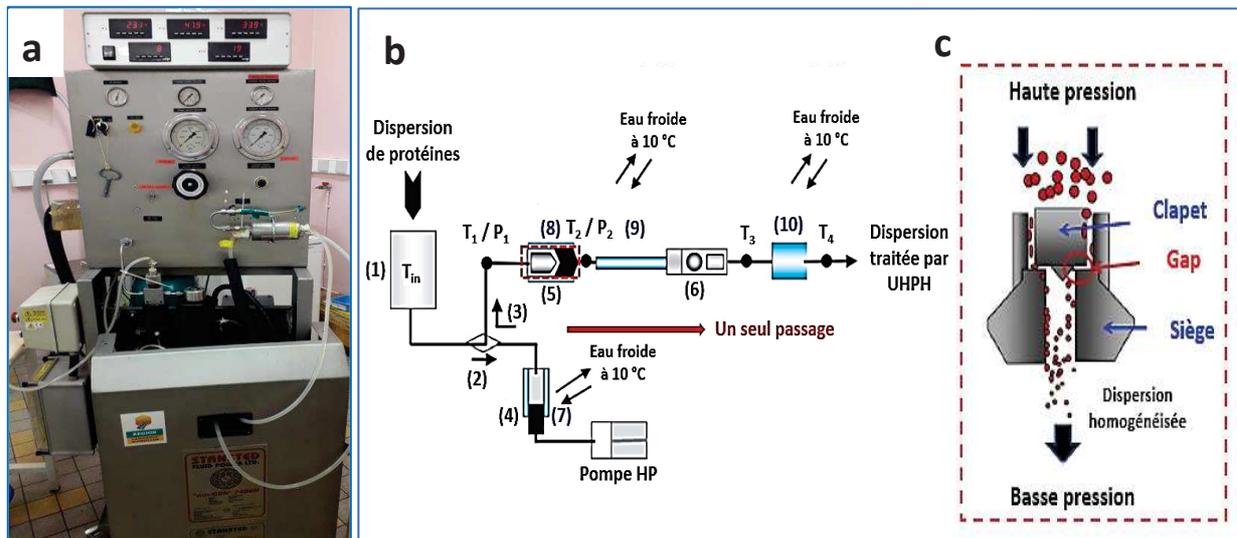
Deux traitements thermiques successifs ont été réalisés dans ce deuxième protocole. Le premier traitement thermique (identique à celui appliqué dans le protocole 1 : 85 °C pendant 1 h) a été appliqué individuellement à chaque dispersion protéique : la dispersion de protéines de pois solubles (1,67 %, p/p), la dispersion de protéines lactosériques (5 %, p/p) et les dispersions de phosphocaséines natives (7,5 et 3,75 %, p/p). Les dispersions traitées thermiquement ont été nommées PP HT pour la dispersion de protéines de pois solubles traitée thermiquement, WP HT pour la dispersion de protéines lactosériques traitée thermiquement et CM HT pour la dispersion de phosphocaséines traitée thermiquement. Puis, un mélange de protéines a été préparé en associant une dispersion PCN HT (7,5 et 3,75 %, p/p) soit à la dispersion PP HT (1,67 % p/p), soit à la dispersion WP HT (5 % (p/p)) selon un rapport massique en protéines de 7,5/2,5 et une concentration en protéines totale de 4 % (p/p). Après agitation à 300 rpm pendant 30 min à 20 °C, le même traitement thermique que celui décrit dans le protocole 1 a été appliqué aux mélanges de dispersions préalablement traitées thermiquement pour obtenir les mélanges nommés (CM-PP) P2 pour le mélange CM HT et PP HT traités thermiquement et (CM-WP) P2 pour le mélange CM HT et WP HT traités thermiquement.

### **II.3.2. Procédé de traitement par haute pression dynamique (HPD)**

Le procédé de traitement par homogénéisation à ultra-haute pression (UHPH) également appelé haute pression dynamique (HPD) est une technologie innovante utilisée dans plusieurs domaines tels que l'agroalimentaire, la cosmétique et le secteur pharmaceutique. Il a pour objectif soit la fragmentation de particules ou de gouttelettes dans le cas d'émulsions (démarche top down) ou l'agrégation de particules (démarche bottom up). Ce procédé peut aussi permettre d'inactiver des micro-organismes, des enzymes et certains virus (**Dumay et al., 2013**).

Dans le cadre de cette étude, le procédé de traitement par haute pression dynamique a été appliqué à la dispersion de protéines de pois solubles et à la dispersion de protéines lactosériques en tant que pré-traitement avant leur mélange avec la dispersion de PCN, le traitement thermique du mélange et l'élaboration de gels acides.

Les dispersions de protéines de pois solubles (1,67 %, p/p) et de protéines lactosériques (10 %, p/p) ont ainsi été traitées par le procédé de haute pression dynamique à l'aide d'un homogénéisateur HPD (modèle FPG7400H, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Royaume-Uni) présenté par la figure II.2. Seule la vanne haute pression (vanne HP ou premier étage) a été utilisée dans cette étude. L'effet du traitement par haute pression dynamique a été étudié pour chaque dispersion dans le cas d'un passage à 100, 200 et 300 MPa ( $P_1$ ) et après deux ( $P_2$ ) ou trois ( $P_3$ ) passages dans l'homogénéisateur HPD à 300 MPa. La température initiale ( $T_{in}$ ) des dispersions avant chaque traitement était de 22 °C.



**Figure II.2.** Homogénéisateur HPD (modèle FPG7400H de Stansted Fluid Power) (a), Schéma du pilote. Le liquide non homogénéisé est pompé vers l'intensificateur haute pression (2), pressurisé (3) et forcé à travers les valves haute pression (5) puis basse pression (6) (b) et schéma de la vanne HP Stansted utilisée (c) (D'après Gràcia-Juliá et al., 2008).

Le pilote est équipé d'une cuve d'alimentation contenant le produit à traiter (1), d'un système de génération de pression fonctionnant en mode pulsé composé d'une pompe haute pression, 40 MPa, et d'un intensificateur capable de multiplier la pression par un facteur 10 (4), d'une valve haute pression (HP, 5) et d'une valve basse pression (BP, 6), et de systèmes de refroidissements placés autour de l'intensificateur (7), de la valve HP (8), immédiatement en sortie de la valve HP (9) et après la valve BP (10).

Les températures  $T_1$  (température du fluide à l'entrée de la valve HP),  $T_2$  (température du fluide immédiatement à la sortie de la valve HP) et  $T_3$  (température du fluide à la sortie de la valve BP et après le refroidissement du produit en sortie de la valve HP) ont été mesurées grâce à des thermocouples (type T de faible inertie, 1,5 mm de diamètre, précision de  $\pm 1$  °C, TC S.A., Dardilly, France). Les pressions  $P_1$  (pression à l'entrée de la valve HP) et  $P_2$  (pression

à la sortie de la valve HP) ont été mesurées à l'aide de capteurs de pression (type PR871F, 0-400 MPa et PR771F, 0-40 MPa, Asco Instruments, Chateaufort, France) ainsi que deux manomètres de type Bourdon. Les valeurs de température et de pression pendant les essais sont lues sur des afficheurs numériques en façade du pilote et consignées (Figure II.3). La température initiale du fluide dans la cuve d'alimentation ( $T_{in}$ ) et sa température en sortie de du pilote ( $T_4$ ) ont été mesurées à l'aide d'un thermomètre (Modèle HI98509, Checktemp Electronic Thermometer, Hanna Instruments) ayant une précision de  $\pm 0,2$  °C. De plus, le débit de traitement du fluide a été quantifié lors de chaque essai.

Grâce au dispositif de refroidissement placé immédiatement en sortie de la valve HP, le temps de séjour du fluide à la température  $T_2$  lors du traitement est  $< 1$  s (soit  $\sim 215$  ms pour le fluide circulant à  $T_2$  à travers la vanne HP plus un temps supplémentaire  $\leq 550$  ms nécessaire au refroidissement du fluide de  $T_2$  à  $T_3$  dans le dispositif de refroidissement) (Picart et al., 2006). Les dispersions traitées ont été recueillies dans des flacons en polyéthylène après le temps maximal de séjour (une fois que la pression de traitement est atteinte de manière stable, les premiers 600 mL de dispersion sont jetés et le volume nécessaire aux analyses est prélevé). Les échantillons traités ont été immédiatement entreposés à 4 °C. Deux traitements par haute pression dynamique ont été réalisés pour chaque dispersion aux différentes pressions (100, 200 et 300 MPa) et pour les différents passages à 300 MPa.

Après le traitement des protéines globulaires par la HPD, les dispersions mères de PCN (respectivement 7,5 et 3,75 % (p/p)) ont été soit mélangées aux dispersions P 300 P3 (protéines de pois traitées par HPD à 300 MPa et après 3 passages), soit aux dispersions WP 300 P1 (protéines lactosériques traitées par HPD à 300 MPa et après 1 passages) selon un rapport massique en protéines de 7,5/2,5 et une concentration totale en protéines de 4 % (p/p). Les mélanges ont ensuite été agités pendant 30 min à 20 °C, placés dans des tubes coniques en plastique hermétiquement fermés de 50 mL (Falcon, Corning, New York, États-Unis) et équilibrés dans un bain-marie à 40 °C pendant 2 min. Ensuite, la température des échantillons a été portée à 85 °C à une vitesse de 1 °C/min, puis maintenue à 85 °C pendant 1 h avant un refroidissement rapide à 20 °C dans de la glace. Ces mélanges ont été nommés respectivement (CM-P300 P3) HT et (CM-WP 300 P1) HT. Le même protocole de traitement thermique a été appliqué aux mélanges PCN et PP ou PCN et WP et les échantillons ont été nommés (CM-PP) HT et (CM-WP) HT. Tous les échantillons ont ensuite été stockés à 4 °C et équilibrés à 20 °C avant d'être analysés.

## II.4. Analyses biochimiques et physico-chimiques des isolats et des dispersions protéiques

### II.4.1. Détermination de la teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche des isolats protéiques a été déterminée selon la méthode 925.1 (AOAC, 2000). Les échantillons ont été pesés dans des coupelles en aluminium préalablement séchées pendant une nuit à 105 °C. Ensuite, les coupelles ont été placées à l'étuve à 105 °C pendant 24 h. La teneur en matière sèche a été calculée pour chaque échantillon selon l'équation (1) :

$$MS=(m_f/m_i)*100 \text{ ..... (Équation 1)}$$

Où MS: teneur en matière sèche (% , p/p) ;

$m_i$  : masse initiale de l'échantillon (g) ;

$m_f$ : masse finale de l'échantillon après séchage à l'étuve à 105 °C (g).

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon.

### II.4.2. Détermination de la teneur en matière minérale

La teneur en matière minérale des isolats protéiques a été déterminée selon la méthode 923.0 (AOAC, 2000). Les échantillons déshydratés ont été placés dans un four à moufle (MR 260, Heraeus) à 600 °C pendant 24 h. La teneur de la matière minérale a été calculée selon l'équation (2) :

$$MM=(M_{\text{cendres}}/M_{\text{sec}})*100 \text{ ..... (Equation 2)}$$

Où MM : teneur en matière minérale (% , p/p) ;

$M_{\text{sec}}$  : masse de l'échantillon après déshydratation (g) ;

$M_{\text{cendres}}$  : masse des cendres après calcination à 600 °C (g).

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon.

### II.4.3. Détermination de la teneur en protéines par le dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total a été réalisé selon la méthode 923.0 (AOAC, 2000), appelée méthode de Kjeldahl, dans une unité de minéralisation (KjelDigester K-436, Büchi, Switzerland) et une unité de distillation (KjelFlex K-360, Büchi, Switzerland). La teneur en protéines présente dans les isolats et les dispersions protéiques a été ensuite calculée à partir de la quantité d'azote protéique présente dans l'échantillon en utilisant le coefficient K de

conversion azote-protéine égal à 6,25 pour les protéines de pois (Shand et al., 2007) et 6,38 pour les protéines du lait (Maubois et al., 2016). Il est à noter que la quantité d'azote non protéique a été déterminée par précipitation des protéines présentes dans les dispersions à l'aide de 12 % (p/v) d'acide trichloracétique (TCA), la quantité d'azote présente dans le surnageant après centrifugation est ensuite soustraite de la quantité totale d'azote présente dans les échantillons et enfin le pourcentage de protéines présent dans l'échantillon est calculé selon l'équation (3).

Une minéralisation de l'échantillon à analyser (0,5 g pour les poudres d'isolat de protéines et 1 mL pour les dispersions protéiques) a été réalisée à 400 °C pendant une heure en présence de 3 mL d'acide sulfurique concentré (98 %) et d'un microcatalyseur (Micro Copper, Büchi Switzerland). Dans ces conditions, l'azote de l'échantillon est complètement transformé en ions ammonium. Après refroidissement, un volume de 30 mL de soude à 30 % a été ajouté à l'échantillon minéralisé pour permettre la formation d'ammoniac. L'ammoniac produit est entraîné par un flux de vapeur d'eau puis piégé dans une solution d'acide borique (2 %, p/v). L'ammoniac est alors dosé directement par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M (unité de distillation Kjelflex K-360, Büchi, Switzerland) : le volume de HCl 0,1 M est relevé lorsque le pH atteint la valeur du pH de l'acide borique seul (pH = 4,65). A partir du volume de HCl utilisé, le pourcentage de protéines est calculé selon l'équation (3) :

$$\% \text{ Protéine} = K * [(V - V_{\text{blanc}}) * N * M * 100] / (m * 1000) - [\text{azote non protéique}] \dots\dots$$

**(Equation 3)**

Où :

V : volume d'HCl utilisé pour la titration de l'échantillon (mL) ;

V<sub>blanc</sub> : volume d'HCl utilisé pour la titration du blanc (mL) ;

N : normalité de l'acide chlorhydrique (mol/L) ;

M : masse molaire de l'azote (14,0067 g/mol) ;

m : masse de l'échantillon (g) ;

K : facteur de conversion (6,25 pour les protéines de pois ; 6,38 pour les protéines du lait).

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon.

#### **II.4.4. Détermination de la solubilité des protéines de pois**

Pour l'étude de la solubilité des protéines de pois en fonction du pH, nous avons utilisé la méthode d'Adebisi & Aluko (2011). Des dispersions de protéines de pois (4 %, p/p) ont été

préparées en dispersant 1 g de l'isolat commercial de protéines de pois soit 0,84 g de protéines de pois dans 16 g d'eau ultrapure puis en agitant cette dispersion pendant 1 h à température ambiante. Le pH de la dispersion a été ensuite ajusté à l'aide d'une solution de NaOH (0,1 M) ou de HCl (0,1 M) pour avoir une gamme de pH allant de 2 à 9. De l'eau ultrapure a ensuite été ajoutée jusqu'à atteindre une masse de 20 g.

Pour l'étude de la solubilité des protéines de pois en fonction de la force ionique, des dispersions de protéines de pois (4 %, p/p) ont été préparées à pH 7 et pH 8 en présence de NaCl à des concentrations de 10, 20, 50, 100 mM. Les dispersions ont été maintenues 2 h sous agitation à température ambiante puis 20 heures à 4 °C.

Pour l'étude de la solubilité des protéines de pois en fonction de la nature du milieu dispersant, des dispersions de protéines de pois (4 %, p/p) ont été préparées en utilisant comme milieu dispersant :

- de l'eau ultrapure avec une dispersion finale à pH 6,7 ;
- un tampon phosphate 10 mM à pH 7 avec ou sans ajout de 5 mM de NaCl ;
- un tampon phosphate 10 mM à pH 8 avec ou sans ajout de 5 mM de NaCl ;
- du SMUF avec une dispersion finale à pH 6,7.

Pour l'étude de la solubilité des protéines de pois en fonction de la concentration initiale en protéines de la dispersion, des dispersions contenant différentes concentrations en protéines (4, 6, 7, 8, 10, 15 %, p/p) ont été préparées dans de l'eau ultrapure avec un pH ajusté à 6,7.

Pour l'étude de la solubilité des protéines de pois en fonction de la vitesse de centrifugation, deux vitesses de centrifugation ont été étudiées : 12 000 × g et 149 000 × g pour une dispersion initiale de 5 % (p/p) en protéines de pois.

Les différentes dispersions élaborées afin d'étudier l'influence des paramètres physico-chimiques cités ci-dessus sur la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial ont été maintenues 2 heures sous agitation à température ambiante puis pendant 20 h à 4 °C. Les dispersions protéiques ont été finalement centrifugées à 12 000 × g pendant 20 min à 20 °C, sauf dans le cas de l'étude de l'influence de la vitesse de centrifugation où deux vitesses de centrifugation (12 000 × g et 149 000 × g) ont été comparées. La concentration en protéines des dispersions initiales et de leurs surnageants respectifs (considérée comme la concentration en protéines solubles) a été déterminée par la méthode de Kjeldahl. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon.

#### II.4.5. Analyse de la composition protéique par électrophorèse PAGE

L'électrophorèse PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) a été utilisée pour séparer et identifier les protéines d'un mélange. En condition native, les protéines sont séparées dans le gel de polyacrylamide sous l'influence du champ électrique appliqué en fonction de leur charge, taille et forme. En condition dénaturante (en présence de SDS), elles sont toutes chargées négativement et s'arrêtent dans le maillage du gel en fonction de leur taille, les plus grosses étant arrêtées rapidement. Cette technique permet donc d'identifier la composition protéique des échantillons analysés et d'éventuelles associations lors de la comparaison des séparations réalisées en conditions native ou bien dénaturante. Le gel d'électrophorèse est un réseau tridimensionnel de polyacrylamide dont la taille des pores dépend de la concentration en acrylamide et en bisacrylamide. Les protéines présentes dans les échantillons analysés vont dans un premier temps migrer à vitesse constante dans une zone à grand maillage (gel de concentration), puis se séparer en fonction de leurs charges électriques dans le gel de séparation. Si ces dernières étaient identiques, donc leur vitesse de migration serait dépendante de leurs tailles et poids moléculaires (les protéines les plus petites vont migrer plus rapidement).

Les trois types de dispersion protéiques utilisées dans cette étude, non traitées, traitées thermiquement ou par haute pression dynamique ainsi que leurs différents mélanges ont été caractérisés par électrophorèse PAGE sur gel discontinu. Trois types d'électrophorèse PAGE ont été réalisés : l'électrophorèse PAGE native, l'électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes (NR) et l'électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices (R). Dans le cas de l'électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes, l'ajout d'un tensioactif anionique comme le dodécylsulfate de sodium (SDS) à l'échantillon à analyser permet de conférer une charge nette négative aux protéines dont le poids moléculaire est alors le seul facteur de séparation. De plus, le SDS permet de dissocier les sous-unités des protéines oligomériques en rompant les liaisons faibles les associant. L'ajout d'un agent réducteur tel que le  $\beta$ -mercaptoéthanol (MSH) lors d'une électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices permet de rompre les ponts disulfures (type S-S) intra- et intermoléculaires.

##### *Électrophorèse PAGE native*

Les dispersions protéiques ont été analysées au moyen de minigels ( $80 \times 80 \times 1,5$  mm) constitués d'un gel de concentration à 3,5 % (v/v) d'acrylamide/bis-acrylamide (référence du produit, C = 37,5:1) et d'un gel de séparation à 5 % (v/v) d'acrylamide/bis-acrylamide. Ces gels ont été préparés respectivement à l'aide d'un tampon phosphate 25 mM et 50 mM (pH 7) et

polymérisés en présence de persulfate d'ammonium (1,8 mM) et de TEMED (2,8 mM). Les échantillons protéiques à analyser ont été dilués à 5 mg/mL dans un tampon phosphate 25 mM (pH 7) en présence de glycérol (150 mL/L) et de bleu de bromophénol (0,0025 %, p/v). Le tampon phosphate 50 mM (pH 7) a été utilisé comme tampon de migration. Les électrophorèses ont été réalisées à une puissance constante de 12 watts à 18 °C pendant 3 h. Le volume déposé dans les puits était de 5 µL pour les échantillons protéiques et de 2 µL pour les marqueurs (Sigma-Aldrich, MWND500, lot SLCC8761, Saint Louis, États-Unis)

### ***Électrophorèses SDS-PAGE en conditions dénaturantes et en conditions dénaturantes et réductrices***

Les électrophorèses SDS-PAGE ont été réalisées sur des gels de concentration à 4 % (v/v) % d'acrylamide/bis-acrylamide (C = 37,5:1) et de séparation à 12 % (v/v) d'acrylamide/bis-acrylamide (C = 37,5:1) préparés respectivement à partir du tampon Tris-HCl (0,5 M /pH 6,8 ) et (1,875 M/pH 8,6). Ensuite, la polymérisation a été réalisée par ajout d'ammonium persulfate à 10 % (Aps, 0,008 M) et de TEMED (0,0008 M). Les échantillons protéiques ont été préparés à une concentration en protéines de 5 % (p/p) dans un tampon contenant 0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8), 2 % (p/v) de SDS, 150 mL/L de glycérol, 0,0025 % (p/v) de bleu de bromophénol et 5 % (v/v) de β-mercaptoéthanol uniquement dans le cas des électrophorèses conditions dénaturantes et réductrices. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 95 °C pendant 5 min puis refroidis dans un bain de glace. La migration a été effectuée avec un tampon tris-glycine (0,025 M Tris, 0,192 M glycine, 0,1 % (p/v) SDS) à pH 8,3. Ces électrophorèses SDS-PAGE ont été réalisées à une puissance constante de 9 W pendant 3 h à 18 °C. Le volume déposé dans les puits était de 5 µL pour les échantillons protéiques et de 15 µL pour les marqueurs (Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard, LC5800, Invitrogen, Carlsbad, États-Unis). Une fois la migration achevée, les gels d'électrophorèse ont été colorés avec une solution à 0,4 % (p/v) bleu de Coomassie G-250 (300 mL de méthanol, 60 mL d'acide acétique glacial et 300 mL d'eau ultrapure) puis décolorés par une solution de décoloration (150 mL de méthanol, 150 mL d'acide acétique glacial et 2 L d'eau ultrapure).

#### **II.4.6. Analyse enthalpique différentielle**

L'analyse enthalpique différentielle ou calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry, DSC) est une technique d'analyse qui permet de quantifier la variation d'enthalpie lors d'une variation linéaire de température imposée à l'échantillon

étudié. Cette technique permet de déterminer à la fois la température de dénaturation des protéines mais aussi la quantité d'énergie nécessaire pour cette dénaturation thermique.

Le principe de mesure consiste à quantifier les gradients de puissance électrique nécessaires pour maintenir l'échantillon (ici la dispersion protéique étudiée) et la référence (le milieu dispersant) à une température identique lorsqu'ils sont soumis à un balayage linéaire en température programmé.

L'étude des propriétés thermodynamiques des dispersions initiales de protéines de pois et de protéines lactosériques a été réalisée à l'aide d'un calorimètre différentiel à balayage Micro DSC III (Setaram, France) et de cellules de mesures standards type « batch » (référence des cellule, cellule cylindrique de diamètre intérieur 6,4 mm et de hauteur 19,5 mm, Setaram, France). Une masse de 800 µg de dispersion protéique (4 %, p/p) et d'eau ultrapure (milieu dispersant) a été placée respectivement dans la cellule échantillon et dans la cellule de référence. Deux cycles de chauffage successifs ont été réalisés entre 22 et 99 °C avec une rampe de montée en température de 1°C/min suivi d'un refroidissement à la même vitesse jusqu'à 22 °C. L'évolution du flux thermique en fonction de la température (thermogramme) a été traité à l'aide du logiciel Calisto Data Processing, version 1.12) et les paramètres suivants ont été évalués pour chaque pic : la température de début de dénaturation ( $T_{\text{onset}}$ ), la température de dénaturation ( $T_d$ ) et l'enthalpie de dénaturation associée ( $\Delta H_d$ ). Les mesures ont été répétées trois fois par échantillon.

#### **II.4.7. Détermination de la taille des particules par spectroscopie par corrélation de photons (PCS)**

La distribution de taille des particules présentes dans les dispersions de protéines a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à l'aide d'un granulomètre Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, Orsay, France). Le principe de cette technique est basé sur la mesure de l'intensité de la lumière diffusée par les particules agitées d'un mouvement brownien et sans interaction entre elles à un angle de détection donné. L'appareil de mesure utilisé est équipé d'une source laser monochromatique de type He-Ne fonctionnant à une longueur d'onde de 633 nm et d'un photomultiplicateur à photodiode placé à un angle de diffusion de 173° pour recueillir au cours du temps la lumière diffusée par les particules. Ce signal est ensuite traité par un système de corrélation (**Figure II.3**). Enfin, une fonction d'autocorrélation de l'intensité correspondant à la probabilité de retrouver une particule à l'instant  $t + dt$  au même point de l'espace qu'à l'instant  $t$  est calculée et permet de déduire le coefficient de diffusion translationnel

de la particule. Le diamètre hydrodynamique des particules ( $D_h$ ) assimilées à des sphères parfaites peut être calculé à partir de ce coefficient de diffusion selon l'équation de Stokes-Einstein (Equation 4).

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \dots\dots\dots \text{(Equation 4)}$$

Où :

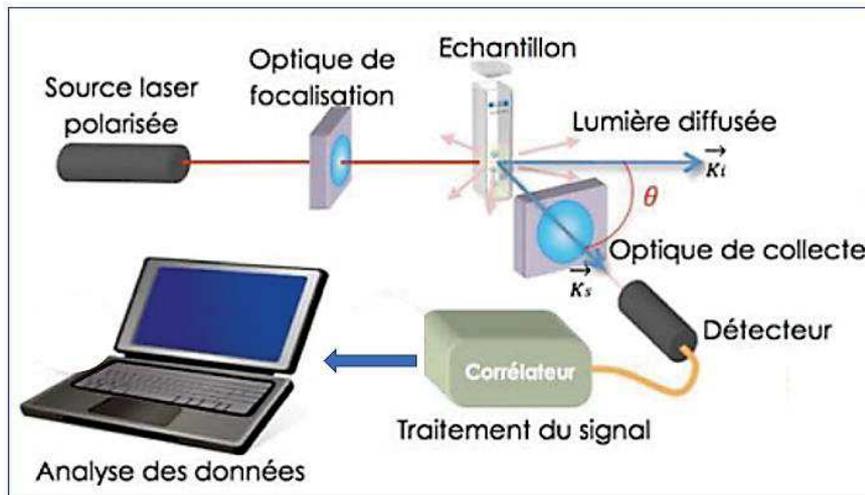
$D_h$  est le diamètre hydrodynamique de la particule (m) ;

T est la température absolue (K) ;

k est la constante de Boltzmann ( $J.K^{-1}$ ) ;

$\eta$  est la viscosité du milieu dispersant ( $m^{-1}.Kg.s^{-1}$ ) ;

D est le coefficient de diffusion ( $m^2.s^{-1}$ ).



**Figure II.3.** Schéma du dispositif simplifié du principe de la diffusion dynamique de lumière (Mainard & Jacob, 2016).

La distribution de taille des particules présentes dans les dispersions de protéines a été déterminée à 25 °C dans une cuve en polystyrène à 4 faces (Sarstedt, Numbrecht, Allemagne). Préalablement à la mesure, les dispersions ont été diluées à une concentration finale de 5 g/L. Les résultats ont été analysés à l'aide de l'algorithme des moindres carrés non négatifs (NNLS) en prenant en compte pour la phase dispersante une viscosité de 0,89 mPa.s et un indice de réfraction de 1,33. Les indices de réfraction réel et imaginaire des protéines sont respectivement de 1,36 et de 0,004 pour les protéines de lait (Regnault, Thiebaud, Dumay, & Cheftel, 2004) et 1,45 et 0,004 pour les protéines de pois (Bogahawaththa & al., 2019). Quatre mesures par échantillon ont été effectuées. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'une courbe de distribution de taille représentant l'intensité de la lumière diffusée ou le nombre de particules en fonction du diamètre. Pour chaque échantillon, une distribution moyenne a été calculée

(moyenne arithmétique pondérée) à partir de la distribution de taille en intensité et a été tracée et le diamètre minimal, le diamètre maximal et le diamètre moyen de chaque pic ont été calculés à partir de la distribution de taille en intensité et en nombre. De plus, le diamètre moyen de la distribution a été quantifié à partir des distributions de taille en intensité et en nombre.

#### II.4.8. Détermination de la charge de surface ou le potentiel Zeta ( $\zeta$ ) des particules

La mesure du potentiel Zêta est réalisée afin d'évaluer la charge des particules présentes dans les échantillons, et ainsi anticiper les interactions électrostatiques protéine-protéine et protéine-solvant ; une valeur élevée en valeur absolue du potentiel Zêta empêche l'agrégation tandis qu'une valeur proche de zéro permet aux particules de se rapprocher et donc favorise l'agrégation. La mesure de la charge moyenne de surface représente la différence de potentiel (DDP) entre la surface de la protéine (ou de la particule) et le milieu environnant. Cette DDP est due à une concentration plus élevée en ions à la surface de la protéine par rapport à la concentration des ions présents dans le milieu environnant. Cette couche électrique est régie par la loi d'Henry (Equation 5) :

$$U_{\varepsilon} = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \dots\dots\dots \text{(Equation 5)}$$

Où :

$U_{\varepsilon}$  est la mobilité électrophorétique ( $m^2.V^{-1}.s^{-1}$ ) ;

$\varepsilon$  est la permittivité de milieu (Farad/m) ;

$z$  est le potentiel Zêta (V) ;

$f(ka)$  est une fonction liée à la proportion entre la taille ( $a$ ) caractéristique du système et la longueur de Debye ( $k$ ) ;

$\eta$  est la viscosité du milieu environnant ( $m^{-1}.Kg.s^{-1}$ ).

La mesure de la charge de surface a été effectuée à l'aide d'un Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, Orsay, France) et de cellules de mesure jetables (cellules capillaires DTS 1060 Zetasizer nano series). Le courant alternatif et l'émission d'un laser de 633 nm de longueur d'onde sont appliqués simultanément. La viscosité du milieu de dispersion était de 0,8872 et les données ont été traitées par le logiciel Malvern V7.01. Les échantillons ont été analysés à pH 6,7, à température de 25 °C et trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon.

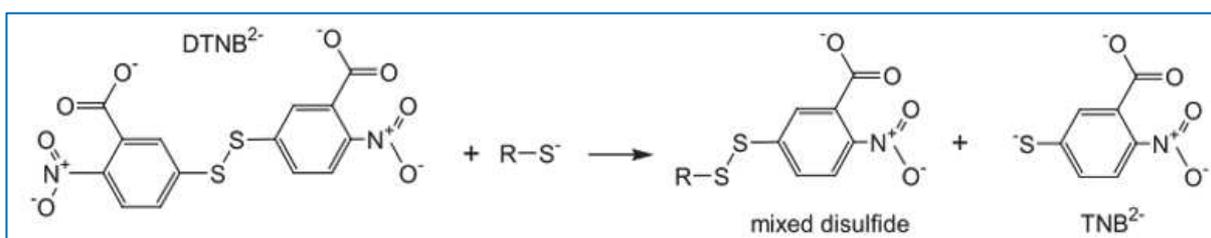
#### II.4.9. Détermination de la quantité de groupes sulfhydryles libres (-SH) et de ponts disulfures (SS)

Le principe de cette méthode repose sur la détermination des groupements sulfhydryles libres des protéines qui peuvent réagir avec le réactif d'Ellman (acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque appelé DTNB) pour donner du TNB<sup>2-</sup> (molécule jaune avec un coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{412} = 13\,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 412 nm) (**Figure II.4**). Trois types de groupements thiols peuvent être quantifiés :

- (1) les groupements sulfhydryles libres de surface (groupements présents à la surface des protéines),
- (2) les groupements sulfhydryles libres totaux dont la quantification nécessite des conditions dénaturantes afin de rendre l'ensemble des groupements thiols libres accessibles
- (3) les groupements sulfhydryles totaux dont la quantification nécessite des conditions dénaturantes et réductrices.

La quantité de ponts disulfures (SS) présents dans les dispersions de protéines analysées peut être déduite et est égale à la moitié de la différence entre les groupements sulfhydryles totaux et les groupements sulfhydryles libres totaux.

Les groupes sulfhydryles (-SH) libres de surface, libres totaux et totaux des échantillons ont été déterminés en utilisant la méthode d'Ellman (**Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961**) avec quelques modifications.



**Figure II.4.** Schéma réactionnel de la réduction du DTNB (D'après **Ellman, 1959**).

Les dispersions de protéines ont été diluées à 7,5 mg/mL dans le tampon Tris-Gly (86 mM Tris, 90 mM glycine et 4 mM EDTA, pH 8,0).

Pour la mesure de la teneur en groupements sulfhydryles libres en surface des protéines, 4 mL de tampon Tris-Gly ont été ajoutés à 1 mL de la dispersion à 7,5 mg/mL.

Pour la teneur en groupements sulfhydryles libres totaux, de l'urée a été ajouté à la dispersion de protéines ci-dessus pour obtenir une concentration en urée de 8 M (dispersion 2),

puis la dispersion a été agitée à 200 rpm pendant une nuit à 20 °C. Ensuite, 4 mL de tampon Tris-Gly ont été ajoutés à 1 mL de cette dispersion de protéines.

Pour évaluer la teneur en groupements sulfhydryles totaux et pouvoir calculer la teneur en ponts disulfures, 0,05 mL de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 4 mL de tampon Tris-Gly ont été ajoutés à 1 mL de la dispersion 2 protéique préparée à 7,5 mg/mL, cette dispersion a été agitée à 200 rpm pendant 1 h à température ambiante. Puis, 10 mL de la solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 12 % (p/v) ont été ajoutés à cette troisième dispersion et le mélange a été incubé pendant 1 h supplémentaire. Le culot obtenu après centrifugation ( $5000 \times g$  pendant 10 min à 20 °C) a été lavé deux fois avec 5 mL de la solution de TCA (12 %, p/v) puis a été dissous dans 10 mL de tampon Tris-Gly. 0,05 mL du réactif d'Ellman (2 mM de DTNB dans le tampon Tris-Gly) a été ajouté à 5 mL de chaque dispersion de protéines préparées comme expliqué ci-dessus et les mélanges ont été incubés pendant 20 min à température ambiante puis l'absorbance a été mesurée à la longueur d'onde de 412 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV 1900, Shimadzu UV-Vis, Japan).

La teneur en groupements sulfhydryle a été calculée selon l'équation (6) :

$$\text{SH}(\mu\text{mol/g}) = \frac{(73.53 \cdot A \cdot D)}{c} \dots\dots \text{(Equation 6)}$$

Où :

A est l'absorbance à 412 nm ;

C est la concentration initiale en protéines de l'échantillon (7,5 mg/mL) ;

D est le facteur de dilution (5 pour les SH de surface et libres, 10 pour les SH totaux),

La constante 73,53 est calculée comme suit :  $10^6 / (1,36 \times 10^4)$  où  $10^6$  est la conversion de la base molaire à la base  $\mu\text{mol/mL}$  et de mg à g de solides ;  $1,36 \times 10^4$  est le coefficient d'extinction molaire ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) de la molécule colorée en jaune ( $\text{TNB}^{2-}$ ) à 412 nm dans le domaine du visible).

La teneur en ponts disulfures a été calculée selon l'équation (7) :

$$\text{SS}(\mu\text{mol/g}) = \frac{\text{SH totaux} - \text{SH libres}}{2} \dots\dots \text{(Equation 7)}$$

Pour chaque type de dosage, trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon.

#### II.4.10. Détermination de l'hydrophobie de surface des protéines

Le principe de cette méthode consiste en un dosage par spectrofluorimétrie des complexes formés par les acides aminés accessibles des protéines dont les résidus sont hydrophobes et une sonde fluorescente, 1-anilino-8-naphthalene-sulfonate (ANS). L'évolution de l'hydrophobie globale d'une protéine peut donner des informations sur son changement conformationnel lors d'un traitement physico-chimique et sur les interactions hydrophobes intermoléculaires existantes.

L'hydrophobie de surface ( $H_o$ ) a été mesurée selon la méthode de **Kato et Nakai (1980)** et de **Haskard et Chan (1998)** avec quelques modifications. Pour chaque dispersion de protéines à analyser, des dilutions ont été préparées dans un tampon phosphate (0,01 M, pH 7) pour obtenir 5 dispersions ayant une concentration finale en protéines comprise entre 0,04 et 0,2 mg/mL. Ensuite, 20  $\mu$ L de la sonde fluorescente (solution d'ANS à 8 mM dans 0,01 mM de tampon phosphate, pH 7) ont été ajoutés à 4 mL à chacune de ces 5 dispersions protéiques. Après 15 min de réaction à l'obscurité, l'intensité de fluorescence du mélange a été mesurée dans une cuvette en quartz (101-QS, Hellma, Allemagne) à 25 °C à l'aide d'un spectrophotomètre de fluorescence (Varian Cary Eclipse, Victoria, Australie). La longueur d'onde d'excitation de  $\lambda_{ex} = 365$  nm a été appliquée et le spectre d'émission de 300 à 650 nm a été mesuré à  $\lambda_{em} = 484$  nm. La largeur de la bande passante du faisceau incident et émis était de 5 nm. Les valeurs de l'intensité de fluorescence du tampon et des dilutions protéiques sans l'ajout d'ANS ont également été mesurées. Pour chaque concentration des dispersions de protéines préparées (pour chaque dilution), l'aire sous le spectre d'émission en fonction de la longueur d'onde est calculée. Ensuite, la droite qui représente les aires calculées en fonction des concentrations est tracée. Enfin, la pente de cette droite correspond à l'hydrophobicité de surface de l'échantillon analysé. Les mesures pour chaque échantillon ont été répétées trois fois.

## **II.5. Gélification par acidification chimique de dispersions protéiques et caractérisation des gels obtenus**

Les mélanges protéiques obtenus suivants les différents protocoles détaillés dans les sections II.3.1 et II.3.2 ont été soumis à une acidification chimique afin de comparer les propriétés rhéologiques et texturales des gels obtenus à partir de ces différents types de mélanges.

La Glucono- $\delta$ -lactone (GDL) s'hydrolyse progressivement dans l'eau en acide gluconique provoquant une baisse progressive du pH. La GDL a été ajoutée à une concentration de 2 % (p/p) sous forme de poudre (49120, Fluka chemicals GmbH, Dublin, Irlande) aux dispersions et mélanges protéiques à étudier soit : les dispersions CM, PP et WP traitées thermiquement représentant les différents témoins et les complexes protéiques obtenus par les différents protocoles ((CM-PP)P1, (CM-PP)P2, (CM-PP) HT, (CM-P 300 P3) HT, (CM-WP)P1, (CM-WP)P2, (CM-WP) HT et (CM-WP 300 P1) HT. L'acidification a été conduite pendant 5 h à 25 °C.

### **II.5.1. Suivi de la cinétique de gélification par acidification chimique**

Afin de suivre l'évolution du pH des différentes dispersions protéiques lors de leur acidification, des volumes de 20 mL de ces différentes dispersions ont été répartis dans sept (7) pots de yaourt en plastique (Pot de fond plat, lot 100022868, RPC Tedeco-Gizeh) placés dans un bain marie maintenu à 25 °C. La GDL (2 %, p/p) a ensuite été ajoutée dans chaque pot. Le pH au cours de l'acidification a été enregistré dès l'ajout de GDL et pendant 5 h grâce à une sonde pH (405-60-T-S7/120-9848, Mettler Toledo, Schwerzenbech, Suisse) connectée à un pH-mètre Consort (C833, Consort, Turnhout, Belgique) équipé d'un système d'acquisition de données enregistrant une mesure de pH toutes les 10 s. La cinétique d'acidification a été suivie en triplicata pour chaque dispersion protéique.

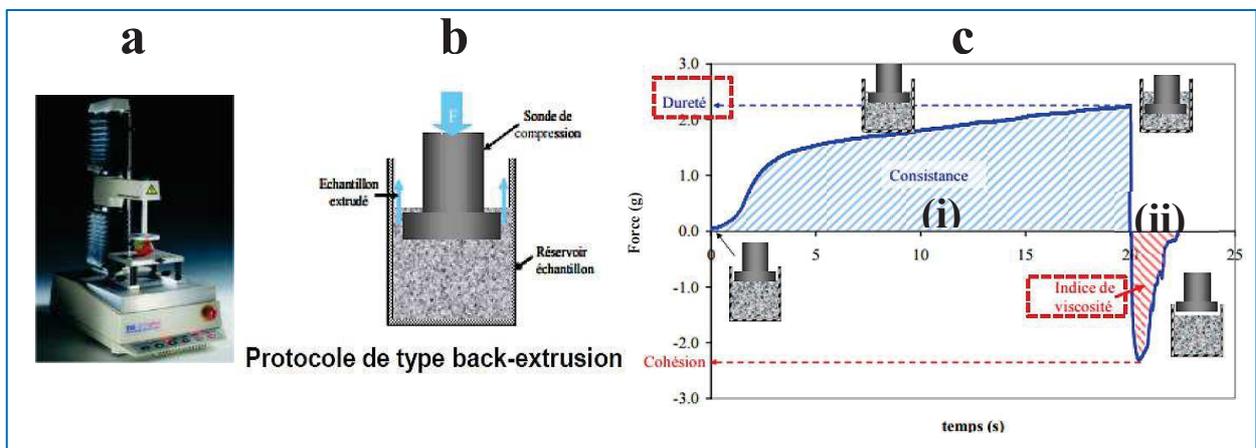
### **II.5.2. Caractérisation rhéologique des gels**

La caractérisation rhéologique des gels protéiques formés a été réalisée en mode dynamique à faible oscillation grâce à un rhéomètre dynamique (MCR 300, Anton Paar, St Albans, Royaume-Uni) utilisant une géométrie de cylindre coaxial (CC27). La réponse dynamique des fluides viscoélastiques à une stimulation oscillatoire a été analysée par la mesure du module de stockage ( $G'$ , caractère élastique) et du module de perte ( $G''$ , caractère visqueux) suite à une déformation constante de faible amplitude (1 %) et à une fréquence de 1 Hz pendant toute la durée de la gélification. Le point de gel est repéré par le point d'intersection entre  $G'$  et

$G''$ , c'est-à-dire lorsque le caractère élastique du gel devient égal au caractère visqueux (Winter, 1987). La prise en gel se traduit ensuite par une augmentation du caractère élastique du gel jusqu'à l'obtention d'un plateau en fin de coagulation lorsque le pH du gel est stabilisé. Expérimentalement, un volume d'échantillon de 20 mL a été mélangé pendant 30 s avec 2 % (p/p) GDL, avant d'être versé dans la coupelle du rhéomètre maintenue à 25 °C grâce à un système Peltier. L'enregistrement des paramètres rhéologiques a ensuite été réalisé toutes les 10 s pendant 5 h de coagulation acide. Chaque mesure a été répétée trois fois pour chaque échantillon.

### II.5.3. Caractérisation de la texture des gels

Les propriétés texturales des gels formés par gélification après ajout de 2 % (p/p) de GDL à 25 °C ont été déterminées à l'aide d'un texturomètre TA-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, Royaume-Uni ; **Figure II.5, a**) équipé d'un capteur de force de 5 kg et d'un module cylindrique en acrylique de 35 mm de diamètre et de 5 mm d'épaisseur (cellule « Back-Extrusion ») (**Figure II.5, b**).



**Figure II.5.** Texturomètre TA-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, Royaume-Uni) (a) sonde type back-extrusion (b) enregistrement de la force en fonction du temps (les paramètres de la texture des gels étudiés sont encadrés en rouge) (c).

Cette mesure a consisté à réaliser (i) une compression du gel par pénétration du module sur une hauteur de 20 mm puis (ii) un retrait de la sonde (**Figure II.5, c**). La vitesse du module était de 1 mm/s lors des deux phases. Les gels ont été stockés à 4 °C pendant 24 h avant cette analyse. Les courbes de force (g) en fonction du temps (s) ont été enregistrées et deux paramètres ont été extraits de ces courbes : la fermeté ou dureté (g) (force maximale lors de la

phase de compression) et l'indice de viscosité (g.s) (aire sous la courbe du mouvement de retrait). Toutes les mesures de texture ont été répétées trois fois.

#### II.5.4. Détermination de la capacité de rétention en eau des gels

La capacité de rétention en eau des gels a été déterminée selon la méthode proposée par **Maltais, Remondetto, Gonzalez, & Subirade (2005)** en y apportant des modifications mineures. Les gels ont été préparés dans des tubes à centrifuger de 38 mL (3117-0380, Thermo scientific, USA) à partir des dispersions auxquelles 2 % (p/p) de GDL ont été ajoutés. Les échantillons ont été ensuite incubés à 25 °C pendant 24 h pour réaliser la gélification puis stockés à 4 °C pendant 24 h avant d'être centrifugés à 5000 × g pendant 5 min à 20 °C (ultracentrifugeuse Optima LE-80k, rotor 70 Ti, Beckman, Californie, États-Unis). Les tubes ont été pesés avant centrifugation ainsi qu'après centrifugation une fois que l'eau libérée par le gel éliminée. La capacité de rétention d'eau a été calculée selon l'équation (8) :

$$\text{Capacite de rétention en eau (\%)} = \left(1 - \frac{m_r}{m_t}\right) * 100 \dots\dots \text{(Equation 8)}$$

Où :

$m_t$  est la masse totale d'eau dans l'échantillon (g) ;

$m_r$  est la masse d'eau libérée des gels après centrifugation (g).

Les mesures ont été effectuées en triplicat.

#### II.5.5. Etude de la microstructure des gels par microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est basée sur le principe de l'interaction matière-électrons obtenue grâce au balayage de la surface de l'échantillon par un faisceau d'électrons qui réémet des particules captées par des détecteurs permettant ainsi de construire une image en 3D représentant la topologie de l'échantillon. Les échantillons analysés (dispersions natives et traitées par haute pression dynamique ou par traitement thermique, complexes protéiques et leurs gels associés) ont été déposés sur des membranes de filtration inorganique (Anodisc 25, grade microscopie électronique à balayage, 2 cm de diamètre, taille moyenne des pores 0,2 μm, Whatman, Maidstone, GB) par immersion des membranes dans les échantillons pendant 15 min. Les échantillons ont ensuite été déshydratés après immersion des membranes dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante (25, 50, 70, 80, 90, 96, 100 %, v/v) à raison de 5 min dans chaque bain. Cette étape a permis de remplacer l'eau des échantillons par de l'éthanol à 100 %. Les échantillons conservés dans l'éthanol à 100 % pendant 1 nuit à 4 °C ont ensuite été séchés à l'aide d'un sécheur au point critique de CO<sub>2</sub>

(Critical Point Dryer 030 Bal-Tec, Balzers Union, Selles sur Cher, Liechtenstein). Cette étape permet de remplacer l'éthanol par le CO<sub>2</sub> liquide, puis de le transformer en gaz en chauffant l'échantillon sous une pression de 72,9 bar, de 4 °C jusqu'à 31,1 °C correspondant au point critique du CO<sub>2</sub>. Enfin, les échantillons, conservés après déshydratation dans une enceinte à 0 % d'humidité, ont été déposés sur des plots recouvert de scotch double afin de subir un traitement de surface par métallisation (pulvérisation d'une couche de platine de 1 nm grâce à l'appareil POLARON SC7620 (BIORAD S.A., France)) pour être observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage sous un voltage de 5 kV à haute résolution (Hitachi S-4800, Tokyo, Japon) et à différents grossissements ( $\times 10\ 000$ ,  $\times 20\ 000$ ,  $\times 40\ 000$  et  $\times 100\ 000$ ).

## **II.6. Etude de la stabilité des gels**

### **II.6.1. Etude de la stabilité des gels par ajout d'un agent dissociant**

L'objectif de cette manipulation consiste à étudier les effets combinés de la concentration d'un agent dissociant, le SDS (0, 2 et 6 g/L) et de l'ultracentrifugation ( $86\,000 \times g$ , 32 min) sur la solubilisation des protéines afin d'identifier la nature des forces d'interaction stabilisant les réseaux tridimensionnels obtenus après gélification par acidification des différents mélanges protéiques non traités ou traités thermiquement. En parallèle, des échantillons témoins ont été analysés : les mélanges de protéines non traités thermiquement et non gélifiés et ceux non traités thermiquement et acidifiés par la GDL.

La démarche expérimentale décrite par **Lefebvre-Cases et al. (1998)** a été appliquée après quelques modifications mineures. Une masse de gel correspondant à un volume de 12 mL de dispersion a été mélangée avec 8 ml d'une solution contenant 2 ou 6 g/L de SDS pour obtenir une concentration finale de 2,4 % (p/p) en protéines. Concernant l'échantillon de référence, 8 ml d'eau ultrapure ont été utilisés pour disperser le gel à la place de la solution de SDS. Les dispersions obtenues ont été homogénéisées à l'aide de l'ultra-turrax (T 25, IKA, Staufen, Allemagne) à 9 000 rpm pendant 1 min. Les dispersions de gel ont ensuite été ultracentrifugées à  $86\ 000 \times g$  pendant 32 min à 20 °C (ultracentrifugeuse Optima LE-80k, rotor 70 Ti, Beckman Instruments, Palo Alto, Californie, USA). La concentration en protéines des surnageants a alors été déterminée par la méthode dosage de l'azote total. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillons.

## **II.6.2. Etude de la stabilité des gels en fonction du temps**

Afin d'étudier la stabilité des gels dans le temps et d'identifier leur capacité à résister aux facteurs extrinsèques physiques (température, forces mécaniques) et chimiques (pH du milieu, force ionique), les propriétés texturales et la capacité de rétention d'eau des gels produits dans la **section II.6** ont été évaluées après un stockage à 4 °C pendant 7 j en utilisant les techniques et protocoles expérimentaux décrits dans les **sections II.5.3 et II.5.4**. Les résultats ont été comparés à ceux du premier jour de stockage. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillons.

## **II.7. Analyse statistique des données**

Les résultats expérimentaux ont été exprimés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type avec au moins trois répétitions par échantillon. Les analyses statistiques des données expérimentales ont été réalisées par analyse de variance (ANOVA). Les différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre échantillons ont été déterminées par le test de Tukey en utilisant le logiciel XLSTAT v2020. En ce qui concerne les régressions linéaires et les paramètres statistiques associés, ils ont été obtenus avec le logiciel Excel® (2020.5.1.1040).

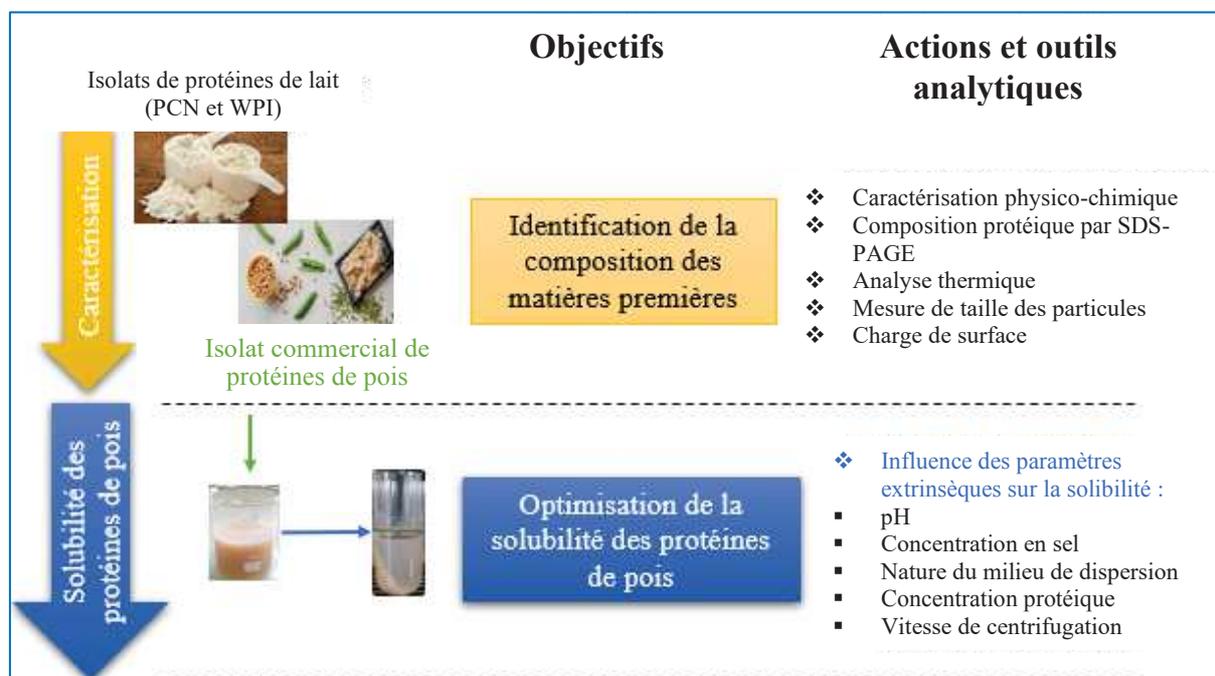
# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**

## Résultats et discussion

Comme annoncé dans l'introduction générale, l'association de protéines de pois à des protéines laitières afin de développer de nouveaux assemblages d'intérêt pour l'industrie agroalimentaire nécessite à l'heure actuelle des travaux de recherche pour mieux comprendre ces systèmes associant protéines végétales et protéines animales. Peu de littérature s'intéresse à la nature des interactions mises en place entre ces deux types de protéines et à leur impact sur les propriétés fonctionnelles de ces assemblages. Bien que les phénomènes d'interaction, d'agrégation et de gélification des protéines laitières et des protéines de pois aient été largement étudiées séparément, l'étude bibliographique réalisée a montré que peu de travaux ont été consacrés au processus d'association des protéines de ces deux sources protéiques pour élaborer des complexes mixtes qui puissent ensuite être utilisés dans l'élaboration de produits dérivés aux propriétés fonctionnelles recherchées telles que la gélification.

C'est dans cette perspective d'obtenir des produits gélifiés mixtes végétal/animal et de comprendre leur optimisation de fabrication que la partie résultats et discussion a été construite. Les objectifs de la première partie de ce travail concernent l'optimisation de la solubilité des protéines de pois et sont synthétisés dans la **figure III.1** extraite de la **figure I.0** présentant l'ensemble des objectifs de la thèse.



**Figure III.1.** Synthèse des objectifs et de l'organisation des analyses réalisées dans la première partie du travail.

### **III.1. Caractérisation physico-chimique des isolats et des dispersions de protéines et optimisation de la solubilité des protéines de pois**

Dans cette première partie de l'étude, l'objectif est d'évaluer les propriétés physico-chimiques des trois isolats commerciaux de protéines mis en œuvre dans ce travail : l'isolat de protéines de pois (PPI), l'isolat de protéines lactosériques (WPI) et l'isolat de phosphocaséines natives (PCN). Cette caractérisation permettra d'avoir une connaissance précise des caractéristiques physico-chimiques de ces trois types de protéines afin d'identifier et comprendre les modifications engendrées par les différents traitements qui leur seront appliqués par la suite individuellement ou en mélange.

De plus, la solubilité des protéines issues de l'isolat commercial de protéines de pois a été étudiée en fonction de différents paramètres physico-chimiques afin de déterminer les conditions permettant d'obtenir une teneur maximale en protéines solubles.

Cette première partie du chapitre Résultats et discussion se divise donc en deux sous-parties :

- La caractérisation physico-chimique des trois isolats protéiques commerciaux portant sur l'analyse de la composition biochimique des isolats, l'analyse qualitative des protéines, l'analyse de leurs propriétés thermodynamiques et la détermination de la taille et de la charge des particules présentes dans les dispersions protéiques préparées à partir des trois isolats.
- L'optimisation de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction de différents paramètres physico-chimiques (pH, force ionique, nature du milieu de dispersion, concentration initiale en protéines, vitesse de centrifugation).

#### **III.1.1. Caractérisation physico-chimique des isolats de protéines de pois, de protéines lactosériques et de phosphocaséines natives**

##### **III.1.1.1. Composition biochimique des isolats protéiques**

La composition biochimique des trois isolats protéiques commerciaux (PPI S85F, WPI Prolacta 90, PCN Promilk 825B) étudiés dans ce travail a été déterminée expérimentalement et est présentée dans le **tableau III.1**. Les résultats obtenus sont comparés aux données transmises par les fournisseurs.

**Tableau III.1.** Composition biochimique des isolats de protéines de pois (PPI, S85F, Roquette Frères), de protéines lactosériques (WPI, Prolacta 90, Lactalis) et de phosphocaséines natives (PCN, Promilk 852B, Ingredia).

Constituants	PPI		WPI		PCN	
	Résultats expérimentaux	Données du fournisseur	Résultats expérimentaux	Données du fournisseur	Résultats expérimentaux	Données du fournisseur
<b>Teneurs (g/100 g de poudre en base humide)</b>						
Matière sèche	93,90 ± 0,19 <sup>a</sup>	93	93,81 ± 0,16 <sup>a</sup>	96,2	93,45 ± 0,21 <sup>a</sup>	95
<b>Teneurs (g/100 g de matière sèche)</b>						
Azote total	13,41 ± 0,21	13,44	14,55 ± 0,32	15	13,12 ± 0,65	12,40
Azote non protéique	0,02 ± 0	-	0,29 ± 0,02	1,1	0,080 ± 0,002	0,87
Matière azotée protéique *	83,69 ± 0,84 <sup>a</sup>	84	90,98 ± 0,22 <sup>b</sup>	89,1	83,16 ± 0,26 <sup>a</sup>	84,64
Matière minérale	3,35 ± 0,85 <sup>a</sup>	3	1,73 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,1	7,89 ± 0,07 <sup>c</sup>	-
Lipides	-	9	-	1,85	-	1,96
Glucides **	3,96 ± 0,08 <sup>a</sup>	0	2,45 ± 0,13 <sup>b</sup>	-	7,00 ± 0,28 <sup>c</sup>	-
Lactose	/	/	-	1,6	-	4

\* : Matière azotée protéique= (Azote total- Azote non protéique) \* k (k : facteur de conversion de l'azote : 6,25 pour les protéines de pois et 6,38 pour les protéines du lait (Maubois et al., 2016 ; Shand et al., 2007).

\*\* : Calculé par différence.

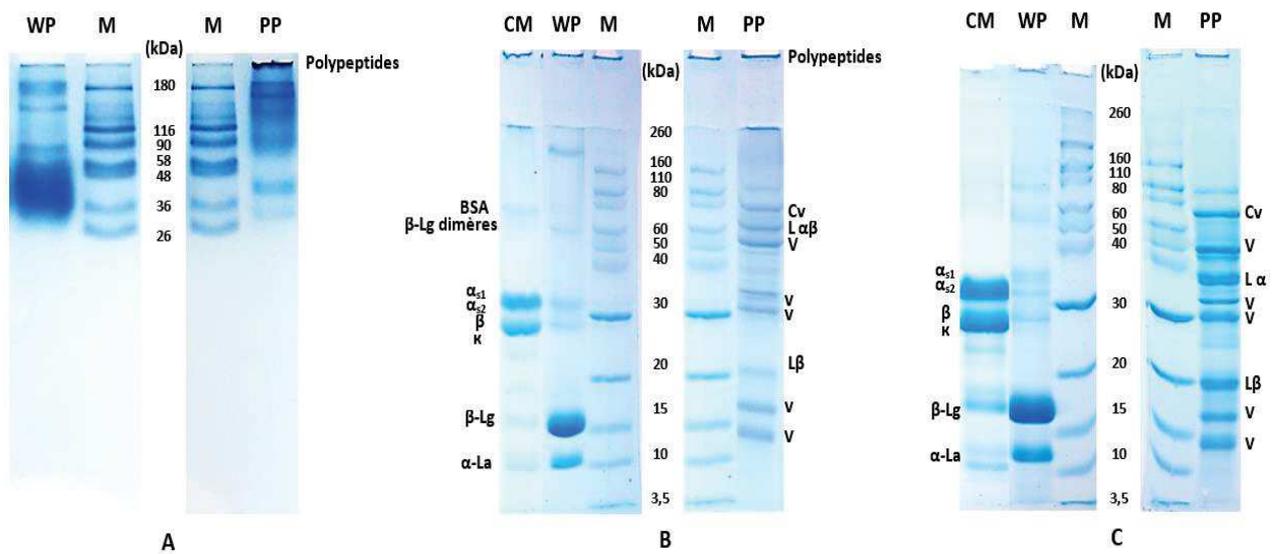
<sup>(a-c)</sup> : Les valeurs suivies de la même lettre dans une même ligne ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

Comme attendu, et conformément aux données des fournisseurs, les trois isolats commerciaux de protéines se caractérisent par une teneur en protéines supérieure à 80 % (p/p) en base sèche. La teneur en protéines de l'isolat de protéines lactosériques est significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevée que celle des deux autres isolats, en raison de la forte solubilité des protéines lactosériques et de l'optimisation du procédé d'obtention à l'échelle industrielle. La teneur en protéines de l'isolat de pois est en accord avec les teneurs obtenues en utilisant le même procédé d'extraction (précipitation isoélectrique) dans différentes études (Can Karaca et al., 2011, Bajaj et al., 2015). La teneur en matières minérales de l'isolat de phosphocaséines natives (PCN) est significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevée que celle de l'isolat de protéines de pois et de l'isolat de protéines lactosériques du fait de la présence du

calcium et du phosphate qui jouent un rôle primordial dans la stabilisation de la structure colloïdale des micelles de caséines. Par ailleurs, la teneur élevée en lipides pour l'isolat de protéines de pois par rapport à WPI et PCN. La teneur en lipides (9 g/100 g) est relativement élevée et pourrait être un facteur limitant pour la solubilité et la capacité de rétention en eau des dispersions protéiques de pois, les lipides pouvant interagir avec les groupements apolaires des acides aminés et favoriser les interactions protéines-lipides au détriment des interactions protéines-eau (Shand et al., 2007). Ces différences de composition biochimique pourraient impacter certaines propriétés fonctionnelles de ces protéines dans la suite de ce travail.

### III.1.1.2. Profils PAGE des isolats protéiques

Les profils électrophorétiques des trois isolats protéiques en conditions natives, en conditions dénaturantes non réductrices, et en conditions dénaturantes et réductrices sont présentés dans la **figure III.2**.



**Figure III.2.** Profils électrophorétiques en conditions natives (A : native-PAGE 4-10 %), dénaturantes (B : SDS-PAGE 4-12 %) et dénaturantes et réductrices (C : SDS+Msh-PAGE 4-12 %) des isolats de protéines de pois (PP), de protéines lactosériques (WP) et de phosphocaséines natives (PCN).

M : marqueurs d'électrophorèses (kDa) (Native : marqueur VWR ; SDS : Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard, LC5800, Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis). BSA : albumine de sérum bovin,  $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  : caséines ;  $\beta$ -Lg :  $\beta$ -lactoglobuline ;  $\alpha$ -La :  $\alpha$ -lactalbumine ; Cv : conviciline ;  $L\alpha\beta$  : légumine,  $L\alpha$  et  $L\beta$  : polypeptides acides et basiques de la légumine, V : viciline.

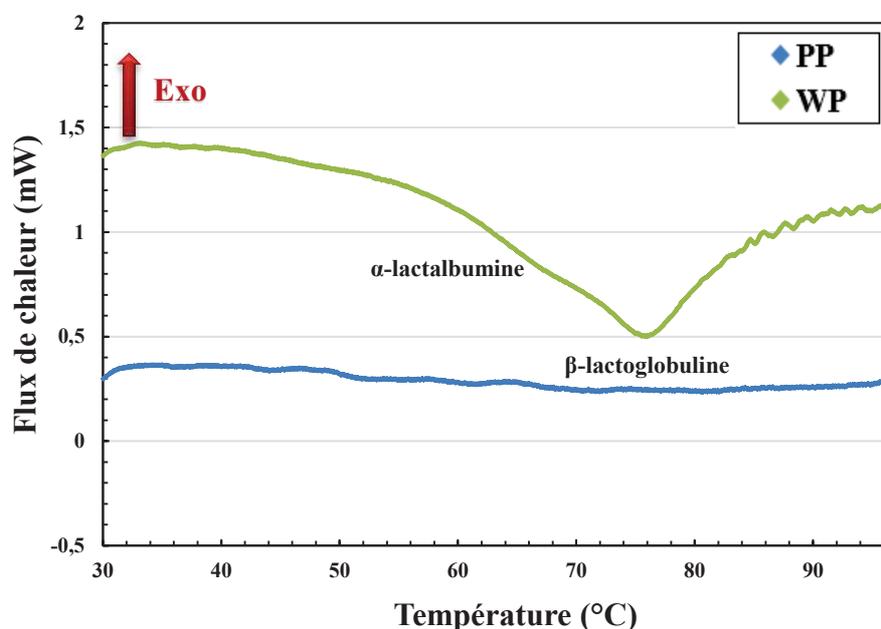
Les profils électrophorétiques en conditions natives de protéines de pois (PP) et de protéines lactosériques (WP) indiquent la présence de bandes dans les puits du gel correspondant à des agrégats de protéines de haut poids moléculaire ( $M_w > 180$  kDa). Pour des protéines de pois issues d'un isolat commercial (S85F, pareil à l'isolat étudié), la présence à l'état natif d'agrégats de très haut poids moléculaire ( $\sim 2700$  kDa) a été rapportée par **Kornet et al. (2021a)**. Plusieurs travaux ont indiqué que ces agrégats natifs se forment généralement lors du procédé d'extraction et de séparation des protéines à cause de l'application de fortes températures (**Lam et al., 2018 ; Johansson et al., 2021**). De plus, les fractions constitutives de protéines de pois correspondant aux hexamères de légumine (360 kDa), aux tétramères de convicine (290 kDa) et aux trimères de viciline (150 kDa) peuvent contribuer à augmenter l'intensité de la bande d'électrophorèse dans le puits de gel. D'autre part, le profil d'électrophorèse en conditions dénaturantes des protéines de pois (PP) a révélé la présence des bandes électrophorétiques correspondant aux polypeptides qui constituent les fractions de légumine ( $\sim 60$  kDa), de viciline ( $\sim 14, 17, 30, 33, 50$  kDa) et de convicine ( $\sim 72$  kDa). Cependant, il a été constaté une absence des polypeptides constitutifs des albumines de pois dans le profil d'électrophorèse. Ceci a été attribué à leurs fortes solubilités grâce à leur propriété hydrophile lors de l'étape de précipitation isoélectrique facilitant ainsi leur séparation (**Kornet et al., 2021a**). En outre, les conditions dénaturantes ont confirmé que les agrégats natifs de protéines de pois étaient formés par des interactions non-covalentes entre les différentes fractions de protéines car ces dernières se dissocient en présence de SDS. De plus, les conditions réductrices ont révélé la présence de la sous-unité  $L\alpha$  acide de la légumine à la bande de (38 - 40 kDa) et la  $L\beta$  basique (19-22 kDa). Ces sous-unités sont liées par un pont disulfure pour former la légumine  $L\alpha\beta$  (60 kDa). Les mêmes profils d'électrophorèse ont été rapportés dans la littérature pour des protéines issus d'isolats commerciaux de pois (**Jiang et al., 2017 ; Kornet et al., 2021a**).

Pour les protéines lactosériques (WP), les trois bandes majeures à 14, 18, 66 et  $> 160$  kDa en conditions dénaturantes et non réductrices correspondent respectivement aux sous-unités de l' $\alpha$ -lactalbumine, de la  $\beta$ -lactoglobuline, de BSA et de polypeptides. Des traces de caséines sont également présentes dans la composition des WP. En conditions réductrices, et en plus des sous-unités retrouvées en conditions dénaturantes, des traces de bandes sont présentes correspondant à quelques fractions suite à la dissociation des polypeptides (dimères de  $\beta$ -Lg, immunoglobulines...).

Le profil électrophorétique des PCN en conditions dénaturantes est caractérisé par la présence des bandes majeures à 23, 25, 24 et 19 kDa qui correspondent respectivement à l' $\alpha_{s1}$ , l' $\alpha_{s2}$ , la  $\beta$  et la  $\kappa$ -caséine. Des traces de protéines lactosériques sont aussi présentes dans la composition des PCNs. Il a été rapporté l'existence d'une quantité de 7 à 8 % de fractions de protéines lactosériques dans la poudre de PCN (Bahri et al., 2018). En conditions réductrices, les bandes de protéines lactosériques sont plus prononcées. Cela peut être attribué à l'interaction de ces dernières *via* des liaisons covalentes avec les caséines suite à l'application de procédés thermiques lors de l'étape de lyophilisation.

### III.1.1.3. Propriétés thermodynamiques des isolats protéiques

Les analyses par microcalorimétrie différentielle à balayage (DSC) ont été réalisées afin de déterminer le taux de dénaturation des protéines des isolats de PPI et de WPI lors de leur préparation à l'échelle industrielle. De plus, ces mesures ont permis de déterminer les températures de dénaturation expérimentales des différentes protéines présentes dans ces deux isolats après dispersion en milieu aqueux afin d'établir le protocole de traitement thermique qui permettra de générer des agrégats. Les thermogrammes des dispersions de protéines PP et WP sont présentés dans la **figure III.3**.



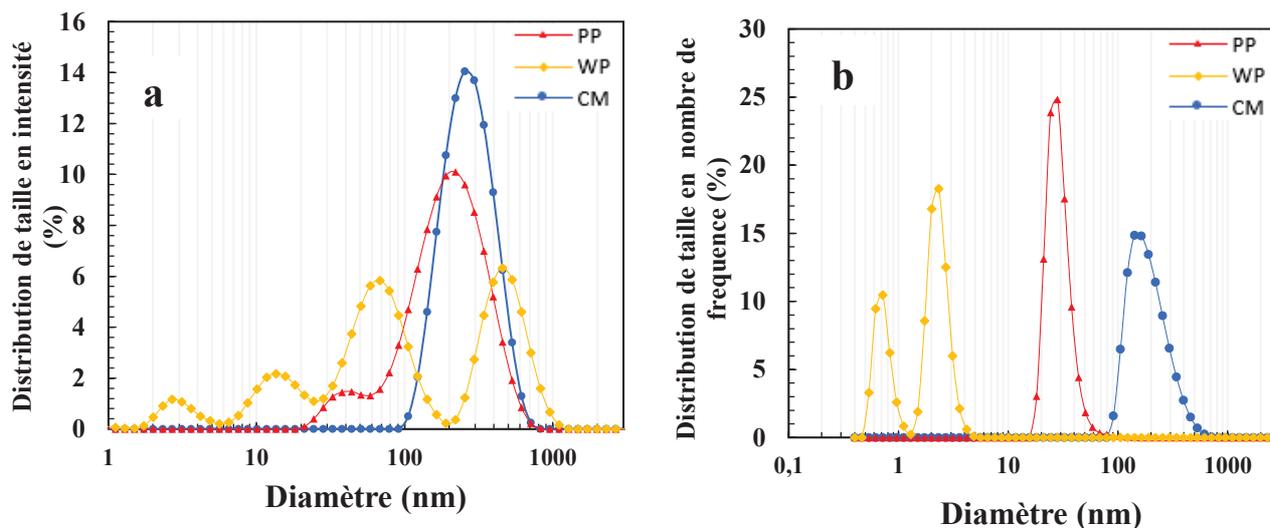
**Figure III.3.** Thermogrammes de la dispersion de protéines de pois solubles (PP, 1,67 % (p/p)) et de la dispersion de protéines lactosériques (WP, 3 % (p/p)) préparées dans l'eau ultrapure (pH 6,7). Chauffage à 1°C/min.

Aucun pic endo- ou exo-thermique n'a été observé pour la dispersion de protéines solubles de pois aux différentes concentrations étudiées (indiquer ici ces différentes concentrations) ce qui témoigne d'une absence de changement de conformation suite au traitement thermique appliqué. Ce résultat conforte les observations faites à partir du profil électrophorétique en conditions natives de l'isolat de protéines de pois confirmant la présence d'agrégats dits natifs. Des résultats similaires ont été rapportés par **Johansson et al. (2021)** et **Kornet et al. (2021a)** pour des protéines de pois issues d'un même isolat commercial (PPI, S85F, Nutralys). Ces auteurs ont attribué la dénaturation thermique des protéines de pois aux conditions brutales du procédé d'extraction. De mêmes interprétations ont été signalées par **Shand et al. (2007)**. Concernant la dispersion de protéines lactosériques, l'épaule à 62 °C et le pic endothermique dominant centré à 75,7 °C correspondent respectivement aux températures de dénaturation de la  $\beta$ -lactoglobuline et de l' $\alpha$ -lactalbumine. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **De la Fuente et al. (2002)** et **Fitzsimons et al. (2007)**. Il a été vérifié que cette dénaturation des protéines lactosériques était irréversible en réalisant un second cycle de chauffage de la dispersion de WP.

#### **III.1.1.4. Détermination de la distribution de taille des particules des dispersions protéiques**

La détermination de la taille des particules de dispersions de protéines est nécessaire et complémentaire dans le sens où ce paramètre peut apporter des informations sur la configuration et l'assemblage des particules de protéines à l'état natif et donc donner une idée préalable sur la composition en fractions de protéines ainsi que leur pré- ou non-association pour former des agrégats.

La **figure III.4** présente les courbes de distribution de taille des particules en intensité (a) et en nombre (b) des dispersions de protéines de pois solubles, de protéines lactosériques et de micelles de caséine mesurées par diffusion dynamique de la lumière.



**Figure III.4.** Distribution de la taille des dispersions de protéines solubles de pois (PP), de protéines lactosériques (WP) dans l'eau et de micelles de caséines (CM) dans le SMUF à pH 6,7. Les mesures de tailles ont été réalisées à 25 °C.

La courbe de distribution de taille en intensité de la dispersion de protéines de pois est bimodale et polydisperse avec des particules dont le diamètre est compris entre 23 nm à 716 nm. La première population se caractérise par un pic maximum à 34 nm tandis que la seconde population a un pic maximum à 220. La courbe de distribution de taille en nombre est monomodale, caractérisée par un pic maximum à 26 nm. Une des études a montré que les oligomères globulaires natifs de pois 7S et 11S ont une taille d'environ 15 nm (**Chihhi et al., 2016**). La taille plus élevée des particules de la dispersion des protéines de pois préparée dans cette étude et les dimensions retrouvées renseignent sur la nature des objets. Ces derniers correspondent probablement aux agrégats natifs de protéines de pois issus de leur préparation industrielle comme décrit précédemment (**Fuhrmeister & Meuser, 2003**) (**Figure III.3**).

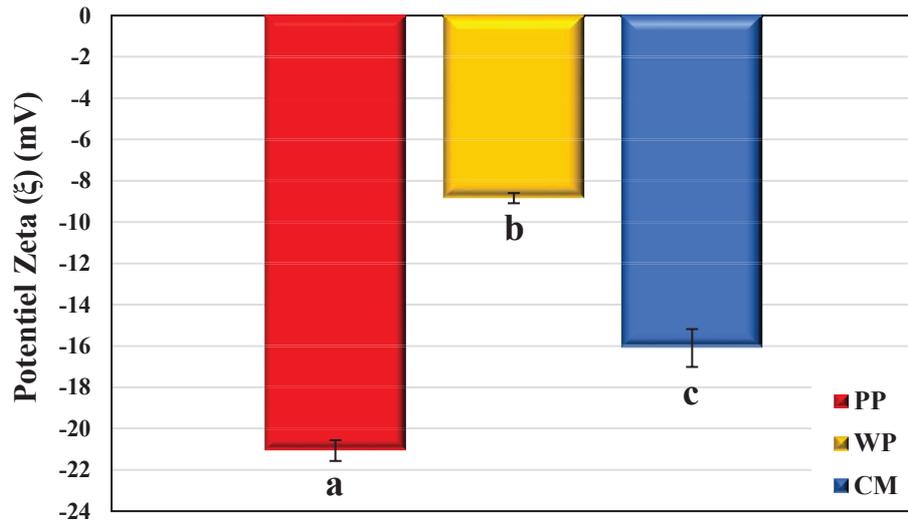
Pour la dispersion de protéines lactosériques, la courbe de distribution de taille en intensité est polydisperse et multimodale avec un premier maximum à 3 nm correspondant à des protéines globulaires individuelles telles que l' $\alpha$ -La et la  $\beta$ -Lg, un second pic maximum à 14 nm correspondant à la forme dimérique de la  $\beta$ -lactoglobuline, un troisième pic à 73 nm qui peut être associé à des assemblages de BSA et d'immunoglobulines et un quatrième pic correspondant fort probablement à des agrégats de haut poids moléculaire comme observé sur le profil électrophorétique en conditions natives de l'isolat de WP (**Figure III.2**). En revanche, la distribution de taille de la dispersion de protéines lactosériques en nombre est bimodale avec un premier pic maximum à 0,7 nm et un second pic à 2 nm indiquant que les protéines

globulaires de faible poids moléculaire telles que l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline sont principalement sous leur forme individuelle ou dimérique. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Blayo et al. (2016)**.

D'autre part, la courbe de distribution de taille en intensité et en nombre de la dispersion de phosphocaséines natives est monomodale, caractérisée par une population polydisperse allant de 106 à 664 nm avec une taille moyenne de 285 nm en intensité. La courbe de distribution de taille en nombre quant à elle montre une distribution monomodale de taille moyenne de 200 nm. Les mêmes tailles de particules de micelles de caséines ont été rapportées dans la littérature (**McSweeney & Fox, 2009**).

#### III.1.1.5. Analyse de la charge de surface des protéines

Le potentiel Zêta ( $\zeta$ ) est un paramètre qui reflète les interactions électrostatiques entre les molécules, il dépend du pH et de la force ionique du milieu de dispersion. Les valeurs de la charge de surface des particules des dispersions de protéines solubles de pois, de protéines lactosériques et de micelles de caséines sont présentées sur la **figure III.5**. Le potentiel Zêta pour les trois dispersions en valeur absolue est supérieur à 8 indiquant que le pH de 6,7 choisi permet de produire un environnement dont la répulsion électrostatique est prononcée. De plus, la charge globale négative des particules confirme que le pH des dispersions (pH 6,7) est supérieur au pH isoélectrique des protéines (pH > pI). Ces valeurs sont en accord avec les résultats rapportés dans la littérature pour les micelles de caséines à pH 6,7, qui sont, en valeur absolue, de l'ordre de 15 à 20 mV (**Wade et al., 1996 ; Walstra, 1990**). Des valeurs similaires avec une charge de surface de -21 mV ont été rapportées par **Can Karaca et al. (2011)** et **Stone et al. (2015b)** pour des protéines de pois issues d'isolats préparés soit par une extraction alcaline/précipitation ou soit par une extraction saline. Pour les protéines lactosériques, la valeur de la charge de surface retrouvée est plus faible en valeur absolue par rapport à celle rapportée par **Lajnaf (2017)** de -23 mV au même pH. Cet écart peut être attribué à la différence de composition en minéraux des deux isolats de protéines étudiés.



**Figure III.5.** Potentiel Zêta ( $\xi$ ) des dispersions de protéines solubles de pois, de protéines lactosériques dans l'eau et de micelles de caséines dans du SMUF à pH 6,7.

a, b, c : Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les échantillons.

## Synthèse

Avant d'entamer l'optimisation de la solubilité des protéines de pois, un rappel des principales informations recueillies lors de cette caractérisation détaillée des agrégats natifs de protéines de pois est proposé :

L'isolat commercial a révélé une bonne teneur en protéines (> 80 %). Des valeurs similaires ont été rapportées dans plusieurs résultats de caractérisation d'isolats commerciaux préparés par la même méthode d'extraction (extraction alcaline/précipitation isoélectrique). De plus, la présence d'une teneur en minéraux (~ 3 %) prévoit à son tour la présence d'une force ionique, l'impact de cette dernière sur la solubilité des protéines de pois va être évaluée dans les paragraphes suivants. Cependant, la poudre commerciale a révélé la présence d'une quantité de lipides qui peuvent altérer la solubilité des protéines par la suite.

D'autre part, et comme leur nom l'indique, les protéines de pois sont pré-dénaturées et existent sous forme d'agrégats natifs de plusieurs kDa de poids moléculaire liés par des interactions non-covalentes pour former des particules de ~ 30 nm. Ces agrégats sont composés uniquement de globulines (légumine, viciline et convicine) et possèdent une charge de surface négative à pH 6,7 (~ -21 mV). Enfin, la taille, le poids moléculaire, la charge, la nature des interactions et la composition de ces agrégats peuvent justifier le choix des paramètres de solubilité et consolider les interprétations des différents phénomènes qui y sont associés.

### III.1.2. Optimisation de la solubilité des protéines de l'isolat de pois

L'intérêt techno-fonctionnel d'une protéine dans une matrice alimentaire est très souvent conditionné par sa solubilité dans un dispersant dans le sens où cette propriété fonctionnelle impacte fortement d'autres propriétés telles que les propriétés moussantes, émulsifiantes, de gélification et de rétention d'eau (**Barac et al., 2010 ; Boghawaththa et al., 2019**). La solubilité d'une protéine dispersée est définie comme un état d'équilibre entre les interactions protéines-protéines et solvant-protéines (**Damodaran, 1994**), ces interactions étant influencées par des facteurs intrinsèques tels que les propriétés hydrophobes, hydrophiles et la conformation des protéines, ainsi que par des facteurs extrinsèques liés au milieu environnant tels que le pH, la force ionique et la nature du milieu de dispersion (**Cheftel et al., 1982 ; McCarthy et al., 2016**). En ce qui concerne les protéines végétales, dans les mêmes conditions expérimentales, elles sont dans leur grande majorité caractérisées par une faible solubilité par rapport aux protéines d'origine animale en raison d'une part de leur structure quaternaire souvent complexe et d'autre part des procédés d'extraction utilisés pour produire des isolats commerciaux de ces protéines qui impactent fortement leurs propriétés physico-chimiques et biochimiques (**Amagliani & Schmitt, 2017**).

Ainsi, en ce qui concerne les protéines végétales et spécialement les protéines de pois issues d'isolats commerciaux, leur solubilité est particulièrement influencée par des paramètres que l'utilisateur ne maîtrise pas tels que le type de cultivar dont dépend le rapport entre viciline et légumine, la nature et la quantité de composés phénoliques présents dans la graine de pois qui réduisent considérablement la solubilité des protéines, ou bien des étapes du procédé d'extraction (précipitation acide ou alcaline, type de séchage) (**Reddy, 1985**). Par exemple, et dans le cas d'une extraction par voie humide qui est le cas pour notre isolat commercial, la protéine de pois peut avoir une solubilité plus faible en raison de la dénaturation induite par la chaleur pendant le séchage par atomisation (**Chao & Aluko, 2018**). Il est donc important de déterminer les conditions optimales de dispersion d'un isolat de protéines de pois afin de maximiser la quantité de protéines solubles qui pourront être ensuite mises en œuvre dans des matrices alimentaires fortement diluées. Cette optimisation a donc été réalisée pour l'isolat commercial de protéines de pois utilisé dans cette étude.

Il serait pertinent de préciser ici que comme cela a été mis en évidence dans la partie précédente, les protéines de cet isolat ne sont pas forcément individualisées et sont en particulier

présentes sous forme d'assemblage. Il s'agit donc d'optimiser la solubilité de ces agrégats natifs.

Le taux de solubilité et la quantité de protéines solubles par rapport à la quantité totale de protéines présentes dans la dispersion initiale, ont été optimisés en fonction de différents paramètres physico-chimiques à savoir :

- le pH de la dispersion ;
- la concentration en sel NaCl de la dispersion ;
- la nature du dispersant ;
- la concentration initiale en protéines de la dispersion ;
- la vitesse de centrifugation lors de la séparation des protéines solubles de la fraction des insolubles.

Le **tableau III.3** présente les différents paramètres d'optimisation utilisés et les combinaisons de ces paramètres appliquées dans le but de déterminer les conditions à appliquer pour obtenir une solubilité maximale. Afin de déterminer l'influence de chaque paramètre sur la solubilité des protéines de pois (colonnes du tableau), il est nécessaire de fixer les valeurs des autres facteurs (lignes du tableau).

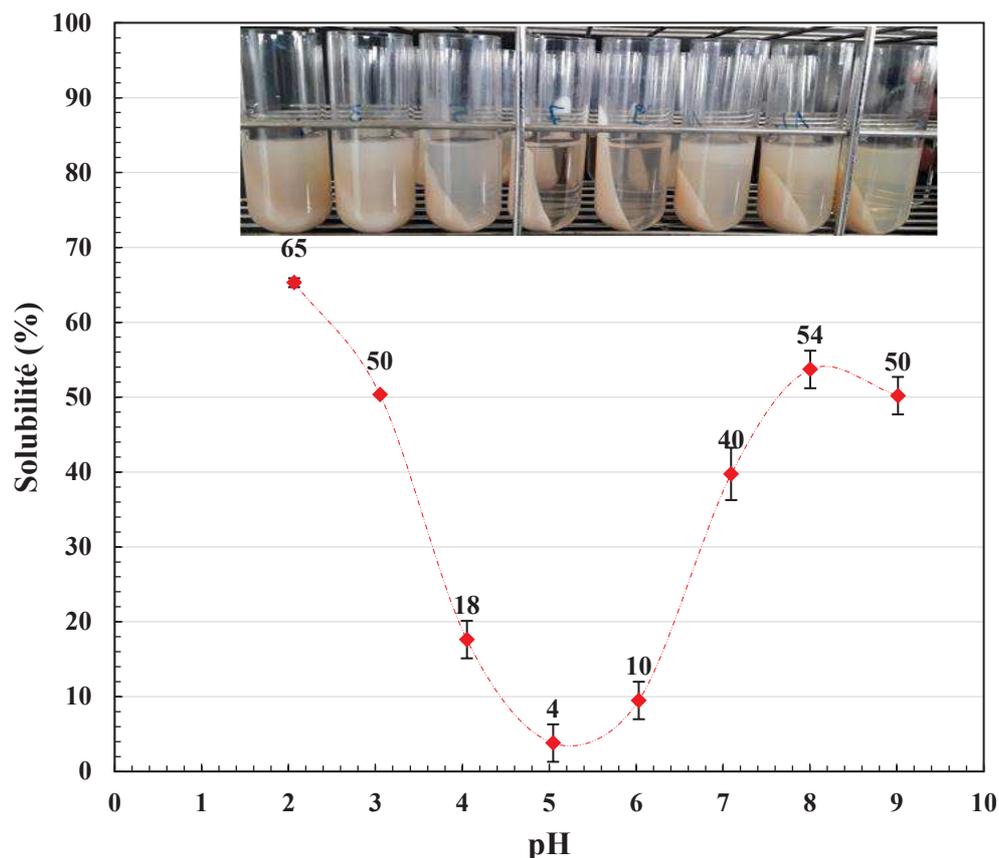
**Tableau III.3.** Récapitulatif des paramètres d'optimisation étudiés pour maximiser la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial S85F.

Paramètres fixés / Paramètres variables		Solubilité des protéines de pois en fonction de :				
		pH	Concentration en sel NaCl	Milieu de dispersion	[Protéique]	Vitesse de centrifugation
pH de la dispersion	2	+				
	3	+				
	4	+				
	5	+				
	6	+				
	6,7			x	x	x
	7	+	x	x		
	8	+	x	x		
	9	+				
milieu de dispersion	Eau ultrapure	x	x	+	x	x
	Tampon phosphate (10 mM)			+		
	SMUF			+		
Concentration en sel (mM de NaCl)	0	x	+	x	x	x
	5			x		
	10		+			
	20		+			
	50		+			
	100		+			
Concentration de la dispersion (% (p/p))	3				+	
	4	x	x	x	+	
	5				+	x
	6				+	
	7				+	
	8				+	
	12				+	
Vitesse de centrifugation (× g)	12 000					+
	149 000					+

+ : paramètre de l'échantillon étudié, + : solubilité maximale, x : paramètre fixé.

### III.1.2.1. Etude de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction du pH

La **figure III.6** montre l'évolution de la solubilité de la dispersion de protéines de pois (4 % (p/p)) dans l'eau ultrapure en fonction du pH.



**Figure III.6.** Profil de solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial S85F (4 % (p/p)) dispersées dans l'eau ultrapure en fonction du pH. Une image correspondant à la solubilité des échantillons aux différents pH est représentée sur la figure.

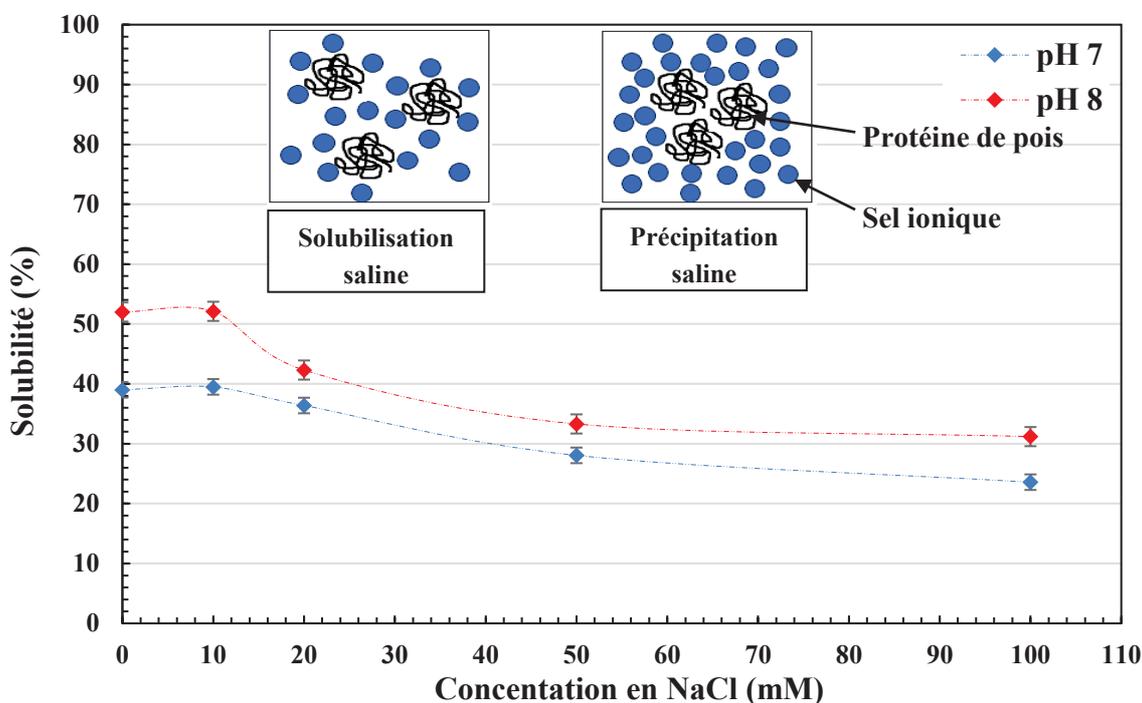
Le profil de solubilité des protéines de pois de l'isolat a une forme caractéristique en « U » avec une valeur minimale de solubilité proche de 4 qui peut être associée au pH isoélectrique de ce mélange protéique. La solubilité des protéines de pois est considérée comme minimale pour un pH compris entre 4,5 et 5,8 (Boye et al., 2010). Certains travaux ont rapporté une solubilité dans l'eau inférieure à 11 % à pH 4,5 pour 12 isolats obtenus par une extraction alcaline et une précipitation isoélectrique à partir de farines de différents cultivars de pois (Arteaga et al., 2021).

D'autre part, ce pH isoélectrique dépend de la composition et de la teneur en fractions de ces protéines : il varie de 4,8 à 4,9 pour la légumine, de 4,6 à 4,8 pour la viciline, de 4,8 à 5,2 pour la convicine et de 5,2 pour les albumines (cf tableau I.1). La solubilité des protéines de pois de l'isolat augmente progressivement au-dessus et en dessous de ce pH et atteint des valeurs maximales pour des pH fortement alcalins (pH 8) et acides (pH 2) en accord avec les précédents travaux de Djoullah (2016) et Ladjal-Ettoumi et al. (2016). Cependant, même à

ces pH « extrêmes », la solubilité des protéines de pois de l'isolat ne dépasse pas 65 %. Cette faible solubilité peut être liée à la procédure d'extraction des protéines utilisée qui peuvent être partiellement ou totalement dénaturées. **Shand et al. (2007)** ont montré que le taux de solubilité de la protéine de pois native produite par une extraction alcaline et une précipitation isoélectrique atteint 60 % dans l'eau à une force ionique nulle et à pH 7, alors qu'elle n'excède pas les 20 % des protéines de pois issues d'un isolat commercial (Propulse). Le taux de solubilité obtenu (40 % à pH 7) correspond également aux valeurs rapportées par **Adebiyi et Aluko, (2011)** et par **Pelgrom et al. (2015)** et est nettement supérieur au taux rapporté par **Jiang et al. (2017)** de 8 % pour un isolat commercial de protéines de pois (S85F, Nutralys, états unis).

### III.1.2.2. Etude de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction de la concentration en sel NaCl

La solubilité de la dispersion protéines de pois (4 % (p/p)) dans l'eau (pH 7 et pH 8) en fonction de la concentration en sel NaCl est présentée dans la **figure III.7**. Ces deux pH ont été choisis en se basant sur une meilleure solubilité des protéines de pois à ces valeurs, comme discuté dans la **section III.1.2**.

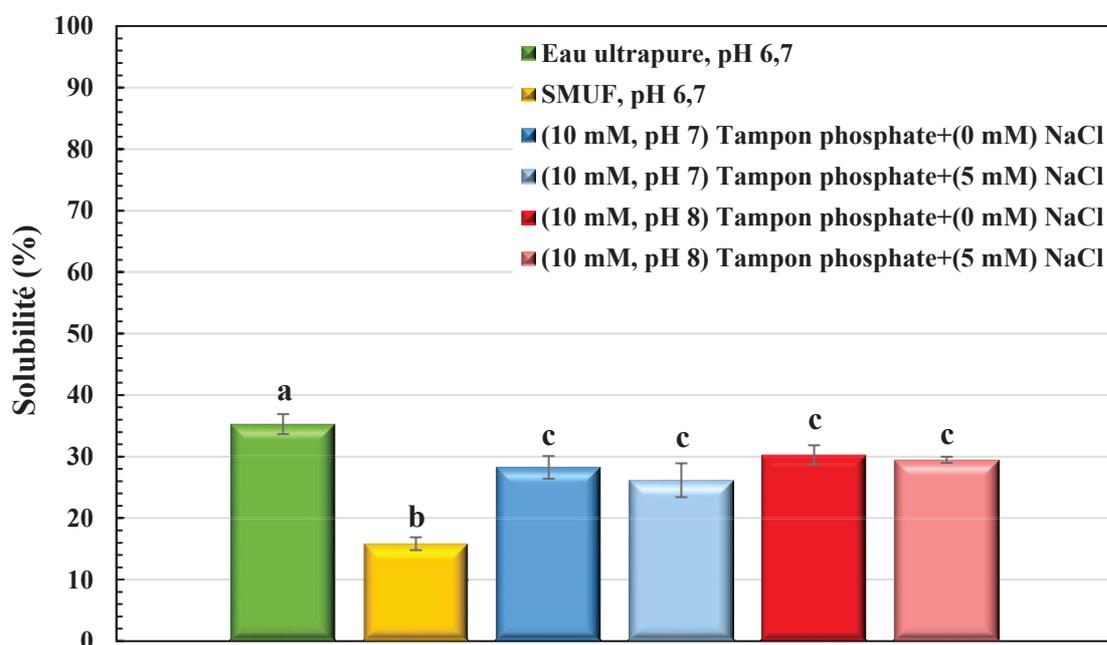


**Figure III.7.** Profil de solubilité des dispersions de protéines pois (4 % (p/p)) dans l'eau ultrapure en fonction de la concentration NaCl à pH 7 et 8.

Selon l'allure des courbes présentées dans la **figure III.7**, et pour les deux pH étudiés, la solubilité diminue avec l'augmentation de la concentration en sel dans la gamme étudiée et atteint une valeur très faible après ajout de 100 mM de NaCl. D'autre part, la solubilité est significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevée pour pH 8 par rapport au pH 7, et cela pour toutes les concentrations en sel étudiées. De plus, il a été constaté que la solubilité était maximale après ajout de 10 mM de NaCl pour les deux pH. Cependant, cette valeur de solubilité n'était pas significativement plus élevée ( $p > 0,05$ ) par rapport à la solution en absence de sel. Ce phénomène d'augmentation de la solubilité est rapporté dans la littérature comme étant l'effet de la solubilisation saline (salting-in) des protéines (**Djoullah, 2016**). Il est décrit par une interaction entre les charges du sel ionique et celles des protéines en dispersion, créant ainsi des contre-ions qui à leurs tours forment une barrière entre les molécules de protéines et empêchant ces dernières d'interagir. Cette action favorise donc une meilleure solubilité des protéines de pois. A l'inverse, une augmentation de la concentration en sel a provoqué une baisse significative de la solubilité ( $p < 0,05$ ) causée par une précipitation saline (salting-out) des protéines (**Damodaran, 1996**). Ce phénomène contribue à réduire la charge globale nette et favorise ainsi des attractions protéines-protéines et des répulsions protéines-milieu de dispersion. Ce comportement de diminution de solubilité est aussi provoqué par masquage des charges négatives par les ions  $\text{Na}^+$  aux pH 7 et 8 (**Deng et al., 2011 ; Kinsella, 1979**). En général, la nature du sel utilisé est très importante dans le sens où il existe des sels qui interagissent et se lient directement à la protéine et peuvent avoir un effet déstabilisant tel que le sulfate d'ammonium. Par contre, d'autres types de sels maximisent la solubilité et favorisent la déshydratation des zones hydrophobes et l'hydratation des zones polaires des protéines (tels que le NaCl). Enfin, et comparé aux valeurs de solubilité des protéines de pois dans l'eau ultrapure sans ajout de sel, la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial n'a pas été améliorée par l'ajout de NaCl. Ceci est peut-être expliqué par l'existence d'une force ionique dans la dispersion initiale due à la présence d'une quantité de sels minéraux (ions monovalents et divalents) dans la composition de l'isolat commercial comme démontré dans le **tableau III.1**.

### III.1.2.3. Etude de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction du milieu de dispersion

Le **figure III.8** présente l'évolution de la solubilité de la dispersion de protéines de pois (4 % (p/p)) à différents pH (6,7 ; 7 et 8) et à des concentrations en sel (0 ou 5 mM de NaCl) en fonction de trois milieux de dispersions (l'eau, le SMUF et le tampon phosphate). Il est tout de même important de noter que les milieux de dispersions étudiés, tels que le tampon phosphate ou le SMUF, sont préparés à partir d'une dissolution dans l'eau d'une quantité de minéraux présentant différentes charges et donc représentant différentes forces ioniques. Le tampon phosphate, par exemple, a été utilisé dans de nombreuses recherches comme étant un milieu adapté pour l'ajustement du pH des dispersions de protéines de pois. D'autre part, la solubilité dans le SMUF a été étudiée afin d'évaluer l'impact d'une diversité de minéraux ainsi que de grandes forces ioniques sur le comportement des protéines de pois en solution. **Gao et al. (2010)** ont défini une valeur de la force ionique du SMUF équivalente à 69 mM. Enfin, le type d'ions et la polarité du milieu sont aussi des facteurs importants qu'il faut prendre en considération et qui peuvent affecter d'une manière significative la solubilité des protéines de pois (**Damodaran, 1996 ; Sun & Arntfield, 2012**).



**Figure III.8.** Solubilité des dispersions de protéines de pois (4 % (p/p)) en fonction de la nature du milieu de dispersion (tampon phosphate 10 mM, eau ultrapure, SMUF), de la force ionique (0 ou 5 mM de NaCl) et du pH (6,7 ; 7 et 8). a, b, c : différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les échantillons.

D'après cette figure, la solubilité des agrégats natifs de protéines de pois est maximale dans l'eau ultrapure avec une différence significative ( $p < 0,05$ ) par rapport aux autres milieux

de dispersions (une valeur de 35 % et cela même à pH 6,7, inférieur à pH 7). Par ailleurs, il a été constaté qu'il n'y a pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) entre les valeurs de solubilité dans le tampon phosphate à différents pH et en présence ou en absence de sel NaCl. De plus, la solubilité diminue après ajout de sel, phénomène attribué au masquage des charges opposées autour des protéines à cause de la présence dans le tampon phosphate d'ions de différentes charges. Enfin, la solubilité est minimale (16 %) avec une différence significative ( $p < 0,05$ ) par rapport aux autres milieux pour la dispersion de protéines dans le SMUF. Etant donné la force ionique élevée de ce tampon, l'effet du salting-out est probablement responsable de cette faible solubilité. De plus, les répulsions électrostatiques entre les protéines dans un environnement hautement chargé favorisent la formation d'agrégats insolubles comme expliqué dans la **section III.1.1.2. Zhang & Cremer (2006)** ont rapporté que trois mécanismes résultent des effets des sels sur la structure des protéines : la neutralisation des charges, les interactions directes entre ions et macromolécules et l'effet de blindage électrostatique. D'autre part, certains auteurs ont indiqué que la concentration en sels joue un double rôle dans la dispersion ; à faibles concentrations, les interactions électrostatiques sont principalement influencées grâce à l'interaction des ions de sels avec les groupements chargés des protéines, tandis qu'à des concentrations élevées, leur influence peut perturber les interactions hydrophobes des protéines (**Sun & Arntfield, 2012**). Des conclusions différentes ont été rapporté par **Melander & Horváth (1977)**. Ces auteurs ont constaté que la déstabilisation des interactions hydrophobes des protéines n'est pas influencée par la concentration, mais par la tension superficielle molaire déterminée par la nature de chaque sel. Ces résultats amènent à conclure que l'eau, en absence de sels, est le meilleur milieu de dispersion testé pour une solubilité maximale pour ce type de protéines d'isolat commercial de pois.

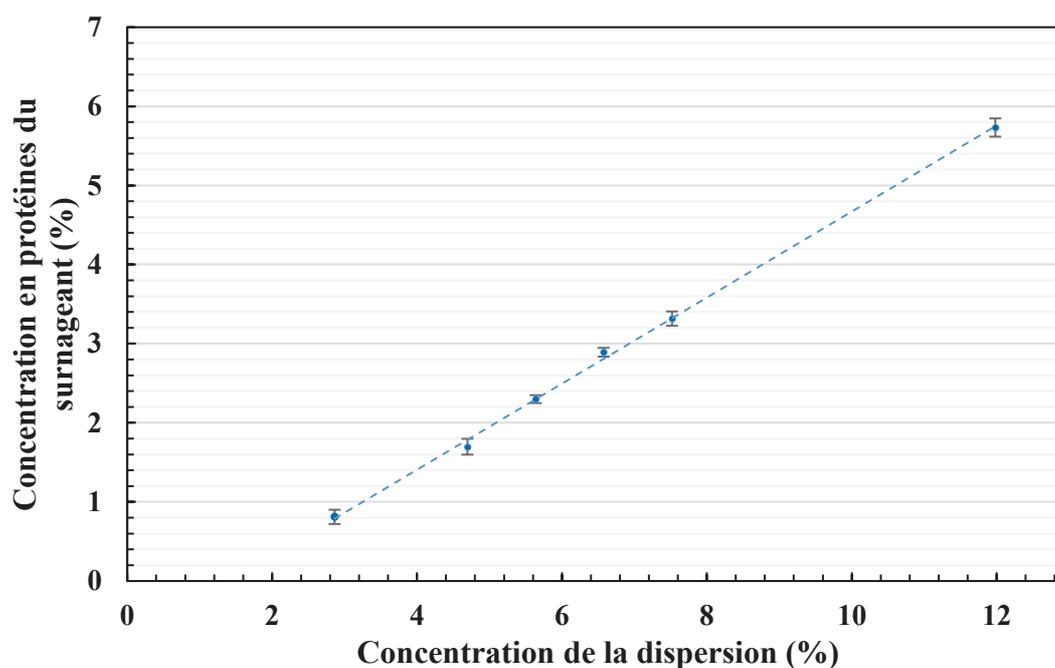
#### **III.1.2.4. Etude de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction de la concentration initiale en protéines**

La solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction de la concentration initiale de protéines a été évaluée en faisant varier la teneur en protéines initiale de 3 à 12 % (p/p) (dispersion dans l'eau UP avec une vitesse de centrifugation de 12 000 x g). Cette concentration maximale en protéines a été difficile à disperser à cause de la saturation de la solution par la présence d'une quantité élevée de poudre formant une dispersion un peu visqueuse.

Comme le montre la **figure III.9**, la teneur en protéines solubles augmente linéairement avec la concentration initiale en protéines de la dispersion selon l'équation (9) :

$$C_{\text{surnaquant}} = 0,5438 * C_{\text{dispersion}} - 0,7680 \quad (R^2 = 0,9989) \quad (9)$$

Il est à noter que cette équation est valable uniquement dans la gamme de concentrations étudiées. Par conséquent, pour maximiser la teneur en protéines solubles, une concentration de départ plus élevée est souhaitée. De plus, le coefficient directeur de cette équation indique que la solubilité des protéines de pois est toujours inférieure à 54 %.



**Figure III.9.** Fonction linéaire de la concentration des protéines solubles de pois dans l'eau ultrapure en fonction des concentrations de dispersions natives à pH 6,7.

### III.1.2.5. Etude de la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial en fonction de la vitesse de centrifugation

L'objectif de l'étape de centrifugation dans la préparation d'une dispersion de protéines solubles est de séparer tous les composés et protéines insolubles des protéines solubles. Sachant que lors d'une centrifugation, la vitesse de sédimentation d'une particule dépend de sa masse, de sa forme, de son volume et de la densité du milieu de dispersion, plusieurs forces peuvent accélérer ou ralentir cette vitesse, à savoir la gravité, la poussée d'Archimède, la force centrifuge et la force d'agitation moléculaire. Dans notre travail les vitesses de centrifugation ont été choisies selon ces critères :

- La vitesse de centrifugation à 12 000 x g permet de sédimenter les gros agrégats ainsi que la majorité des composés insolubles tels que les traces de fibres, l'azote insoluble,

les lectines, et les lipoxygénases... D'autre part, et selon la littérature, cette vitesse permet de récupérer la totalité des fractions solubles de globulines et d'albumines des protéines de pois (Chihi et al., 2016).

- L'ultracentrifugation à 149 000 x g permet de précipiter la totalité des composés insolubles ainsi qu'une grande partie des fractions solubles avec un grand coefficient de sédimentation (Svedberg (S)), telles que les fractions 11 S et 7S des protéines de pois. Plus la valeur de ce coefficient est élevée, plus la vitesse de sédimentation est importante.

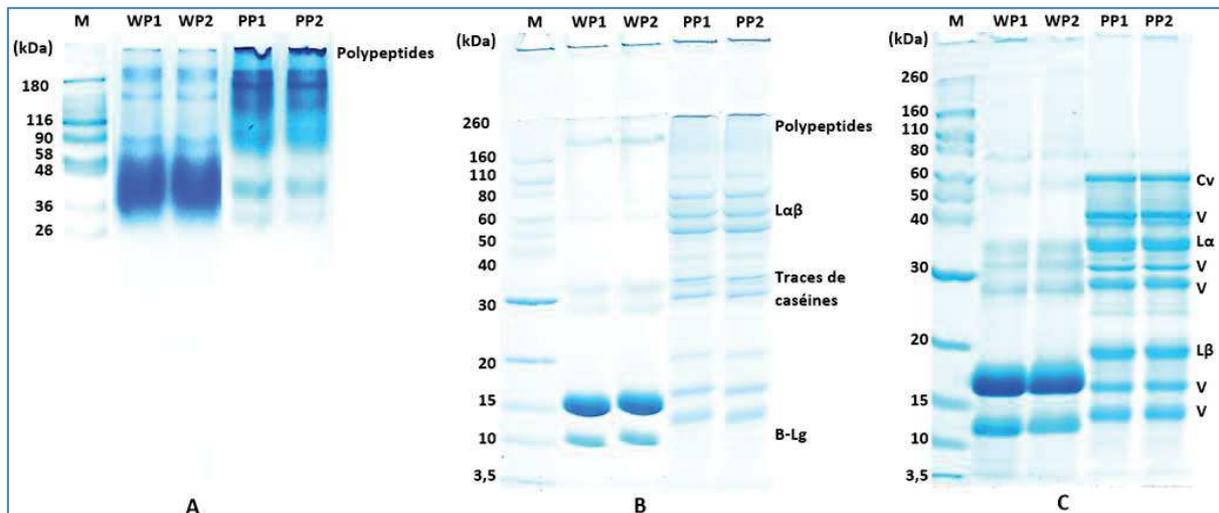
Afin d'évaluer l'influence de la vitesse de centrifugation sur la solubilité des protéines de l'isolat commercial de pois, ces dernières ont été dispersées à une concentration de 5 % (p/p) dans l'eau ultrapure et à pH 6,7. Deux vitesses de centrifugation ont été évaluées à savoir 12 000 et 149 000 x g pendant 20 min à 20 °C. Ensuite, et dans le but de positionner cette propriété fonctionnelle par rapport à une autre protéine globulaire, la solubilité des agrégats natifs de protéines de pois a été comparée à celle des protéines lactosériques à la concentration de 3 % (p/p) dans les mêmes conditions expérimentales. La solubilité de ces protéines est présentée dans le **tableau III.4**.

**Tableau III.4.** Solubilité de dispersion de protéines de pois (5 %, p/p) dans l'eau ultrapure à pH 6,7 en comparaison avec celle de la dispersion de protéines lactosériques (3 %, p/p) dans les mêmes conditions en fonction de la vitesse de centrifugation.

		Isolat commercial de protéines de pois		Isolat commercial de protéines lactosériques	
		Vitesse de centrifugation (× g)		Vitesse de centrifugation (× g)	
		12 000	149 000	12 000	149 000
Concentration en protéines (%)	<b>Dispersion native</b>	5,0 ± 0,1		3,0 ± 0,1	
	<b>Protéines solubles</b>	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,9 ± 0,0	2,8 ± 0,1
<b>Solubilité (%)</b>		33 ± 0 <sup>a</sup>	26 ± 0 <sup>b</sup>	98 ± 0 <sup>c</sup>	93 ± 0 <sup>d</sup>

<sup>a, b, c, d</sup> : différentes lettres indiquent des différences significatives de solubilité dans une même ligne.

La sédimentation est influencée lors de la centrifugation par la densité et la taille des particules de protéines en suspension. Comme attendu, la solubilité des deux types de protéines étudiées est significativement ( $p < 0,05$ ) plus faible pour une vitesse de centrifugation de 149 000 x g par rapport à une vitesse de centrifugation de 12 000 x g. D'un point de vue qualitatif, la composition en protéines présentes dans les surnageants n'a pas été impactée par l'augmentation de la vitesse de centrifugation. Les électrophorèses montrant les compositions en fractions des deux protéines aux deux vitesses de centrifugation sont présentées dans la **figure III.10**.



**Figure III.10.** Profils électrophorétiques en conditions natives (A : native-PAGE 4-10 %), dénaturants (B : SDS-PAGE 4-12 %) et dénaturants et réductrices (C : SDS+Msh-PAGE 4-12 %) des fractions solubles d'isolats de protéines de pois et de protéines lactosériques (PP1 et WP1) et (PP2 et WP2) respectivement après centrifugations à 12 000 et 149 000 x g. M : marqueurs d'électrophorèses (kDa).  $\beta$ -Lg :  $\beta$ -lactoglobuline ;  $\alpha$ -La :  $\alpha$ -lactalbumine ; Cv : conviciline ;  $La\beta$  : légumine,  $La\alpha$  et  $L\beta$  : polypeptides acides et basiques de la légumine, V : viciline.

La solubilité des protéines de pois est plus impactée par l'ultracentrifugation à 149 000 x g par rapport à celle des protéines lactosériques car le rapport des solubilités pour chaque protéine aux deux vitesses de centrifugation (solubilité 149 000/ solubilité 12 000 x g) est respectivement de 0,79 et 0,95 pour les deux protéines. Cette différence peut être justifiée par la présence des agrégats natifs de très hauts poids moléculaires et de tailles  $> 33$  nm présents dans les dispersions de protéines natives comme démontré dans la composition et la tailles des particules de ces protéines dans respectivement le profil d'électrophorèses et les distributions de tailles (**Figure III.2 et figure III.4**). De plus, les fractions présentes dans la composition des protéines de pois correspondant aux hexamères, tétramères et trimères de hauts poids

moléculaires (> 150 kDa) peuvent précipiter et sédimenter à très grande vitesse avec des coefficients de sédimentations respectifs de 11S, 7S et 7S pour les légumine, les convicilines et les vicilines.

Les paramètres influençant la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial ont donc été optimisés afin de maximiser leur solubilité pour la suite de l'étude. Les paramètres optimaux retenus sont résumés dans le **tableau III.5**. Il est tout de même important de noter qu'à pH 8, la solubilité des protéines de pois était meilleure comparée au pH 6,7. Pour la suite de l'étude, notre choix se justifie par l'utilisation de cette fraction soluble dans des mélanges avec les protéines de lait à ce pH. D'autre part, la concentration en protéines de la dispersion initiale a été sélectionnée à 5 % (p/p) pour avoir une quantité suffisante en protéines solubles après la centrifugation (> 1 % (p/p)) nécessaire pour obtenir des mélanges avec les protéines de lait aux concentrations totales et aux ratios définis dans la **section III.2**.

**Tableau III.5.** Synthèse des conditions de dispersion des protéines de pois sélectionnés afin de maximiser la solubilité des protéines de pois de l'isolat commercial

pH	Milieu de dispersion	Force ionique (mM NaCl)	Concentration de la dispersion (% (p/p))	Vitesse de centrifugation (x g)
6,7	Eau ultrapure	0	5	12 000

## Synthèse

Après avoir caractériser les trois isolats utilisés pour la suite de notre étude, les points importants à retenir sont les suivants :

- Les trois poudres commerciales contiennent une teneur élevée en protéines (> 83 %) une quantité de minéraux et de lipides conforme aux données de la littérature et des fournisseurs. Cependant, les thermogrammes obtenus par analyse enthalpique ont confirmé que les protéines de pois étaient plus ou moins dénaturées et que leur conformation a été modifiée par les traitements physico-chimiques lors du procédé d'extraction industriel. Par contre, les protéines lactosériques étaient sous leur forme native, avec une température de dénaturation identifiée à 75,7 °C.

- Il est à noter qu'à l'échelle industrielle, les pois sont nettoyés et broyés pour en retirer les coques. Ensuite, les fibres et l'amidon sont éliminés par ajout de l'eau. Puis, une séparation des protéines par précipitation isoélectrique est réalisée et les protéines de pois solubles dans l'eau (albumines) sont éliminées, ce qui a été constaté lors de la caractérisation des profils d'électrophorèses (**section III.1.1.2**). Après, et dans le but de réduire l'humidité et la contamination microbienne, un traitement thermique est effectué, suivi d'un séchage par pulvérisation pour obtenir la poudre de l'isolat de protéines de pois. Ces procédés thermiques ont probablement contribué à changer la conformation et la structure des protéines natives et cela a été identifié par l'absence de température de dénaturation thermique de ces protéines.

- D'autre part, la composition biochimique des protéines de pois a révélé la présence des fractions de globulines (vicilines, convicilines et légumines). La solubilité de ces fractions associées dans la dispersion a été optimale dans l'eau ultrapure, la force ionique n'était cependant pas nulle du fait de la présence de minéraux dans l'isolat de pois (3,4 g/100g de matière sèche, cf **tableau III.1**). Enfin, les dispersions mères ont été préparées à pH 6,7 (pour être dans les mêmes conditions opératoires que celles des dispersions de micelles de caséines) et la suite de l'étude a été réalisée avec la fraction soluble des protéines de pois obtenue après centrifugation à 12000 x g afin d'éliminer toutes les matières insolubles.

### **III.2. Influence des conditions du traitement thermique sur la formation d'interactions micelles de caséines-protéines de pois et micelles de caséines-protéines lactosériques, puis sur la gélification acide de ces assemblages**

L'application de procédés technologiques sur les matières premières laitières (traitements thermiques notamment par la pasteurisation ou la stérilisation, ou bien par les hautes pressions dynamiques) en amont de la gélification des protéines est une étape importante pour la stabilisation microbiologique des gels fabriqués, mais aussi pour leur fonctionnalisation. Ainsi, l'optimisation de cette étape lors du remplacement partiel des protéines laitières solubles par des protéines alternatives représente une étape intéressante à étudier afin de générer des structures gélifiées stables dans le temps et aux propriétés recherchées. C'est dans cette optique que cette deuxième partie a été construite afin d'étudier les conditions et les propriétés d'agrégation des protéines solubles de pois et des micelles de caséines ainsi que le potentiel de gélification des agrégats mixtes de protéines formés, ces mélanges étant très peu étudiés dans la littérature.

Cette partie comprend l'étude de :

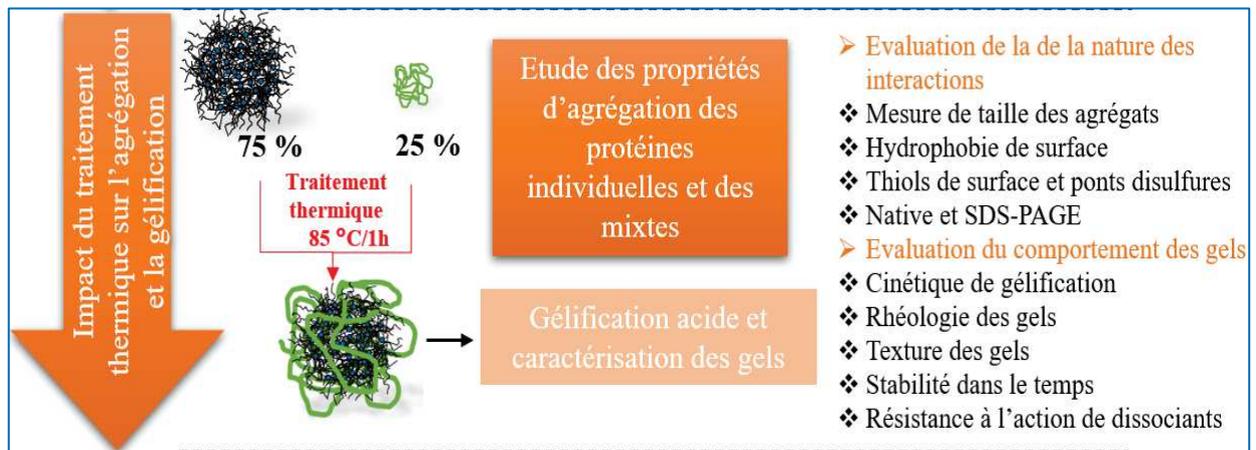
- l'impact des conditions de traitement thermique sur les interactions protéiques des micelles de caséine-protéines de pois,
- l'étude de la gélification des complexes micelles de caséine-protéines de pois formés par acidification (GDL) et la caractérisation rhéologique des gels obtenus,
- la stabilité dans le temps des différents gels acides obtenus ainsi que leur résistance à la dissociation suite à l'ajout d'un agent dissociant afin de caractériser les différents types d'interactions qui maintiennent et stabilisent le réseau protéique des gels obtenus.

Une synthèse de cette partie est schématisée sur la **figure III.11**.

Plus en détail, la première partie de ce chapitre a fait l'objet d'une publication soumise dans le journal « *Food Research International* ». L'originalité de ce travail réside dans la mise en place de deux protocoles différents de traitement thermique dans le but de favoriser l'association et l'interaction entre les protéines de pois et les micelles de caséines et de comprendre les mécanismes mis en jeu. Nous avons ainsi étudié l'impact du traitement thermique sur les propriétés des agrégats de protéines simples (protéines laitières ou protéines de pois), puis sur des agrégats mixtes obtenus par le mélange des deux catégories de protéines

à des pourcentages définis. Ces deux voies devront permettre de fonctionnaliser les micelles de caséines et d'aboutir à de nouveaux objets biochimiques avec de nouvelles propriétés tout en mettant en valeur les bénéfices des protéines de pois, que ce soit d'un point de vue nutritionnel, économique ou encore environnemental. C'est dans cette optique que les propriétés des gels acides obtenus (la capacité de rétention d'eau et les propriétés rhéologiques et texturales) ont été étudiées et comparées à celles des gels de protéines de lait.

La seconde partie complète la précédente en présentant l'étude de la stabilité des gels acides mixtes dans le temps et leur résistance suite à l'ajout de différents agents dissociants afin d'identifier les interactions prédominantes établies entre les protéines et à l'origine de leur stabilisation.



**Figure III.11.** Démarche expérimentale adoptée pour l'étude de l'impact du traitement thermique sur l'agrégation mixte et son influence sur la gélification par acidification.

### III.2.1. Impact du traitement thermique sur les interactions entre protéines et les propriétés de gélification acide d'un système mixte de micelles de caséine et de protéines de pois solubles (Article 1)

**Impact of two thermal processing routes on protein interactions and acid gelation properties of casein micelle-pea protein mixture compared to casein micelle-whey protein one.**

#### **Abstract:**

The influence of two heating protocols (protocol 1 and 2) on protein interactions and acid-induced gelation properties of casein micelle-pea protein mixture (CM-PP) was investigated and then compared to casein micelle-whey protein mixture (CM-WP). The CM:PP and CM:WP protein weight ratio for mixtures was 7.5:2.5, for a total protein content of 4% (pH 6.7). Protocol 1 consisted of a heat treatment (85 °C for 1h) of CM-PP and CM-WP mixtures respectively. Regarding protocol 2, casein micelle, pea protein and whey protein stock dispersions were individually pretreated by heating (85°C for 1 h) before the mixtures were made and heated in the same conditions of protocol 1 (85 °C for 1 h). Heat pretreatment realized in the protocol 2 significantly increased PP hydrophobicity and reinforced weak interactions of the initial PP particles. This pretreatment led to twofold smaller pea particle compared to whey protein aggregates. The hydrophobic interactions between pea proteins and casein micelles promoted by the two heating protocols have greatly contributed to improve acid gelation functionalities of CM. Regardless of the heating protocol, acid-induced gelation of the CM-PP mixtures led to the formation of gel networks with a significant increase in stiffness and firmness compared to casein micelle or CM-WP mixtures gels.

**Keywords:** pea protein, whey protein, casein micelle, thermal processing, protein mixture, acid gelation, rheological properties.

**Abbreviations:** BSA, bovin serum albumin; CM, casein micelle; CM HT, heat-treated casein micelle; DB, dry basis; GDL, glucono- $\delta$ -lactone; MSH, 2-mercaptoethanol;  $M_w$ , molecular weight; NR, non-reducing conditions; P1, heat treatment protocol 1; P2, heat treatment protocol 2; PCN, native-like phosphocasein; PCS, photon correlation spectroscopy; pI, isoelectric point; PP, pea protein; PP HT, heat-treated pea protein; PPI, pea protein isolate; R, reducing conditions; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; SH, thiol group; SMUF, simulated milk ultrafiltrate; WHC, water holding capacity; WP, whey protein; WP HT, heat-treated whey protein; WPI, whey protein isolate.

## 1. Introduction

A high proportion of food proteins consumed in developed countries are animal-based, for which production methods have detrimental impacts on the environment compared to plant-based proteins due to both higher inputs of natural resources and greater emissions of harmful pollutants (Nadathur, Wanasundara, & Scanlin, 2017; Sabaté & Soret, 2014). In high income countries, policy actions are now implemented to restore a healthy and sustainable balance in consumption concerning the ratio of plant to animal protein (De Boer & Aiking, 2019). In order to reduce the excess consumption of animal proteins with the aim of limiting environmental impacts, one of the solutions is to partially replace animal proteins by plant ones in processed foods and propose to consumers innovative food with nutritional and functional interest combining animal and plant proteins (Alves & Tavares, 2019; Guyomarc'h et al., 2021). However, the association of plant and animal proteins requires at present time better knowledge to understand the processing, the properties and the stability of these novel assemblies and optimize them.

Different proteins have been tested to develop these mixed systems as reviewed by Alves & Tavares (2019). Concerning the recurring animal proteins used in mixed systems, milk proteins have the advantage to be very well characterized by extensive research studies and the diversity of their physicochemical properties allows to explore varied association ways to plant proteins (Alves & Tavares, 2019). Bovine milk proteins consist in 80% wt. caseins and 20% wt. whey proteins with  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and bovine serum albumin as major fractions. The four fractions of caseins ( $\alpha$ <sub>1</sub>-,  $\alpha$ <sub>2</sub>-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins) are auto-associated to form casein micelles (CM) mainly through hydrophobic bonds and calcium phosphate nanoclusters bound to phosphoserine residues of the casein chains (De Kruif et al., 2012; Walstra, Geurts, Noomen, Jellema, & Van Boekel, 1999). Casein micelles are spherical particles (~ 150 nm in average diameter) characterized by an hydrophilic surface made of the C-terminal part of  $\kappa$ -caseins (Walstra et al., 1999). This highly hydrated auto-assembly stabilized by a net negative charge is a remarkably stable colloidal structure not affected by aggregation phenomenon at milk pH and temperature lower than 100 °C (Lucey & Singh, 2003). However, acidification (pI ~ 4.6) induces casein micelles coagulation (Horne, 1999). Heating above 70 °C CM in presence of whey proteins before acidification promotes whey protein denaturation but also their interactions with CM surface inducing strengthened acidified gels (Lucey & Singh, 1997; Lucey, Tamehana, Singh, & Munro, 1998).

Concerning plant proteins, proteins from pea (*Pisum sativum*) have gained great attention in food area over the last decade, particularly from a nutritional point of view since they contain all the essential amino acids and particularly a high content of lysine and branched chain amino (Lam, Can Karaca, Tyler, & Nickerson, 2018). Besides, the sustainable agronomic practices of pea crop, availability, low cost and health benefits recognized to the extracted pea proteins represent interesting advantages over other plant proteins (Roy, Boye, & Simpson, 2010). Although pea off-flavor development is a weakness, pea proteins are characterized by their high digestibility and relatively fewer allergenic responses and negative health controversies compared to soy proteins (Fischer, Cachon, & Cayot, 2020). In contrast to traditional cereal proteins, the main pea proteins are globulins (~ 65-80%) representing globular storage proteins classified according to their sedimentation coefficient. They consist of 7S vicilin (160 - 200 kDa), 7S convicilin (~ 280 kDa) and 11S legumin (360 - 400 kDa). The albumin fraction (20-35 % of total pea proteins) combines metabolic and enzymatic proteins (Owusu-Ansah & McCurdy, 1991). The proportion of these different proteins depends on genetic factors and, to a lesser extent, on the crop environment (Lam et al., 2018). Several interesting techno-functional properties were established for pea protein isolates such as solubility, water- and oil-holding capacity, emulsification, foaming and gelation (Lam et al., 2018). Pea protein gels have been well characterized and documented in the literature (Lu, He, Zhang, & Bing, 2019). However, the processing conditions applied to industrially obtain pea protein isolate may affect these functional properties, limiting their applications in the food industry (Barac, Pesic, Stanojevic, Kostic, & Cabrilo, 2015; Burger & Zhang, 2019).

An opportunity to partially replace animal-based proteins by plant-based proteins is to produce protein gels mixing milk and plant proteins. Particular attention has been given to the aggregation and gelation of soy proteins and their mixtures with milk proteins (Beliciu & Moraru, 2013; Martin, de los Reyes Jiménez & Pouvreau, 2016; Schmitt et al., 2019). Regarding pea/milk protein mixtures, several works have been published on heat-induced gelation or fermentation-induced gelation (Alves & Tavares, 2019 ; Ben-Harb et al., 2018; Chihi, Sok & Saurel, 2018; Silva et al., 2018; Silva et al., 2019; Youssef et al., 2016), but few have been devoted to gels obtained from casein micelles and pea proteins mixtures by chemical acidification. Mession, Roustel & Saurel (2017) characterized the glucono- $\delta$ -lactone acid gelation of non-fractionated pea protein extract or isolated fractions of 7S vicilin and 11S legumin combined with casein micelles (1:1 weight ratio, 3.6% total protein, initial pH 7.1). Before acidification, a heat treatment was applied directly to the pea protein-casein micelle

mixtures or independently to the pea protein samples prior to mixing them with unheated casein micelles. The acidification of pre-heated non-fractionated pea proteins mixed with unheated casein micelles resulted in gels characterized by a rapid gelation, a higher final storage modulus and a higher gelation pH compared to single-protein gels. However, the acidification of the co-heated non-fractionated pea proteins-casein micelles mixture did not result in gel formation due to the presence of large and sedimentable pea protein aggregates.

Numerous studies have been devoted to the gelation of milk proteins, focusing on the impact of thermal denaturation of whey proteins and their covalent interaction through disulfide interaction with the surface of casein micelles, increasing the strength of acid gels. But currently, little is known about the interactions between pea proteins and milk proteins, specifically between soluble pea proteins containing cysteine residues and casein micelles upon application of heat treatment and acidification process. Therefore, the purpose of the present study was to improve the multi-scale (molecular, microscopic, macroscopic) understanding of the acid CM-PP mixed gel structuring by comparing two different pre-gelation processes: (1) co-heating of untreated CM and PP (2) co-heating of previously independently heat-treated casein micelles and pea proteins. The acid gel structuring and properties obtained with CM-PP mixtures were compared to those obtained with casein micelles-whey proteins (CM-WP) mixtures subjected to the same pre-gelation protocols. Besides, the objective of this work was to functionalize casein micelles with a commercial pea protein isolate, at the same natural ratio observed for CM-WP, to evaluate its potential applications in food industry. Gelation kinetics, rheological and textural gel properties were compared and related to the physicochemical properties of the different mixed dispersions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Pea protein isolate powder was kindly provided by Roquette Frères (Nutralys S85F, batch W278N, Lestrem, France), whey protein isolate powder was obtained from Lactalis Ingredients (Prolacta 90, batch R51640, Bourgbarré, France) and native-like phosphocasein powder was purchased from Ingredia Dairy Ingredients (Promilk 852B, batch 082156, Arras, France). PCN was industrially prepared by microfiltration, then diafiltration using the milk mineral soluble phase conferring a quasi-native state to the prepared casein micelles. The three commercial powders were stored at 4 °C away from moisture and light.

Tri-potassium citrate monohydrate, tri-sodium citrate dihydrate,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  were purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  and  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  from Amresco (Solon, Ohio, USA),  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ , TCA and  $\text{KOH}$  from VWR BDH Prolabo (Leuven, Belgium) and tris[hydroxymethyl] aminomethane (Tris), EDTA, glycine, sodium phosphate dibasic, sodium dodecyl sulfate, urea, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid ammonium salt (ANS), glycerol, 2-mercaptoethanol, acrylamide/bis-acrylamide, ammonium persulfate, N, N, N', N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) from Sigma (St. Louis, MO, USA). Coomassie brilliant blue G250, D-(+)-gluconic acid  $\delta$ -lactone were obtained from Fluka chemicals GmbH (Dublin, Ireland) and bromophenol Blue was and sodium dihydrogen phosphate monohydrate was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All solutions were prepared using Milli-Q ultrapure water (Millipore®).

## 2.2. Proximate composition analysis

Moisture and ash content of the commercial powders (PPI, WPI, PCN) were determined according to AOAC methods 925.10 and 923.0, respectively (AOAC, 2000). Protein content was determined using Kjeldahl method in a Büchi mineralization and distillation unit (KjelFlex K-360, Switzerland) with a nitrogen conversion factor of 6.25 and 6.38 for PPI and milk proteins, respectively (Shand, Ya, Pietrasik, & Wanasundara, 2007). Fat content was given by suppliers. Carbohydrate content was calculated by subtracting the sum of the protein, ash and fat contents from the total solid. The proximate composition analysis of the tree powders is summarized in **tableau III.6**.

**Tableau III.6.** Proximate composition of commercial pea isolate (PPI), whey protein isolate (WPI) and native phosphocasein (PCN) powder.

Chemical composition	Pea protein isolate	Whey protein isolate	Native phosphocasein
Moisture (%)	6.10 ± 0.17 <sup>a</sup>	6.19 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.55 ± 0.15 <sup>b</sup>
Ash (% DB)	3.35 ± 0.83 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.07 <sup>b</sup>	7.89 ± 0.07 <sup>c</sup>
Protein (% DB)	83.23 ± 0.84 <sup>a</sup>	93.97 ± 0.22 <sup>b</sup>	83.16 ± 0.26 <sup>a</sup>
Fat (% DB)*	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.95 ± 0.02 <sup>c</sup>
Carbohydrate (% DB)**	13.27 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.45 ± 0.13 <sup>b</sup>	7.00 ± 0.28 <sup>c</sup>

Results expressed as mean ± standard deviation (n=3).

\*: Supplier data.

\*\* : Calculated by differences.

DB: Dry basis.

<sup>a-c</sup> Values followed by different letters within a line are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 2.3. Preparation of single protein dispersions

Pea (PP) and whey (WP) protein powders were suspended separately at 5% (w/w) in Milli-Q ultrapure water, gently stirred at 300 rpm for 2 h at 20 °C and then overnight at 4 °C to allow complete hydration. The pH of the two dispersions was adjusted to pH 6.7 with 1 M NaOH or 1 M HCl without affecting their concentrations. The PPI dispersion was then centrifuged (ultracentrifuge Optima LE-80k, rotor 70 Ti, Beckman, California, USA) at 12000 × g for 20 min at 20 °C and the supernatant was collected as the protein soluble fraction (PP). The yield of the soluble fraction for the PP dispersions after the centrifugation was 34% with a PP protein content of 1.7% (w/w).

The PCN powder was suspended at 3.75% (w/w) in lactose-free simulated milk ultrafiltrate (SMUF) according to **Jenness & Koops (1962)** to keep the mineral environment of native casein micelles. CM dispersion was stirred at 300 rpm for 30 min at 20 °C then the pH was adjusted to pH 6.7 with 1 M NaOH. CM dispersion was then stored at 4 °C overnight to improve the powder hydration and was then warmed for 1 hour at 40 °C and rapidly cooled to 20 °C just before experiments to ensure complete hydration.

### 2.4. Preparation of heat-treated protein mixtures

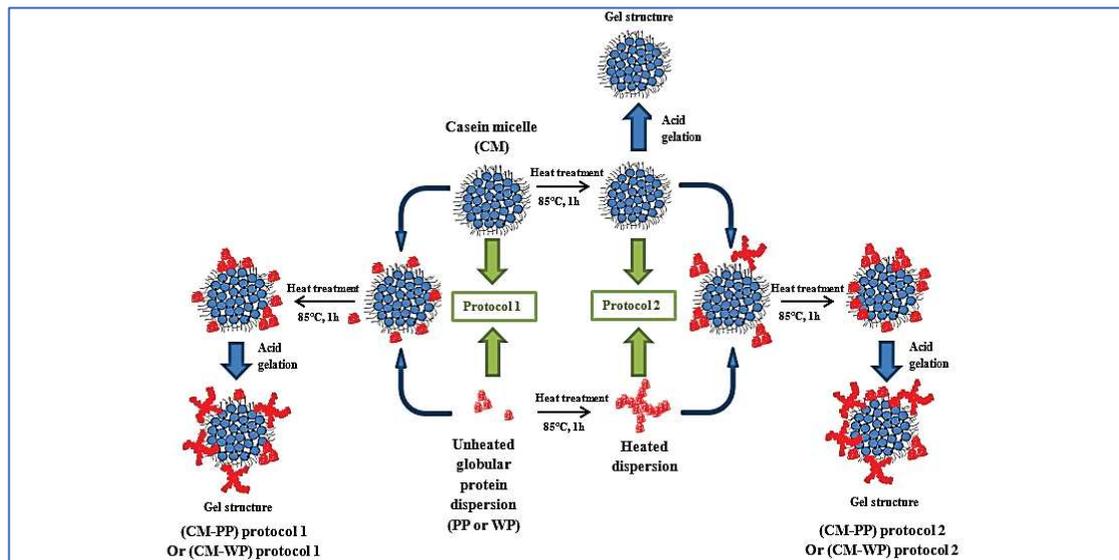
Mixture samples were prepared according to two different protocols as presented in **figure III. 12**.

Protocol 1. The CM stock dispersion was first mixed with PP or WP dispersion in a 7.5:2.5 protein ratio conducting to a total protein content of 4% (w/w). This total protein content was selected based on the reference of the bovine milk protein concentration (**Walstra & al., 1999**). Mixtures were then stirred using a magnetically stirrer at 300 rpm for 30 min at 25 °C, placed in hermetically sealed 15 mL plastic conical tubes (Falcon, Corning, New York, USA) and equilibrated in a water bath at 40 °C for 2 min. Thereafter, sample temperature was increased to 85 °C at a rate of 1 °C/min, and then maintained at 85 °C for 1 h before a rapid cooling to 20 °C in ice. These mixtures were named (CM-PP) P1 and (CM-WP) P1, respectively. Samples were then stored at 4 °C and equilibrated at 20 °C prior to analysis.

Protocol 2. The PP, WP and CM stock dispersions were placed in the hermetically sealed plastic conical tubes and then submerged in a water bath at 40 °C for 2 min for equilibration. Thereafter, sample temperature was increased to 85 °C at a rate of 1 °C/min, and then maintained at 85 °C for 1 h before cooling down to 20 °C using an iced water bath. The heated dispersions were named heat treated pea protein (PP HT), heat treated whey protein (WP HT)

and heat-treated casein micelles (CM HT).

CM HT were mixed with PP HT or WP HT in a 7.5:2.5 protein ratio conducting to a total protein content of 4% (w/w). After stirring using a magnetically stirrer at 300 rpm for 30 min at 25 °C, the same heat treatment procedure as described above was carried out to the mixed samples to obtain the heated mixtures (CM-PP) P2 and (CM-WP) P2.



**Figure III.12.** Schema of the two protocols carried out to study the association of soluble pea (PP) or whey (WP) proteins to casein micelles (CM). Protocol 1: mixing of PP or WP with CM then heating of the mixture (85 °C for 1 h). Protocol 2: pre-heating (85 °C for 1 h) of PP, WP, CM dispersions separately before mixing PP or WP with CM then heating of the mixture (85 °C for 1h). For each protocol, the CM / PP or WP protein ratio was 7.5:2.5 with a total protein content of 4% (w/w).

## 2.5. Particle size distribution by photon correlation spectroscopy

The particle size distribution of the different dispersions was measured at 25 °C by dynamic light scattering using the Malvern NanoSizer (Zetasizer nano ZS, Malvern Instruments, Orsay, France) with a photodiode detector with 4 mW He–Ne laser operating at a wavelength of 633 nm and a fixed scattering angle of 173°. Prior to analysis, samples were diluted to 10 g/L with ultrapure water. Measurements were carried out in four-sided clear polystyrene cuvettes (Sarstedt, Numbrecht, Germany) with at least twelve runs per measurement. The dispersant viscosity and refractive index for water were 0.8875 mPa.s and 1.330, respectively. The real refractive indexes was 1.36 for the milk protein (**Regnault, Thiebaud, Dumay, & Cheftel, 2004**) and 1.45 for pea protein isolate (**Bogahawaththa & al., 2019**). The minimal, maximal and mean diameters were determined from the light-intensity and

the number frequency (%) distribution curves. Measurements were evaluated in quadruplicate.

## 2.6. Determination of sulfhydryl group content

The surface, free and total sulfhydryl (SH) groups of protein samples were determined using Ellman's method (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961) with some modifications. Protein stock dispersions were diluted to 7.5 mg/mL in tris-glycine buffer (86 mM Tris, 90 mM glycine and 4 mM EDTA, pH 8.0) for surface SH content measurement. For free SH content, protein stock dispersions were diluted to the same concentration in tris-glycine buffer containing 8 M urea then the solution was gently stirred overnight at 20 °C. To evaluate the total SH group content and calculate the disulfide bonds, 0.05 mL of 2-mercaptoethanol and 4 mL of tris-glycine buffer were added to 1 mL of the protein stock dilution prepared in tris-glycine buffer containing 8 M urea then the mixture was incubated for 1 h at room temperature. Then 10 mL of 12% (w/v) tri-chloroacetic acid (TCA) solution were added and the mixture was incubated for an additional hour. The precipitate after centrifugation (5000 × g for 10 min) was washed twice with 5 mL of TCA solution. After that, the precipitate was dissolved in 10 mL of tris-glycine buffer before adding 0.05 mL of Ellman's reagent (2 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid in the tris-glycine buffer) and incubating the mixture at room temperature for 20 min. The absorbance was measured at 412 nm using a spectrophotometer (UV 1900, Shimadzu UV-Vis, Japan).

The SH content was calculated according to Eq (1):

$$\text{SH}(\mu\text{mol/g}) = (73.53 * A * D)/C \quad (1)$$

where A is the absorbance at 412 nm, C is the sample protein concentration (7.5 mg/mL), D is the dilution factor, the constant 73.53 is calculated as  $10^6 / (1.36 \times 10^4)$  ( $10^6$  is the conversion from molar basis to  $\mu\text{mol/mL}$  basis and from mg to g solids;  $1.36 \times 10^4$  is the molar absorptivity).

The SS content was calculated according to Eq (2):

$$\text{SS}(\mu\text{mol/g}) = (\text{Total SH} - \text{free SH})/2 \quad (2)$$

All determinations were performed in triplicate.

## 2.7. Surface hydrophobicity

Surface hydrophobicity (Ho) was measured as reported by Kato & Nakai (1980) and

**Haskard & Li-Chan (1998)** with minor modifications. A 8 mM ANS stock solution was prepared in phosphate buffer (0.01 M, pH7), ANS being used as the fluorescence probe. For each protein dispersion to analyze, dilutions were prepared in the same buffer to obtain 5 final protein concentrations ranging from 0.04 to 0.2 mg/mL. Then, 20  $\mu$ L ANS stock solution were added to 4 mL of each protein concentration. The fluorescence intensity of the mixture was measured using a fluorescence spectrophotometer (Varian Cary Eclipse, Australia) at  $\lambda_{ex}$ = 365 nm and  $\lambda_{em}$ = 484 nm in quartz cuvette (101-QS, Hellma, Germany). The surface hydrophobicity of protein sample represents the initial slope of fluorescence intensity versus protein concentration calculated by linear regression. All determinations were performed in triplicate.

## 2.8. Polyacrylamide gel electrophoresis

Polyacrylamide gel electrophoresis analysis was performed for all samples under native, non-reducing (NR) and reducing (R) conditions on a discontinuous buffer system according to **Gràcia-Juliá & al. (2008)**.

### 2.8.1. Native-PAGE

Proteins were analyzed using minigels (80  $\times$  80  $\times$  1.5 mm) consisted in 3.5% (v/v) acrylamide/bis-acrylamide (C = 37.5:1) stacking gel and 5% (v/v) separating gel, prepared in 25 mM and 50 mM phosphate buffer (pH 7), respectively. Ammonium persulphate and TEMED were added at 1.8 and 2.8 mM, respectively. Protein samples were diluted at 5 mg/mL in 25 mM phosphate buffer (pH 7) in the presence of glycerol (150 mL/L) and bromophenol blue (0.0025% (w/v)). Electrophoresis was carried out with a running 50 mM phosphate buffer at pH 7. Electrophoresis were carried out at a constant power of 12 W at 18  $^{\circ}$ C for 3 h. After completion, electrophoresis gels were stained with R-250 Coomassie blue and then washed.

### 2.8.2. SDS-PAGE

SDS-PAGE was conducted in 4% stacking and 12% separating gels. Samples were prepared in sample buffer containing 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 150 mL/L glycerol, 0.0025% (w/v) bromophenol blue, and 5 % (v/v) 2-mercaptoethanol only in the case of reducing condition. Samples were then heated at 95  $^{\circ}$ C for 5 min and cooled at the room temperature. The migration was conducted with a tris-glycine running buffer (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% (w/v) SDS) at pH 8.3. SDS-PAGE were run at a constant power of 9 W for 3 h at 18  $^{\circ}$ C. Per well, 5  $\mu$ L of sample containing 0.5% (w/w) of proteins or 15  $\mu$ L of molecular weight markers (Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard, LC5800, Invitrogen,

Carlsbad, USA) were loaded per well. After completion, electrophoresis gels were stained with R-250 Coomassie blue and then washed.

## 2.9. Rheological measurements

Rheological measurements of the different samples were carried out in a dynamic rheometer (MCR 300, Anton Paar, Graz, Austria) using a coaxial cylinder geometry (CC27). The evolution of the storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) was recorded for 5 h at a constant strain of 1% and a frequency of 1 Hz. A sample volume of 20 mL was mixed with 2% (w/w) gluconic acid  $\delta$ -lactone (GDL) and poured into the rheometer cup maintained at 25 °C. The gel point was obtained when the storage modulus ( $G'$ ) was equal to the loss modulus ( $G''$ ). Simultaneously, the kinetic of acidification at 25 °C was followed using pH-meter (C833, Consort, Turnhout, Belgium) equipped of a data acquisition system recording one measure each 10 seconds. The acidification kinetic and rheological analysis were carried out in triplicate.

## 2.10. Texture analysis of gels

The textural properties of gels formed by gelation at 25 °C with 2% (w/w) GDL was determined using a TA-XT2i texture analyzer (Stable Microsystems, Godalming, England) equipped with a 5 kg load cell. The gels were stored at 4 °C for 24 h prior to the texture profile analysis. The test was carried out with a back-extrusion cell (35 mm diameter disc, 5 mm thickness). The test speed was 1 mm/s and the probe moved down into the gel for a penetration depth of 20 mm. The curves of force (g) as a function of time (s) were recorded and characterized from two parameters: firmness (g) as maximum positive force peak during the compression and viscosity (g.s) as area under the curve of the return movement. All texture measurements were evaluated in triplicate.

## 2.11. Gel water-holding capacity

The water-holding capacity (WHC) of gels was determined according to Maltais, Remondetto, Gonzalez, & Subirade (2005) with minor modifications. Gels were prepared into 38 mL round centrifuge tubes (3117-0380, Thermo scientific, USA) from dispersions with addition of 2% (w/w) GDL. Samples were incubated at 25 °C for 24 h for gelation, then stored at 4 °C for 24 h before being centrifuged at  $5000 \times g$  for 5 min at 20 °C (ultracentrifuge Optima LE-80k, rotor 70 Ti, Beckman, California, USA). Gels were weighed before and after centrifugation and WHC was calculated according to Eq (3):

$$\text{WHC (\%)} = (1 - W_r/W_t) * 100 \quad (3)$$

where  $W_t$  is the total mass (g) of water in the sample and  $W_r$  is the mass (g) of water released by centrifugation from gels. Measurements were carried out in triplicate.

### **2.12. Statistical analysis**

Results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analyses of experimental data were performed by analysis of variance (ANOVA). Significant ( $p < 0.05$ ) differences between samples were determined by Tukey's tests using the XLSTAT v2020 software. Linear regressions and related statistical parameters were obtained by Excel® software (2020.5.1.1040).

### 3. Results and discussion

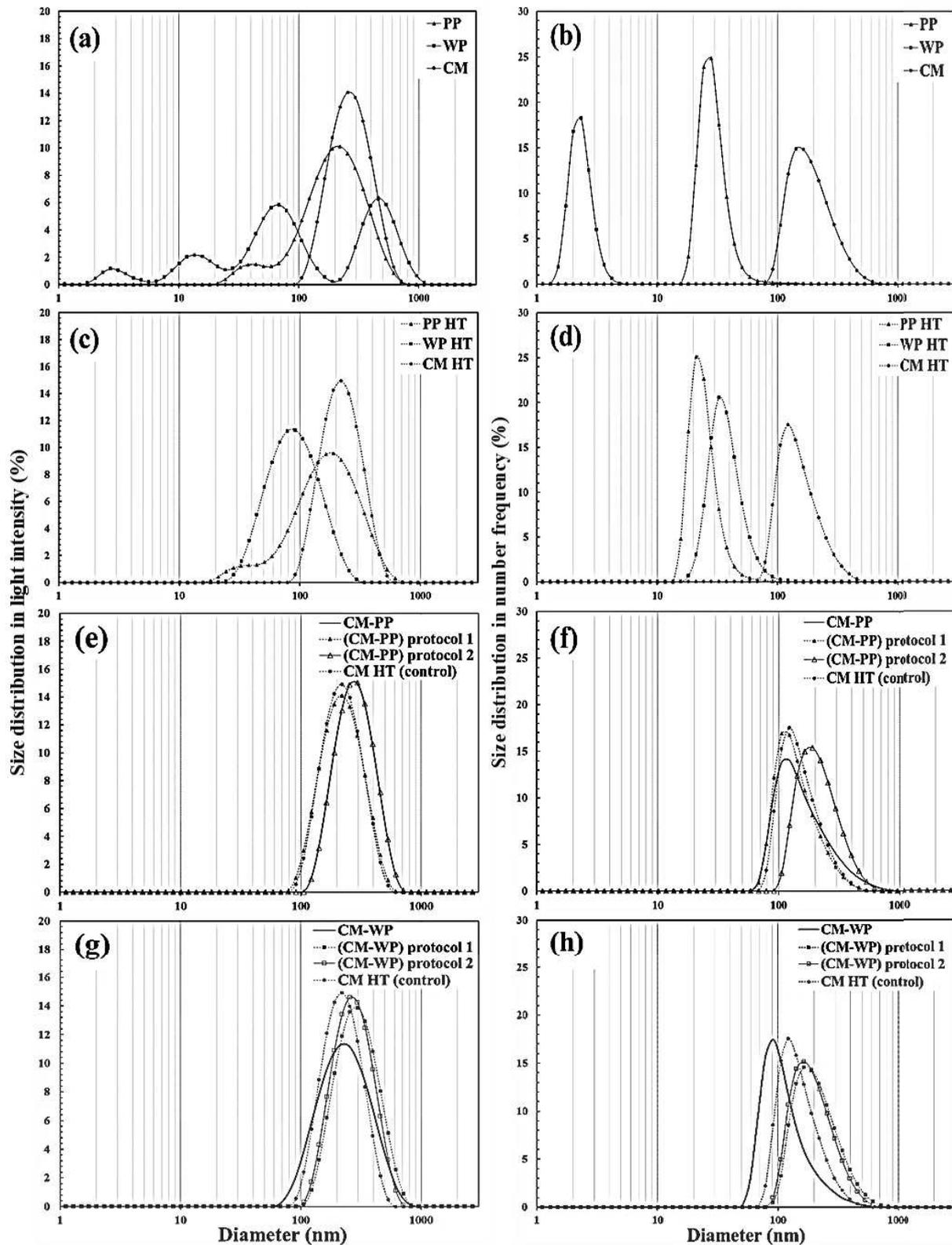
#### 3.1. Effect of the heat treatment protocols on single proteins and protein mixtures properties

The effect of the different heat treatment protocols was investigated on (i) the three individual protein dispersions (first step of protocol 2) and (ii) CM-PP and CM-WP mixtures (protocol 1 and second step of protocol 2) focusing on the size of the assemblies created and the type of interactions involved.

##### 3.1.1. Effect of the heat treatment on single proteins

The size distribution curve in light intensity of soluble PP fraction obtained from the commercial isolate showed a bimodal distribution characterized by a first population with a maximum located at 220 nm (peak 1) and a second one at 34 nm (**Figure III. 13, a; Tableau III.7**). The size distribution curve in number frequency confirmed that the largest number of particles was characterized by a mean diameter of  $28.8 \pm 2.4$  (**Figure III.13, b; Tableau III.7**). This indicated that the soluble PP from the commercial isolate are aggregated since the size of native legumin and vicilin oligomers was expected  $\sim 15$  nm (**Chihi, Mession, Sok, & Saurel, 2016**). This aggregation phenomenon was confirmed from the native PAGE electrophoretic profile of the soluble PP fraction since a very intense band was present at the top of the stacking gel and also a strong one at the borderline between the stacking and separating gels (**Figure III.14, a – lane 1**). These two bands revealed the presence of large protein complexes in the soluble PP dispersion with a molecular weight higher than 200 kDa as estimated compared to the molecular weight markers (**Fig. III.14, a – lane M5**). **Chao & Aluko (2018)** also observed by native PAGE similar pea protein aggregates in a commercial pea protein obtained by isoelectric pH precipitation. These constituents corresponded most probably to soluble pea protein aggregates, called native aggregates, generated during the industrial process since the pea protein isolate used in this study was obtained by isoelectric precipitation, purification then drying in a multi-stage spray dryer according to the supplier. The aggregation of globulins on the same commercial isolate was also observed by size exclusion chromatography with a single peak on the chromatogram indicating particle molecular weight of at least 2 700 kDa (**Kornet & al., 2021**). As SDS induced the dissociation of aggregates formed by non-covalent bonds, the SDS-PAGE pattern in absence of MSH of soluble pea proteins (**Fig. III.14, b – lane 1**) showed the different pea globulins bands: convicilin (72 kDa), legumin  $L\alpha\beta$  (60 kDa) and four vicilin subunits (17, 30, 33, 50 kDa). However, some protein constituents did not enter in the

stacking gel corresponding to aggregates not dissociated by SDS. These aggregates can be formed by intermolecular disulfide bonds involving cysteine thiol groups of legumin and convicilin. They were however not constituted with vicilin since this pea protein had not cysteine in its amino-acids sequence and consequently cannot be involved in intramolecular or intermolecular disulfide bonds leading the formation of such aggregates (**Barac & al., 2010**). On SDS-PAGE pattern in presence of MSH (**Figure III.14, c – lane 1**), legumin was dissociated into legumin acidic subunit ( $L\alpha$  38-40 kDa) and basic subunit ( $L\beta$  19-22 kDa) linked by disulfide bond (**Lam & al., 2018**). Besides, no band of polypeptides were presented at the top of the stacking gel allowing to conclude that a part of native aggregates was associated *via* covalent bound. The heat treatment (85 °C for 1h – step 1 protocol 2) of the soluble pea protein dispersion did not modify the size distribution curve profiles (**Fig. III.13, c, d**) and no difference was observed on the electrophoretic patterns between control (PP) and heated (PP HT) pea protein irrespective of the type of electrophoresis (**Fig. III.14, a, b, c – lane 2**). However, this processing induced a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in the mean diameter calculated from the distribution curves in intensity or in number frequency (**Tableau III.7**). Besides, the surface thiols content (**Figure III.15, a**) and the hydrophobicity (**Figure III. 16**) of PP was significantly ( $p < 0.05$ ) increased by the heat treatment. These different changes suggested that the heat treatment of native pea aggregates has probably reinforced weak interactions between pea proteins involved in these aggregates.



**Figure III.13.** Particle size distribution curves in light intensity (a, c, e, g) or in particle number frequency (b, d, f, h) of (a, b) untreated dispersions (PP: soluble pea protein dispersed in ultrapure water, WP: whey protein dispersed in ultrapure water, CM: casein micelle dispersed in SMUF at pH 6.7), (c, d) pre-heated dispersions (PP HT: pre-heated soluble pea proteins, WP HT: pre-heated whey proteins, CM HT: pre-heated casein micelles), (e, f) untreated and heated

casein micelle-pea protein mixtures at 4% (w/w) total protein concentration and 7.5:2.5 protein ratio (CM-PP: untreated casein micelle-pea protein mixture, (CM-PP) P1: casein micelle-pea protein mixture protocol 1, (CM-PP) P2: casein micelle-pea protein mixture protocol 2) and (g, h) untreated and heated casein micelle-whey protein mixtures at 4% (w/w) total protein concentration and 7.5:2.5 protein ratio ( CM-WP: untreated casein micelle-whey protein mixture, (CM-WP) P1: casein micelle-whey protein mixture protocol 1, (CM-WP) P2: casein micelle-whey protein mixture protocol 2). Protocol 1: mixing of PP or WP with CM then heating of the mixture (85 °C for 1h). Protocol 2: pre-heating (85 °C for 1h) of PP, WP, CM dispersions separately before mixing PP or WP with CM then heating of the mixture (85 °C for 1h). Measurements were carried out by photon correlation spectroscopy (PCS) at 25 °C. Mean curves were calculated from quadruplicate PCS measurements.

**Tableau III.7.** Particle size characteristics of untreated pea protein (PP), whey protein (WP) and casein micelle (CM) dispersions, heated (85 °C for 1h) pea protein (PP HT), whey protein (WP HT) and casein micelle (CM HT) dispersions, the untreated mixtures (CM-PP and CM-WP) and the mixtures obtained by the two heat treatment protocols: protocol 1 (P1) and protocol 2 (P2).

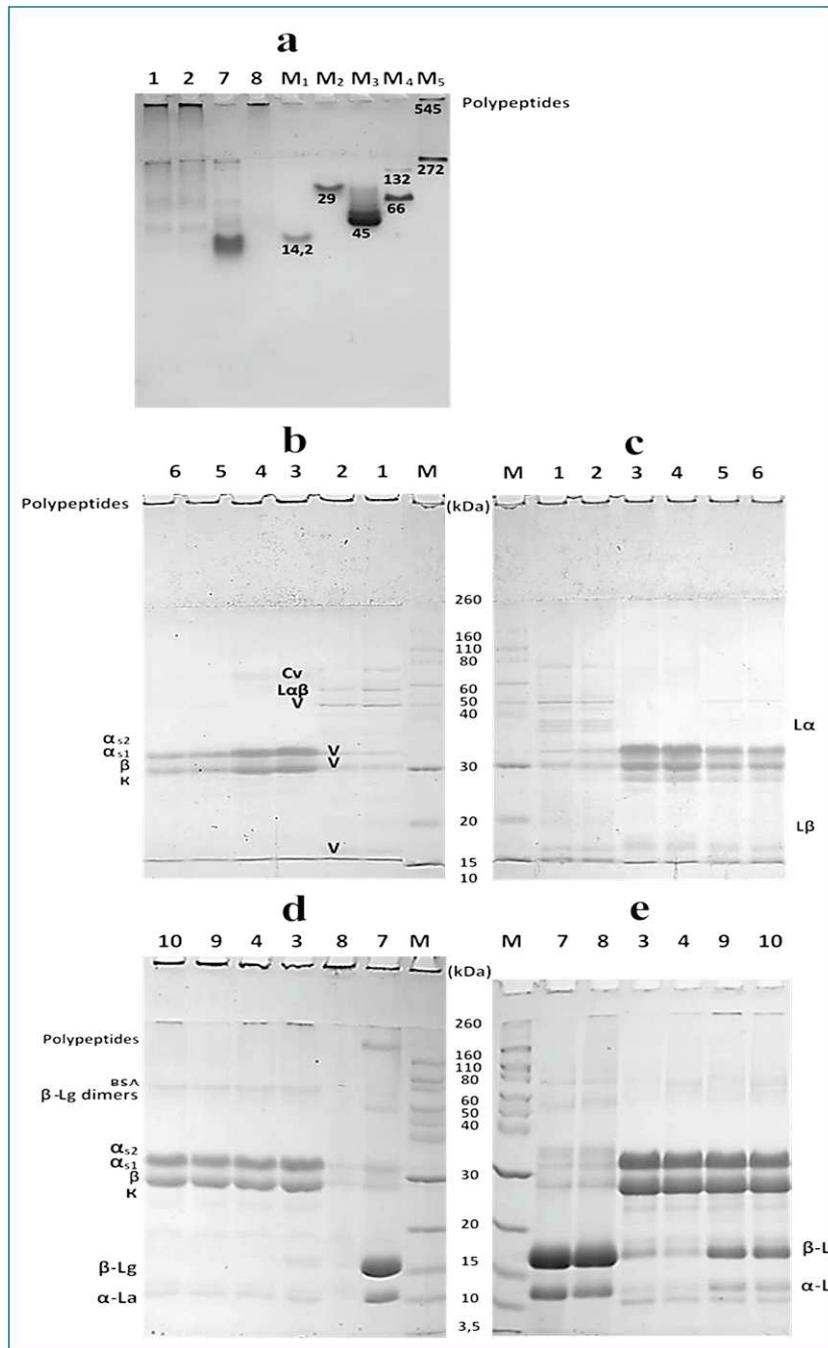
	Distribution in light intensity				Distribution in number frequency			
	Mean diameter (nm)	Minimal diameter (nm)	Value of the peak maximum (nm)	Maximal diameter (nm)	Mean diameter (nm)	Minimal diameter (nm)	Value of the peak maximum (nm)	Maximal diameter (nm)
PP	214 ± 3							
Peak 1		23	34 ± 3	59	29 ± 2	19	26 ± 2	111
Peak 2		59	220 ± 0	716	–	–	–	–
PP HT	167 ± 9							
Peak 1		19	30 ± 3	44	22 ± 2	16	21 ± 0	91
Peak 2		44	164 ± 0	615	–	–	–	–
WP	216 ± 18							
Peak 1		1.5	3 ± 0	5	2 ± 1	0.5	1 ± 0	1
Peak 2		5	14 ± 2	27	2 ± 1	1	2 ± 0	4
Peak 3		27	73 ± 17	151	–	–	–	–
Peak 4		151	462 ± 68	925	–	–	–	–
WP HT	98 ± 2	24	87 ± 7	295	40 ± 4	23	36 ± 5	135
CM	285 ± 10	106	255 ± 0	664	200 ± 2	91	153 ± 16	664
CM HT	234 ± 4	91	220 ± 0	531	159 ± 5	79	122 ± 0	507
CM-PP	294 ± 4	122	342 ± 0	647	173 ± 18	72	111 ± 10	868
(CM-PP) P1	232 ± 4	87	220 ± 0	531	151 ± 2	75	117 ± 10	531
(CM-PP) P2	298 ± 5	122	295 ± 0	680	221 ± 0	101	190 ± 0	680
CM-WP	254 ± 6	68	220 ± 0	787	123 ± 6	56	91 ± 0	615
(CM-WP) P1	313 ± 4	111	295 ± 0.0	787	219 ± 2	91	164 ± 0	787
(CM-WP) P2	287 ± 5	106	255 ± 0	712	203 ± 3	91	164 ± 0	647

Results expressed as mean ± standard deviation (n=3).

Values were calculated from the size distribution curves in light intensity and in number frequency as determined by photon correlation spectroscopy at 25 °C.

The size distribution curve in intensity of untreated WP dispersion showed four different

populations (**Figure III.13, a**). The first one characterized by a maximum located at 3 nm corresponded to individual globular proteins such as  $\alpha$ -La and  $\beta$ -Lg, the second one (14 nm) can be attributed to  $\beta$ -Lg dimers, the third one (72 nm) corresponded to BSA and immunoglobulins assemblies and the fourth one (462 nm) was probably due to some large aggregates (**Figure III.13, a, Tableau III.7**). The size distribution curve in number of WP displayed a bimodal population distribution with a mean diameter lower than 2 nm indicating that whey proteins from the isolate were mostly in their individual or dimeric form (**Figure III.13, b; Tableau III.7**). This was confirmed by the native (**Figure III.14, a – lane 7**) and SDS-PAGE under non-reducing conditions (**Figure III.14, d – lane 7**) electrophoresis patterns. The three major bands on SDS-PAGE profile at 13, 17 and > 160 kDa corresponded to  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and polypeptides subunits, respectively.



**Figure III.14.** Electrophoretic patterns of (a) native PAGE, (b, d) SDS-PAGE in non-reducing condition and (c,e) SDS-PAGE in reducing condition of control and pre-heated PP (PP HT), WP (WP HT), CM (CM HT) dispersions (step 1 protocol 2) and mixtures of PP or WP with CM (2.5:7.5 protein ratio with 4% (w/w) total protein concentration) treated according to protocol 1 ((CM-PP) P1 ; (CM-WP) P1) or protocol 2 ((CM-PP) P2 ; (CM-WP) P2). Control PP (lane 1), PP HT (lane 2), control CM (lane 3), CM HT (lane 4), (CM-PP) P1 (lane 5), (CM-PP) P2 (lane 6), control WP (lane 7), WP HT (lane 8), (CM-WP) P1 (lane 9), (CM-WP) P2 (lane 10). Makers for native PAGE: alpha-lactalbumin (lane M<sub>1</sub>), carbonic anhydrase (lane M<sub>2</sub>), albumin chicken egg white (lane M<sub>3</sub>), bovine serum albumin (lane M<sub>4</sub>), urease from jack bean (lane M<sub>5</sub>). Markers for SDS-PAGE (lane M): 12 protein bands ranging in molecular weight from 3.5 - 260 kDa. Cv: convicilin. Lαβ: legumin subunit, Lα and Lβ: acidic and basic

legumin polypeptides, V: vicilin polypeptides, BSA: bovine serum albumin,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ : caseins,  $\beta$ -Lg:  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -La:  $\alpha$ -lactalbumin.

The heat treatment (step 1 of protocol 2) of WP dispersion induced the formation of large WP aggregates. The size distribution curves in light intensity and in number frequency (**Figure III.13, c, d**) of WP HT displayed a monomodal distribution characterized by a mean diameter in number frequency of 40 nm (**Tableau III.7**). The heated-induced aggregates were also observed from the native PAGE and SDS-PAGE electrophoretic profiles of WP HT in the form of a single intense band present at the top of the stacking gel (**Figure III.14, a – lane 8, Figure III. 14, d – lane 8**). This band disappeared from the SDS-PAGE pattern in the presence of MSH (**Figure III.14, e – lane 8**) demonstrating that WP heated-induced aggregates were created by disulfide bonds. As a result, the disulfide bond content of HT WPs was significantly ( $p < 0.05$ ) higher compared to that of WP (**Figure III.15, b**). The temperature applied during the heat treatment (85 °C), higher than the temperature of denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin, BSA and  $\beta$ -lactoglobulin (62 °C, 64 °C and 78 °C, respectively) induced the protein unfolding and the formation of intermolecular bonds, particularly disulfide bonds, leading to irreversible conformational and techno-functional changes to WP (**De la Fuente, Singh & Hemar, 2002**). A significant ( $p < 0.05$ ) increase in surface hydrophobicity of WP HT compared to WP was also observed due to the exposure of the hydrophobic clusters of unfolded proteins as a result of the heat treatment (**Figure III.16**).

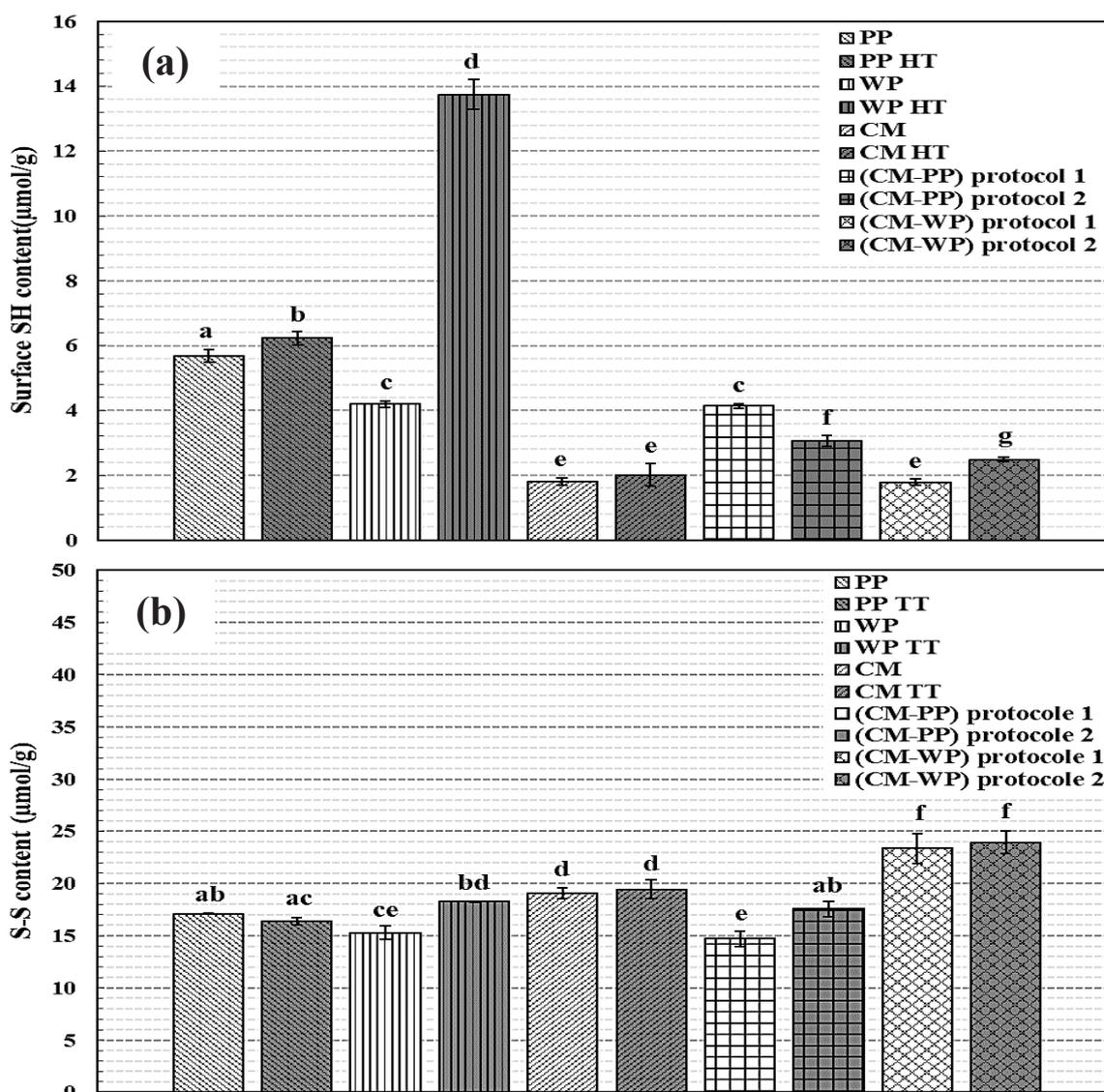
The pre-heating (step 1 of protocol 2) of the soluble PP and WP led to protein aggregates characterized by specific physico-chemical properties. PP HT aggregates were twofold smaller compared to WP HT particles (**Tableau III.7**) and the surface thiol groups of WP HT was significantly ( $p < 0.05$ ) higher than those of the PP native aggregates and PP HT aggregates (**Figure III.15, a**). Besides, although WP HT aggregates were characterized by a higher hydrophobicity compared to untreated WP, these aggregates remained less hydrophobic than PP HT particles.

Untreated and heat-treated (step 1 of protocol 2) casein micelles were characterized by a monomodal distribution in light intensity and in number frequency (**Figure III. 13, a, d**). A slight but significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the CM mean diameter from  $285 \pm 10$  nm to  $234 \pm 4$  nm (in light intensity) was noticed after the heat treatment (**Tableau III.7**). This size reduction could be associated to an irreversible change of colloidal calcium phosphate and/or reassociation of  $\kappa$ -caseins on casein micellar surface (**Le Ray et al., 1998**). In addition to the

four casein fractions,  $\alpha_{s1}$ - (23 kDa),  $\alpha_{s2}$ - (25 kDa),  $\beta$ - (24 kDa),  $\kappa$ - (19 kDa) caseins, polypeptides of  $M_w$  in the range of 60 - 80 kDa were detected on SDS-PAGE profiles of CM and CM HT (**Figure III.14, b, e – lanes 3-4**) probably due to small amount of  $\beta$ -lactoglobulin dimers, lactoferrin, immunoglobulin G and bovine serum albumin, as already reported by **Anema & Li (2000)** and **Beliciu & Moraru (2013)**.

### 3.1.2. Effect of heat treatments on CM-PP and CM-WP mixtures

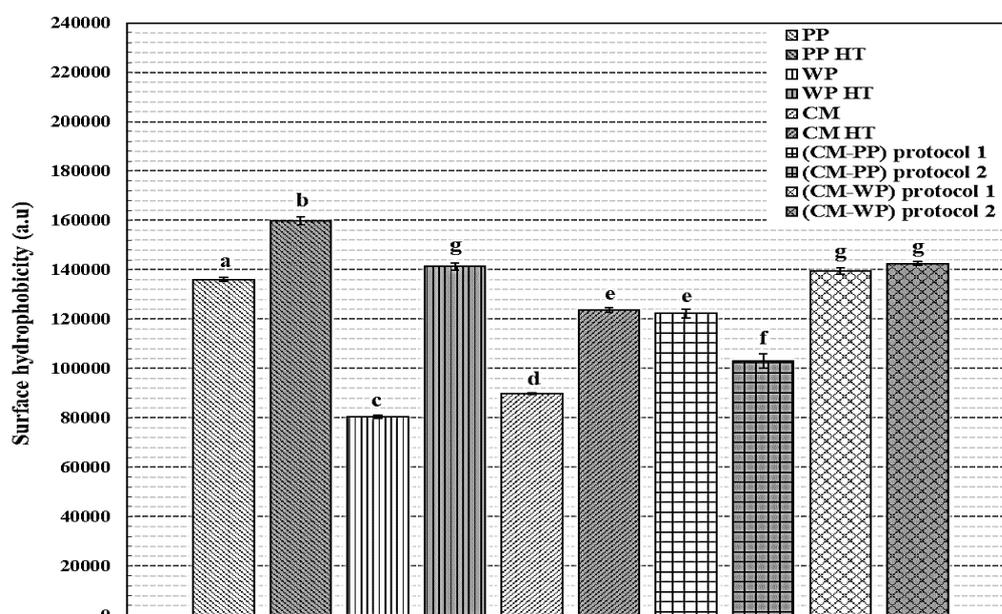
The protocol 1 heat treatment was applied to the CM-PP and CM-WP mixtures prepared with untreated PP, WP and CM dispersions. The untreated CM-PP and CM-WP mixtures stood out particularly according to the size of the PP and WP soluble fractions mixed with CM. As previously described, PP fraction was composed of native aggregates formed by weak interactions and disulfide bonds while WP contained native individual whey proteins as particles with a diameter of a few nanometers. The comparison of the size distribution curves in light intensity of untreated CM-PP mixture (CM-PP) and CM-PP mixture treated with protocol 1 ((CM-PP) P1) showed a shift to lower size of the monomodal distribution resulting in a reduction of the mean diameter from 293 nm to 232 nm (**Figure III.13, e, f; Tableau III.7**). This size decrease induced by the heat treatment was also observed on the size distribution in number frequency with a reduction of the largest particles. The size distribution curves in light intensity and frequency number of (CM-PP) P1 mixture was finally very similar to those of the CM HT which resulted in not significantly different mean diameters for (CM-PP) P1 and CM HT (**Figure III.13, 2e, f; Tableau III.7**). No new bands were observed on non-reducing and reducing SDS-PAGE gels concerning (CM-PP) P1 (**Figure III.14, b, c – lane 5**), which indicated that no new complexes between pea protein and casein micelles were created. As (CM-WP) P1 mixture was characterized by a significantly ( $p < 0.05$ ) higher hydrophobicity compared to untreated CM-PP mixture, it appeared that the protocol 1 generated an interactive potential *via* higher hydrophobic interactions that could be interesting in the gel process. The impact of the protocol 2 on the characteristics of the CM-PP mixture led to obtain particles larger than particles of CM HT and (CM-WP) P1 mixture (**Figure III.13, e, f; Tableau III.7**). The surface thiol groups and disulfide bonds of (CM-PP) P2 mixture were not significantly more numerous compared to those of the untreated CM-PP mixture indicating that the protocol 2 did not induce phenomena involving thiol groups such as disulfide bonds (**Figure III. 15**).



**Figure III.15.** Surface thiol groups (a) and disulfide bonds (b) of untreated pea protein (PP), whey protein (WP) and casein micelle (CM), heated (85 °C for 1 h) pea protein (PP HT), whey protein (WP HT) and casein micelle (CM HT) and mixtures CM-PP and CM-WP treated by the two heat treatment protocols: protocol 1 (P1) and protocol 2 (P2). Means of triplicate plus standard deviation are shown. Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

The same technological route (protocol 1) applied to native CM-WP mixture induced a significant ( $p < 0.05$ ) increase of the particle mean diameter from  $254 \pm 6$  nm to  $313 \pm 4$  nm in light intensity (Figure III.13, g; Tableau III.7) in accordance with Anema & Li (2003). Regarding the electrophoretic pattern of (CM-WP) P1 under non-reducing conditions, the bands corresponding to  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin disappeared whereas large polypeptides ( $M_w > 260$  kDa) was observed (Figure III.14, d – lane 9). When reducing conditions were

applied on SDS-PAGE, the band pattern was similar to that of the original fractions (**Figure III. 14, e – lane 9**). In the same time for (CM-WP) P1, a higher amount of disulfide bonds associated to a lower thiol free was observed compared to the untreated CM-WP mixture (**Figure III.15, b**). These heat-induced changes were attributed to direct interactions of  $\beta$ -lactoglobulin with  $\kappa$ -casein but also the formation of soluble aggregates created mainly by interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin which then interacted with casein micelles *via* disulfide bonds and also hydrophobic and ionic interactions (**Corredig & Dalgleish, 1999**). Concerning (CM-WP) P2, the first heat treatment applied to WP alone led to whey protein aggregates involving disulfide bonds which reduced the direct interactions of  $\beta$ -lactoglobulin with  $\kappa$ -casein on casein micelle surface during the second heating stage. Consequently, the mean size of (CM-WP) P2 was significantly lower than that of (CM-WP) P1.



**Figure III.16.** Surface hydrophobicity of untreated pea protein (PP), whey protein (WP) and casein micelle (CM), heated (85 °C for 1h) pea protein (PP HT), whey protein (WP HT) and casein micelle (CM HT) and mixtures CM-PP and CM-WP treated by the two heat treatment protocols: protocol 1 (P1) and protocol 2 (P2). Bars with different letter significantly differ ( $p < 0.05$ ). Means were of triplicate determinations.

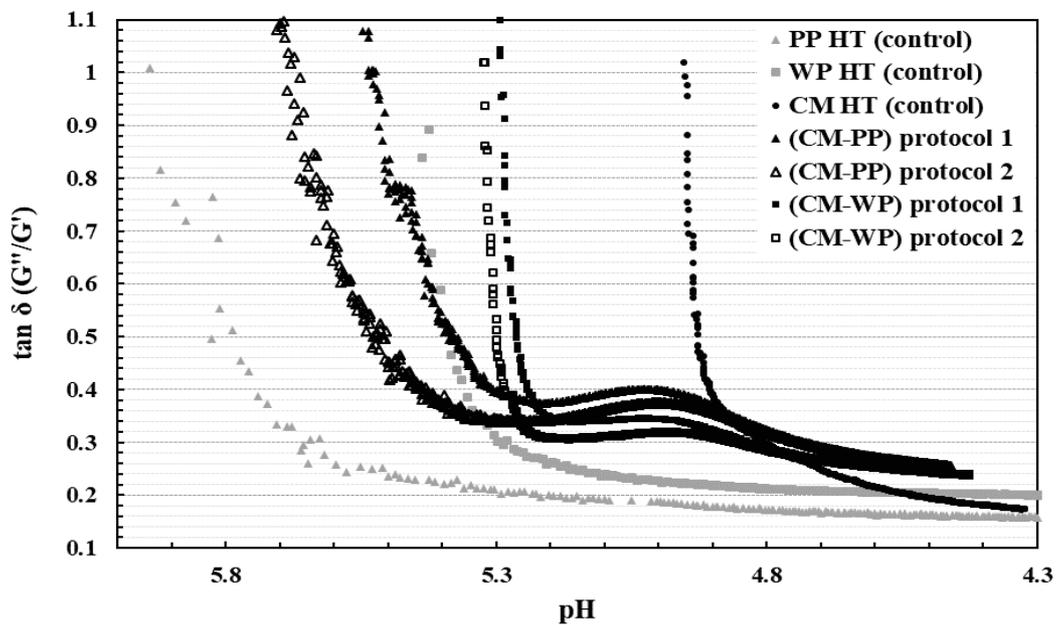
### 3.2. Acid gelation of heat-treated protein mixtures

#### 3.2.1. Rheological behavior of heat-treated protein mixtures

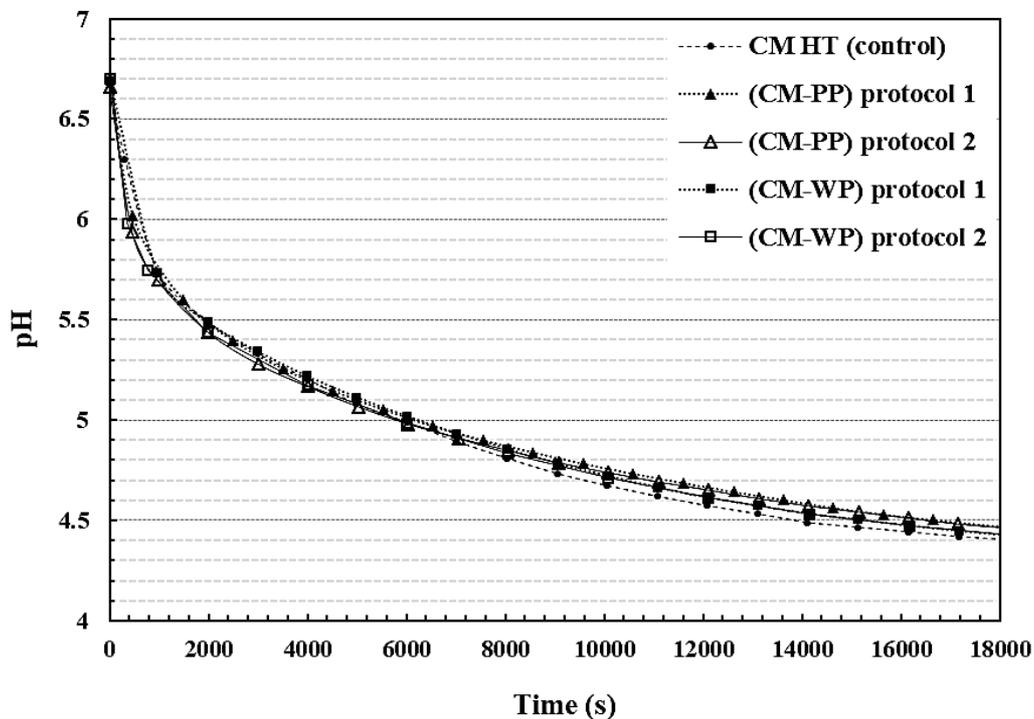
The rheological behavior of the different heat-treated protein mixtures was compared with each other and also with the individual protein dispersions (PP, WP and CM) to evaluate

the effect of the protein mixtures composition and of the heat treatment protocols on the formation of acid-induced gels. The rheological parameters during acidification of the different samples and the viscoelastic properties of the protein gels at the gel point and after 5 h of acidification are presented in **Figure III.17** and **tableau III.8**, respectively. For all samples, a rapid decrease in pH was observed during the first 20 min of acidification characterized by a similar initial rate of acidification (**Figure III.18**). The gel point ( $\tan \delta = 1$ , indicative parameter of the sol-gel transition) of (CM-PP) P1 and (CM-PP) P2 mixtures was reached almost three times faster compared to acid-induced gelation of CM HT dispersion and approximately 1.5 times compared to (CM-WP) P1 and (CM-WP) P2 mixtures (**Tableau III.8**). This more rapid sol-gel transition in the case of the (CM-PP) P1 and (CM-PP) P2 is probably associated to the influence of the PP aggregates pI allowing a gel point pH higher of 0.5 unit compared to CM HT gel point. Even if no significant difference was observed between the gel point parameters of (CM-PP) P1 and (CM-PP) P2, the storage modulus of (CM-PP) P1 at the final acidification point was significantly ( $p < 0.05$ ) higher compared to (CM-PP) P2 (**Tableau III.8**). As expected, the gel point time of (CM-WP) P1 and (CM-WP) P2 mixtures was observed significantly ( $p < 0.05$ ) earlier compared to CM HT (**Tableau III.8**) since acid-induced gelation begins at a higher pH ( $\sim$  pH 5.4) due to the presence of denatured whey proteins, particularly  $\beta$ -lactoglobulin and whey protein/k-casein aggregates (**Anema, Lee, Lowe, & Klostermeyer, 2004; Donato, Alexander, & Dalgleish, 2007; Nicolai, 2019**) and to the higher hydrophobicity of WP HT aggregates as also reported by **Morand, Guyomarc'h, Legland, & Famelart (2012)**. As in the case of CM and PP mixtures, no significant difference was noticed concerning the pH and  $G'$  at the gelation point between (CM-WP) P1 and (CM-WP) P2 mixtures but  $G'$  after 5 h of gelation was significantly higher for (CM-WP) P2 compared to (CM-WP) P1. This difference observed in the case of the two types of mixtures, CM with PP or WP, could be attributed to the difference in surface free thiol groups before acidification, a higher level of surface free thiol groups favoring a higher storage modulus at the final acidification point. The  $\tan \delta$  evolution according to pH after gel point for (CM-PP) P1 and (CM-PP) P2 was characterized by a shoulder around pH 5. **Mession, Roustel, & Saurel (2017b)** showed that the acid-induced gelation of the heated CM-fractionated vicilin or unheated CM-PP aggregates mixtures led to a higher final storage modulus compared to single protein gels, whereas, the presence of large and sedimentable aggregates in the case of the CM-PP and CM-legumin mixtures impaired gelation. This work revealed a net reinforcement of the gel network after addition of PP to the CM and a significant higher  $G'$  after 5 hours of acidification compared to the CM-WP mixtures. These gels characteristics may be due to differences in the size, number

of aggregates or combination of both. These significant differences were also related to the type, nature and strength of interactions governing the gel structure.



**Figure III.17.** Evolution of  $\tan \delta (G''/G')$  as a function of pH during acidification of the different samples. Acidification carried out with 2% (w/w) GDL for 5 h at 25 °C.



**Figure III.18.** Representative acidification kinetics of heat-treated casein micelle (CM HT), casein micelle-pea protein mixture (CM-PP) and casein micelle-whey protein mixture (CM-WP) treated by the two heat treatment protocols: protocol 1 (P1) and protocol 2 (P2). Acidification carried out with 2% (w/w) GDL for 5 h at 25 °C.

### 3.2.2. Texture and water holding capacity of acid gels

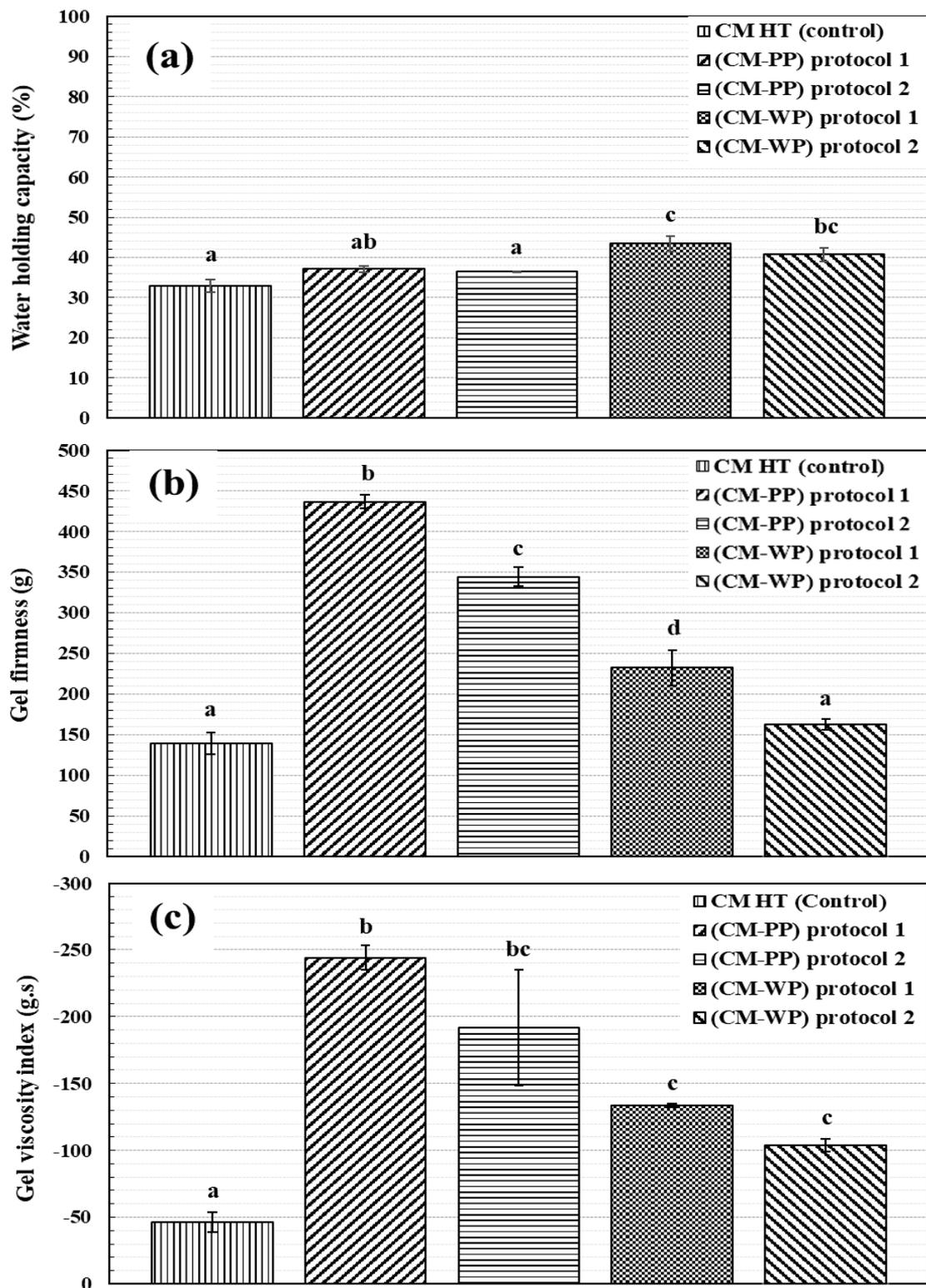
The texture profile (gel firmness and viscosity index) and water holding capacity (WHC) of the acid-induced gels obtained from (CM-PP) and (CM-WP) mixtures were investigated and compared to those of CM HT gels as control (**Figure III.19**). Uniform gels obtained from (CM-PP) mixtures were characterized by a significant higher firmness and viscosity index than those obtained with CM control or heat-treated (CM-WP) mixtures. However, the greatest strength of the CM-PP gel protein network did not result in an improving of the water holding capacity compared to control gels. This suggested that the interactions established during the acidification and gelation of the heat-treated (CM-PP) mixtures allowed the coexistence of two independent gels stabilized by low-energy interactions that did not promote water retention in gel network after the centrifugation test. In contrast, the gels formed with heat-treated (CM-WP) mixture were more homogeneous and more stable, with a better affinity to water.

**Tableau III.8.** Rheological parameters of acid-induced gelation (2% (w/w) GDL at 25 °C) of heated casein micelle dispersion (CM HT, 3%, (w/w)), (CM-PP) and (CM-WP) mixtures (4% (w/w) total protein and 7.5:2.5 protein ratio) heat-treated according to the protocol 1 (P1) and protocol 2 (P2).

		CM HT	(CM-PP) P1	(CM-PP) P2	(CM-WP) P1	(CM-WP) P2
Gel point	Time (s)	5290 ± 131 <sup>a</sup>	1790 ± 85 <sup>b</sup>	1900 ± 82 <sup>b</sup>	3358 ± 46 <sup>c</sup>	2765 ± 26 <sup>d</sup>
	pH	4.94 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.53 ± 0.05 <sup>b</sup>	5.46 ± 0.06 <sup>b</sup>	5.29 ± 0.06 <sup>c</sup>	5.32 ± 0.03 <sup>c</sup>
	G' (Pa)	0.27 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.04 <sup>a</sup>
Final point (5h of acidification)	pH	4.33 ± 0.08 <sup>a</sup>	4.47 ± 0.02 <sup>b</sup>	4.46 ± 0.05 <sup>b</sup>	4.43 ± 0.09 <sup>ab</sup>	4.43 ± 0.02 <sup>ab</sup>
	G' (Pa)	160 ± 7 <sup>a</sup>	726 ± 11 <sup>b</sup>	622 ± 60 <sup>c</sup>	429 ± 11 <sup>d</sup>	516 ± 16 <sup>e</sup>

Results expressed as mean ± standard deviation (n=3).

<sup>(a-c)</sup> Values followed by different letters within a lane are significantly different (p < 0.05).



**Figure III.19.** Water holding capacity (a), gel firmness (b) and gel viscosity index (c) of acid-induced gels from heat treated casein micelle (CM HT), casein micelle-pea protein mixture (CM-PP) and casein micelle- whey protein mixture (CM-WP) treated by the two heat treatment protocols: protocol 1 (P1) and protocol 2 (P2). Acidification carried out with 2% (w/w) GDL for 5h at 25 °C. Bars with different letter significantly differ ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Conclusion

Heat treatment of PP induced a decrease in particle size and participated in an increase in surface hydrophobicity and thiols through the exposure of hydrophobic groups and sulfur-containing amino acid residues naturally present in native aggregates. On the other hand, heat treatment of the WP revealed an increase in particle size and surface hydrophobicity compared to the native proteins. These large aggregates were enhanced by the establishment of covalent bonds.

For the (CM-PP) Protocol 1 mixture, the application of heat treatment did not change the size of the micelles, presuming an absence of interaction between soluble pea proteins and micelles. In contrast, the same treatment applied to a mixture of pretreated proteins (CM-PP) Protocol 2 caused an increase in micelle size that can be justified by an increase in the surface hydrophobicity of the heat-treated pea protein aggregates that could interact with the casein micelles through hydrophobic bonds.

For both WP and CM mixtures, and as demonstrated by SDS-PAGE and size measurements, both protocols induced the association of these proteins through the establishment of hydrophobic and covalent interactions with  $\kappa$ -casein on the surface.

The properties of the casein gels obtained by acidification were strongly affected by the type of the soluble proteins (WP or PP) and their aggregated forms. Stiffer and firmer gels with faster gel setting times were obtained for PP and CM mixture, which seems to demonstrate that PP interacts with each other first to form a gel that is independent of the CM gel created at lower pH. These PP gels would likely be trapped in the milk gel, thus acting as a "space-filling gel" in contrast to the mixed WP and CM gels that are formed with complexes of these two proteins stabilized by covalent interactions. Thus, these results showed that pea proteins are interesting functional ingredients for food product formulations.

### III.2.2. Évaluation de la stabilité des gels acides mixtes

La stabilité dans le temps des gels acides de type yaourt est recherchée par les entreprises qui les fabriquent afin d'apporter aux consommateurs un produit stable, n'évoluant pas durant la période de stockage afin d'éviter l'apparition de défauts comme de la synérèse en surface des gels ou des textures hétérogènes et évolutives au cours du temps. De nombreux travaux existent dans la littérature décrivant d'une part les solutions existantes pour renforcer la stabilité des gels acides laitiers (addition d'agent de texture, impact du procédé de fabrication) et d'autre part les méthodes pour suivre et évaluer cette stabilité, dont les analyses de texture et/ou de suivi de la synérèse au cours du temps par exemple (**Bierzuńska et al., 2019 ; Galante et al., 2018 ; Laneuville & Turgeon, 2014**). Des études de la stabilité des gels à base de protéines végétales existent, dont certaines sur les gels à base de protéines de pois obtenues par traitement thermique (**Tanger et al., 2022 ; Sun et al., 2010**), mais aucun travail a été réalisé sur les gels acides mixtes protéines lactières / isolat de protéines de pois, étude intéressante à traiter dans le cadre de ce travail de thèse.

Les paramètres intervenant directement sur la structure de gels acides et leur résistance lors de leur conservation dans le temps sont nombreux : la nature des protéines à l'origine de la formation du gel, leur structure au moment de la gélification (native, dénaturée, monomérique, agrégée, etc. en fonction des traitements subis), leur capacité à interagir entre elles pour former des gels capables d'emprisonner la phase aqueuse (*via* des interactions de faible ou forte énergie en fonction d'un éventuel prétraitement ou du procédé de gélification appliqué), la cinétique de la prise en gel (modulée par les conditions opératoires de gélification), etc.

En guise d'illustration, il est connu que les caractéristiques physico-chimiques des gels laitiers peuvent être modifiées ou améliorées par différents traitements physiques tels que les températures élevées, les pressions, les micro-ondes, les ultrasons ou chimiques (**Section I.2.2.3** du manuscrit). Il en est de même pour les gels obtenus à partir de protéines de pois (**Sun et al., 2012**).

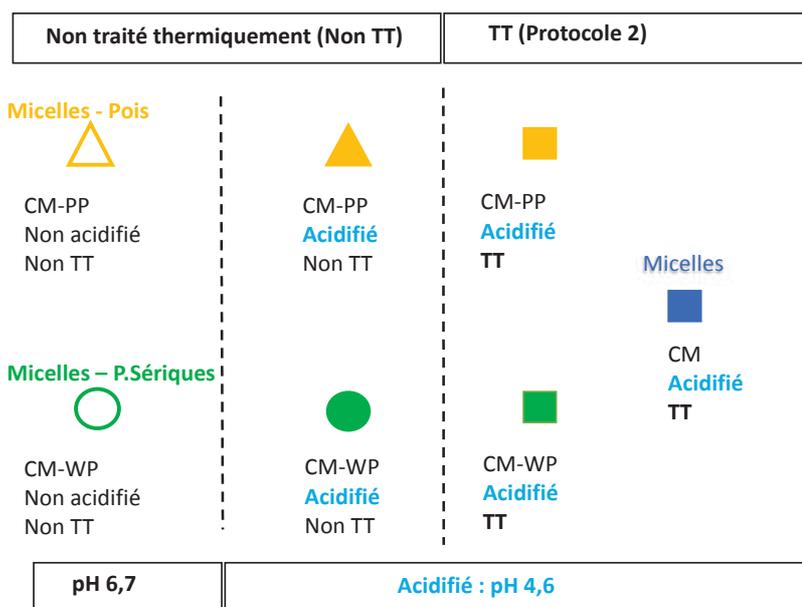
Le remplacement partiel des protéines animales par des protéines végétales dans les aliments transformés amène aujourd'hui les chercheurs à étudier la formation de ces gels mixtes afin d'optimiser leurs propriétés fonctionnelles, notamment de gélification. Dans le cadre des produits laitiers, la substitution partielle de protéines lactières par des protéines végétales doit éviter, lors du traitement technologique appliqué, que les interactions protéine-protéine mises en place suivent des voies amenant à la séparation de phase due à une incompatibilité

thermodynamique ou à la précipitation de certaines protéines dues à la nature des interactions mises en place lors de la gélification (Ainis et al., 2018).

Une fois que la mise en place des interactions entre protéines végétales et animales est maîtrisée, les gels obtenus sont analysés par des méthodes bien connues telles que la rhéologie et l'analyse de la texture. Cependant, ces techniques ne fournissent pas d'informations approfondies sur la nature des liaisons qui forment le gel et qui le stabilisent dans le temps. De ce fait, les méthodes d'investigation et d'analyse des types d'interactions établies lors de la formation de la structure tridimensionnelle des gels représentent un intérêt certain. Parmi ces méthodes, certaines consistent à utiliser des agents bloquants des interactions spécifiques entre les protéines afin d'observer leur impact sur la texture des gels produits et par voie de conséquence, de déduire l'importance de leur rôle dans la construction du gel et sa stabilisation dans le temps (Tanger et al., 2022). D'autres méthodes consistent à mesurer le taux de solubilité des protéines après dissolution du gel dans des solutions dispersantes contenant des agents qui ciblent spécifiquement chaque type d'interaction et dissocient les protéines. Par exemple, le SDS et l'urée sont ajoutés pour rompre les liaisons de faible énergie (respectivement hydrophobes et hydrogène) alors que le  $\beta$ -mercaptoéthanol ou le DTT réduisent les ponts disulfures. Ces méthodes sont citées dans la littérature comme pouvant être adaptées à différents systèmes protéiques comme les gels de protéines lactosériques et de pois (Felix et al., 2017 ; Shimada & Cheftel, 1988, Marchesseau & Cuq, 1995, Lefebvre-Cases et al., 1998).

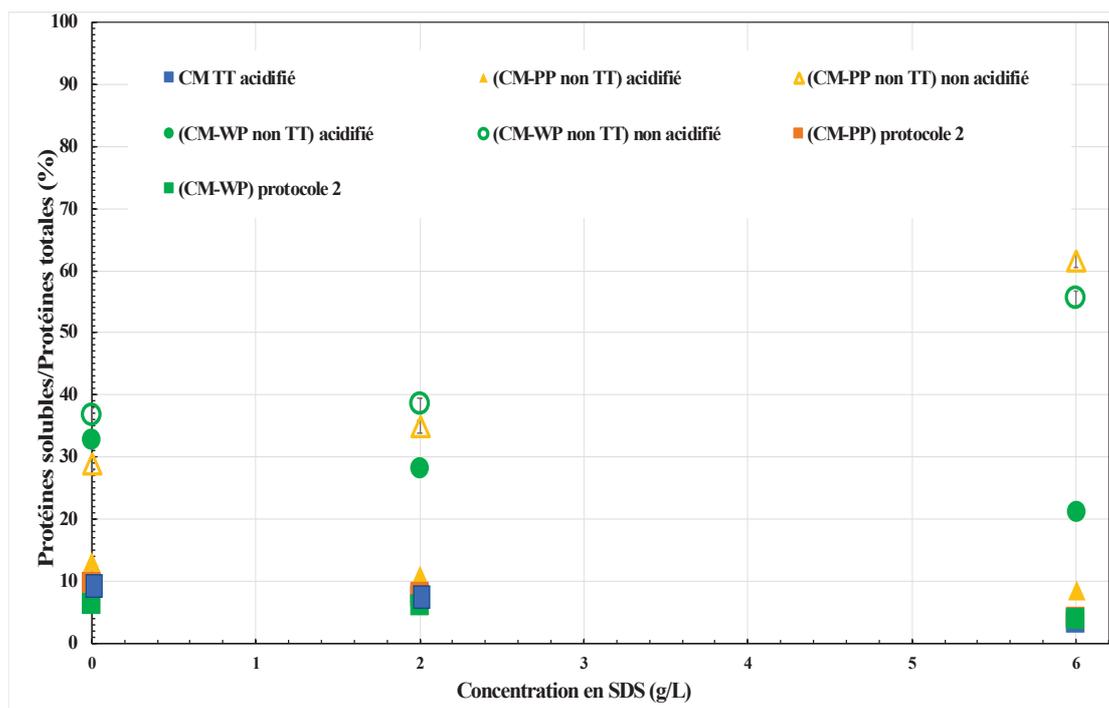
### III.2.2.1. Etude de la stabilité des gels par ajout d'un agent dissociant

L'objectif de cette partie est d'évaluer la nature des principales interactions impliquées dans la formation de gels issus d'une acidification des dispersions de mixtes de micelles de caséines et de protéines solubles (protéines de pois/ou lactosériques) et d'étudier l'impact d'un traitement thermique appliqué sur la nature des interactions formées et la rigidité des gels. Ainsi, les échantillons représentés sur la **figure III.20A** ont été analysés.



**Figure III.20A.** Représentation des différents échantillons de mixtes micelles de caséine (CM) et protéines de pois (PP) ou protéines lactosérique (WP) notés CM-PP ou CM-WP, acidifiés à pH 4,6 ou non (pH 6,7), ayant subi ou pas de traitement thermique à 85 °C et pendant 1 h (TT ou non TT).

La procédure expérimentale consiste à étudier l'effet de l'ajout d'un agent dissociant à différentes concentrations (0, 2 et 6 g/L de SDS) sur la solubilisation des protéines. Pour cela, une fois que l'agent chimique est ajouté, une ultracentrifugation ( $86,000 \times g$ , 32 min) permet de précipiter les gels ou agrégats non dissociés et de récupérer le surnageant afin doser les protéines devenues solubles suite à ce traitement. La technique utilisée repose ainsi sur l'aptitude des réseaux de protéines à résister à l'action dissociante du SDS agissant principalement sur les interactions hydrophobes. Afin de faciliter l'action de l'agent dissociant, le gel additionné de la solution dénaturante a été homogénéisé à ultra-turrax (T 25; IKA-Technologie de laboratoire, Janke et Kundel, Staufen, Allemagne) à une vitesse de 9000 rpm pendant 1 min comme décrit dans plusieurs travaux (Gómez-Guillén et al., 1997 ; Shimada et Cheftel, 1988). Les résultats de la solubilité des protéines en fonction de la concentration en SDS sont présentés dans la **figure III.20B**.



**Figure III.20B.** Effet de l'action dissociante (solution de SDS) sur la solubilité des protéines issues de différentes dispersions : impact du traitement thermique et de l'acidification sur la nature des interactions et sur la rigidité des gels.

En absence d'agent dissociant SDS (0 g/L), les mélanges de protéines de pois/micelles de caséines et protéines lactosériques/micelles de caséines non traités thermiquement et non acidifiés présentent des taux de solubilité des protéines dans l'eau respectivement de 29 % et 37 %. Ces valeurs sont proches des concentrations en protéines solubles présentes initialement dans les mélanges constitués (ratio 2,5 (protéines solubles de PP ou WP) : 7,5 (micelles de caséine)), mais restent légèrement supérieures à 25 % du pourcentage attendu. Cet écart significatif de solubilité de  $\approx 4$  % pour les mélanges CM-PP et de  $\approx 12$  % pour les mélanges CM-WP peut correspondre à la présence d'une concentration résiduelle en protéines lactosériques dans la dispersion initiale de micelles de caséines et à une solubilisation de caséines individualisées suite à l'étape d'ultracentrifugation. La différence de pourcentage en protéines solubles des deux mélanges peut s'expliquer par le poids moléculaire des protéines de pois qui est beaucoup plus élevé que celui des protéines sériques pour certaines fractions. Ces protéines et les agrégats qu'elles peuvent former entre elles, sédimentent donc lors de l'étape d'ultracentrifugation et représentent donc un pourcentage de 8 % de plus que pour les protéines sériques.

Après acidification des mélanges non traités thermiquement (CM-PP non TT et CM-WP non TT), le taux de solubilité diminue de façon conséquente pour les mélanges contenant

des protéines de pois (CM-PP) pour passer de 29 % à 13 % et de façon beaucoup plus faible pour les mélanges contenant des protéines sériques (passage de 37 à 32 % de solubilité). Cette baisse de pH révèle l'importance de la réduction des charges négatives sur la formation des interactions électrostatiques attractives entre les protéines solubles et les micelles de caséines. Pour les protéines solubles du lait, la faible diminution montre que l'acidification n'implique que très peu de protéines solubles dans la formation du gel et qu'une grande partie reste soluble.

Pour les protéines de pois, cette acidification insolubilise un taux plus élevé de protéines, laissant penser que les interactions électrostatiques sont importantes pour la structuration du gel acide mixte obtenu, et qu'elles doivent de même faciliter, par ce rapprochement, l'établissement d'autres interactions de faible énergie du type hydrophobes et hydrogène.

Par contre, tous les échantillons traités thermiquement révèlent une solubilité beaucoup plus faible, proche ou inférieure à 10 %, ce qui démontre l'impact du procédé de traitement thermique préalable à l'acidification sur la dénaturation des protéines solubles provoquant l'exposition des groupements hydrophobes et la formation d'interactions supplémentaires. Pour les protéines sériques, le pourcentage de protéines solubles est très faible ( $\approx 6\%$ ), indiquant qu'en plus du renforcement des interactions hydrophobes, l'établissement de ponts covalents de type pont disulfures a été rendu possible entre les protéines solubles entre elles, mais aussi avec les protéines de surface de la micelle de caséines (**Corredig & Dalgleish, 1999 ; Donato & Guyomarc'h, 2009**). Par contre, la diminution est plus faible pour le pois (passage de 13 % à 10 % lors du traitement thermique), ce qui supposerait que les liaisons disulfures sont moins impliquées dans la structuration du gel CM-PP. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui ont suggéré qu'une coopération entre les divers types d'interactions est nécessaire pour la stabilisation du réseau de gel formé par acidification (**Lucey & Horne, 2018 ; Marchesseau et al., 1997**).

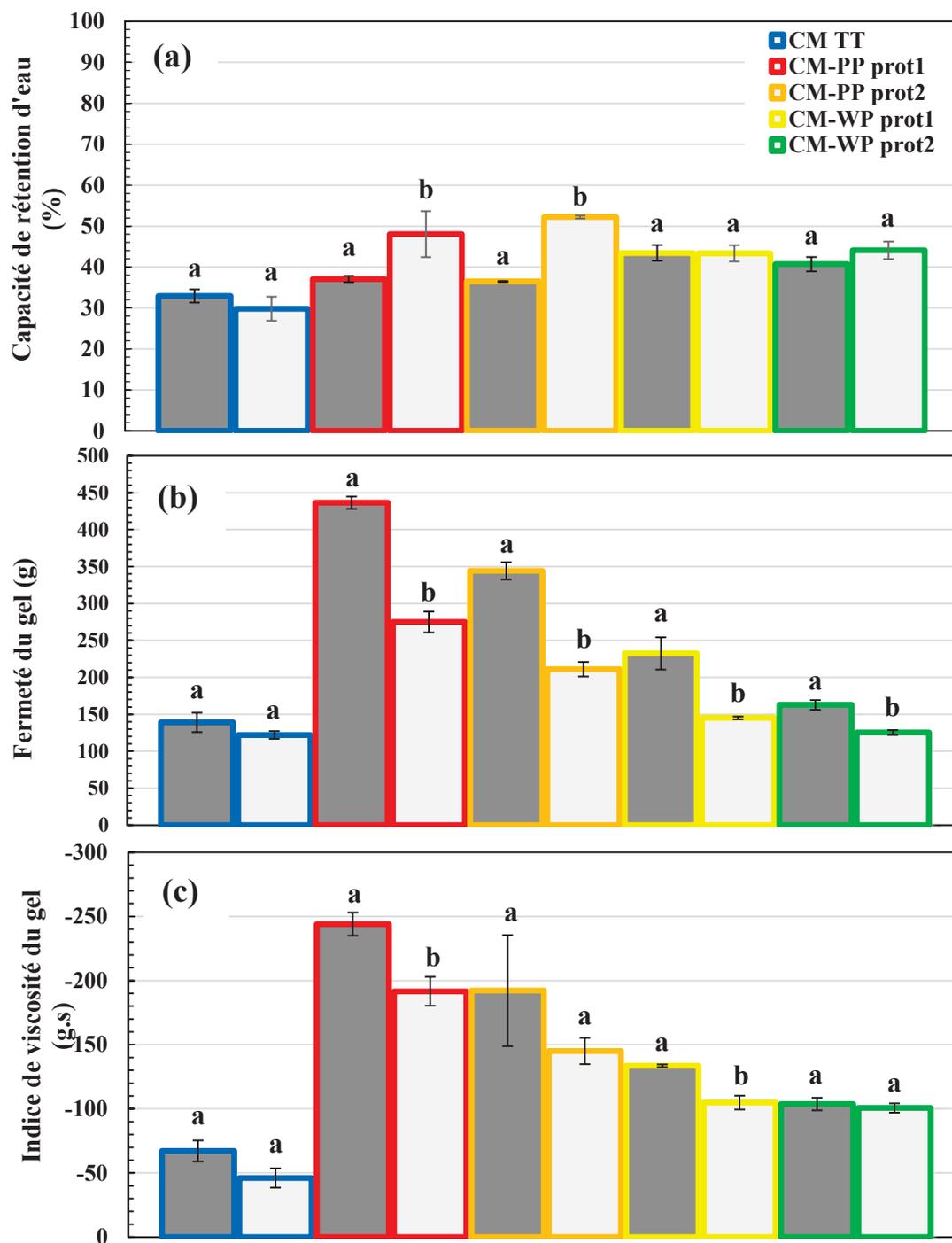
En présence de SDS à une concentration de 2 g/L, une légère augmentation de la solubilité des mélanges non acidifiés et non traités thermiquement (CM-PP non TT) et (CM-WP non TT) qui passent de 29 % à 35 % pour le mélange avec les protéines de pois (augmentation de 6 %) et de 37 à 39 % pour les mélanges avec les protéines sériques. L'action du SDS se caractérise par une rupture des interactions hydrophobes en agissant particulièrement avec les groupes non polaires des chaînes latérales d'acides aminés et en imposant des répulsions avec son groupement sulfate chargé négativement au pH du lait. Par contre, pour tous les échantillons acidifiés, la concentration de 2 % n'est pas suffisante pour dissocier les

protéines, que ce soit dans les mélanges contenant des protéines de pois et des protéines sériques, indiquant que la structure des gels n'est pas essentiellement construite avec des interactions hydrophobes et donc renforcée par d'autres types d'interactions. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de **Roefs & van Vliet (1990)** qui ont constaté que les interactions électrostatiques dominaient lors de la gélification du lait obtenue par acidification.

Enfin, lors de l'utilisation du SDS à une concentration élevée de 6 g/L, seuls les échantillons non traités thermiquement et non acidifiés présentent des taux de solubilisation élevés respectivement de 56 % et 61 % pour les CM-WP et les CM-PP indiquant la déstabilisation des interactions hydrophobes qui maintiennent la micelle et la solubilisation de caséines les plus hydrophobes, dont notamment la caséine- $\kappa$ . Par contre, pour tous les échantillons acidifiés, traités thermiquement ou non, le taux des protéines solubles reste faible et quasiment constant ce qui confirmerait l'importance des interactions électrostatiques dans la structuration des gels acides. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Lefebvre-Cases et al. (1998)** qui ont remarqué que l'ajout de 6 g/L de SDS après acidification d'un lait non traité thermiquement permettait une bonne solubilisation des protéines. Certains travaux (**Paula Vilela & al., 2020**) montrent que l'action du SDS sur la solubilisation des protéines gélifiées nécessiterait un chauffage et une agitation thermique des chaînes moléculaires. Il est à noter que le groupement  $\text{SO}^{3-}$  du SDS en milieu acide est probablement moins efficace qu'au pH du lait du fait de la neutralisation d'une partie de la charge. Par ailleurs, tous les échantillons ayant subi un traitement thermique présentent de très faibles taux de dissociation du fait de la présence de ponts disulfures dans la construction du gel (**Tanger et al., 2021**). La rigidité et la force des gels mixtes sont ainsi nettement améliorées lors du chauffage des protéines avant l'acidification, que ce soit pour l'ajout de protéines de pois ou de protéines sériques.

La **figure III.21** représente la stabilité dans le temps (après 7 jours de stockage) des gels mixtes formés suite à l'application d'un traitement thermique et d'une acidification comme décrits dans la **partie III.2.1**. Ce paramètre est déterminant lors de l'évaluation de la qualité du produit final pour une utilisation à l'échelle industrielle.

### III.2.2.2. Etude de la stabilité des gels en fonction du temps



**Figure III.21.** Comparaison de la stabilité des gels dans le temps après 1 jour (Gris foncé) et 7 jours (Gris clair) de stockage à 4 °C pour l'étude des propriétés suivantes : (a) : la capacité de rétention d'eau (%), (b) : la fermeté du gel (g) et (c) : l'indice de viscosité du gel (g.s). Les gels ont été préparés à partir d'une dispersion de CM à 3 % (p/p) (contrôle) chauffée et de leurs mélanges avec PP ou WP à 4 % (p/p) de concentration totale (rapport de protéines de 7,5 : 2,5), traités thermiquement avec les deux protocoles (protocoles 1 et 2). Les histogrammes pris deux à deux diffèrent significativement ( $p < 0,05$ ) lorsque la lettre est différente.

Les gels acides formés à partir de mélanges contenant les micelles de caséines et les protéines sériques présentent la plus forte capacité de rétention d'eau après 1 jour de stockage (**Figure III.21, a**) et n'évolue pas significativement après 7 jours de stockage. Par contre, la capacité de rétention d'eau des gels contenant des protéines de pois (CM-PP) augmente significativement ( $p < 0,05$ ) quel que soit le protocole utilisé (protocole 1 ou 2) après 7 jours de stockage, pour devenir supérieure à celle des CM-WP. Bien que les phénomènes qui se produisent au cours de la synérèse de gels mixtes ne soient pas totalement décrits et détaillés dans la littérature (**Omrani Khiabani et al., 2020**), cette augmentation pourrait être due à la réorganisation structurale et conformationnelle des caséines associées aux protéines de pois qui piègeraient plus de molécules d'eau à l'intérieur du réseau. Cet effet aurait pour conséquent de diminuer la fermeté des gels comme le montre la **figure III.21-b** et de participer à la diminution de l'indice de viscosité, avec des réseaux plus hydratés et donc moins ferme.

Cette étude sur la stabilité des gels après 7 jours de stockage a confirmé que les protéines de pois améliorent la fermeté des gels mixtes acides (CM-PP) mais que leur stabilité dans le temps évoluait rapidement par rapport à celle des gels CM-WP. Cette stabilité est impactée en termes de fermeté avec une diminution de 30 à 40 % après 7 jours de stockage et en termes de capacité de rétention d'eau avec une aptitude plus grande (augmentation de  $\approx 20$  % de la capacité de rétention d'eau) après 7 jours. L'impact des différents traitements thermiques et des différentes sources de protéines solubles des mélanges sur les paramètres de texture et la stabilité des gels acides est donc important. L'ajout des protéines de pois apporte plus de fermeté mais induit une évolution plus rapide au cours du stockage avec une augmentation de la capacité à retenir l'eau et une diminution de la fermeté.

## Synthèse

L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre a été d'étudier l'influence de deux protocoles de traitement thermique sur les propriétés d'interaction et d'association des micelles de caséines (CM) mélangées à des protéines solubles de pois (PP) provenant d'un isolat commercial (PPI) dans des conditions similaires aux conditions naturelles de protéines du lait bovin, avec une concentration totale de 4 % (p/p) à pH 6,7 et à un ratio protéique respectivement de 7,5:2,5. Les différents assemblages protéiques formés ont été caractérisés par des techniques biochimiques et physico-chimiques, puis comparés à des mélanges modèles de protéines laitières préparées dans les mêmes conditions. Les attentes de ces recherches étaient d'élaborer des gels mixtes par acidification de ces différents assemblages pour, d'une part réduire la part des protéines animales dans un produit laitier gélifié au profit de protéines végétales et d'autre part, comprendre les interactions établies entre les deux types de protéines pour apporter de nouvelles propriétés fonctionnelles à cette association protéique hybride.

Le premier protocole a consisté à traiter thermiquement (85 °C/1 h), au-delà des températures de dénaturation thermique des protéines impliquées, les mélanges de protéines solubles de pois et de micelles de caséines natives. Le second protocole a reposé sur l'application du même traitement thermique sur un mélange de protéines déjà pré-dénaturées thermiquement à 85 °C pendant 1 h. Les techniques électrophorétiques (SDS-PAGE) et de mesure de la taille des particules (PCS) ont permis de mettre en évidence la composition des sous-unités constitutives des deux matières premières étudiées en fonction de la nature des traitements appliqués, ainsi que leurs associations en étudiant leur taille, les différents types d'interactions impliquées et la structure des gels acides obtenus (rétention d'eau, rigidité et fermeté du gel). Il s'est avéré que les particules protéiques présentes dans les dispersions natives de protéines de pois solubles étaient sous une forme compacte et agrégée, assemblages renforcés par des liaisons non-covalentes. Ces agrégats dits natifs étaient composés principalement de fractions de globulines à savoir : les légumines, les vicilines et les convicilines. Par ailleurs, les protéines lactosériques étaient sous leur forme native dans les dispersions, composées de fractions individuelles de  $\beta$ -lactoglobuline, d' $\alpha$ -lactalbumine et de BSA.

Le traitement thermique du PP soluble a provoqué une diminution de la taille des particules (29 nm à 22 nm) et a participé à l'augmentation de manière significative de son hydrophobie (+ 15 %) et de ses thiols de surface (+ 7 %) grâce à l'exposition des groupements

hydrophobes et des résidus d'acides aminés soufrés naturellement présents dans les agrégats natifs. D'autre part, le traitement thermique des WP a induit une augmentation significative de la taille des particules (2 nm à 40 nm) et de leur hydrophobie de surface (+ 43 %) par rapport aux protéines natives. Ces agrégats de taille importante ont été renforcés par l'établissement de liaisons covalentes.

Ainsi, les deux protéines globulaires se sont comportées différemment face au traitement thermique, avec la dissociation d'agrégats natifs structurés par des liaisons de faible énergie dans le cas du pois, et la génération d'agrégats de plus grande taille structurés par l'établissement de liaisons covalentes pour les protéines solubles du lait. L'application de ce procédé thermique a donc réduit la différence importante de taille observée à l'état natif entre ces deux types de protéines solubles (29 nm pour le pois et 2 nm pour les protéines sériques) pour obtenir une différence plus faible avec une taille de 22 nm pour les agrégats de protéines de pois et de 40 nm pour ceux de protéines sériques).

Pour les mélanges de protéines de pois et de micelles de caséines, l'application d'un traitement thermique (Protocole 1) n'a pas modifié la taille des micelles, présageant d'une absence d'interaction entre les deux types de protéines. Par contre, le traitement thermique des micelles de caséines en présence des agrégats de PP traités thermiquement (Protocole 2) a provoqué une augmentation de la taille des micelles (de 159 nm à 221 nm). Cette augmentation peut se justifier par l'augmentation de l'hydrophobie de surface des agrégats de protéines de pois traités thermiquement qui semblent interagir avec les micelles de caséine par des liaisons hydrophobes.

Pour les mélanges de WP natives et de micelles de caséines, l'application d'un traitement thermique (Protocole 1) induit, comme attendu, une augmentation de la taille des micelles suite à la dénaturation des protéines sériques ( $\beta$ -lactoglobuline et d' $\alpha$ -lactalbumine) et leur association à la micelle par la mise en place d'interactions hydrophobes et covalentes avec la caséines- $\kappa$  en surface (de 159 nm à 219 nm). La formation d'agrégats thermiques de WP préalablement au traitement thermique des micelles de caséines (Protocole 2) produit des micelles de caséines de taille un peu plus petites (203 nm) que celles obtenues par le protocole 1 (219 nm), mais toujours supérieures celles des micelles de caséines seules traitées thermiquement, démontrant que l'interaction de ces agrégats avec la surface micellaire est toujours effective. La dénaturation préalable a probablement modifié la taille des agrégats, tout en gardant une interactivité importante avec la surface micellaire après chauffage.

L'étude de l'acidification sur ces mélanges de micelles de caséines (CM) et protéines végétales (natives (protocole 1) ou dénaturées (protocole 2) avant le traitement thermique préalable à la gélification acide) a montré que le système mixte PP-MC s'associait différemment du système WP-MC. En effet, l'ajout de WP, quel que soit le protocole utilisé, accélère le temps de gélification et la rigidité du gel après 5 h de coagulation ( $G' = 429$  Pa (protocole 1) et  $516$  Pa (protocole 2)) pour une valeur de  $160$  Pa lorsque le gel contient uniquement des caséines. De leur côté, les gels obtenus avec les mixtes de PP et CM atteignent des rigidités encore plus élevées après 5 h de coagulation ( $G' = 726$  Pa (protocole 1) et  $622$  Pa (protocole 2)), avec des temps de prise en gel encore plus rapides ( $1790$  s pour CM-PP (protocole 1) pour  $3358$  s (CM-WP protocole 1) contre  $5290$  s pour les gels témoin de micelles de caséines seules). Cette accélération des temps de prise se justifie par la différence de pI des caséines, WP et PP (respectivement de  $4,6 - 5,1 - 5,3$ ) qui semble démontrer que les PP interagissent entre elles en premier pour former un gel qui est indépendant du gel laitier initié à des pH plus bas, nos travaux ayant montré une absence d'interaction entre les micelles et PP. L'hypothèse avancée par ces résultats serait que ces gels PP se retrouveraient « emprisonnés » dans le gel laitier, jouant ainsi le rôle de « remplisseur » ou « space-filled gel » en améliorant la fermeté globale de la matrice (la fermeté est élevée ( $435$  g) pour le gel protocole 1). Pour les gels contenant des WP, ces protéines interagissent aussi en premier du fait de leur pI plus élevé que celui des caséines, mais étant associées par des ponts covalents aux micelles de caséines, le gel formé est mixte, présentant une bonne fermeté du fait de la présence d'interaction de forte énergie ( $235$  g pour le gel protocole 1), mais reste inférieure à celle des PP-CM car le gel ne possède pas de gel « remplisseur ».

La partie complémentaire à ces travaux, dédiée à l'étude de la stabilité des gels vis-à-vis d'agents dissociants, a permis de confirmer que les interactions mises en jeu lors de la gélification étaient renforcées suite à l'application du traitement thermique et que les gels « remplisseur » des gels mixtes contenant des protéines de pois n'étaient pas dissociés par l'action du SDS aux différentes concentrations étudiées, confirmant une diversité d'interaction, dont la présence de liaisons électrostatiques. L'étude sur la stabilité des gels après 7 jours de stockage a confirmé que les protéines de pois améliorent fortement la fermeté des gels mixtes acides (CM-PP) par rapport aux gels CM-WP, mais que cette fermeté n'était pas stable dans le temps et avait tendance à diminuer après 7 jours de stockage. La capacité de rétention d'eau est aussi améliorée pour les gels mixtes par rapport au gel de micelles de caséines, mais la

différence observée entre la nature des protéines (PP ou WP) est plus faible, ne permettant pas de conclure à un rôle bénéfique des protéines de pois sur cette fonctionnalité.

Ainsi, les résultats de cette partie ont montré que les protéines de pois sont des ingrédients fonctionnels intéressants à utiliser dans les formulations de produits alimentaires tels que les gels de types yaourts, apportant de la fermeté au gel acide et une augmentation de sa capacité de rétention d'eau.

### **III.3. Influence du traitement par haute pression dynamique sur les propriétés physicochimiques des protéines de pois et sur leurs propriétés de gélification dans le mélange micelles de caséines-protéines de pois**

Cette partie du chapitre a pour objectif d'étudier le double impact de la combinaison d'un traitement thermique et d'un traitement par haute pression dynamique sur les propriétés des mélanges de protéines. La haute pression dynamique (HPD) étant un procédé qui a connu ces dernières années un intérêt croissant dans la formulation de produits alimentaires grâce à son potentiel à modifier les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines, tout en préservant leurs saveurs, couleurs et valeurs nutritionnelles (Ngarize et al., 2005). Ces changements pourraient permettre une utilisation plus large des protéines de pois d'une part et d'autre part de les incorporer comme des substituts dans des matrices laitières pour améliorer leurs fonctionnalités. La HPD est un traitement non thermique qui a des effets importants sur les liaisons non covalentes (Nunes & Tavares, 2019), ce qui peut entraîner des changements conformationnels importants. De plus, chaque niveau de pression pourrait induire des modifications différentes dans la conformation quaternaire et tertiaire des protéines, voire même dans leur structure secondaire (Hu et al., 2021).

A cet effet, la stratégie suivie dans cette partie repose sur l'évaluation de l'influence de la HPD appliquée à différentes intensités (100 à 300 MPa) et avec un nombre de passage entre 1 et 3 à 300 MPa) sur les dispersions de protéines de pois dans un premier temps, puis sur la capacité d'association de ces particules traitées par HPD aux micelles de caséines grâce au procédé de traitement thermique appliqué (85 °C, 1 h). Les mélanges formés ont été caractérisés par différentes méthodes, puis gélifiés par acidification chimique. Les comportements des gels ont été étudiés et comparés aux gels de protéines de lait. La démarche expérimentale est présentée dans la **figure III.22**.

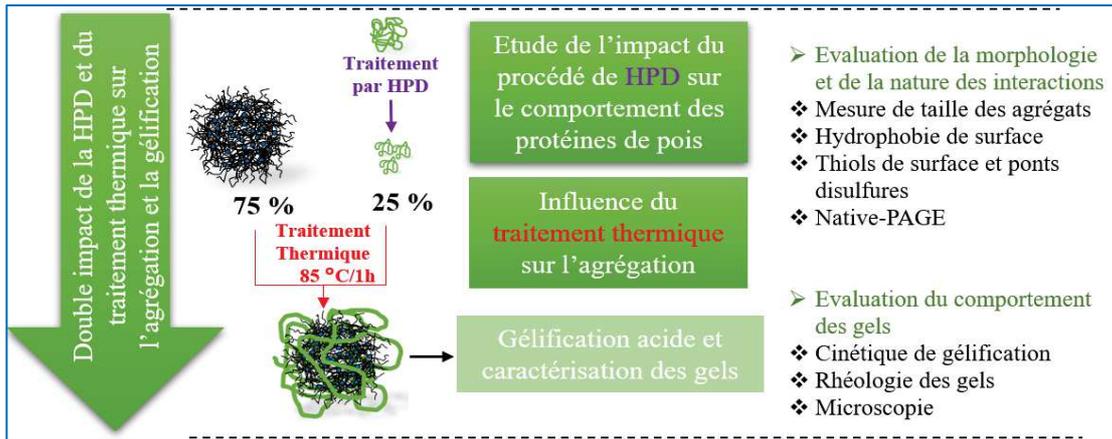


Figure III.22. Démarche expérimentale adoptée pour l'étude du double impact de la HPD et du traitement thermique sur l'agrégation mixte et leur influence sur la gélification par acidification.

### **III.3.1. Impact du traitement dynamique à haute pression sur les modifications des protéines globulaires et les propriétés de gélification acide du mélange micelles de caséines-protéines de pois comparé aux micelles de caséines-protéine lactosériques (Article 2).**

#### **Impact of dynamic high-pressure pre-treatment of soluble pea protein on their interaction with casein micelles after a heat treatment: influence on acid gels properties.**

##### **Abstract:**

Functionalization of casein micelles (CM) with a commercial pea protein isolate to generate new colloids with interesting functional properties for acid gelation was investigated. The present study focuses on the impact of dynamic high-pressure (DHP) processing on pea protein (PP) properties and on their association with casein micelle by heat treatment (HT) processing in comparison with whey proteins (WP). The impact of DHP and HT treatments was studied on a mix of 7.5:2.5 CM/PP ratio and 4% (w/w) total protein concentration. Treatments at pressures of 100, 200 and 300 MPa of PP induced significant reduction in size and surface thiol content and a significant increase in surface hydrophobicity. On the other hand, recycling at 300 MPa was effective in further reducing the PPs size. It was found that the native PP aggregates were fragmented under the action of high shear forces. On the other hand, DHP allowed the aggregation of the WPs. The size of aggregates increased with increasing treatment intensity. In addition, hydrophobic interactions were found to have a major role in controlling aggregate size. After HT, DHP-treated PP were not involved in the formation of mixed complexes with casein micelles. PP formed dense, heterogeneous fragments filling the space surrounding the CM particles without associating with the latter. In contrast, mixed complexes were formed by the association of aggregates from DHP-treated WP with casein micelles. However, hydrophobic interactions were efficient in improving the acid gelation and strength of the mixed CM-PP gels compared to CM-WP ones.

**Keywords:** Pea proteins, Whey proteins, Casein micelles, Dynamic high-pressure processing, Thermal processing, Protein mixtures, Molecular interactions, Acid gelation, Visco-elastic properties.

## 1. Introduction

One of the main worldwide challenges of human nutrition is now to be able to ensure the demand for proteins over the coming years, knowing that the demand for animal proteins is expected to double by 2050 (**Henchion et al., 2017**). However, it is now recognized that the animal-based protein industrial production has large impacts on biodiversity loss, nitrogen cycle disruption and also climate change (**Aiking & de Boer, 2018**). The transition towards a more sustainable, less energy-consuming, healthier and more diversified protein consumption is therefore necessary, leading to the development of food with a partial or total substitution of animal-based proteins by plant-based proteins. Numerous studies have therefore conducted to a better scientific and technical knowledge on alternative plant proteins, such as rice, lentil and pea, and particularly on their techno-functional and nutritional properties (**Burger & Zhang, 2019; Lafarga, 2018; Zhao et al, 2020**).

On the other hand, and among few plant proteins that are considered complete, pea proteins are inexpensive and hypoallergenic (**Jiang et al., 2017**). According to the solubility criterion, pea proteins include globulins (55 – 65% of total proteins), the major fractions soluble in saline solutions, albumins (18 – 25%) soluble in water, prolamins (4 – 5%), soluble in hydroalcoholic solutions and glutelins (3 – 4%), soluble in highly alkaline solutions (**Lu et al., 2019**). Pea globulins are oligomeric storage proteins that differ in their sedimentation coefficient depending on their molecular weight (**Tanger, Engel, & Kulozik, 2020**). They are composed of legumin (11S) with a hexameric structure of 360 - 400 kDa. Each of the six monomers consists of an acidic polypeptide subunit of ~ 40 kDa and a basic subunit of ~ 20 kDa, connected by a disulfide bridge (**Barac et al., 2010**). Vicilin is a trimeric glycosylated protein of molecular weight of 150 - 200 kDa, characterized by high glutamic acid, aspartic acid, and lysine content and low methionine content and absence of cysteine which not allowing it to participate in intra- or intermolecular disulfide bridge formation (**Shewry & al., 1995**). Each monomer (~ 50 kDa) is composed of three polypeptides ( $\alpha$  ~ 20 kDa,  $\beta$  ~ 13 kDa and  $\gamma$  ~ 12 - 16 kDa) assembled via hydrophobic interactions (**Tzitzikas et al., 2006**). Convicilin (7S) (~ 290 kDa), the third minor fraction of globulins, formed by weak interactions association of four monomers (~ 71 kDa) (**O’Kane et al., 2004c**). This non-glycosylated protein has a nearly identical amino acid profile (80%) to the vicilin (7S). However, the low water solubility of pea proteins limits their utilities in the development of new food products (**Gao et al., 2020; Lan, Xu, Ohm, Chen, & Rao, 2019**). The extraction process and further processing implemented at industrial scale to produce pea protein isolates while ensuring a cost-effectiveness can besides

induce functionality losses. Particularly, thermal processing applied during extraction and stabilization process can lead to protein conformational change and aggregation (**Aluko et al., 2009; Lam et al., 2018; Shand et al., 2007**).

To overcome this limitation, different strategies have been investigated to process pea proteins and improve their functional properties using physical (hydrostatic and dynamic pressure, ultrasonic, microwaves and cold atmospheric plasma treatments), chemical (succinylation, phosphorylation, acylation and pH-shifting) and enzymatic (alcalase hydrolysis) methods (**Ge et al., 2020; Jiang et al., 2017; Klost & Drusch, 2019**). Dynamic high-pressure is one of the physical non-thermal processing that could be effective in modifying the functionality of pea protein isolate processed at industrial scale in addition to not requiring chemical addition and not affecting the nutritional properties of proteins (**Saricaoglu, 2020**). These changes could enable broader use of pea proteins in the food industry. Dynamic high-pressure treatment is a continuous process combining homogenization and pressurization. It consists in the application of a high-pressure gradient in a very short time following by a single pass of the protein dispersion through a narrow hole of the high-pressure valve. On the other hand, recycling can make it possible to improve the efficiency of the process by increasing the residence times of the fluid in the valve. Each pressure level and/or number of passes could induce various conformational changes. Protein dispersions processing by dynamic high-pressure can result to bottom-up (particle assembly) or top-down (particle size reduction) modifications due to shear force, turbulence and cavitation phenomena occurring in the high-pressure valve and at its outlet (**Dumay et al., 2013**).

Dynamic high-pressure mainly causes disruptions in the quaternary and tertiary structures of globular proteins through the disruption of hydrophobic and electrostatic interactions within the protein molecules leading to reformation and structural rearrangement of intra- and intermolecular bonds (**Bouaouina, Desrumaux, Loisel, & Legrand, 2006**).

This phenomenon could be of major interest for the fragmentation of native aggregates present in commercial pea protein isolates. For example, **Saricaoglu (2020)** reported that particle size of lentil protein isolate dispersion significantly decreased up to 100 MPa treatment. Furthermore, increasing pressure from 50 to 150 MPa caused unfolding of protein particles leading to an improvement of emulsifying, foaming and gelling properties. Moreover, microfluidization at pressures level from 70 to 130 MPa led to large globulin aggregates breakdown due to structural rearrangements (**Oliete et al., 2018**). These authors revealed

decreased protein aggregates particle size and hydrophobicity. However, the new protein conformations induced emulsion stability and reduced creaming and flocculation phenomena.

On the other hand, other works have revealed that dynamic high-pressure treatments can have an opposite effect to dissociation. This is the case for whey protein dispersions (10%, w/w) that formed aggregates of size around 100 nm above 225 MPa and at pH 6,5. These aggregates were mainly generated by hydrophobic interaction (**Grácia-Juliá et al., 2008**).

To allow the substitution of animal proteins by plant proteins in food products while obtaining better functionality or innovative designs remains however a challenge and an opportunity at the same time. The combination of soluble pea proteins with milk proteins and more specifically with casein micelles through physical or chemical processes could contribute to improve the functionality of these colloids. Furthermore, previous studies have shown that heat treatments prior to cold acidification of milk protein blends resulted in higher gel strength and water holding capacity compared to untreated blends (**Lucey, Teo, Munro, & Singh, 1997; Lucey, Tamehana, M., Singh, & Munro, 1998**). Nevertheless, this gelation technique has been little used until now compared to the thermal or simple acidification processes applied to functionalize two proteins in mixture.

Concerning the mechanisms of association and interactions of pea and casein micelles with this type of gelation, the analysis of the literature clearly shows that these mixed systems are very little documented. However, **Mession, Roustel, & Saurel (2017b)** evaluated the acidification-induced cold gelling behavior of the mixtures of fractionated globular pea protein aggregates and casein micelles pretreated thermally at a total concentration of 3.6 %, at a ratio of 1:1 and at pH 7.1. This work revealed that only the heat-treated vicilin-casein micelle mixture led to a significant increase in storage modulus upon gelation. This was explained by an initiation of gel network formation by soluble and sedimentable vicilin aggregates at pH 6.4, followed by a strengthening of the network through dissociated casein micelle particles. On the other hand, the high size of the aggregates formed by the heat-treated legumin-casein micelles mixtures were a real obstacle for the proper development of the gelation. Moreover, these authors revealed that no specific interactions including the formation of disulfide bridges were found between legumin and casein aggregates and this despite the presence of cysteine in this fraction. These authors suggested that further investigations were needed to explain the effect of the ratio of pea and milk proteins on the mixed aggregation properties and on the acid gelation. Other side, **Ben-Harb et al. (2018)** showed that following chemical acidification of a

mixture at a total concentration of 14.8% and a 1:1 ratio of commercial pea and milk proteins, electrostatic interactions had a major impact on the stiffness of the final gels. Furthermore, these authors found that the stiffness of the pea protein gels was significantly higher than that of the blends.

Hence, the present work was undertaken to study the influence of the high dynamic pressure process with different intensities (100, 200 and 300 MPa) and number of passes (1, 2 or 3) on the structure and conformation of the pea protein dispersions in a first step. The association capacity of the treated particles with the casein micelles (4%, w/w total concentration, 2.5:7.5 protein ratio and at pH 6,7) by the heat treatment process will be evaluated afterwards. The formed mixtures will be characterized in terms of particle size, hydrophobicity, sulfhydryl groups (SH) and disulfide bond (SS) content, morphology and compared to milk protein mixtures. Finally, these blends will be gelled by chemical acidification and the behavior of the gels will be evaluated by rheology and scanning electron microscopy.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials

Pea protein isolate powder was kindly provided by Roquette Frères (Nutralys S85F, batch W278N, Lestrem, France), whey protein isolate powder was obtained from Lactalis Ingredients (Prolacta 90, batch R51640, Bourgbarré, France) and native-like phosphocasein powder was purchased from Ingredia Dairy Ingredients (Promilk 852B, batch 082156, Arras, France). Native-like phosphocasein was industrially prepared by microfiltration, then diafiltration using the milk mineral soluble phase conferring a quasi-native state to the prepared casein micelles. The three commercial powders stored at 4 °C away from moisture and light. The composition of the three isolates powders was presented on **tableau III.9**.

**Tableau III.9.** Proximate composition of commercial pea isolate, whey protein isolate and native phosphocasein powder.

Chemical composition	Pea protein isolate	Whey protein isolate	Native phosphocasein
Moisture (%)	6.10 ± 0.17 <sup>a</sup>	6.19 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.55 ± 0.15 <sup>b</sup>
Ash (% DB)	3.35 ± 0.83 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.07 <sup>b</sup>	7.89 ± 0.07 <sup>c</sup>
Protein (% DB)	83.23 ± 0.84 <sup>a</sup>	93.97 ± 0.22 <sup>b</sup>	83.16 ± 0.26 <sup>a</sup>
Fat (% DB)*	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.95 ± 0.02 <sup>c</sup>
Carbohydrate (% DB)**	13.27 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.45 ± 0.13 <sup>b</sup>	7.00 ± 0.28 <sup>c</sup>

Results expressed as mean ± standard deviation (n=3).

\*: Supplier data.

\*\* : Calculated by differences.

DB: Dry basis.

<sup>a-c</sup> Values followed by different letters within a line are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Tri-potassium citrate monohydrate, tri-sodium citrate dihydrate,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  were purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  and  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  from Amresco (Solon, Ohio, USA),  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ , TCA and  $\text{KOH}$  from VWR BDH Prolabo (Leuven, Belgium) and tris[hydroxymethyl] aminomethane (Tris), EDTA, glycine, sodium phosphate dibasic, sodium dodecyl sulfate (SDS), urea, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid ammonium salt (ANS), glycerol, 2-mercaptoethanol, acrylamide/bis-acrylamide, ammonium persulfate, N, N, N', N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) from Sigma (St. Louis, MO, USA). Coomassie brilliant blue G250, D-(+)-gluconic acid  $\delta$ -lactone were obtained from Fluka chemicals GmbH (Dublin, Ireland) and bromophenol Blue was and sodium dihydrogen phosphate monohydrate was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

All solutions were prepared using Milli-Q ultrapure water (Millipore®).

## 2.2. Globular and casein protein dispersions preparation

Pea and whey protein powders were suspended separately at 5 and 10% (w/w) respectively in Milli-Q ultrapure water, gently stirred at 300 rpm for 2 h at 20 °C and then overnight at 4 °C to allow complete hydration. The pH of the two dispersions was adjusted to pH 6.7 with 1 M NaOH or 1 M HCl without affecting their concentrations. The PPI dispersion was then centrifuged (ultracentrifuge Optima LE-80k, rotor 70 Ti, Beckman, California, USA) at  $12000 \times g$  for 20 min at 20 °C and the supernatant was collected as the protein soluble fraction (PP).

The native-like phosphocasein powder was suspended at 3.75% (w/w) in lactose-free simulated milk ultrafiltrate (SMUF) according to Jenness & Koops (1962) to keep the mineral environment of native casein micelles. CM dispersion was stirred at 300 rpm for 30 min at 20 °C then the pH was adjusted to pH 6.7 with 1 M NaOH. CM dispersion was then stored at 4 °C overnight to improve the powder hydration and was then warmed for 1 hour at 40 °C and rapidly cooled to 20 °C just before experiments to ensure complete hydration.

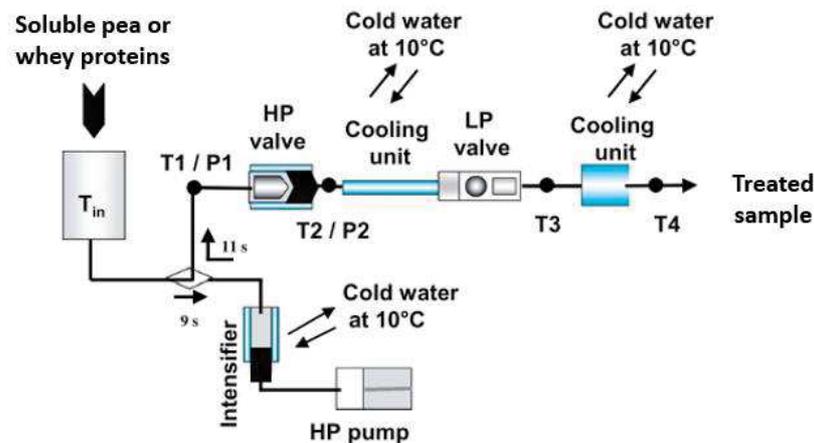
## 2.3. Dynamic high-pressure processing (DHP) of globular protein dispersions

Pea protein soluble fraction PP (1.67% (w/w)) and whey protein WP (10% (w/w)) dispersions were processed at an initial temperature ( $T_{in}$ ) of 22 °C using a DHP homogenizer (model FPG7400H, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK) as described by Grácia-Juliá et al. (2008) (**Figure III.23**). Samples were processed at 100, 200, and 300 MPa with a single pass through the circuit (P1) and after two (P2) or three (P3) passes in the DHP homogenizer at 300 MPa for each dispersion. Samples were noted P 300 P1, P 300 P2 and P 300 P3 for PP or W 300 P1, W 300 P2 and W 300 P3 for WP recycling at 300 MPa. Compared to PP, the effect of DHP on WP has not been studied at 100 and 200 MPa because these low pressures did not affect the size distribution at 10 % (w/w) protein concentration except few changes recorded according to (Grácia-Juliá et al., 2008).

A single high-pressure valve (HP valve or first stage) was used in this study. The high-pressure generation system consisted of a single intensifier driven by a hydraulic pump and operated in a pulsed mode as previously described (Picart et al., 2006). During processing, temperature and pressure were measured using low inertia T thermocouples, pressure gauges and Bourdon gauges at the inlet ( $T_1$ ,  $P_1$ ), outlet ( $T_2$ ,  $P_2$ ) of the HP valve and after rapid cooling

downstream of the HP valve (T3) as shown in figure 1. Heat exchangers with water circulation at 10 °C were installed around the intensifier, around the HP valve, at the immediate outlet of the HP valve to avoid overheating the fluid (first cooling device), and after the low-pressure valve (LP valve or second stage) to adjust the final temperature of the treated fluid (second cooling device).

With this cooling device, the residence time of the fluid at temperature T2 in the HP homogenizer is < 1 s (i.e., ~ 215 ms for the fluid flowing at T2 through the HP valve plus an additional time  $\leq 550$  ms required to cool the fluid from T2 to T3 in the cooling device) for one-pass homogenization (Picart et al., 2006). The initial temperature of the protein dispersions in the feed tank ( $T_{in} = 22 \pm 1$  °C) and the temperature at the homogenizer outlet ( $T4 = 26 \pm 0.5$  °C) were measured with thermistors. The pulse flow rate ranged from 16 L/h at 100 MPa to 13 L/h at 300 MPa. Two UHPH treatments were performed for each sample at different pressures and different numbers of passes. Two controls were considered in our study: the pea protein dispersion and the whey protein dispersion. The treated dispersions were collected in sterile containers and immediately analyzed.



**Figure III.23.** Schematic representation of the dynamic high-pressure homogenizer.

## 2.4. Heat treatment processing

After the DHP single globular protein treatment, the CM stock dispersion was first mixed with P 300 P3 or WP 300 P3 dispersion in a 7.5:2.5 protein ratio according to protein content conducting to a total protein content of 4 % (w/w). Mixtures were then stirred for 30 min at 25 °C, placed in hermetically sealed 15 mL plastic conical tubes (Falcon, Corning, New York, USA) and equilibrated in a water bath at 40 °C for 2 min. Thereafter, sample temperature was increased to 85 °C at a rate of 1 °C/min, and then maintained at 85 °C for 1 h before a rapid cooling to 20 °C in ice. These mixtures were named (CM-P300 P3) HT and (CM-W 300 P1)

HT, respectively. The same heat-treatment protocol was applied on CM and PP or WP mixtures and samples were named (CM-PP) HT and (CM-WP) HT. All samples were then stored at 4 °C and equilibrated at 20 °C prior to analysis.

## 2.5. Particle size distribution by photon correlation spectroscopy (PCS)

The particle size distribution of the different dispersions was measured at 25 °C by dynamic light scattering using the Malvern NanoSizer (Zetasizer nano ZS, Malvern Instruments, Orsay, France) with a photodiode detector with 4 mW He–Ne laser operating at a wavelength of 633 nm and a fixed scattering angle of 173°. Prior to analysis, samples were diluted to 10 g/L with ultrapure water. Measurements were carried out in four-sided clear polystyrene cuvettes (Sarstedt, Numbrecht, Germany) with at least twelve runs per measurement. The dispersant viscosity and refractive index for water were 0.8875 mPa s and 1.330, respectively. The real refractive indexes was 1.36 for the milk protein (**Regnault, Thiebaud, Dumay, & Cheftel, 2004**) and 1.45 for pea protein isolate (**Bogahawaththa & al., 2019**). The minimal, maximal and mean diameters were determined from the light-intensity and the number frequency (%) distribution curves. Measurements were evaluated in triplicate.

## 2.6. Determination of sulfhydryl groups (SH) and disulfide bond (SS)

The surface, free and total sulfhydryl (SH) groups of protein samples were determined using Ellman's method (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961) with some modifications. Protein stock dispersions were diluted to 7.5 mg/mL in tris-glycine buffer (86 mM Tris, 90 mM glycine and 4 mM EDTA, pH 8.0) for surface SH content measurement. For free SH content, protein stock dispersions were diluted to the same concentration in tris-glycine buffer containing 8 M urea then the solution was gently stirred overnight at 20 °C. To evaluate the total SH group content and calculate the disulfide bonds, 0.05 mL of 2-mercaptoethanol and 4 mL of tris-glycine buffer were added to 1 mL of the protein stock dilution prepared in tris-glycine buffer containing 8 M urea then the mixture was incubated for 1 h at room temperature. Then 10 mL of 12% (w/v) tri-chloroacetic acid (TCA) solution were added and the mixture was incubated for an additional hour. The precipitate after centrifugation (5000 × g for 10 min) was washed twice with 5 mL of TCA solution. After that, the precipitate was dissolved in 10 mL of tris-glycine buffer before adding 0.05 mL of Ellman's reagent (2 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid in the tris-glycine buffer) and incubating the mixture at room temperature for 20 min. The absorbance was measured at 412 nm using a spectrophotometer (UV 1900, Shimadzu UV-Vis, Japan).

The SH content was calculated according to Eq (1):

$$\text{SH}(\mu\text{mol/g}) = (73.53 * A * D)/C \quad (1)$$

where A is the absorbance at 412 nm, C is the sample protein concentration (7.5 mg/mL), D is the dilution factor, the constant 73.53 is calculated as  $10^6 / (1.36 \times 10^4)$  ( $10^6$  is the conversion from molar basis to  $\mu\text{mol/mL}$  basis and from mg to g solids;  $1.36 \times 10^4$  is the molar absorptivity).

The SS content was calculated according to Eq (2):

$$\text{SS}(\mu\text{mol/g}) = (\text{Total SH} - \text{free SH})/2 \quad (2)$$

All determinations were performed in triplicate.

## 2.7. Surface hydrophobicity

Surface hydrophobicity (Ho) was measured as reported by **Kato & Nakai (1980)** and **Haskard & Li-Chan (1998)** with minor modifications. A 8 mM ANS stock solution was prepared in phosphate buffer (0.01 M, pH7), ANS being used as the fluorescence probe. For each protein dispersion to analyze, dilutions were prepared in the same buffer to obtain 5 final protein concentrations ranging from 0.04 to 0.2 mg/mL. Then, 20  $\mu\text{L}$  ANS stock solution were added to 4 mL of each protein concentration. The fluorescence intensity of the mixture was measured using a fluorescence spectrofluorometer (Varian Cary Eclipse, Australia) at  $\lambda_{\text{ex}} = 365$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 484$  nm in quartz cuvette (101-QS, Hellma, Germany). The surface hydrophobicity of protein sample represents the initial slope of fluorescence intensity versus protein concentration calculated by linear regression. All determinations were performed in triplicate.

## 2.8. ANS fluorescence analysis

Tryptophan fluorescence at 25 °C was used to estimate PP structural changes before and after DHP treatment. A 8 mM ANS stock solution was prepared in phosphate buffer (0.01 M, pH7), ANS being used as the fluorescence probe. For each protein dispersion to analyze, dilutions were prepared in the same buffer to obtain 5 final protein concentrations ranging from 0.04 to 0.2 mg/mL. Then, 20  $\mu\text{L}$  ANS stock solution were added to 4 mL of each protein concentration. Poured in quartz cuvette (101-QS, Hellma, Germany), samples were subjected to a 365 nm excitation wavelength and fluorescence emission spectra recorded from 400 to 650 nm in a spectrofluorometer (Varian Cary Eclipse, Australia).

## 2.9. Native Polyacrylamide gel electrophoresis

Polyacrylamide gel electrophoresis analysis was performed for all samples under native discontinuous buffer system according to Grácia-Juliá & al. (2008) .

Proteins were analyzed using minigels (80 × 80 × 1.5 mm) consisted in 3.5% (v/v) acrylamide/bis-acrylamide (C = 37.5:1) stacking gel and 5% (v/v) separating gel, prepared in 25 mM and 50 mM phosphate buffer (pH 7), respectively. Ammonium persulphate and TEMED were added at 1.8 and 2.8 mM, respectively. Protein samples were diluted at 5 mg/mL in 25 mM phosphate buffer (pH 7) in the presence of glycerol (150 mL/L) and bromophenol blue (0.0025% (w/v)). Electrophoresis was carried out with a running 50 mM phosphate buffer at pH 7. Per well, 5 µL of sample containing 0.5% (w/w) of proteins or 2 µL of molecular weight markers (Sigma-Aldrich, MWND500, batch SLCC8761, Saint Louis, USA). Electrophoresis was carried out at a constant power of 12 W at 18 °C for 3 h. After completion, electrophoresis gels were stained with R-250 Coomassie blue and then washed.

## 2.10. Rheological measurements

Rheological measurements of the different samples were carried out in a dynamic rheometer (MCR 300, Anton Paar, Graz, Austria) using a coaxial cylinder geometry (CC27). The evolution of the storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) was recorded for 5 h at a constant strain of 1 % and a frequency of 1 Hz. A sample volume of 20 mL was mixed with 2 % (w/w) gluconic acid  $\delta$ -lactone (GDL) and poured into the rheometer cup maintained at 25 °C. The gel point was obtained when the storage modulus ( $G'$ ) was equal to the loss modulus ( $G''$ ). Simultaneously, the kinetic of acidification at 25 °C was followed using pH-meter (C833, Consort, Turnhout, Belgium) equipped of a data acquisition system recording one measure each 10 seconds. The acidification kinetic and rheological analysis were carried out in triplicate.

## 2.11. Morphology observation by scanning electron microscopy

To carry out scanning electron microscopy observations, samples were fixed on inorganic filtration membranes (Anodisc 25, scanning electron microscopy grade, 2 cm in diameter, average pore size 0.2 µm, Whatman, Maidstone, UK). For this, membranes were immersed in milk samples. Then, milk samples that were fixed on the membranes were immediately dehydrated through a graded series of ethanol/water baths (25, 50, 70, 80, 90, 96, 100%, v/v; 5 min each). Dehydration of samples was completed using a CO<sub>2</sub> critical point dryer (CPD 030 Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Metallised samples were then observed using a

Hitachi S-4800 high-resolution scanning electron microscope (Tokyo, Japan) at three magnifications (20 000 ×, 40 000 ×, 100 000 ×).

### **2.12. Statistical analysis**

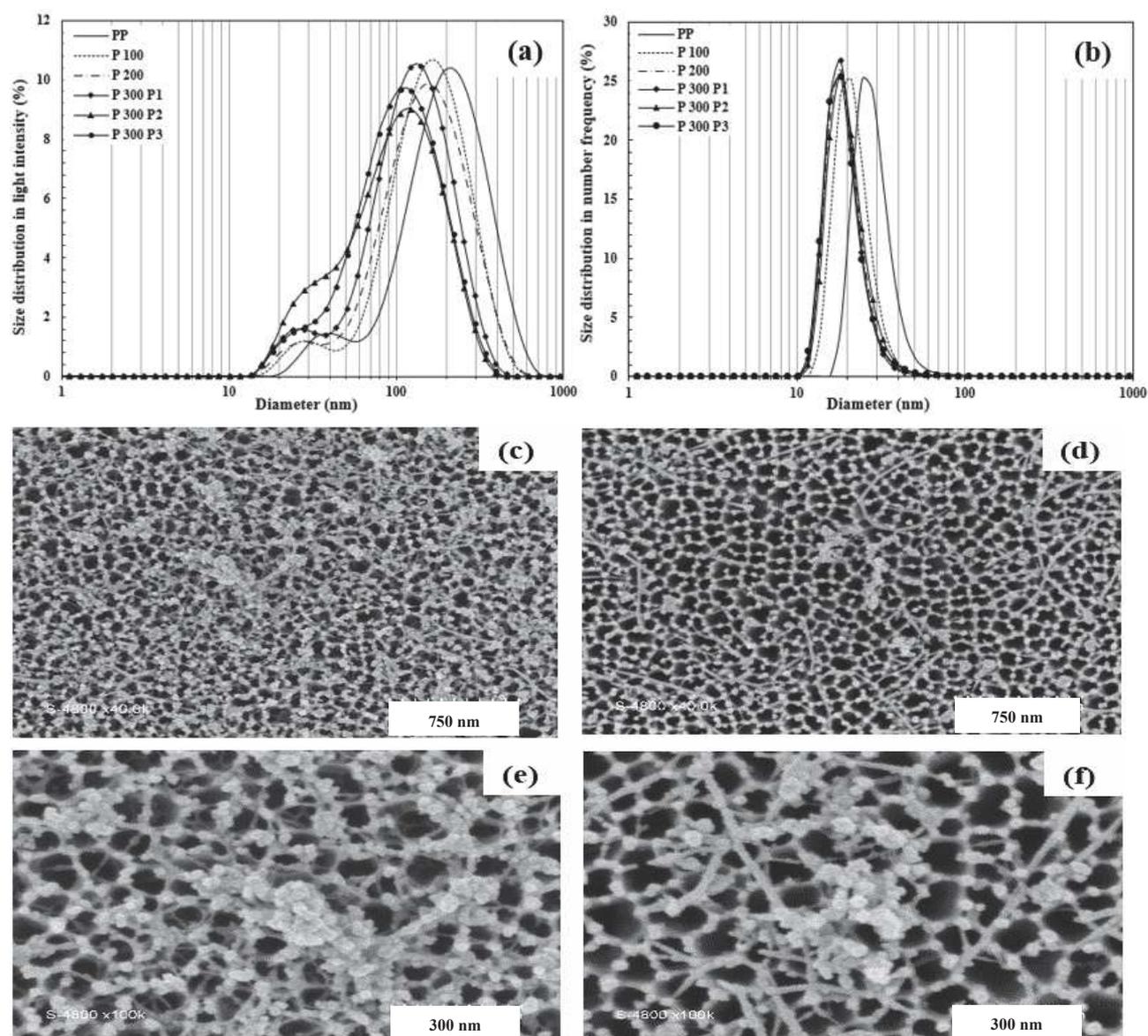
Experimental results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation with at least three replicates per sample. Statistical analyses of experimental data were performed by analysis of variance (ANOVA). Significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples were determined by Tukey's test using XLSTAT v2020 software. Linear regressions and associated statistical parameters were obtained with Excel® software (2020.5.1.1040).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Effect of dynamic high-pressure (DHP) on pea protein dispersion properties

The study of the DHP process effect on the characteristics of pea protein (PP) in aqueous dispersion focused on the impact of two parameters: the pressure level applied between 100 and 300 MPa and the number of passes of the sample (one (P1), two (P2) or three passes (P3)) at 300 MPa in the homogenizer. Protein sizes, microstructure, fluorescence intensity, surface hydrophobicity and surface sulfhydryl contents were evaluated for each pressure parameter.

The size distribution curves in number frequency and in light intensity of the soluble PP dispersion showed monomodal and bimodal populations with mean diameters of  $29 \pm 2$  nm and  $214 \pm 4$ , respectively (Figure III.24, a-b; Tableau III.10).



**Figure III.24.** Particle size distribution curves in light intensity frequency (a) or in particle number frequency (b) of PP dispersion (1.7%, w/w, pH 6.7) after DHP at 100–300 MPa (single pass P 300 P1), or at 300 MPa with two or three passes (P 300 P2, P 300 P3) realized by photon correlation spectroscopy at 25 °C. Mean curves from three PCS measurements are shown. Scanning electron micrographs of PP dispersion (c-e), PP dispersion after DHP at 300 MPa (d-f) and three passes at two magnifications (40 000 × and 100 000 ×). The dotted lines indicate the length scale.

**Tableau III.10.** Particle size characteristics of PP dispersion, their DHP treated samples at 100, 200 or 300 MPa and at 300 MPa for one (P1), two (P2) or three (P3) passes or WP dispersion, their DHP treated samples at 300 MPa for one, two or three homogenization passes.

	Distribution in light intensity				Distribution in number frequency			
	Mean diameter	Minimal diameter	Maximal diameter	Value of the peak maximum	Mean diameter	Minimal diameter	Maximal diameter	Value of the peak maximum
	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)
Pea protein (PP)	214 ± 4 <sup>a</sup>				29 ± 2 <sup>a</sup>			
Peak 1		22	59	34 ± 3 <sup>a</sup>		19 <sup>a</sup>	111	26 ± 2 <sup>a</sup>
Peak 2		59	680	220 ± 0 <sup>A</sup>		–	–	–
P 100	170 ± 15 <sup>b</sup>				22 ± 2 <sup>b</sup>			
Peak 1		16	33	28 ± 0 <sup>b</sup>		14 <sup>b</sup>	83	19 ± 2 <sup>b</sup>
Peak 2		33	535	165 ± 24 <sup>B</sup>		–	–	–
P 200	163 ± 2 <sup>b</sup>				20 ± 2 <sup>b</sup>			
Peak 1		16	38	28 ± 0 <sup>b</sup>		12 <sup>b</sup>	79	18 ± 0 <sup>b</sup>
Peak 2		38	559	164 ± 0 <sup>B</sup>		–	–	–
P 300 P1	132 ± 6 <sup>c</sup>				19 ± 1 <sup>b</sup>			
Peak 1		15	28	26 ± 2 <sup>b</sup>		12 <sup>b</sup>	72	17 ± 1 <sup>b</sup>
Peak 2		28	420	135 ± 11 <sup>C</sup>		–	–	–
P 300 P2	110 ± 3 <sup>d</sup>				20 ± 1 <sup>b</sup>			
Peak 1		12	21	18 ± 0 <sup>c</sup>		12 <sup>b</sup>	79	18 ± 0 <sup>b</sup>
Peak 2		21	378	122 ± 0 <sup>D</sup>		–	–	–
P 300 P3	116 ± 1 <sup>c</sup>				21 ± 0 <sup>b</sup>			
Peak 1		15	28	24 ± 0 <sup>b</sup>		12 <sup>b</sup>	72	17 ± 1 <sup>b</sup>
Peak 2		28	396	111 ± 10 <sup>D</sup>		–	–	–
Whey protein (WP)	109 ± 23 <sup>a</sup>				3.0 ± 0.5 <sup>a</sup>			
Peak 1		2	6	4 ± 0		2	9	3 ± 0
Peak 2		6	68	27 ± 6		–	–	–
Peak 3		68	983	143 ± 21		–	–	–
W 300 P1	328 ± 14 <sup>b</sup>				38 ± 2 <sup>b</sup>			
Peak 1		28	59	51 ± 0		23	222	33 ± 0
Peak 2		59	1164	326 ± 27		–	–	–
W 300 P2	321 ± 20 <sup>b</sup>				85 ± 19 <sup>c</sup>			
Peak 1		47	91	79 ± 15		41	164	59 ± 12
Peak 2		91	1281	308 ± 25		164	769	220 ± 0
W 300 P3	439 ± 7 <sup>c</sup>				106 ± 19 <sup>c</sup>			
Peak 1		59	164	91 ± 0		48	165	69 ± 10
Peak 2		164	1223	438 ± 36		165	912	255 ± 0

Values were calculated from the size distribution curves in light intensity and in number frequency as determined by photon correlation spectroscopy at 25 °C. Results are expressed as means of triplicate determinations  $\pm$  standard deviation.

(A-D), (a-c) Different letters indicate significant difference within a line between DHP treated PP or WP samples ( $p < 0.05$ ).

The few large particles observed in the light intensity mode corresponded to native or soluble pea protein aggregates as described in our previous work (**Beghdadi et al, 2022**). However, DHP treatment at 100, 200 and 300 MPa of the soluble PP fractions revealed the same shape of curves than native PP aggregates, but with a significant shift ( $p < 0.05$ ) to lower mean sizes (in light intensity as in number frequency) if compared to the untreated samples. Comparing the impact of the three pressurized treatments, a non-significant ( $p > 0.05$ ) decrease of the mean diameter in light intensity (**Figure III.24, a**) has been found between P 100 and P 200 samples, whereas a significant ( $p < 0.05$ ) decrease of 31 nm was observed between P 200 and P 300 P1. Furthermore, for number frequency observations (**Figure III.24, b**), the same tendency was noticed for the pressure impact. But in contrast, no significant change ( $p > 0.05$ ) was noticed for either the maximum ( $\sim 18$  nm) or the mean diameters ( $\sim 20$  nm) in number frequency between the three treatment intensities studied (similar curves in figure 2b). These observations revealed that a DHP treatment of 100 MPa reduces significantly the size of large and small native aggregates (native 214 nm, DHP treatment 170 nm) and these observations may be explained by the subjection of PP molecules to increasing high-speed shear forces and cavitation phenomena during the DHP process, resulting in smaller particle size as demonstrated by **Chen et al. (2016)**. On the other hand, increasing pressure intensity seems to cause more fragmentation of large particles (**Figure III.24a** and **tableau III.10**) with light intensity mean diameters of 163 and 132 nm for 200 and 300 MPa pressures, respectively. However, this fragmentation did not induce a great size reduction as it is difficult to observe difference in molecular weight in native electrophoretic profile (**Figure III.25**).



**Figure III.25.** Electrophoretic patterns of native 4–10% PAGE of native pea dispersion (PP) and PP dispersion treated by one single pass at a dynamic high pressure of 100 (P 100), 200 (P 200), 300 (P 300) MPa. Markers for native PAGE: alpha-lactalbumin (lane 1), carbonic anhydrase (lane 2), albumin chicken egg white (lane 3), bovine serum albumin (lane 4), urease from jack bean (lane 5).

On the other hand, recycling was the second parameter influencing PP structural properties. **Figure III.24, a-b** and **tableau III.10** presented the size distribution curves in light intensity frequency and in particle number frequency obtained for PP dispersions treated at 300 MPa after three passes (P1, P2 and P3). In addition to the bimodal distribution in light intensity for all samples, a significant ( $p < 0.05$ ) decrease of 38 % and 46 % of the light intensity mean diameter and a shift to lower size for the maximal particle size were observed between PP or P 300 P1 and P 300 P3, respectively. In contrast, no significant ( $p > 0.05$ ) changes were observed for all particles size characteristics in number frequency between the pressure-treated samples at the different passes. Interestingly, P 300 P2 sample showed the significant ( $p < 0.05$ ) lowest mean, minimal and maximal diameter in light intensity compared to all samples. Furthermore, a shoulder was noticed at 38 nm and at higher intensity compared to other samples indicating that the number of large particles size has increased. The second pass could induce more homogeneous fragmentation. As expected, the number of passes applied induced a top-down of P 300 P1 particles size.

The microstructure of the protein aggregates presented in **figure III.24, c-d-e-f** confirmed this size decrease for DHP treated samples. Indeed, PP sample (control) had a morphology resembling the bunches of grapes with rough surfaces and distributed in a

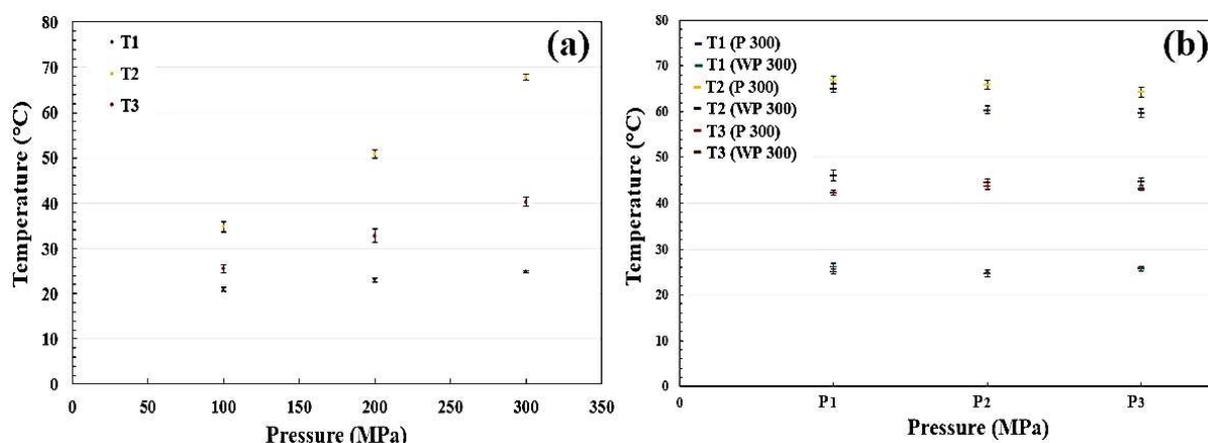
heterogeneous way of size justifying the polydispersity of the PP particles as shown in size distribution curves. The DHP treatment exhibit smaller fragments and lack structural uniformity compared to the control (PP) which confirmed the fragmentation of protein particles and their irregular shape after the DHP treatment. These observations agreed with results found by **Oliete et al. (2018)** for pea globulin DHP treatment.

To complete the physico-chemical characterization of the DHP treated aggregates, fluorescence intensity, surface hydrophobicity and SH/S-S content have been determined in order to study the impact of the pressure intensity and recycling on the molecular structure and the creation of possible new interactions. Results presented in **tableau III.11** showed that no significant difference for intrinsic fluorescence values ( $p > 0.05$ ) at the maximum absorption wavelength ( $\lambda_{\max}$ ) were observed between the untreated PP and the DHP treated PP at 100 and 300 MPa after recycling. A significant increase was noticed at pressures of 200 and 300 MPa (**Tableau III.11**). In addition to the same findings as the intrinsic fluorescence, the surface hydrophobicity ( $H_0$ ) has shown a significant increase in its values at the pressure of 100 MPa compared to non-DHP treated PP. These results suggest that the quaternary and tertiary spatial structure of the protein particles was modified by the pressure applied after 100 MPa. Besides, the pressure at 200 and 300 MPa induced exposure of hydrophobic side chains to the surface of proteins leading to an increase of the surface hydrophobicity (**Ye et al., 2011**). However, recycling induced lowering of the exposure of hydrophobic side chains which may be explained by the dissociation of large protein aggregates leading to unmasking of the buried hydrophobic groups (**Bouaouina, Desrumaux, Loisel, & Legrand, 2006**). All PP samples showed significant higher surface hydrophobicity compared to WP ones which could be an advantage to facilitate their interaction with casein micelles. On the other hand, surface SH content revealed a significant ( $p < 0.05$ ) decrease after increasing the DHP intensity and no significant changes ( $p > 0.05$ ) have been recorded after recycling compared to the first pass at 300 MPa. Additionally, the S-S content showed no significant changes between DHP-treated samples and PP dispersion. This result suggested that some changes in the surface accessibility have been operated during the DHP treatment, internalizing free SH groups inside the protein particle but with no action on the S-S bridges already present as mentioned by **Kunugi & Tanaka (2002)**. DHP treatment could therefore have an impact on the disruption of weak interactions, as reported by **Wu et al. (2020)**, which can lead to the internalization of the SH position. This effect may be more pronounced because of the influence of the temperatures control at the inlet, at the outlet and after immediate cooling at the HP valve (**Figure III.26**). Since the increase of

pressure caused a significant increase of temperatures at the different parts of the HP valve, recycling maintained the maximum temperatures obtained for the first pass but participated in increasing the residence time in the valve inducing more PP particles partial disruption, unfolding and structural rearrangements.

**Tableau III.11.** ANS fluorescence, surface hydrophobicity ( $H_0$ ), surface SH and S-S content of PP dispersion after DHP single pass at 100, 200 and 300 MPa, and after DHP at 300 MPa with two or three passes. WP dispersion after DHP at 300 MPa and one pass is also presented. Different letters in a column significantly differ ( $p < 0.05$ ). Means were of triplicate determinations.

Samples	Fluorescence intensity at $\lambda_{max}$ (a.u)	Surface hydrophobicity ( $H_0$ ) (a.u)	Surface SH content ( $\mu\text{mol/g}$ )	S-S content ( $\mu\text{mol/g}$ )
PP	464 ± 4 <sup>a</sup>	177703 ± 3885 <sup>a</sup>	4.15 ± 0.06 <sup>a</sup>	22 ± 1 <sup>a</sup>
P 100	449 ± 16 <sup>a</sup>	183671 ± 10186 <sup>ab</sup>	2.50 ± 0.08 <sup>b</sup>	20 ± 3 <sup>a</sup>
P 200	477 ± 6 <sup>b</sup>	196023 ± 2732 <sup>b</sup>	1.49 ± 0.06 <sup>c</sup>	23 ± 2 <sup>a</sup>
P 300 P1	485 ± 22 <sup>ab</sup>	196777 ± 6288 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.4 <sup>d</sup>	21 ± 2 <sup>a</sup>
P 300 P2	452 ± 11 <sup>a</sup>	182347 ± 6177 <sup>a</sup>	0,4 ± 0.2 <sup>d</sup>	22 ± 2 <sup>a</sup>
P 300 P3	447 ± 14 <sup>a</sup>	179796 ± 7744 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>d</sup>	23 ± 2 <sup>a</sup>
WP	220 ± 5 <sup>c</sup>	93908 ± 4657 <sup>c</sup>	-	-
W 300 P1	249 ± 12 <sup>d</sup>	107341 ± 9756 <sup>c</sup>	-	-



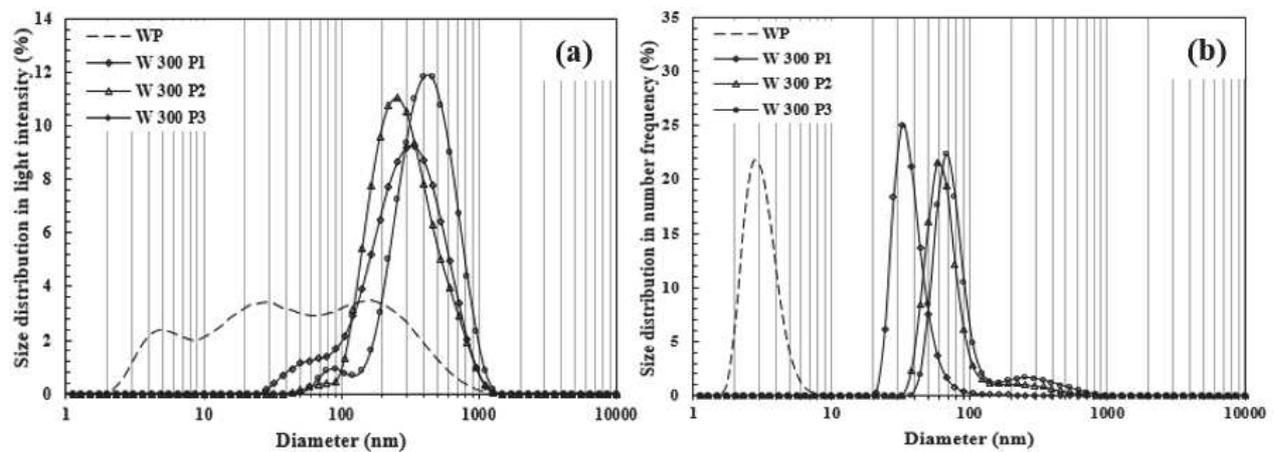
**Figure III.26.** Temperature measured before the HP valve (T1, ●), at the HP valve outlet (T2, ●) and after immediate cooling at the HP valve outlet (T3, ●), (a): during DHP at 100–300 MPa and one pass for PP and (b): during DHP at 300 MPa and recycling at 1–3 passes (P1, P2, P3) for PP (T1, —; T2, —; T3, —) and WP (T1, —; T2, —; T3, —). ( $T_{in} = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). PP dispersions containing 1,7% (w/w) and WP dispersions containing 10 % (w/w) protein. Means of three independent experiments are shown. The standard deviations are included in the symbols.

### 3.2. Effect of dynamic high-pressure on whey protein dispersion properties

The size distribution curves in light intensity and in number frequency of the WP dispersion (control, 10% w/w, pH 6.7) showed trimodal and monomodal populations,

respectively (**Figure III.27**). The three peaks (mean diameter of  $109 \pm 23$  nm) indicated the presence of individual globular fractions as  $\alpha$ -La and  $\beta$ -Lg,  $\beta$ -Lg tetramers or octamers and BSA or immuno-globulins assemblies, respectively. In addition, the monomodal size distribution in number (mean diameter of 3 nm) indicated that the WP fractions were present in their individual or dimeric form, which was confirmed by **Beghdadi et al. (2022)** and **Gracia-Juliá et al. (2008)** and by the native electrophoretic profile (**Figure III.25**).

**Figure III.27.** Particle size distribution curves in light intensity frequency (a) or in particle number frequency (b) of WP dispersion (10%, w/w, pH 6.7) after DHP at 300 MPa and one, two or three homogenization passes. Measurements were carried out by photon correlation spectroscopy at 25 °C. Mean curves from three PCS measurements are shown.



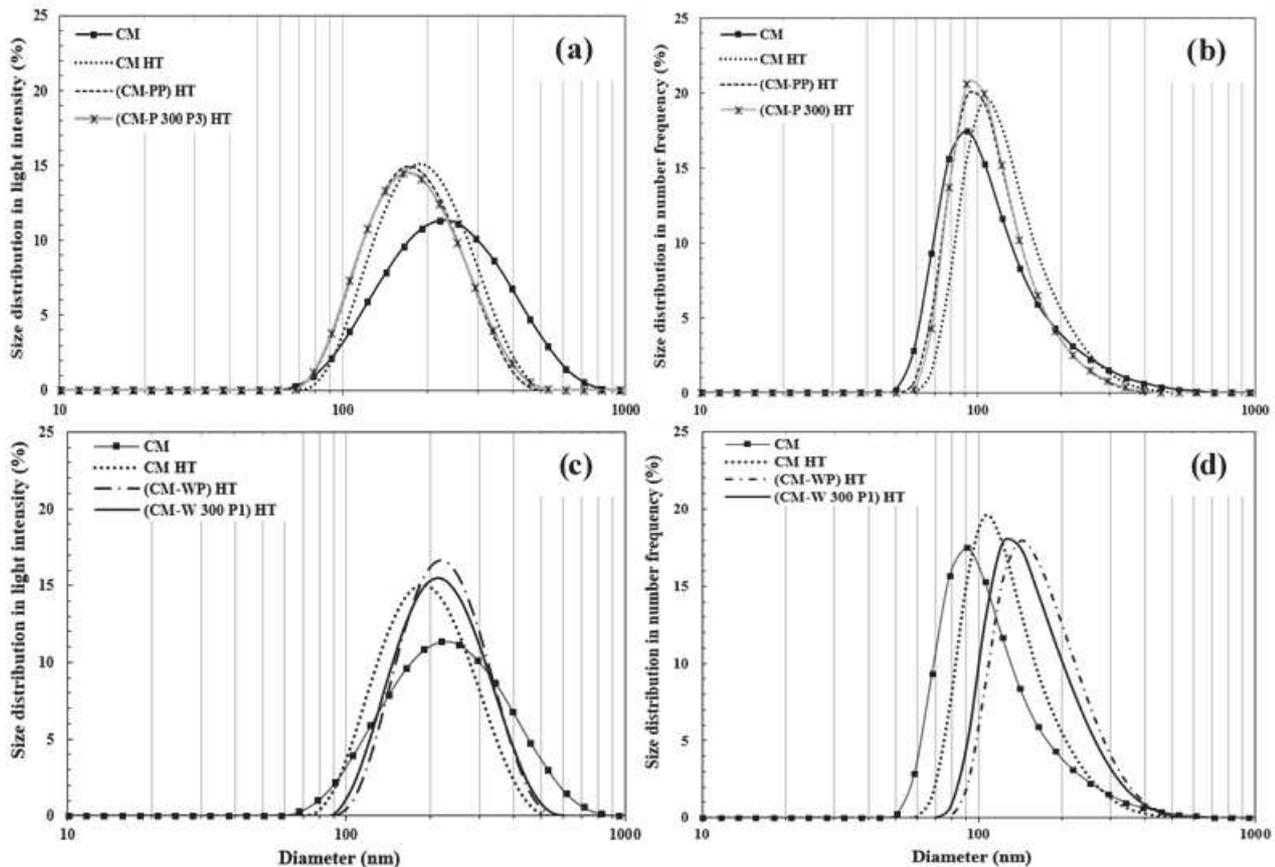
However, DHP treatment of the WP dispersion obtained at 300 MPa with one homogenization pass induced marked shift towards larger size as shown in the size distribution curves. In light intensity, sample presented a bimodal population with a mean diameter of  $328 \pm 14$  nm, a minor and a major peaks at 51 and 326 nm, respectively. In number frequency, size distribution curve showed a monomodal population centered at  $38 \pm 2$  nm. Thus, compared to the WP dispersion without treatment (control), these values corresponded clearly to the presence of WP aggregates. On the other hand, after the second homogenization pass (W 300 P2), both size distribution curves in light intensity and in number frequency presented bimodal populations with higher size characteristics than the first pass (mean diameter of  $321 \pm 20$  nm and  $85 \pm 19$ , respectively as presented in **tableau III.10, figure III.27**). However, the second peak in number frequency curve indicated the formation in small number of a population of large WP aggregates (maximum peak of 220 nm). The third recycling pass confirmed this aggregation tendency with an additional significant ( $p < 0.05$ ) increase of the mean diameter of 68 and 111 nm compared to the first pass in light intensity and in number frequency, respectively. Recycling clearly increased the WP particles association and their sizes,

representing to a bottom-up process. This fact could be explained by an aggregation phenomenon which was allowed by an improvement of dynamic high-pressure efficiency. Same results were reported by **Chevalier-Lucia & Picart-Palmade (2019)**. It is likely that most of the biggest aggregates induced by DHP were broken by mechanical forces of cavitation, shear, turbulence simultaneously, but still a few of them remained, giving the highest sizes on the distribution curves in intensity (**Bouaouina et al., 2006; Grácia-Juliá et al., 2008**). As a result, the shear forces experienced during each pass were decisive in controlling the size of the WP aggregates. Furthermore, no significant differences on the surface hydrophobicity and a small significant ( $p < 0.05$ ) increase of the intrinsic fluorescence were noticed between native and 300 MPa DHP treated WP after one pass. This indicates that the tertiary structure was affected by the DHP treatment but buried hydrophobic groups were unmasked by the dissociation and the re-formation of protein aggregates (**Tableau III.11**). These findings agreed with results found by **Bouaouina et al. (2006)**. But on the other hand, some irreversible structural changes as protein unfolding could start at 225 MPa pressure level as observed by **Grácia-Juliá et al. (2008)**. Furthermore, in our study, protein aggregation resulted from a combined effect of mechanical forces and short-life heating phenomena due to the cycling at 300 MPa (maximum of 67 °C; **Figure III.26**). However, some WP fractions may partially unfold at this temperature without impacting the WP denaturation which occurs at ~ 84 °C as revealed by previous authors works (**Fitzsimons et al., 2007**). Interestingly, as this temperature was almost constant after recycling, the high increase of WP treated size was probably due to the formation of large aggregates with a predominance of hydrophobic interactions as suggested by **Grácia-Juliá et al. (2008)** and by our previous study that showed the formation of WP aggregates of ~ 40 nm size after a heat-treatment at 85 °C for 1 h (**Beghdadi et al., 2022**). Surprisingly, 300 MPa DHP treated WP after the first pass led to aggregates of the same size (~ 38 nm). Moreover, recycling induced larger aggregates assemblies of ~ 85 and ~ 106 nm after the second and the third homogenization pass indicating that hydrophobic interactions are reinforced in this process, probably by the rise in temperature during the process that facilitated the WP aggregation.

### **3.3. Characterization of heat-treated mixtures of pea or whey proteins with casein micelles: effect of dynamic high-pressure pre-treatment of pea and whey dispersions**

In order to assess the ability of globular aggregates to interact with casein micelles under almost similar conditions, different numbers of passes were chosen for pea or whey proteins to obtain protein aggregates of the same size order. After the DHP treatment at 300 MPa with one

homogenization passes for whey proteins (WP) and three for pea proteins (PP), treated samples were mixed separately with CM at 4% (w/w) total protein concentration and 7.5:2.5 protein ratio. Mixtures were then heated at 85 °C for 1 h and formed dispersions that were compared to non-heated (non-HT) and heated (HT) mixtures of native PP or WP with casein micelles (CM). Samples were noted ((CM-PP) non-HT and (CM-PP) HT) or ((CM-WP) non-HT and (CM-WP) HT) (Figure III.28 and tableau III.12).



**Figure III.28.** Particle size distribution curves (a–b) for CM dispersion, (CM-P 300 P3) HT (Heat-treated mixture at 4% (w/w) total protein concentration and constant 7.5:2.5 protein ratio of casein micelle and pressurized pea protein at 300 MPa/three homogenization passes) and (CM-PP) HT (Heat-treated casein micelle-pea protein mixture at 4% (w/w) total protein concentration and constant protein ratio), (c–d) CM dispersion, (CM-W 300 P1) HT (Heat-treated mixture at 4% (w/w) total protein concentration and constant protein ratio of casein micelle and pressurized whey protein at 300 MPa/one homogenization pass) and (CM-WP) HT (Heat-treated casein micelle-whey protein mixture at 4% (w/w) total protein concentration and constant protein ratio). Measurements were carried out by photon correlation spectroscopy at 25 °C and size distribution curves were given in light intensity frequency (a, c) or in particle number frequency (b, d). Mean curves from three PCS measurements are shown.

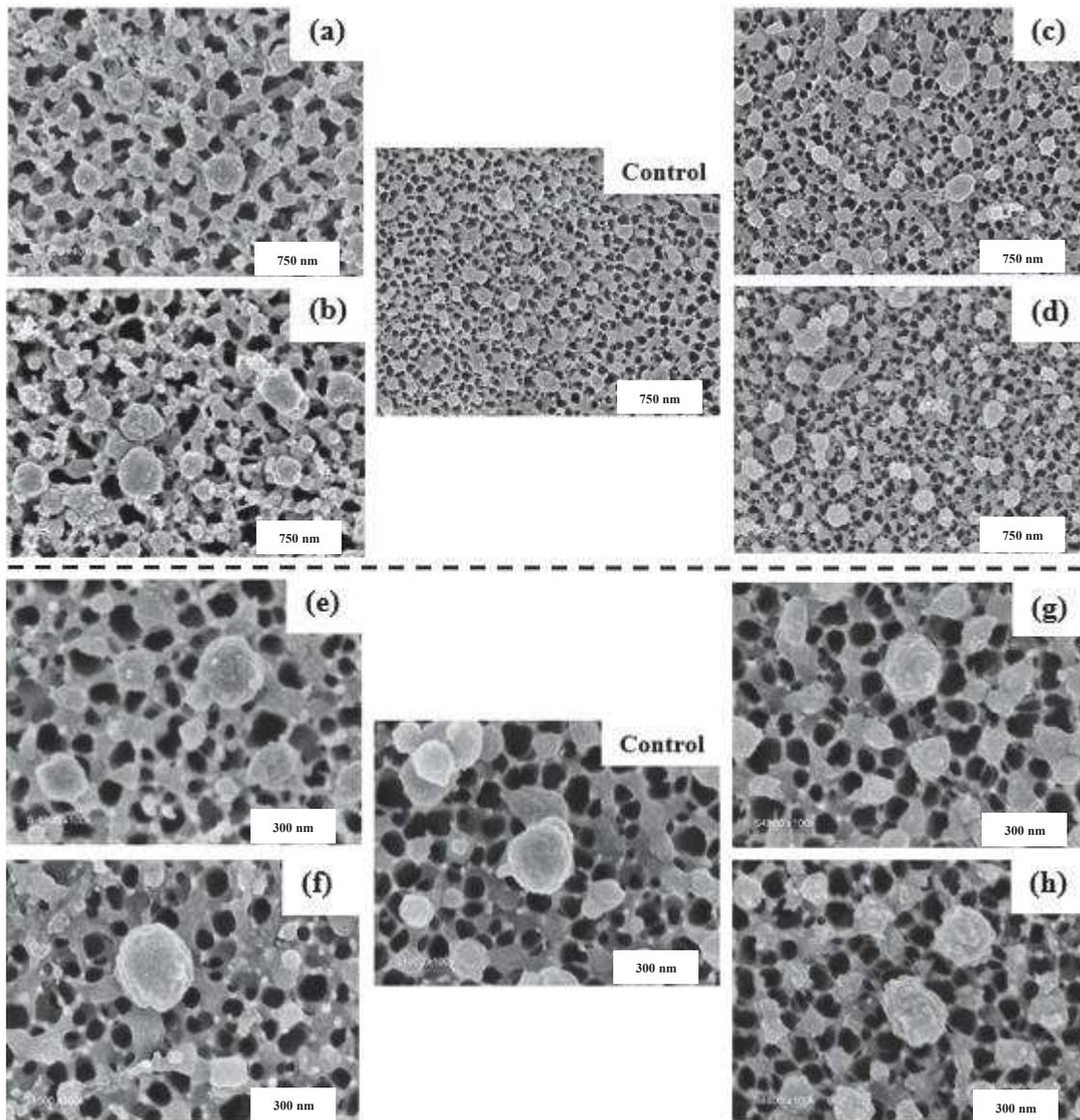
**Tableau III.12.** Particle size characteristics of CM dispersions, their heat-treated sample and their mixtures with PP or WP dispersions or with DHP-treated PP at 300 MPa and three passes or with DHP-treated WP at 300 MPa and one pass obtained with or without heat treatment protocol.

	Distribution in light intensity				Distribution in number frequency			
	Mean diameter	Minimal diameter	Maximal diameter	Value of the peak maximum	Mean diameter	Minimal diameter	Maximal diameter	Value of the peak maximum
	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)
Casein micelles (CM)	254 ± 6 <sup>a</sup>	68	787	220 ± 0	123 ± 6 <sup>ab</sup>	56	615	91 ± 0
Heated casein micelles (CM HT)	204 ± 2 <sup>b</sup>	83	459	190 ± 0	134 ± 4 <sup>a</sup>	72	459	106 ± 0
(CM-PP) non-HT	294 ± 4 <sup>c</sup>	122	647	342 ± 0	173 ± 18 <sup>c</sup>	72	868	111 ± 10
(CM-PP) HT	187 ± 2 <sup>d</sup>	75	438	164 ± 0	118 ± 5 <sup>b</sup>	65	396	96 ± 8
(CM-P 300 P3) HT	190 ± 4 <sup>d</sup>	75	483	173 ± 15	119 ± 3 <sup>b</sup>	65	396	96 ± 8
(CM-WP) non-HT	254 ± 6 <sup>a</sup>	68	787	220 ± 0	123 ± 6 <sup>ab</sup>	56	615	91 ± 0
(CM-WP) HT	234 ± 2 <sup>c</sup>	106	507	220 ± 0	176 ± 4 <sup>c</sup>	87	507	142 ± 0
(CM-W 300 P1) HT	231 ± 2 <sup>c</sup>	96	531	220 ± 0	165 ± 3 <sup>c</sup>	83	531	122 ± 0

Results are expressed as means of triplicate determinations ± standard deviation.

Values were calculated from the size distribution curves in light intensity and in number frequency as determined by photon correlation spectroscopy at 25 °C.

<sup>(a-e)</sup> Different letters indicate significant difference within a line between mixed proteins samples and CM ( $p < 0.05$ ).



**Figure III.29.** Scanning electron micrographs of dispersions of: heated CM (control), (a-e) (CM-PP) HT, (b-f) (CM-P 300 P3) HT, (c-g) (CM-WP) HT and (d-h) (CM-W 300 P1) HT at two magnifications  $40\,000\times$  and  $100\,000\times$ , respectively. The dotted lines indicate the length scale.

In order to evaluate the impact of the heat treatment on single CM and mixed protein dispersions, size distribution curves and particles characteristics were presented in **Tableau III.12** and **Figure III.28, a-b-c-d**. For the CMs, the heat treatment applied resulted in a significant ( $p < 0.05$ ) decrease of all size parameters in light intensity and a significant ( $p < 0.05$ ) slight increase in number frequency sizes (**Tableau III.12**). It could be explained by an increase of number of particles of smaller sizes and a decrease of number of larger particles sizes. These observations could be due to the dissociation of the colloidal calcium phosphate

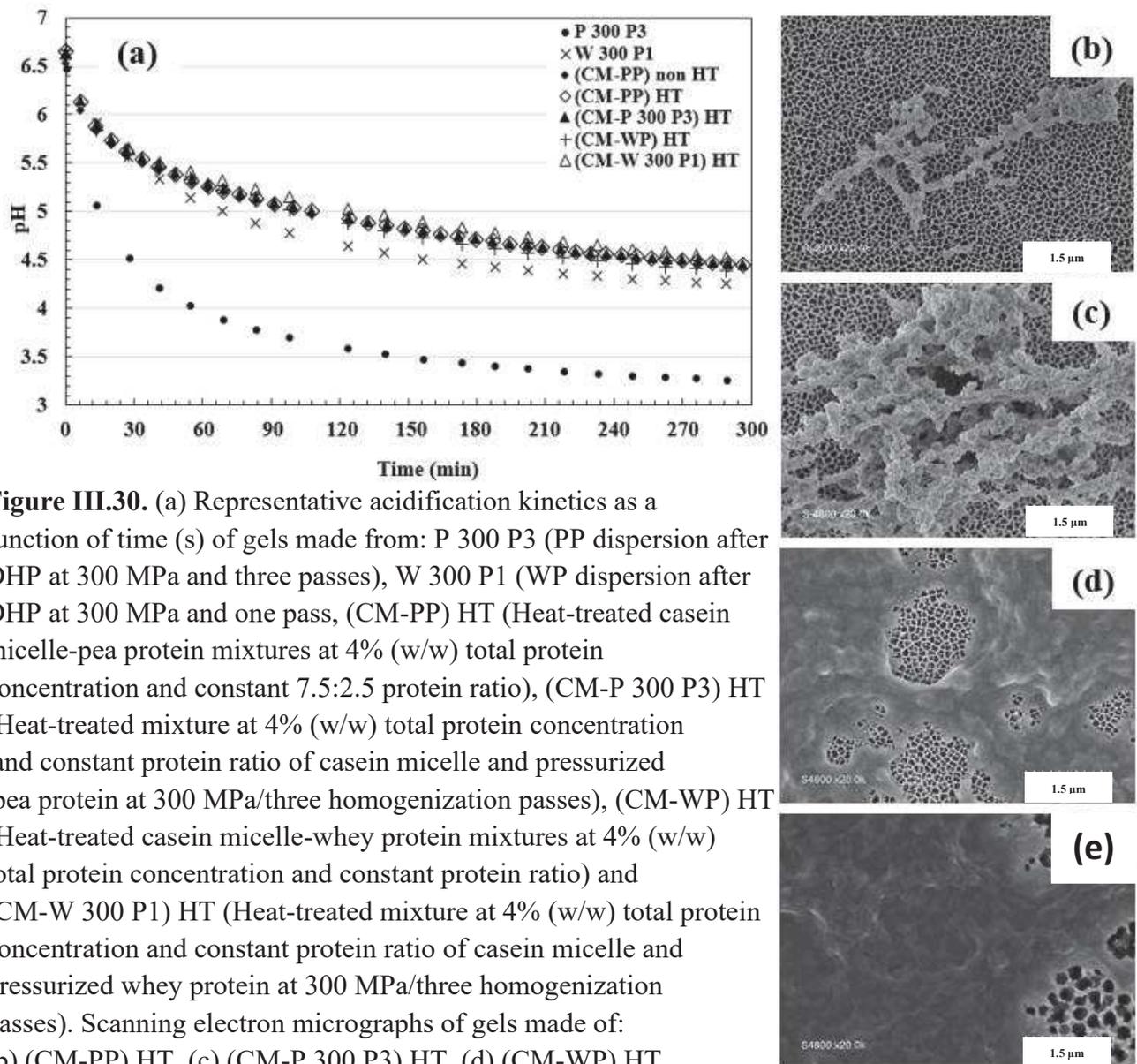
and/or reassociation of  $\kappa$ -caseins and traces of WP fractions already present in the protein isolate on casein micelle surface (Le Ray, & al. 1998).

On the other hand, the mixture of (CM-PP) non-HT revealed a monomodal and high polydisperse population in both light intensity and number frequency size distributions with  $294 \pm 4$  and  $173 \pm 18$  nm mean diameters, respectively (Tableau III.12). Contrary to expectations, the two populations peaks composed of the two proteins were not visible, indicating a very heterogenous distribution with a wide range of the particle sizes in the mixture. However, the heat treatment induced a shift to lower sizes with significant ( $p < 0.05$ ) decrease of the mean diameter of 36 and 32% in light intensity and in number frequency, respectively (Figure III.28, a-b). Furthermore, no differences in the shape of curves or in particles size were observed between heated (CM-PP) and (CM-P 300 P3). Moreover, SEM micrographs presented in Figure III.29, a-e and Figure III.29, c-g showed similar dispersions of protein mixture (CM-PP or CM-WP) composed of large quasi-spherical particles of sizes around 250 - 300 nm corresponding to CM HT. The mixtures distributions were polydisperse with a rough surface formed by small particles clinging to the surface of CMs which correspond to PP or P300 P3 dissociated aggregates. Small heterogeneous and dense fragments filled the space surrounding the large particles without associating with the latter. Observations well-matched with PCS results and indicated that no new complexes between native or DHP treated pea proteins and casein micelles were created during heating.

For the (CM-WP) non-HT mixture, the size distribution curve was as expected superimposed on that of native CM. It is explained by the size of native WP particles which did not exceed 3 nm (Figure III.27). Nevertheless, and compared to heated CM, the heat treatment has led to a significant ( $p < 0.05$ ) increase of 13 and 24% of the mean diameter in light intensity and in number frequency, respectively. Furthermore, as the minimum diameter also increased significantly in both distributions, the polydisperse distribution tended to be reduced and the diameter of the maximum peak increased further. Same observations and no changes in size characteristics were noticed for the (CM-W 300 P1) HT mixture. PCS results well matched with SEM micrographs presented in Figure III.29, b-d-f-h which show a similar organization of the particles in three-dimensional space. Besides, the spherical particles corresponding to heated mixtures aggregates had rough surfaces with larger sizes compared to the control. The areas surrounding were filled by denser and small particles aggregates corresponding probably to WP aggregates. These findings lead to the hypothesis that mixed complexes were formed by

the association of aggregates from non-treated or DHP treated WP with casein micelles. The types of interactions involved may control the gel behavior.

The visco-elastic properties parameters were followed for single protein dispersions as well as for protein mixtures according to acidification time to better understand the influence of each physical treatment applied (**Tableau III.13**). Furthermore, the acidification kinetic of the different samples were followed during 5 h at 25 °C after addition of 2% (w/w) GDL as presented in **figure III.30, a**.



**Figure III.30.** (a) Representative acidification kinetics as a function of time (s) of gels made from: P 300 P3 (PP dispersion after DHP at 300 MPa and three passes), W 300 P1 (WP dispersion after DHP at 300 MPa and one pass, (CM-PP) HT (Heat-treated casein micelle-pea protein mixtures at 4% (w/w) total protein concentration and constant 7.5:2.5 protein ratio), (CM-P 300 P3) HT (Heat-treated mixture at 4% (w/w) total protein concentration and constant protein ratio of casein micelle and pressurized pea protein at 300 MPa/three homogenization passes), (CM-WP) HT (Heat-treated casein micelle-whey protein mixtures at 4% (w/w) total protein concentration and constant protein ratio) and (CM-W 300 P1) HT (Heat-treated mixture at 4% (w/w) total protein concentration and constant protein ratio of casein micelle and pressurized whey protein at 300 MPa/three homogenization passes). Scanning electron micrographs of gels made of: (b) (CM-PP) HT, (c) (CM-P 300 P3) HT, (d) (CM-WP) HT, (e) (CM-W 300 P1) dispersions at magnification 20 000 ×. The dotted lines indicate the length scale.

**Tableau III.13.** Rheological parameters of acid-induced gelation of heated pea protein dispersion (PP HT, 1% (w/w)), heated whey protein dispersion (WP HT, 1% (w/w)), heated casein micelle dispersion (CM HT, 3% (w/w)), PP and WP DHP treated dispersions, (CM-PP) and (CM-WP) non-heated mixtures and (CM-P 300 P3), (CM-W 300 P1), (CM-PP), (CM-WP) heat-treated mixtures (4% (w/w) total protein concentration and 7.5:2.5 protein ratio).

		PP HT (control)	P 300 P3 (control)	WP HT (control)	W 300 P1 (control)	CM HT (control)	(CM-PP) non HT	(CM-PP) HT	(CM-P 300 P3) HT	(CM-WP) non HT	(CM-WP) HT	(CM-W 300 P1) HT
Gel point	Time (s)	190	270	NG	NG	5290	927	1735	1980	6310	4140	4020
	pH	6.02 ± 0.05 <sup>a</sup>	5.76 ± 0.05 <sup>b</sup>	NG	NG	4.94 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.78 ± 0.03 <sup>b</sup>	5.60 ± 0.01 <sup>c</sup>	5.56 ± 0.00 <sup>d</sup>	5.12 ± 0.01 <sup>e</sup>	5.22 ± 0.00 <sup>f</sup>	5.33 ± 0.01 <sup>g</sup>
	G' (Pa)	0.16 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>a</sup>	NG	NG	0.27 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.07 <sup>bc</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.28 ± 0.00 <sup>c</sup>
Final point (After 5h)	pH	3.38 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.25 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.47 ± 0.03 <sup>c</sup>	4.21 ± 0.03 <sup>d</sup>	4.33 ± 0.09 <sup>de</sup>	4.41 ± 0.02 <sup>e</sup>	4.45 ± 0.02 <sup>e</sup>	4.46 ± 0.03 <sup>e</sup>	4.35 ± 0.01 <sup>d</sup>	4.37 ± 0.01 <sup>d</sup>	4.51 ± 0.01 <sup>f</sup>
	G' (Pa)	2.03 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.35 <sup>b</sup>	NG	NG	160 ± 7 <sup>c</sup>	551 ± 48 <sup>d</sup>	721 ± 48 <sup>e</sup>	649 ± 29 <sup>e</sup>	79 ± 8 <sup>f</sup>	416 ± 39 <sup>g</sup>	466 ± 23 <sup>g</sup>

NG: non-gelled.

Results are expressed as means of triplicate determinations ± standard deviation of triplicate determinations.

<sup>(a-g)</sup> Different letters indicate significant difference within a line ( $p < 0.05$ ).

All dispersions containing CM gelled after acidification in solid and macroscopically homogeneous gels. The (1%, w/w) PP HT and P 300 P3 dispersions formed viscous and weak gels (2.03 and 1.28 Pa, respectively). However, the (1%, w/w) WP HT and W 300 P1 didn't gel (**Tableau III.13**). This may be attributed to the weakness of the network despite electrostatic repulsion decrease due to the low protein concentration or the sedimentation of large particles during the gel development (**Nicolai & Durand, 2013**). Compared to the PP HT sample, the gel point was reached later and at a significant ( $p < 0.05$ ) lower pH for the P 300 P3 dispersion. This could be explained by a longer time required for network formation and gelation of smaller protein particle sizes obtained after DHP treatment. It has been shown that DHP-treatment at 100 MPa significantly affects the Zeta potential of hazelnut protein meal by increasing its absolute value inducing a better stability of the dispersions and a higher time for precipitation and consequently a lower isoelectric pH (**Saricaoglu et al., 2018; Shariffa et al., 2016**). In addition, the decrease in particle size following the DHP-treatment as mentioned above causes an increase in the surface area and charged sites of the protein surface, and thus, the increase of the zeta potential of the P 300 P3 dispersion. Likewise, the two PP samples gels (PP HT and P 300 P3, respectively) reached the gel point almost 28 and 20 times faster and at a pH higher of 1 and 0.8 unit compared CM HT dispersion. It may be due to a higher isoelectric pH of pea proteins around 5-6 (Liang & Tang, 2013). The latter results were indeed observed during the acidification of the non-heated mixture of pea and casein micelles proteins which started to gel at a similar pH to that of PP. This rapid gelation of PP and P 300 P3 samples has certainly also impacted the early formation of the gel network of their heated mixtures with CM compared to CM-WP and CM-W300 P1 ones. Thus, the (CM-P 300 P3) HT and (CM-PP) HT gel points pHs were higher of 0.3 and 0.4 units compared to (CM-W 300 P1) HT and (CM-WP) HT, respectively. More valuable, the final storage modulus after 5 h of acidification was significantly ( $p < 0.05$ ) higher for both CM and PP mixtures compared to CM and WP ones. Moreover, no changes were observed between (CM-P 300 P3) HT and (CM-PP) HT or (CM-W 300 P1) HT and (CM-WP) HT indicating that the heat treatment was more efficient in controlling the mixtures aggregation. In contrast, the heat treatment seemed to have a real influence on pea or whey proteins in admixture with CMs since the final  $G'$  of the non-heated (CM-PP) (551 Pa) or (CM-WP) (79 Pa) clearly showed a significant ( $p < 0.05$ ) lower value compared to heated (CM-PP) (721 Pa) and (CM-P 300 P3) (649 Pa) or (CM-WP) (416 Pa) and (CM-W 300 P1) (466 Pa) mixtures samples (**Tableau III.13**). However, this process had a greater impact on WP and CMs mixtures since a very low  $G'$  was recorded for the non-heated (CM-WP) compared to heated (CM-WP) sample. After acidification of the heat-treated

mixtures, it is clearly reported that addition of WP to CM causes a strong increase of  $G'$ . It is evident that WP co-aggregate with CM and reinforce the CM network (Nicolai, 2019). Moreover, the less obvious difference between the stiffness of the gels after acidification of the thermally pretreated or not mixtures showed that the main bonds involved between PP and CM could be attributed to hydrophobic and electrostatic interactions. The latter differences between CM-PP and CM-WP mixture gels behavior were probably related to the impact of the single PP and WP aggregates size and surface hydrophobicity after dynamic high-pressure treatment on their ability of interaction with CM. Before the mixtures heat treatment, the size of the pressure-treated PP aggregates was twice as small as the pressure-treated WP ones. Thereby, the space network of the pea-casein micelles mixtures was denser and more compact compared to whey-casein micelles mixtures as shown in **figure III.30, b-c-d-e**. Similar observations were noticed for mixed gels from commercial pea and whey protein (Kornet et al., 2021a) but also from soy and whey protein (McCann et al., 2018) which have shown that PP may interact and co-aggregate with WP. In addition, the non-treated or pressure-treated PP had higher surface hydrophobicity compared to WP (**Tableau III.11**) inducing additional structural rearrangement of smaller size and more compact PP aggregates. Their specific interactions with CM by means of hydrophobic and electrostatic interactions may govern and strengthen the gel network, resulting in stabilization of the gel structure with further increase in  $G'$ .

#### 4. Conclusion

In this study, the DHP treatment was used to provide new functionality to pea and whey proteins in aqueous dispersion to enhance the strength of acidic gels obtained by GDL addition. The pressure treatment at 100, 200 and 300 MPa of native soluble aggregates of pea proteins obtained from a commercial isolate induced a significant size and surface thiols content reduction and significant increase in the surface hydrophobicity. On the other hand, the high shear action of three recycling at 300 MPa were efficient to significantly reduce the size of the native pea proteins aggregates and their surface thiols content without impacting the surface hydrophobicity of the pea particles. This DHP treatment could be defined as a top-down process which caused non-covalent interactions disruption leading to PP aggregates size destruction. Then, the addition of these pressured pea protein to CM, followed by a heat treatment, was effective to form homogeneous acid gel with interesting properties. The combination of DHP and HT upstream of the gelation step was efficient in improving the acid gelation and strength of the mixed pea-CM gel. Applying the same treatment conditions on other globular proteins as whey proteins result in significantly lower different structural behavior. The results of this

study showed a possible integration of pea proteins into dairy gels with a synergistic improvement of the properties of acidic gels obtained after DHP and thermal treatment of protein dispersions. The combination of these two physical treatments can improve the stiffness and rheological properties of mixed plant/milk acid gels, offering interesting perspectives in the food industry.

## Synthèse

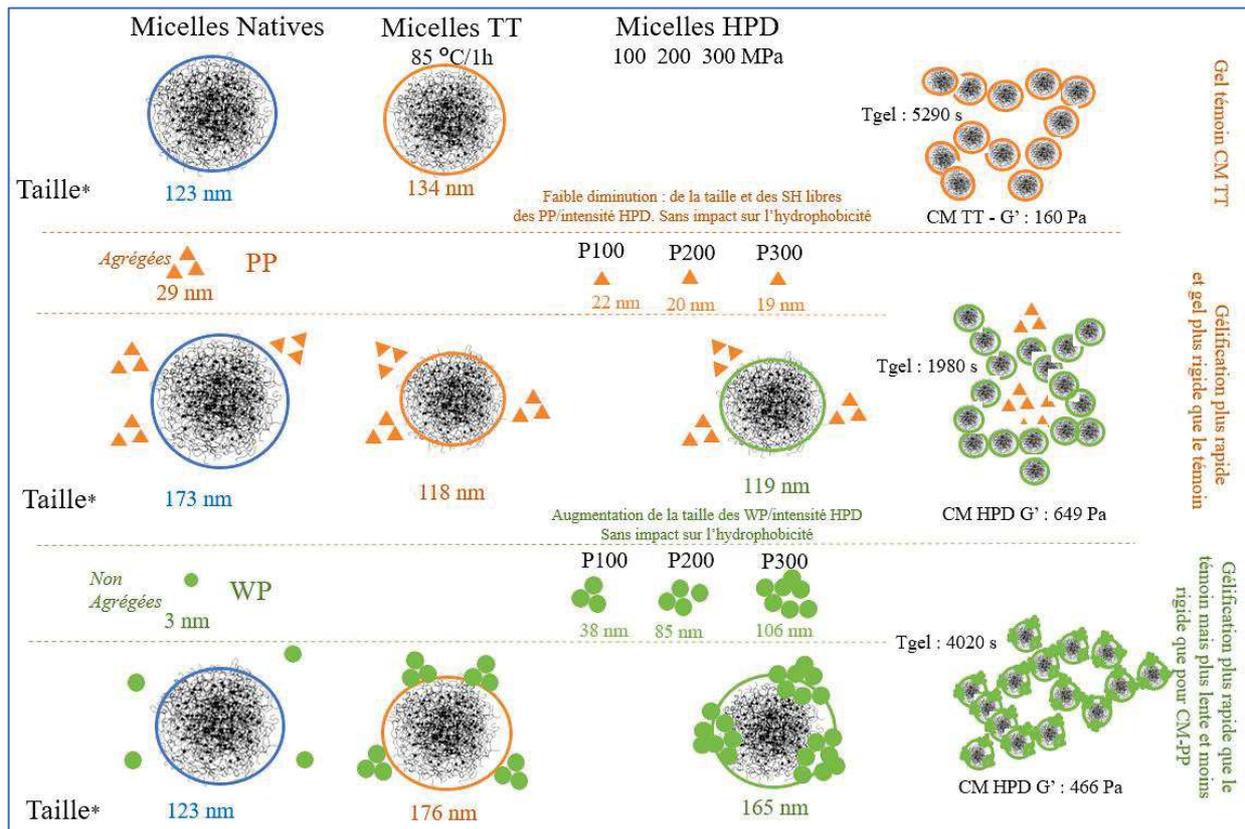
Dans cette partie, le procédé de traitement par haute pression dynamique (HPD) a été utilisé principalement pour modifier les caractéristiques physicochimiques des protéines de pois dans une perspective d'améliorer leur fonctionnalité. Selon la littérature et sachant que ces dernières étaient présentes dans les dispersions initiales sous forme d'agrégats natifs, ce procédé pouvait soit permettre de fragmenter les agrégats natifs stabilisés par de faibles énergies, soit assembler les agrégats de protéines en favorisant des interactions de faibles énergies.

Dans les conditions expérimentales choisies, le traitement aux pressions de 100, 200 et 300 MPa des protéines de pois a induit une réduction significative de la taille des agrégats natifs et de leur teneur en thiols de surface (**Figure III.31**). Par contre, aucun changement n'a été remarqué pour l'hydrophobie de surface. D'autre part, les différents passages dans l'homogénéisateur à la pression de 300 MPa ont été efficaces pour réduire d'avantage et de manière significative la taille des PP et la teneur en thiols de surface. Il a été constaté que les agrégats natifs de PP ont été fragmentés sous l'action des forces de cisaillement élevées. Le traitement à HPD a probablement provoqué une perturbation des interactions non covalentes conduisant ainsi à une destruction des agrégats de PP. Cette étude a montré également que l'application des mêmes conditions de traitement à d'autres protéines globulaires (WP) a entraîné un comportement structurel complètement différent. La HPD a permis l'agrégation des WP. La taille des agrégats a été augmentée avec l'augmentation de l'intensité du traitement. De plus, il a été constaté que les interactions hydrophobes avaient un rôle majeur dans le contrôle de la taille des agrégats après chaque passage dans l'homogénéisateur.

Suite au traitement thermique des mélanges de protéines globulaires de PP ou WP traitées par HPD avec les CM, les techniques de mesure de taille et de microscopie électronique à balayage ont été efficaces pour déterminer le comportement de ces protéines dans les dispersions mixtes. Il a été observé que les protéines de pois traitées par HPD n'étaient pas impliquées dans la formation de complexes mixtes avec les micelles de caséine pendant le chauffage. Les protéines de pois formeraient des fragments denses « space gel-fillers » et hétérogènes, remplissant l'espace autour des particules de CM gélifiées, sans vraiment s'associer à ces dernières.

A l'opposé, des complexes mixtes ont été formés par l'association d'agrégats provenant de WP non traités ou traités par HPD avec des micelles de caséine.

La préparation des gels mixtes par l'acidification par GDL d'une dispersion de protéines globulaires et de micelles de caséines représente une bonne alternative pour modifier les propriétés du gel acide laitier. De plus, des gels plus rigides ont été obtenus pour les mélanges de PP et de CM comparés aux gels de WP et CM. Cependant, l'apport des HP est négligeable par rapport aux traitements thermiques préalable à l'acidification en termes de rigidité.



\* : Distribution de taille des particules en nombre de fréquence.

HPD : haute pression dynamique / CM : Micelle de caséines / Tgel : temps de gélification / TT : Traitement thermique / G' : Module élastique permettant d'évaluer la rigidité du gel, obtenu après 5h de coagulation par ajout de GDL.

**Figure III.31.** Synthèse schématisant les résultats obtenus pour les traitements par haute pression dynamique (HPD) et/ou traitement thermique (TT) des protéines globulaires, des micelles de caséine et des mixtes.

# **Conclusions générales et perspectives**

## **Conclusions générales et perspectives**

L'augmentation de la demande en protéines dans le cadre de l'alimentation humaine à l'échelle mondiale mais aussi la nécessité de rationaliser la production des protéines d'origine animale afin de réduire ses impacts environnementaux conduisent à développer des stratégies favorisant la substitution totale ou partielle des protéines d'origine animale dans le régime alimentaire des pays développés. Ainsi, le rééquilibrage du ratio entre les protéines d'origine animale et végétale nécessite de développer de nouvelles associations entre ces deux familles de protéines. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était d'étudier l'association fonctionnelle des protéines solubles d'une légumineuse, le pois, avec les assemblages protéiques laitiers que sont les micelles de caséines. L'influence de deux procédés physiques, un traitement thermique et un traitement par haute pression dynamique, sur les protéines de pois solubles, pré-traitement réalisé avant leur association aux micelles de caséines puis la gélification de ce mélange, a été évaluée. L'association fonctionnelle des protéines solubles de pois aux micelles de caséines a été de plus comparée tout au long de ce travail à celle des micelles de caséines et des protéines lactosériques, considérées comme un modèle de référence.

Les protéines de pois ont été sélectionnées suite à une étude bibliographique comparant les différentes protéines d'origine végétale disponibles actuellement sous la forme d'isolats commerciaux. L'équilibre nutritionnel, la bonne digestibilité, les propriétés fonctionnelles mises en avant dans les études à disposition mais aussi la très faible teneur en composés allergènes et antinutritionnels ont été les arguments en faveur du choix des protéines de pois. De plus, plusieurs isolats de protéines de pois sont actuellement accessibles à l'échelle commerciale permettant ainsi de réaliser cette étude avec des protéines dans la conformation qu'elles ont à l'issue du procédé d'extraction et de stabilisation mis en œuvre à l'échelle industrielle et donc telles qu'elles seraient utilisées dans le cadre d'une utilisation applicative.

Afin d'atteindre les objectifs fixés, ce travail de thèse a été réalisé en trois grandes étapes.

Dans la première étape, les trois isolats commerciaux de protéines mis en œuvre dans ce travail ont tout d'abord été caractérisés d'un point de vue biochimique et physico-chimique. L'optimisation de la solubilité des protéines de pois issue de l'isolat commercial sélectionné (Nutralys® S85F, Roquette) a ensuite été réalisée. La solubilité des protéines dépendant de facteurs intrinsèques liés à la nature des protéines mais aussi de facteurs extrinsèques que sont les propriétés physico-chimiques du milieu environnant, l'influence de ces derniers (pH, force

ionique, nature du dispersant) a été étudiée afin d'optimiser la solubilité des protéines de pois. Les paramètres permettant une solubilisation maximale, et donc retenus pour la suite de cette étude, sont une concentration initiale en protéines de pois de 5 % (p/p) dispersée dans de l'eau ultrapure à un pH de 6,7 avec une étape de séparation des phases solubles et insolubles par centrifugation à une vitesse de centrifugation de  $12\,000 \times g$  pendant 20 min. Ces conditions opératoires ont ainsi permis d'obtenir une dispersion contenant 1,7 % de protéines de pois solubles soit un taux de solubilité optimale de 33 %.

Concernant les protéines solubles de pois extraites, il s'agit de globulines (légumine, vivilines et convicilines) présentes sous la forme d'agrégats d'un diamètre moyen de 29 nm et assemblés par des liaisons non-covalentes. Ces agrégats dits natifs sont fort probablement induits par le procédé d'extraction mis en œuvre à l'échelle industrielle. La présence de ces agrégats a été par la suite confirmée par analyse enthalpique différentielle. En ce qui concerne les protéines lactosériques, elles sont présentes dans l'isolat commercial sous leur forme native (diamètre moyen 2 nm).

La seconde partie de ce travail a porté sur l'étude de l'influence de deux protocoles de traitement thermique sur les propriétés d'interaction et d'association des micelles de caséines (CM) en présence des protéines solubles de pois (PPI) extraites de l'isolat commercial avec une concentration totale en protéines pour le mélange de 4 % (p/p) à pH 6,7 et un ratio protéique CM : PPI de 7,5 : 2,5. Le premier protocole a consisté en un co-chauffage (85 °C/1 h) du mélange des protéines solubles de pois et des micelles de caséines. Le second protocole a comporté deux étapes successives : un pré-traitement thermique (85 °C/1 h) des protéines de pois et des micelles de caséines séparément puis un co-chauffage (85 °C/ 1 h) du mélange des deux dispersions pré-traitées thermiquement. La même étude a été réalisée sur un mélange uniquement composé dans les mêmes proportions de protéines laitières, soit des micelles de caséines et des protéines lactosériques à la place des protéines solubles de pois.

L'étude de l'influence d'un pré-traitement thermique (85 °C/1 h) sur des deux types de protéines globulaires étudiées, les protéines solubles de pois et les protéines lactosériques, a permis de mettre en évidence une réduction de la taille des particules de protéines de pois (29 nm à 22 nm) lors de ce traitement thermique alors que ce même traitement thermique a conduit à la formation d'agrégats de protéines lactosériques d'un diamètre moyen de 40 nm mettant en œuvre des liaisons covalentes. Ce pré-traitement thermique a de plus augmenté significativement l'hydrophobie de surface de ces deux familles de protéines (+ 15 % pour les

protéines solubles de pois et + 43 % pour les protéines lactosériques) facilitant par la suite leur interaction avec la surface micellaire lors de leur mélange avec les micelles de caséines suivi d'un traitement thermique (85 °C/1 h).

L'acidification des mélanges de micelles de caséines et de protéines solubles de pois obtenus par les deux protocoles a conduit à l'obtention de gels plus fermes et se structurant plus rapidement par comparaison avec les gels obtenus à partir de l'association des deux fractions de protéines laitières. Les protéines de pois interagiraient ainsi entre elles dans un premier temps, leur pI étant plus élevé que celui des protéines lactosériques et des micelles de caséines, formant un gel indépendant du gel créé à partir des micelles de caséines. Le gel formé par les protéines de pois, indépendant de l'association des micelles de caséines, se comporterait ainsi comme un gel de remplissage renforçant le gel établi par les micelles de caséines.

Dans la troisième partie de cette étude, l'influence du niveau de pression et du nombre de passages lors d'un pré-traitement par haute pression dynamique (HPD) a été évaluée sur les protéines solubles de pois à la fois sur leurs propriétés physico-chimiques mais aussi leur réactivité lors de leur association avec des micelles de caséines puis la gélification de ce mélange. Le pré-traitement par haute pression dynamique aux 3 niveaux de pression testés (100, 200 et 300 MPa) a conduit à une réduction significative de la taille et du nombre de groupement sulfhydryle en surface des particules de protéines solubles de pois en comparaison avec les agrégats initiaux de protéines de pois. Cette réduction est cependant du même ordre de grandeur que celle observée lors du pré-traitement thermique mis en œuvre dans la seconde partie de ce travail. L'augmentation de l'hydrophobie de surface des protéines solubles de pois suite au pré-traitement par haute pression dynamique est légèrement moindre (+ 11 %) que celle induite par le pré-traitement thermique (+ 15 %). Les forces de cisaillement élongationnelles générées lors du passage dans l'entrefer de la valve HP ainsi que les turbulences et le phénomène de cavitation en aval de la valve HP ont eu ainsi un impact moins marqué sur les propriétés physico-chimiques des protéines solubles de pois que le pré-traitement thermique mis en œuvre précédemment. Ce même pré-traitement appliqué aux protéines lactosériques (300 MPa – 1 à 3 passages) se traduit par la formation d'agrégats dont la taille moyenne augmente avec le nombre de passages. Deux passages à 300 MPa sont nécessaires pour obtenir des agrégats de taille similaire à ceux obtenus lors du pré-traitement thermique favorisant la formation de liaisons covalentes. Le pré-traitement par HPD des protéines solubles de pois (300 MPa – 3 passages) ou des protéines lactosériques (300 MPa – 1 passage) avant leur association aux micelles de caséines n'a pas d'influence significative sur la fermeté des gels obtenus par acidification

chimique en comparaison avec les mélanges constitués de protéines de pois ou de protéines lactosériques non traitées. Dans les deux cas, les protéines de pois non pré-traitées ou pré-traitées par HPD ont gélifiées indépendamment des micelles de caséines renforçant la fermeté globale des gels obtenus en jouant un rôle de remplissage.

Les expérimentations réalisées dans cette thèse ont permis d'apporter de nouvelles connaissances concernant les modalités d'assemblage de protéines d'origine végétale, les protéines solubles de pois, avec le système protéique colloïdal modèle qu'est la micelle de caséines. Les caractéristiques des gels obtenus par acidification de cet assemblage protéines animales/protéines végétales se sont révélées prometteuses car les gels obtenus sont plus fermes avec une prise en gel plus rapide que des gels préparés à partir de micelles de caséines et de protéines lactosériques.

Cette étude pourrait être complétée en s'intéressant à un système plus complexe, comme peuvent l'être les gels laitiers du commerce, ajoutant au système d'étude d'autres constituants biochimiques tels que les glucides et les lipides. Ces derniers ont souvent été considérés comme des sources de renforcement des propriétés structurelles et peuvent ainsi permettre d'élaborer des matrices avec de nouvelles propriétés fonctionnelles.

D'autre part, la nature de l'agent acidifiant lors de l'assemblage des protéines de pois avec les micelles de caséines pourrait être aussi une variable d'étude. Ainsi, la cinétique de gélification et les caractéristiques texturales des gels obtenus pourraient être étudiées avec comme précurseur d'acide des ferments lactiques ou encore en réalisant une acidification *via* l'injection de CO<sub>2</sub> sous pression. De plus, il serait intéressant d'étudier l'effet d'une coagulation de type présure sur le mélange micelles de caséines/protéines solubles de pois avec dans l'optique l'élaboration d'un fromage mixte par exemple.

Enfin, il serait pertinent, d'un point de vue nutritionnel, d'étudier la capacité de rétention de l'assemblage mixte étudié dans ce travail concernant des molécules d'intérêt nutritionnel sensibles et d'évaluer le rôle protecteur que cet assemblage pourrait jouer pour protéger ces molécules et permettre une meilleure biodisponibilité.

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

### A

- Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S., & Salem, A. (2009). Factors affecting the functional properties of whey protein products: A review. *Food Reviews International*, 25(3), 251–270. <https://doi.org/10.1080/87559120902956224>.
- Adebiyi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*, 128(4), 902–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.116>.
- Afify, A. E. M. M. R., El-Beltagi, H. S., El-Salam, S. M., & Omran, A. A. (2012). Protein solubility, digestibility and fractionation after germination of sorghum varieties. *PLoS ONE*, 7(2), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031154>.
- Aiking, H., & de Boer, J. (2018). The next protein transition. *Trends in Food Science and Technology*, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.008>.
- Ainis, W. N., Ersch, C., & Ipsen, R. (2018). Partial replacement of whey proteins by rapeseed proteins in heat-induced gelled systems: Effect of pH. *Food Hydrocolloids*, 77, 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.016>.
- Akerstrom, B., Flower, D. R., & Salier, J. P. (2000). Lipocalins: unity in diversity. *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*, 9(1482), 1–8.
- Alting, A. C., Hamer, R. J., De Kruif, C. G., Paques, M., & Visschers, R. W. (2003). Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 469–479. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00023-7).
- Aluko, R. E., Mofolasayo, O. A., & Watts, B. M. (2009). Emulsifying and foaming properties of commercial yellow pea (*Pisum sativum* L.) seed flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9793–9800. <https://doi.org/10.1021/jf902199x>.
- Alves, A. C., & Tavares, G. M. (2019). Mixing animal and plant proteins: Is this a way to improve protein techno-functionalities? *Food Hydrocolloids*, 97, 105–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.016>.
- Amagliani, L., & Schmitt, C. (2017). Globular plant protein aggregates for stabilization of food foams and emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.013>.

- Anema, S. G., & Li, Y. (2000). Further studies on the heat-induced, pH dependent dissociation of casein from the micelles in reconstituted skim milk. *LWT–Food Science and Technology*, 33, 335–343. <https://doi.org/10.1006/fstl.2000.0665>.
- Anema, S. G., & Li, Y. (2003). Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal of Dairy Research*, 70(1), 73–83. <https://doi.org/10.1017/S0022029902005903>.
- Anema, S. G., Lee, S. K., Lowe, E. K., & Klostermeyer, H. (2004). Rheological properties of acid gels prepared from heated pH-adjusted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 337–343.
- Anuradha, S.N., & Prakash, V., (2009). Altering functional attributes of proteins through cross linking by transglutaminase - A case study with whey and seed proteins. *Food Research International*, 42(9), 1259–1265.
- AOAC (2000). *Official methods of analysis* (17th ed.). Gaithersburg, ML, USA: AOAC International.
- Aoki, T., Yamada, N., & Kako, Y. (1990). Relation between Colloidal Calcium Phosphate Cross-linkage. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(9), 2287–2292.
- Arteaga, V. G., Kraus, S., Schott, M., Muranyi, I., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2021). Screening of twelve pea (*Pisum sativum* L.) cultivars and their isolates focusing on the protein characterization, functionality, and sensory profiles. *Foods*, 10(4), 758–775. <https://doi.org/10.3390/foods10040758>.

## **B**

- Bajaj, P. R., Tang, J., & Sablani, S. S. (2015). Pea Protein Isolates: Novel Wall Materials for Microencapsulating Flaxseed Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 8(12), 2418–2428. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1589-6>.
- Bahri, A., Martin, M., Gergely, C., Marchesseau, S., & Chevalier-Lucia, D. (2018). Topographical and nanomechanical characterization of casein nanogel particles using atomic force microscopy. *Food Hydrocolloids*, 83, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.029>.
- Bahri, A., Martin, M., Gergely, C., Pugnière, M., Chevalier-Lucia, D., & Marchesseau, S. (2017). Atomic Force Microscopy study of the topography and nanomechanics of casein micelles captured by an antibody. *Langmuir*, 33(19), 4720–4728. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00311>.

- Barac, M. B., Pešić, M. B., Stanojević, S. P., Kostić, A. Z., & Čabrilo, S. B. (2015). Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates-a review. *Acta Periodica Technologica*, 46, 1–18. <https://doi.org/10.2298/APT1546001B>.
- Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M., Stanojevic, S., Zilic, S., Macej, O., & Ristic, N. (2010). Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 4973–4990. <https://doi.org/10.3390/ijms11124973>.
- Batista, A. P., Portugal, C. A. M., Sousa, I., Crespo, J. G., & Raymundo, A. (2005). Accessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36(3), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.04.003>.
- Beghdadi, A., Picart-Palmade, L., Cunault, C., Marchesseau, S., & Chevalier-Lucia, D. (2022). Impact of two thermal processing routes on protein interactions and acid gelation properties of casein micelle-pea protein mixture compared to casein micelle-whey protein one. *Accepté dans Food Research International*.
- Beliciu, C. M., & Moraru, C. I. (2011). The effect of protein concentration and heat treatment temperature on micellar casein-soy protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1448–1460.
- Beliciu, C. M., & Moraru, C.I. (2013). Physico-chemical changes in heat treated micellar casein-soy protein mixtures. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.013>.
- Ben-Harb, S., Panouillé, M., Huc-Mathis, D., Moulin, G., Saint-Eve, A., Irlinger, F., Bonnarme, P., Michon, C., & Souchon, I. (2018). The rheological and microstructural properties of pea, milk, mixed pea/milk gels and gelled emulsions designed by thermal, acid, and enzyme treatments. *Food Hydrocolloids*, 77, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.022>.
- Berot, S., Le Goff, E., Foucault, A., & Quilien, L. (2007). Centrifugal partition chromatography as a tool for preparative purification of pea albumin with enhanced yields, *Journal of Chromatography B*, 845(2), 205–209.
- Bierzuńska, P., Cais-Sokolińska, D., & Yiğit, A. (2019). Storage stability of texture and sensory properties of yogurt with the addition of polymerized whey proteins. *Foods*, 8(11), 1–9. <https://doi.org/10.3390/foods8110548>.
- Blayo, C., Vidcoq, O., Lazennec, F., & Dumay, E. (2016). Effects of high-pressure processing (hydrostatic high pressure and ultra-high pressure homogenisation) on whey protein native state and susceptibility to tryptic hydrolysis at atmospheric pressure. *Food Research International*, 79, 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.024>.

- Bogahawaththa, D., Bao C., Nguyen H., Trivedi, J., Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2019). Impact of selected process parameters on solubility and heat stability of pea protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 102, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.034>.
- Bora, P. S., Brekke, C. J., & Powers, J. R. (1994). Heat Induced Gelation of Pea (*Pisum sativum*) Mixed Globulins, Vicilin and Legumin. *Journal of Food Science*, 59(3), 594–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb05570.x>.
- Borzova, V. A., Markossian, K. A., Chebotareva, N. A., Kleymenov, S. Y., Poliansky, N. B., Muranov, K. O., Stein-Margolina, V. A., Shubin, V. V., Markov, D. I., & Kurganov, B. I. (2016). Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin. *Plos One*, 11(4), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153495>.
- Bottcher, S. R., & Foegeding, E. A. (1994). Whey protein gels: fracture stress and strain and related microstructural properties. *Food Hydrocolloids*, 8, 113-123.
- Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., & Legrand, J. (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, 16(4), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.05.004>.
- 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(11), 3754–3762. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.019>.
- Boukid, F., Rosell, C. M., & Castellari, M. (2021). Pea protein ingredients: A mainstream ingredient to (re)formulate innovative foods and beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 729–742. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.040>.
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>.
- Burger, T. G., & Zhang, Y. (2019). Recent progress in the utilization of pea protein as an emulsifier for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.007>.

C

- Can Karaca, A., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44, 2742–2750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>.
- Chao, D., & Aluko, R. E. (2018). Modification of the structural, emulsifying, and foaming properties of an isolated pea protein by thermal pretreatment. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 357–366. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1406536>.
- Chao, D., Jung, S., & Aluko, R. E. (2018). Physicochemical and functional properties of high pressure-treated isolated pea protein. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.10.014>.
- Cheftel, J. C., & Lorient, D. (1982). Les propriétés fonctionnelles des protéines lactières et leur amélioration. In *Le lait*, 62, 435–483. HAL Id : hal-00928942.
- Chen, X., Xu, X., & Zhou, G. (2016). Potential of high-pressure homogenization to solubilize chicken breast myofibrillar proteins in water. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 170–179.
- Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L. (2019). High-pressure homogenization in food processing. *Green Food Processing Techniques*, Elsevier, 139–157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815353-6.00005-7>.
- Chihi, M. L., Messon, J. L., Sok, N., & Saurel, R. (2016). Heat-Induced Soluble Protein Aggregates from Mixed Pea Globulins and  $\beta$ -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(13), 2780–2791. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00087>.
- Chihi, M. L., Sok, N., & Saurel, R. (2018). Acid gelation of mixed thermal aggregates of pea globulins and  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 85, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.006>.
- Chihi., M. L. (2016). Etude des interactions dans la formation d'agrégats thermiques mixtes entre globuline de pois et  $\beta$ -lactoglobuline : application à l'élaboration de gels acides. Thèse de Doctorat en sciences des aliments, AgroSupDijon. France. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01447760>.
- Cho, Y. H., Lucey, J. A., & Singh, H. (1999). Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat globule surface material and heat treatment of milk. *International Dairy Journal*, 9(8), 537–545. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00123-5).
- Cochereau, R., Nicolai, T., Chassenieux, C., & Silva, J. V. C. (2019). Mechanism of the spontaneous formation of plant protein microcapsules in aqueous solution. *Colloids and*

Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 562, 213–219.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.11.019>.

Comfort, S., & Howell, N. K. (2002). Gelation properties of soya and whey protein isolate mixtures. *Food Hydrocolloids*, 16(6), 661–672. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00033-4).

Corredig, M., & Dalgleish, D. G. (1999). The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *International Dairy Journal*, 9(3–6), 233–236. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00066-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00066-7).

Croy, R. R. D., Hoque, M. S., Gatehouse, J. A., & Boulter, D. (1984). The major albumin proteins from pea (*Pisum sativum* L.). Purification and some properties, *Biochemistry Journal*, 218, 795–803.

## D

Dahl, W., Foster, L., & Tyler, R. (2012). Review of the health benefits of peas (*pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition*, 108, S3–S10.

Dalgleish, D. G. (1992). Bovine milk protein properties and the manufacturing quality of milk. *Livestock Production Science*, 35, 75–93.

Dalgleish, D. G. (1990). The conformation of proteins on solid/water interfaces-caseins and phosvitin on polystyrene latices. *Colloids and Surfaces*, 46, 141–155.

Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles - Review and possible improvements. *Soft Matter*, 7(6), 2265–2272. <https://doi.org/10.1039/c0sm00806k>.

Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 449–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>.

Dalgleish, D. G., Law, A. J. R. (1989). pH-induced dissociation of bovine casein micelles. 2. Mineral solubilization and its relation to casein release. *Journal of Dairy Research*, 56, 727–735.

Damodaran, S. (1994). Structure-function relationship of food proteins. In N. S. Hettiarachchy, & G. R. Ziegler (Eds.), *Protein functionality in food systems*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc, 1–37.

Damodaran, S., (1996). Amino acids, peptides, and proteins: In *Food Chemistry*, Marcel Dekker Inc ed. O. R. Fennema, New York, 321–429.

- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. W. (2008). *Fennema's food chemistry* (4th ed.); Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, FL, pp. 1160.
- De Boer, J., & Aiking, H. (2019). Strategies towards healthy and sustainable protein consumption: A transition framework at the levels of diets, dishes, and dish ingredients. *Food Quality and Preference*, 73, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.11.012>.
- De Kruif, C. G., & Holt, C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. *Advanced Dairy Chemistry*, 1(3), 233–275.
- De Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S., & Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, (171-172), 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002>.
- De la Fuente, M. A., Singh, H., & Hemar, Y. (2002). Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 13(8), 262–274. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00133-4).
- Deng, Q., Wang, L., Wei, F., Xie, B., Huang, F., Huang, W., Shi, J., Huang, Q., Tian, B., Xue, S., (2011). Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from *Ginkgo biloba* seeds. *Food Chemistry*, 124(4), 1458–1465.
- Derbshyre, E., Wright, D. J., & Boutler, D. (1976). Legumin and vicilin storage proteins of legume seed. *Phytochemistry*, 15, 3–24.
- Dickinson, E. (1992). Structure and composition of adsorbed protein layers and the relationship to emulsion stability. *Journal of the Chemical Society – Faraday Transactions*, 88, 2973–2983.
- Dickinson, E., & McClements, D. J. (1995). *Advances in Food Colloids* London. Blackie Academic and Professional.
- Djoullah, A. (2016). Réticulation enzymatique des protéines de pois pour la formation de microparticules : application à l'encapsulation de la riboflavine. Thèse de Doctorat en science des aliments, AgroSupDijon. France. HAL Id : tel-01375883.
- Djoullah, A., Husson, F., & Saurel, R. (2018). Gelation behaviors of denaturated pea albumin and globulin fractions during transglutaminase treatment. *Food Hydrocolloids*, 77, 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.005>.
- Donato, L., & Guyomarc'h, F. (2009). Formation and properties of the whey protein/ $\kappa$ -casein complexes in heated skim milk - A review. *Dairy Science and Technology*, 89(1), 3–29. <https://doi.org/10.1051/dst:2008033>.

- Donato, L., Alexander, M., & Dalgleish, D. G. (2007). Acid gelation in heated and unheated milks: Interactions between serum protein complexes and the surfaces of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4160–4168. <https://doi.org/10.1021/jf063242c>.
- Dreyer, L., Astier, C., Dano, D., Hosotte, M., Jarlot-Chevaux S., Sergeant, P. & Kanny, G. (2014). Consommation croissante d'aliments contenant du pois jaune : un risque d'allergie ? *Revue Française d'Allergologie*, 54(1), 20–26.
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., & Blayo, C. (2013). Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science and Technology*, 31(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.005>.
- Dumay, E., Picart, L., Regnault, S., Thiebaud, M. (2006). High pressure–low temperature processing of food proteins *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins & Proteomics*, 1764, 599–618.

## E

- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Ercili-Cura, D., Lille, M., Legland, D., Gaucel, S., Poutanen, K., Partanen, R., & Lantto, R. (2013). Structural mechanisms leading to improved water retention in acid milk gels by use of transglutaminase. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.07.008>.
- Færgemand, M., Sørensen, M. V., Jørgensen, U., Budolfson, G. and Qvist, K. B. (1999). Transglutaminase: effect on instrumental and sensory texture of set style yoghurt. *Milchwissenschaft*, 54, 563–66.
- Famelart, M. H., Guyomarc'h, F., Morand, M., & Novales, B. (2011). Agrégation protéique et propriétés gélifiantes et moussantes des protéines laitières – quoi de neuf sur le plan des connaissances ? *Innovations Agronomiques*, 13(13), 117–132.

## F

- FAO. (2017). The future of food and agriculture. Trends and challenges. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Felix, M., Perez-Puyana, V., Romero, A., & Guerrero, A. (2017). Development of thermally processed bioactive pea protein gels: Evaluation of mechanical and antioxidant properties. *Food and Bioproducts Processing*, 101, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.10.013>.

- FOP. (2015). Données statistiques de terresinovia. Fédération française des producteurs d'oléagineux (colza, tournesol, soja) et de protéagineux (pois, féveroles, légumes secs).
- Fischer, E., Cachon, R., & Cayot, N. (2020). *Pisum sativum* vs *Glycine max*, a comparative review of nutritional, physicochemical, and sensory properties for food uses. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.021>.
- Fitzsimons, S. M., Mulvihill, D. M., & Morris, E. R. (2007). Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.07.007>.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science. Enzymatic Coagulation of Milk*, (Chapter 7), 185–229. doi:10.1007/978-1-4899-7681-9\_7.
- Fuhrmeister, H., & Meuser, F. (2003). Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. *Journal of Food Engineering*, 56(2–3), 119–129. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00241-8).

## G

- Galante, M., Boeris, V., Álvarez, E., & Risso, P. (2018). Microstructural and textural properties of rennet-induced milk protein gel: Effect of guar gum. *International Journal of Food Properties*, 3(20), S2569–S2578. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1375513>.
- Gao, R., Halsema, F. E. D. Van, Temminghoff, E. J. M., Leeuwen, H. P. Van, Valenberg, H. J. F. Van, Eisner, M. D., Giesbers, M., & Boekel, M. A. J. S. Van. (2010). Modelling ion composition in simulated milk ultrafiltrate (SMUF). I: Influence of calcium phosphate precipitation. *Food Chemistry*, 122(3), 700–709. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.040>.
- Gao, Z., Shen, P., Lan, Y., Cui, L., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Research International*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109045>.
- Gatehouse, J. A., Croy, R. R. D., Morton, H., Tyler, M., Boulter, D. (1981). Characterisation and subunit structures of the vicilin storage proteins of pea (*Pisum sativum* L.). *European Journal of Biochemistry*, 118(3), 627–633.
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reproduction, Nutrition, Development*, 45, 473–483.
- Ge, J., Sun, C. X., Corke, H., Gul, K., Gan, R. Y., & Fang, Y. (2020). The health benefits, functional properties, modifications, and applications of pea (*Pisum sativum* L.) protein:

- Current status, challenges, and perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1835–1876. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12573>.
- Geerts, M., Nikiforidis, C. V., van der Goot, A. J., & van der Padt, A. (2017). Protein nativity explains emulsifying properties of aqueous extracted protein components from yellow pea. *Food Structure*, 14, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.09.001>.
- Gehin, B., Gueguen, J., Bassot, P., & Seger, A. (2010). Répondre aux besoins spécifiques de qualité pour augmenter l'utilisation des légumineuses en transformation industrielle, *Innovations Agronomiques*, 11, 115–127.
- Gélébart, P., Riaublanc, A., Famelart, M. H., Jonchère, C., Beaumal, V., Anton, M., & Garnier, C. (2019). Protein aggregates modulate the texture of emulsified and acidified acid milk gels. *Food Hydrocolloids*, 93, 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.007>.
- Gómez-Guillén, M. C., Borderías, A. J., & Montero, P. (1997). Chemical Interactions of Nonmuscle Proteins in the Network of Sardine (*Sardina pilchardus*) Muscle Gels, *LWT - Food Science and Technology*, 30, 602–608. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0239>.
- Gorissen, S. H. M., Crombag, J. J. R., Senden, J. M. G., Waterval, W. A. H., Bierau, J., Verdijk, L. B., & van Loon, L. J. C. (2018). Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids*, 50(12), 1685–1695. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2640-5>.
- Gosal, W. S., Clark, A. H., Ross-Murphy, S. B. (2004). Fibrillar  $\beta$ -lactoglobulin gels: Part 1. Fibril formation and structure. *Biomacromolecules*, 5, 2408–2419.
- Gough, P., & Jenness, R. (1962). Heat denaturation of  $\beta$ -lactoglobulins A and B, *Journal of Dairy Science*, 45, 1033–1039.
- Gràcia-Juliá, A., René, M., Cortés-Muñoz, M., Picart, L., López-Pedemonte, T., Chevalier, D., & Dumay, E. (2008). Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: A comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. *Food Hydrocolloids*, 22(6), 1014–1032. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.05.017>.
- Grygorczyk, A., Alexander, M., & Corredig, M. (2013). Combined acid- and rennet-induced gelation of a mixed soya milk–cow's milk system. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(11), 2306–2314.
- Gueguen, J. (1989). Relation between conformation and surface hydrophobicity of pea (*Pisum sativum* L.) globulins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1236–1241.
- Gueguen, J. (1991). Pea and fababean proteins. In Hudson, B. J. F. (Ed.). *Developments in food proteins*. London: Elsevier Applied Science, 7, 5–78.

- Gueguen, J., & Cerletti, P. (1994). Proteins of some legume seeds: soybean, pea, fababean and lupin. *New and Developing Sources of Food Proteins*, 145–193. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2652-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2652-0_6).
- Gueguen, J., Chevalier, M., Barbot, J., & Schaeffer, F. (1988). Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic strength. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44(2), 167–182. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740440208>.
- Guillin, F., Calvez, J., Guérin-Deremaux, L., Lefranc-Millot, C., Khodorova, N. & Gaudichon, C. (2019). Nitrogen and amino acid digestibility of a pea protein isolate in rats and comparison with casein and gluten. 6th International Conference on Food Digestion, Grenade, Spain. hal-02789192.
- Guldiken, B., Stobbs, J., & Nickerson, M. (2021). Heat induced gelation of pulse protein networks. *Food Chemistry*, 350, 129–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129158>.
- Guyomarc'h, F., Bouhallab, S., Canon, F., Deutsch, S., Drigon, V., Dupont, D., Garric, G., Gu, E., Guyot, T., Hiolle, M., Le, Y., Lechevalier, V., Nau, F., Thierry, A., & Valence, F. (2021). Mixing milk, egg and plant resources to obtain safe and tasty foods with environmental and health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.010>.
- Guyomarc'h, F., Law, A. J. R., & Dalgleish, D. G. (2003). Formation of soluble and micelle-bound protein aggregates in heated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4652–4660. <https://doi.org/10.1021/jf0211783>.
- Guyomarc'h, F., Queguiner, C., Law, A. J. R., Horne, D. S., & Dalgleish, D. G. (2003). Role of the soluble and micelle-bound heat-induced protein aggregates on network formation in acid skim milk gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7743–7750. <https://doi.org/10.1021/jf030201x>.

## H

- Hall, G. M. (1996). *Methods of testing protein functionality*. Blackie Academic & Professional: London, UK, 265–333.
- Harwalkar, V. R. (1980). Kinetics of thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 2.5. *Journal of Dairy Science*, 63, 1052–1057.
- Haskard, C., A., & Li-Chan, E. C. Y. (1998). Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, 2671–2677.
- Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003). High pressure homogenisation of raw bovine milk (a)

- effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70, 297–305.
- Helmick, H., Turasan, H., Yildirim, M., Bhunia, A., Liceaga, A., & Kokini, J. L. (2021). Cold denaturation of proteins: where bioinformatics meets thermodynamics to offer a mechanistic understanding: pea protein as a case study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(22), 6339–6350. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06558>.
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods*, 6(7), 53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>.
- Heng, L., Van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., Van Boekel, M. A. J. S., Vincken J. P., Roozen, J. P., & Voragen, A. G. J. (2004). Protein-flavour interactions in relation to development of novel protein foods. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 217–224.
- Hinderink, E. B. A., Boire, A., Renard, D., Riaublanc, A., Sagis, L. M. C., Schroën, K., Bouhallab, S., Famelart, M.-H., Gagnaire, V., Guyomarc'h, F., & Berton-Carabin, C. C. (2021). Combining plant and dairy proteins in food colloid design. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 101507. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101507>.
- Holt, C., de Kruif, C. G., Tuinier, R., & Timmins, P. A. (2003). Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(2–3), 275–284. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00520-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00520-4).
- Hong, Y.-H. & Creamer, L. K. (2002). Changed protein structures of bovine  $\beta$ -lactoglobulin B and  $\alpha$ -lactalbumin as a consequence of heat treatment. *International Dairy Journal*, 12, 345–59.
- Horne, D. S. (1999). Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 9, 261–268.
- Hu, C., Xiong, Z., Xiong, H., Chen, L., & Zhang, Z. (2021). Effects of dynamic high-pressure microfluidization treatment on the functional and structural properties of potato protein isolate and its complex with chitosan. *Food Research International*, 140, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109868>.
- Huppertz, T., Fox, P., F., & Kelly, A., L. (2004). Dissociation of caseins in high pressure-treated bovine milk. *International Dairy Journal*, 14, 675–680.

## I

- Ingham, B., Erlangga, G. D., Smialowska, A., Kirby, N. M., Wang, C., Matia-Merino, L., Haverkamp, R. G., & Carr, A. J. (2015). Solving the mystery of the internal structure of casein micelles. *Soft Matter*, 11(14), 2723–2725. <https://doi.org/10.1039/c5sm00153f>.

**J**

- Jackson, P., Boutler, D., & Thurman, D. A. (1969). A comparison of some properties of vicilin and legumin isolated from seeds of *Pisum sativum*, *Vicia faba* and *Cicer arietinum*. *New Phytology*, 68, 25–33.
- Jarzębski, M., Fathordoobady, F., Guo, Y., Xu, M., Singh, A., Kitts, D. D., Kowalczewski, P. L., Jeżowski, P., & Pratap Singh, A. (2019). Pea Protein for Hempseed Oil Nanoemulsion Stabilization. *Molecules*, 24(23), 42–88. <https://doi.org/10.3390/molecules24234288>.
- Jenness, R., & Koops, J. (1962). Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 16, 153–164.
- Jiang, S., Ding, J., Andrade, J., Rababah, T. M., Almajwal, A., Abulmeaty, M. M., & Feng, H. (2017). Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 835–842. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.046>.
- Johansson, M., Xanthakis, E., Langton, M., Menzel, C., Vilaplana, F., Johansson, D. P., & Lopez-sanchez, P. (2021). Mixed legume systems of pea protein and unrefined lentil fraction: Textural properties and microstructure. *Food Science and Technologie*, 144, 111–120.
- Jose, J., Pouvreau, L., & Martin, A. H. (2016). Mixing whey and soy proteins: Consequences for the gel mechanical response and water holding. *Food Hydrocolloids*, 60, 216–224.

**K**

- Kato, A., & Nakai, S., (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624 (1), 13–20.
- Kavanagh, G. M., Clark, A. H., Gosal, W. S., & Ross-Murphy, S. B. (2000). Heat-induced gelation of  $\beta$ -lactoglobulin/ $\alpha$ -lactalbumin blends at pH 3 and pH 7. *Macromolecules*, 33, 19, 7029–7037.
- Kazmierski, M., & Corredig, M., (2003). Characterization of soluble aggregates from whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 17, 685–692.
- Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S., Maruyama, N., & Utsumi, S. (2008). Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fava bean, cowpea, and French bean with those of soybean-French bean 7S globulin exhibits excellent properties. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10273–10279. <https://doi.org/10.1021/jf801721b>.
- Kinsella, J., (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists*

Society, 56(3), 242–258.

- Klost, M., & Drusch, S. (2019). Functionalisation of pea protein by tryptic hydrolysis - characterisation of interfacial and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 86, 134–140.
- Kornet, R., Shek, C., Venema, P., Jan van der Goot, A., Meinders, M., & van der Linden, E. (2021a). Substitution of whey protein by pea protein is facilitated by specific fractionation routes. *Food Hydrocolloids*, 117, 106691. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106691>.
- Kornet, R., Veenemans, J., Venema, P., van der Goot, A. J., Meinders, M., Sagis, L., & van der Linden, E. (2021b). Less is more: Limited fractionation yields stronger gels for pea proteins. *Food Hydrocolloids*, 112, 106–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106285>.
- Koutina, G., Knudsen, J.C, Andersen, U., Skibsted, L. H. (2014). Temperature effect on calcium and phosphorus equilibria in relation to gel formation during acidification of skim milk, *International Dairy Journal*, 36, 65–73.
- Koutina, G., Skibsted, L.H. (2015). Calcium and phosphorus equilibria during acidification of skim milk at elevated temperature, *International Dairy Journal*, 45, 1–7.
- Kristensen, H. T., Denon, Q., Tavernier, I., Gregersen, S. B., Hammershøj, M., Van der Meeren, P., Dewettinck, K., & Dalsgaard, T. K. (2021). Improved food functional properties of pea protein isolate in blends and co-precipitates with whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 113, 106–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106556>.
- Kristensen, H.T., Christensen, M., Hansen, M.S., Hammershøj, M. and Dalsgaard, T.K. (2021), Protein–protein interactions of a whey–pea protein co-precipitate. *International Journal of Food Science & Technology*, 1–14. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15165>.
- Kunugi, S. & Tanaka, N. (2002). Cold denaturation of proteins under high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595, 329–344.

## L

- Ladjal-Ettoumi, Y., Boudries, H., Chibane, M., & Romero, A. (2016). Pea, chickpea and lentil protein isolates: physicochemical characterization and emulsifying properties. *Food Biophysics*, 11(1), 43–51. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9411-6>.
- Lafarga, T. (2018). Potential Applications of Plant-Derived Proteins in the Food Industry. *Novel Proteins for Food, Pharmaceuticals and Agriculture*, 117–137. <https://doi.org/10.1002/9781119385332.ch6>.
- Lajnaf, R. (2017). Propriétés techno-fonctionnelles du lait de dromadaire. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier, France.

- Laligant, A., Famelart, M.-H., Brulé, G., Piot, M., & Paquet, D. (2003). Fermentation by lactic acid bacteria at two temperatures of pre-heated reconstituted milk. 1. Behaviour of proteins and minerals. *Lait*, 83(3), 181–192.
- Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34(2), 126–147. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1242135>.
- Lam, A. C. Y., Warkentin, T. D., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2017). Physicochemical and functional properties of protein isolates obtained from several pea cultivars. *Cereal Chemistry*, 94, 89–97. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-04-16-0097-FI>.
- Lam, R.S.H., & Nickerson, M.T. (2015). The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin. *Food Chemistry*, 173, 163–170.
- Lan, Y., Xu, M. W., Ohm, J. B., Chen, B. C., & Rao, J. J. (2019). Solid dispersion-based spray-drying improves solubility and mitigates beany flavour of pea protein isolate. *Food Chemistry*, 278, 665–673.
- Laneville, S. I., & Turgeon, S. L. (2014). Microstructure and stability of skim milk acid gels containing an anionic bacterial exopolysaccharide and commercial polysaccharides. *International Dairy Journal*, 37(1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.014>.
- Law, A. J. R., & Leaver, J. (1998). Effects of acidification and storage of milk on dissociation of bovine casein micelles. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 46, 5008–5016.
- Le Ray, C., Maubois, J. -L., Gaucheron, F, Brulé, G, Pronnier, P., & al. (1998). Heat stability of reconstituted casein micelle dispersions: changes induced by salt addition. *Le Lait*, INRA Editions, 78(4), 375–390.
- Lefaiivre, J., Trembley, L., Julien, J. P., & Brisson, G. J. (1972). Complementary role of soluble milk proteins with soybean proteins. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 5, 87–94.
- Lefebvre-Cases, E., Gastaldi, E., Vidal, V., Marchesseau, S., Lagaude, A., Cuq, J. L., & Tarodo De La Fuente, B. (1998). Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 932–938. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75653-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75653-X).
- Li, J., & Dalgleish, D. G. (2006). Controlled proteolysis and the properties of milk gels. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 54, 4687–4695.
- Liang, H. N., & Tang, C. H. (2013). pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocolloids*, 33, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.005>.

- Liang, Y., Matia-Merino, L., Gillies, G., Patel, H., Ye, A., & Golding, M. (2017). The heat stability of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 28, 63–73.
- Lin, C., Hill, A., & Corredig, M. (2012). Gelation of mixtures of soymilk and reconstituted skim milk subjected to combined acid and rennet. *Journal of Texture Studies*, 43(6), 468–476.
- Liu, Q., Li, Z., Pan, X., Dai, Y., Hou, H., Wang, W., Ding, X., Zhang, H., Li, X., & Dong, H. (2021). Effect of grinding on the structure of pea protein isolate and the rheological properties of its acid-induced gels. *International Journal of Food Science and Technology*, 3455–3462. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14969>.
- Lu, Z. X., He, J. F., Zhang, Y. C., & Bing, D. J. (2019). Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 83–98. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1651248>.
- Lucey, J. A., & Horne, D. S. (2018). Perspectives on casein interactions. *International Dairy Journal*, 85, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.04.010>.
- Lucey, J. A., & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International*, 30(7), 529–542. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5).
- Lucey, J. A., & Singh, H. (2003). Acid coagulation of milk. *Advanced dairy chemistry, Vol. 2: proteins*, 2nd ed. (eds. P.F. Fox & P. L. H. McSweeney), Aspen Publishers, Gaithersburg, 1001–1026.
- Lucey, J. A., Munro, P.A., Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, 9(3–6), 275–279. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00074-6).
- Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (1998). A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- $\delta$ -lactone. *Food Research International*, 31(2), 147–155. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00075-1).
- Lucey, J. A., Teo, C. T., Munro, P. A., Singh, H. (1997). Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. *Journal of Dairy Research*, 64, 591–600.
- Lucey, John A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (1998). Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *Journal of Dairy Research*, 65(4), 555–567. <https://doi.org/10.1017/S0022029998003057>.

M

- Mainard, M., & Jacob, D. (2016). Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. *Photoniques*, 83, 40–44. <https://doi.org/10.1051/photon/20168340>.
- Maltais, A., Remondetto, G. E., Gonzalez, R., & Subirade, M. (2005). Formation of soy protein isolate cold-set gels: Protein and salt effects. *Journal of Food Science*, 70(1), 67–73.
- Marchesseau, S., & Cuq, J. L. (1995). Water-holding capacity and characterization of protein interactions in processed cheese. *Journal of Dairy Research*, 62(3), 479–489. <https://doi.org/10.1017/S0022029900031174>.
- Marchesseau, S., Gastaldi, E., Lagaude, A., & J.L Cuq (1997). Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *Journal of Dairy Science*, 80 (8), 1483–1489. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76076-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76076-4).
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Yada, R. Y. (1998). Immunochemical examination of the surface physico-chemical properties of various dicotyledonous and monocotyledonous globulin seed storage proteins. *Food Chemistry*, 63, 85–95.
- Martin, A. H., de los Reyes Jiménez, M. L., & Pouvreau, L. (2016). Modulating the aggregation behaviour to restore the mechanical response of acid induced mixed gels of sodium caseinate and soy proteins. *Food Hydrocolloids*, 58, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.029>.
- Matsudomi, N., Oshita, T., Kobayashi, K., & Kinsella, J. E. (1993).  $\alpha$ -Lactalbumin enhances the gelation properties of bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (41), 1053–1057.
- Matsudomi, N., Oshita, T., Sasaki, E., & Kobayashi, K. (1992). Enhanced heat-induced gelation of  $\beta$ -lactoglobulin by  $\alpha$ -lactalbumin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 1697–1700.
- Matsudomi, N., Rector, D., & Kinsella, J. E. (1991). Gelation of bovine serum albumin and  $\beta$ -lactoglobulin; effects of pH, salts and thiol reagents. *Food Chemistry*, (40), 55–69.
- Matsumura, Y., Mitsui, S., Dickinson, E., & Mori, T. (1994). Competitive adsorption of  $\alpha$ -lactalbumin in the molten globule state. *Food Hydrocolloids*, (8), 555–566.
- Matta, N. K., Gatehouse, J. A., & Boulter, D. (1981). Molecular and subunit heterogeneity of legumin of *Pisum sativum* L. (garden pea)—a multi-dimensional gel electrophoretic study. *Journal of Experimental Botany*, 32(6), 1295–1307.

- Maubois, J.L., & Lorient, D. (2016). Dairy proteins and soy proteins in infant foods nitrogen-to-protein conversion factors. *Dairy Science and Technologie*, 96, 15–25. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0271-0>.
- McCann, T. H., Guyon, L., Fischer, P., & Day, L. (2018). Rheological properties and microstructure of soy-whey protein. *Food Hydrocolloids*, 82, 434–441.
- McCarthy, N. A., Kennedy, D., Hogan, S. A., Kelly, P. M., Thapa, K., Murphy, K. M., & Fenelon, M. A. (2016). Emulsification properties of pea protein isolate using homogenization, microfluidization and ultrasonication. *Food Research International*, 89, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.024>.
- McClements, D. J. (2005). Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions. *Langmuir*, 21, 9777–9785.
- McGuffey, M.K., Epting, K.L., Kelly, R.M., & Foegeding, E.A. (2005). Denaturation and aggregation of three  $\alpha$ -lactalbumin preparations at neutral pH. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 3182–3190.
- McMahon, D. J., & Brown, R. J. (1984). Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review. *Journal of Dairy Science*, 67(3), 499–512. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81332-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81332-6).
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (2009). Advanced dairy chemistry. In *Advanced Dairy Chemistry* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5>.
- McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2016). *Advanced Dairy Chemistry || Enzymatic Coagulation of Milk*, 10.1007/978-1-4939-2800-2(Chapter 11), 287–307. doi:10.1007/978-1-4939-2800-2\_11.
- Melander, W., & Horváth, C. (1977). Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183, 200–215.
- Mession, J. -L., Chihi, M. L., Sok, N., & Saurel, R. (2015). Effect of globular pea proteins fractionation on their heat-induced aggregation and acid cold-set gelation. *Food Hydrocolloids*, 46, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.025>.
- Mession, J. -L., Roustel, S., & Saurel, R. (2017a). Interactions in casein micelle – Pea protein system (part I): Heat-induced denaturation and aggregation. *Food Hydrocolloids*, 67(Part I), 229–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.015>.
- Mession, J. -L., Roustel, S., & Saurel, R. (2017b). Interactions in casein micelle-pea protein system (Part II): Mixture acid gelation with glucono- $\delta$ -lactone. *Food Hydrocolloids*, 73, 344–357. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.029>.

- Mezzenga, R., & Fischer, P., (2013). The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. *Reports on Progress in Physics*, 76(4). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/76/4/046601>.
- Mills, O. E. (1976). Effect of temperature on tryptophan fluorescence of  $\beta$ -lactoglobulin B, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 434(2), 324–332.
- Mollé D., Jean K., & Guyomarc'h F., 2006. Chymosin sensitivity of the heat-induced serum protein aggregates isolated from skim milk. *International Dairy Journal* 16, 1435–1441.
- Moller, R. E., Stapelfeldt, H. & Skibsted, L. H. (1998). Thiol reactivity in pressure- unfolded  $\beta$ -lactoglobulin. Antioxidative properties and thermal refolding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 425–430.
- Mondor, M., Tuyishime, O., & Droplet, H. (2012). Production of pea protein concentrates by ultrafiltration: influence of hollow-fibre module. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 135–138.
- Morand, M., Guyomarc'h, F., Legland, D., & Famelart, M.-H. (2012). Changing the isoelectric point of the heat-induced whey protein complexes affects the acid gelation of skim milk. *International Dairy Journal*, 23(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.10.006>.
- Moreno, H. M., Domínguez-Timón, F., Díaz, M. T., Pedrosa, M. M., Borderías, A. J., & Tovar, C. A. (2020). Evaluation of gels made with different commercial pea protein isolate: Rheological, structural and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 99, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105375>.
- Morgan, P. E., Treweek, T. M., Lindner, R. A., Price, W. E., & Carver, J. A. (2005). Casein proteins as molecular chaperones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7) 2670–2683.
- Mulvihill, D. M. & Ennis, M. P. (2003). Functional milk proteins: production and utilization. In *Advanced Dairy Chemistry, Proteins*, 3rd Ed (P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, eds). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 1, 1175–228.
- Mulvihill, D. M. & Fox, P. F. (1989). Physico-chemical and functional properties of milk proteins. In *Developments in Dairy Chemistry – 4. Functional Milk Proteins* (P. F. Fox, ed.). London. Elsevier Applied Science. New York, 131–172.
- Munialo, C. D, van der Linden, E., Akt, K., de Jongh, H. H. J. (2015). Quantitative analysis of the network structure that underlines the transitioning in mechanical responses of pea protein gels. *Food Hydrocolloids*, 49, 104–117.

Munialo, C. D., Martin, A. H., Van Der Linden, E., & De Jongh, H. H. J. (2014a). Fibril formation from pea protein and subsequent gel formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(11), 2418–2427. <https://doi.org/10.1021/jf4055215>.

Munialo, C. D., van der Linden, E., & de Jongh, H. H. J. (2014b). The ability to store energy in pea protein gels is set by network dimensions smaller than 50nm. *Food Research International*, 64, 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.038>.

## N

Nadathur, S. R., Wanasundara, J. P. D, & Scanlin, L. (2017). Proteins in the diet: Challenges in feeding the global population. In *Sustainable Protein Sources*, Elsevier, 1–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00001-9>.

Ngarize, S., Adams, A., & Howell, N. (2005). A comparative study of heat and high pressure induced gels of whey and egg albumen proteins and their binary mixtures. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 984–996. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.008>.

Nicolai, T. (2019). Gelation of food protein-protein mixtures. *Advances in Colloid and Interface Science*, 270, 147–164. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.06.006>.

Nicolai, T., & Durand, D. (2013). Controlled food protein aggregation for new functionality, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 18(4), 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.03.001>.

Nicolai, T., Britten, M., & Schmitt, C. (2011).  $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1945–1962. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.006>.

Nieuwenhuijse, J. A., Sjollem, A., van Boekel, M. A. J. S., van Vliet, T., & Walstra, P. (1991). The heat stability of concentrated milk. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 45, 193–224.

Nunes, L., & Tavares, G. M. (2019). Thermal treatments and emerging technologies: Impacts on the structure and techno-functional properties of milk proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 90, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.004>.

## O

O’Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & Van Boekel, M. A. J. S. (2004b). Heat-induced gelation of pea legumin: Comparison with soybean glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5071–5078. <https://doi.org/10.1021/jf035215h>.

O’Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & van Boekel, M. A. J. S. (2004a). Characterization of Pea Vicilin. 2. Consequences of compositional heterogeneity on heat-induced gelation behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3149–3154.

- O’Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & van Boekel, M. A. J. S. (2004c). Characterization of Pea Vicilin. 1. Denoting Convicilin as the  $\alpha$ -Subunit of the “Pisum” Vicilin Family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3141–3148. doi:10.1021/jf035104i.
- O’Kane, F. E., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & Van Boekel, M. A. J. S. (2005). Gelation behavior of protein isolates extracted from 5 cultivars of *Pisum sativum* L. *Journal of Food Science*, 70(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07073.x>.
- Oliete, B., Potin, F., Cases, E., & Saurel, R. (2018). Modulation of the emulsifying properties of pea globulin soluble aggregates by dynamic high-pressure fluidization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.015>.
- Omrani Khiabani, N., Motamedzadegan, A., Naghizadeh Raisi, S., & Alimi, M. (2020). Chemical, textural, rheological, and sensorial properties of wheyless feta cheese as influenced by replacement of milk protein concentrate with pea protein isolate. *Journal of Texture Studies*, 51(3), 488–500. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12508>.
- Ortega-Requena, S., & Rebouillat, S. (2015). Bigger data open innovation: Potential applications of value-added products from milk and sustainable valorization of by-products from the dairy industry. *Green Chemistry*, 17(12), 5100–5113. <https://doi.org/10.1039/c5gc01428j>.
- Osborne, T. B., & Campbell, G. F. (1898). Proteins of the pea. *Journal of American Chemical Society*, 20, 348-362.
- Owusu-Ansah, Y. J., & McCurdy, S. M. (1991). Pea proteins: A review of chemistry, technology of production, and utilization. *Food Reviews International*, 7(1), 103–134. <https://doi.org/10.1080/87559129109540903>.

## P

- Paquin, P., Lacasse, J., Subirade, M., & Turgeon, S. (2003). Continuous process of dynamic high-pressure homogenization for the denaturation of proteins. US Patent, 6, 511, 695.
- Patel, H. A., Singh, H., Havea, P., Considine, T., & Creamer, L. K. (2005). Pressure- induced unfolding and aggregation of the proteins in whey protein concentrate solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9590 – 9601.
- Paula Vilela, T., Gomes, A. M., & Ferreira, J. P. (2020). Probing the structure-holding interactions in cheeses by dissociating agents – A review and an experimental evaluation with emmental cheese. *Current Research in Food Science*, 3, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2020.07.001>.

- Payens, B. Y. T. A. J. (1979). Casein micelles: the colloid-chemical approach. *Journal of Dairy Research*, 46(2), 291–306.
- Pelgrom, P. J. M., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. I. (2015a). Functional analysis of mildly refined fractions from yellow pea. *Food Hydrocolloids*, 44, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.001>.
- Pelgrom, P. J. M., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. I. (2015b). Method development to increase protein enrichment during dry fractionation of starch-rich legumes. *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1495–1502. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1513-0>.
- Pessen, H., Purcell, J.M., & Farrell, H.M., (1985). Proton relaxation rates of water in dilute solutions of  $\beta$ -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochim. Biophys. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 828, 1–12.
- Phadungath, C. (2005). The mechanism and properties of acid-coagulated milk gels. *Journal of Science and Technology*, 27, 2, 433-448.
- Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Guiraud, J. P., Cheftel, J. C., & Dumay, E. (2006). Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*, 73, 454–463.

## Q

- Qi, P. X., Ren, D., Xiao, Y., & Tomasula, P. M. (2015). Effect of homogenization and pasteurization on the structure and stability of whey protein in milk. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 1–14. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8920>.
- Qi, X. L., Brownlow, S., Holt, C., & Sellers, P. (1995). Thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1248(1), 43–49.

## R

- Rasmussen, L. K., Højrup, P., & Petersen, T. E. (1992). Localization of two interchain disulfide bridges in dimers of bovine  $\alpha$ 2-casein: Parallel and antiparallel alignments of the polypeptide chains. *European Journal of Biochemistry*, 203(3), 381–386. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16561.x>.
- Rasmussen, L. K., HØOjrup, P., & Petersen, T. E. (1994). Disulphide arrangement in bovine caseins: Localization of intrachain disulphide bridges in monomers of k- and  $\alpha$ 2-casein

- from bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 61(4), 485–493. <https://doi.org/10.1017/S0022029900028417>.
- Reddy, N. R., Pierson, M. D., Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. (1985). Dry bean tannins: A review of nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 62, 541–9.
- Regnault, S., Dumay, E., & Cheftel, J., C. (2006). Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9 °C or 20 °C: Effects on the distribution of mineral and proteins between colloidal and soluble phases. *The Journal of Dairy Research*, 73, 91–100.
- Regnault, S., Thiebaud, M., Dumay, E., & Cheftel, J. C. (2004). Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9°C or 20°C: effects on casein micelle size distribution. *International Dairy Journal*, 14(1), 55–68. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00144-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00144-4).
- Relkin, P., & Launay, B. (1990). Concentration effects on the kinetics of  $\beta$ -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study, *Food Hydrocolloids*, 4, 19–32.
- Rempel, C., Geng, X., & Zhang, Y. (2019). Industrial scale preparation of pea flour fractions with enhanced nutritive composition by dry fractionation. *Food Chemistry*, 276, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.003>.
- Roefs, S. P. F. M., & van Vliet, T. (1990). Structure of acid casein gels 2. Dynamic measurement and types of interaction forces. *Colloids & Surface*, 50, 161–175.
- Roefs, S. P. F. M., Hols, G., & Mil, P. J. J. M. (1994). Properties of dispersions of soya and whey proteins: A technological approach. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 48, 41–55.
- Roesch, R. R., & Corredig, M. (2005). Heat-induced soy-whey proteins interactions: Formation of soluble and insoluble protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3476–3482.
- Roesch, R. R., & Corredig, M. (2006). Study of the effect of soy proteins on the acid-induced gelation of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8236–8243.
- Roesch, R., Juneja, M., Monagle, C., & Corredig, M. (2004). Aggregation of soy/milk mixes during acidification. *Food Research International*, 37(3), 209–215.
- Roy, F., Boye, J. I., & Simpson, B. K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43(2), 432–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.002>.

S

- Sabaté, J., & Soret, S. (2014). Sustainability of plant-based diets: back to the future. *The American journal of clinical nutrition*, 100(1), 476–82. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071522>.
- Saldanha do Carmo, C., Silventoinen, P., Nordgård, C. T., Poudroux, C., Dessev, T., Zobel, H., Holtekjølen, A. K., Draget, K. I., Holopainen-Mantila, U., Knutsen, S. H., Sahlstrøm, S. (2020). Is dehulling of peas and faba beans necessary prior to dry fractionation for the production of protein- and starch-rich fractions? Impact on physical properties, chemical composition and techno-functional properties. *Journal of Food Engineering*, 278, 109–121 <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109937>.
- Sandra, S., & Dalglish, D. G. (2005). Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Dairy Journal*, 15, 1095–1104.
- Saricaoglu, F. T. (2020). Application of high-pressure homogenization (HPH) to modify functional, structural and rheological properties of lentil (*Lens culinaris*) proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.034>.
- Saricaoglu, F. T., Gul, O., Besir, A., & Atalar, I. (2018). Effect of high-pressure homogenization (HPH) on functional and rheological properties of hazelnut meal proteins obtained from hazelnut oil industry by-products. *Journal of Food Engineering*, 233, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.003>.
- Saurel, R. (2020). Protéines de pois : structure, extraction et fonctionnalités. *Techniques de l'Ingénieur*, F6040, 1–17.
- Savage, G. P. & Deo, S. (1989). The nutritional value of peas (*Pisum sativum* L.). A literature review. *Nutrition Abstract and Review (Series A)*, 59, 65-87.
- Schmidt, D. G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In P. F. Fox (Ed.), *Developments in dairy chemistry*, 61–87.
- Schmitt, C., Bovay, C., Rouvet, M., Shojaei-Rami, S., & Kolodziejczyk, E. (2007). Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: physicochemical, interfacial, and foaming properties. *Langmuir*, 23(8), 4155–4166.
- Schmitt, C., Silva, J. V., Amagliani, L., Chassenieux, C., & Nicolai, T. (2019). Heat-induced and acid-induced gelation of dairy/plant protein dispersions and emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 27, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.05.002>.

- Schokker EP, Singh H, & Creamer LK. (2000). Heat-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A and B with  $\alpha$ -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 10, 843–53.
- Schorsch, C., Carrie, H. & Norton, I. T. (2000). Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation. *International Dairy Journal*, 10, 529–539.
- Schutyser, M. A. I., Pelgrom, P. J. M., van der Goot, A. J., & Boom, R. M. (2015). Dry fractionation for sustainable production of functional legume protein concentrates. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.013>.
- Serra, M., Trujillo, A.J., Quevedo, J.M., Guamis, B., & Ferragut, V., (2007). Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenization. *International Dairy Journal*, 17, 782–790.
- Shand, P. J., Ya, H., Pietrasik, Z., & Wanasundara, P. K. J. P. D. (2007). Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chemistry*, 102(4), 1119–1130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.060>.
- Shand, P. J., Ya, H., Pietrasik, Z., & Wanasundara, P. K. J. P. D. (2008). Transglutaminase treatment of pea proteins: Effect on physicochemical and rheological properties of heat-induced protein gels. *Food Chemistry*, 107(2), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.095>.
- Shanmugam, A., Chandrapala, J., & Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.005>.
- Shariffa, Y. N., Tan, T. B., Abas, F., Mirhosseini, H., Nehdi, I. A., & Tan, C. P. (2016). Producing a lycopene nanodispersion: The effects of emulsifiers. *Food and Bioprocess Technology*, 98, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.01.014>.
- Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A., & Rana, J. C. (2015). Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 43, 679–689.
- Shewry, P. R., Napier, J. A., Tatham, A. S. (1995). Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *Plant Cell*, 7, 945–956.
- Shim, J., & Mulvaney, S. J. (2001). Effect of heating temperature, pH, concentration and starch/whey protein ratio on the viscoelastic properties of corn starch/whey protein mixed gels. *Journal of Science & Food Agriculture*, 81 (8), 706–717.

- Shimada, K., & Cheftel, J. C. (1988). Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein isolate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 1018–1025. <https://doi.org/10.1021/jf00083a029>.
- Silva, J. V. C., Balakrishnan, G., Schmitt, C., Chassenieux, C., & Nicolai, T. (2018). Heat-induced gelation of aqueous micellar casein suspensions as affected by globular protein addition. *Food Hydrocolloids*, 82, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.002>.
- Silva, J. V. C., Cochereau, R., Schmitt, C., Chassenieux, C., & Nicolai, T. (2019). Heat-induced gelation of mixtures of micellar caseins and plant proteins in aqueous solution. *Food Research International*, 116, 1135–1143.
- Silva, J. V. C., Jacquette, B., Amagliani, L., Schmitt, C., Nicolai, T., & Chassenieux, C. (2019). Heat-induced gelation of micellar casein/plant protein oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 569, 85–92.
- Singh, H., & Fox, P.F. (1985). Heat stability of milk: pH-dependent dissociation of micellar kappa-casein on heating milk at ultra-high temperatures, *Journal of Dairy Research*, (52), 529–538.
- Stading, M., & Hermansson, A. M. (1991). Large deformation properties of b-lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 5(4), 339–352.
- Stapelfeldt, H., Petersen, P. H., Kristiansen, K. R., Qvist, K. B., & Skibsted, L. H. (1996). Effect of high hydrostatic pressure on the enzymic hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. *Journal of Dairy Research*, 63, 111–118.
- Stone, A. K., Avarmenko, N. A., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015a). Functional properties of protein isolates from different pea cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 24, 827–833.
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015b). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76(P1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017>.
- Sui, Q., Roginski, H., Williams, R. P. W., Versteeg, C., & Wan, J. (2011). Effect of pulsed electric field and thermal treatment on the physicochemical and functional properties of whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 21(4), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.001>.
- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2010). Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat treatment. *Food Research International*, 43(2), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.039>.

- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2011a). Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate induced by heat treatment: Effect of heating and cooling rate. *Food Chemistry*, 124, 1011e1016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.063>.
- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2011b). Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking. *Food Hydrocolloids*, 25, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.002>.
- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2011c). Dynamic oscillatory rheological measurement and thermal properties of pea protein extracted by salt method: Effect of pH and NaCl. *Journal of Food Engineering*, 105(3), 577–582. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.008>
- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2012). Molecular forces involved in heat-induced pea protein gelation: Effects of various reagents on the rheological properties of salt-extracted pea protein gels. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.014>.
- Swaigood, H. E. (1993). Review and Update of Casein Chemistry. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 3054–3061. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77645-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77645-6).
- Swanson, B.G. (1990). Pea and lentil protein extraction and functionality. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 67(5), 276–280.

## T

- Taherian, A. R., Mondor, M., Labranche, J., Drolet, H., Ippersiel, D., & Lamarche, F. (2011). Comparative study of functional properties of commercial and membrane processed yellow pea protein isolates. *Food Research International*, 44(8), 2505–2514. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.030>.
- Talbot, B., & Waugh, D. F. (1970). Micelle-forming characteristics of monomeric and covalent polymeric  $\kappa$ -caseins. *Biochemistry*, 9, 2807–2813.
- Tanaka, N., & Kunugi, S. (1996). Effect of pressure on the deuterium exchange reaction of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 18, 33–39.
- Tanger, C., Andlinger, D. J., Brümmer-Rolf, A., Engel, J., & Kulozik, U. (2021). Quantification of protein-protein interactions in highly denatured whey and potato protein gels. *MethodsX*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101243>.
- Tanger, C., Engel, J., & Kulozik, U. (2020). Influence of extraction conditions on the conformational alteration of pea protein extracted from pea flour. *Food Hydrocolloids*, 107, 105–130.

- Tanger, C., Müller, M., Andlinger, D., & Kulozik, U. (2022). Influence of pH and ionic strength on the thermal gelation behaviour of pea protein. *Food Hydrocolloids*, 123(January 2021), 106–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106903>.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., & Cheftel, J. C. (2003). High pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13, 427–439.
- Thomar, P., & Nicolai, T. (2016). Heat-induced gelation of casein micelles in aqueous suspensions at different pH. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 801–807. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.030>.
- Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., & Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(6), 589–601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00623.x>.
- Treweek, T. (2012). Alpha-casein as a molecular chaperone. *Milk Protein*, 85–119. <https://doi.org/10.5772/48348>.
- Tzitzikas, E. N., Vincken, J. P., De Groot, J., Gruppen, H., & Visser, R. G. F. (2006). Genetic variation in pea seed globulin composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 425–433. <https://doi.org/10.1021/jf0519008>.

## V

- Vasbinder, A. J., Rollema, H. S., Bot, A., & de Kruif, C. G. (2003). Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1556–1563. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73741-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73741-2).
- Vélez-Erazo, E. M., Bosqui, K., Rabelo, R. S., Kurozawa, L. E., & Hubinger, M. D. (2020). High internal phase emulsions (HIPE) using pea protein and different polysaccharides as stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 105, 775. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105.775-784>.

## W

- Wade, T., Beattie, J. K., Rowlands, W. N., & Augustin, M. -A. (1996). Electroacoustic determination of size and zeta potential of casein micelles in skim milk. *Journal of Dairy Research*, 63, 387–404, <https://doi.org/10.1017/S0022029900031915>.
- Walstra P., Wouters J. T. M., & Geurts T. J. (2005). *Dairy science and technology*. Florida: CRC Press.

- Walstra, P. (1990). On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 73, 1965–1979. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78875-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78875-3).
- Walstra, P. (1993). Introduction to aggregation phenomena in food colloids. In *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties* (E. Dickinson and P. Walstra, eds), Cambridge. The Royal Society of Chemistry, 3–15.
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: Do they exist? *International Dairy Journal*, 9(3–6), 189–192. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00059-X).
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., & Van Boekel, M. A. J. S. (1999). Milk components. In P. Walstra, T. J. Geurts, A. Noomen, A. Jellema, & M. A. J. S. Van Boekel (Eds.), *Dairy Technology* (pp. 27-105). New York : Marcel Dekker.
- Walstra, P., & Jenness, R. (1984). *Dairy Chemistry and Physics*. (J. Wiley, Ed.) (Wiley-Inte). New York.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., & Van Boekel, M. A. J. S. (1999). Milk components. *Dairy Technology*, In P. Walstra, T. J. Geurts, A. Noomen, A. Jellema, & M. A. J. S. Van Boekel (Eds.), Marcel Dekker, 27–105.
- Walstra, P., Wouters, J. T., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. Second edition (Taylor & F, Vol. 4).
- Winter, H. H. (1987). Can the gel point of a cross-linking polymer be detected by the  $G' - G''$  crossover? *Polymer Engineering & Science*, 27(22), 1698–1702. <https://doi.org/10.1002/pen.760272209>.
- Wong, D. W. S., Camirand, W. M., & Pavlath, A. E. (1996). Structures and Functionalities of Milk Proteins. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(8). <https://doi.org/10.1080/10408399609527751>.
- Wong, D., Vasanthan, T., & Ozimek, L. (2013). Synergistic enhancement in the co-gelation of salt-soluble pea proteins and whey proteins. *Food Chemistry*, 141(4), 3913–3919. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.082>.
- Wu, D., Tu, M., Wang, Z., Wu, C., Yu, C., Battino, M., & Du, M. (2020). Biological and conventional food processing modifications on food proteins: Structure, functionality, and bioactivity. *Biotechnology Advances*, 40, 107–121.
- X**
- Xiong, T., Xiong, W., Ge, M., Xia, J., Li, B., & Chen, Y. (2018). Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate. *Food Research International*, 109, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.044>.

Y

Ye, Y. H., Sha, X. M., Tu, Z. C., Wang, H., Zhang, X. C., Zhang, Q. T., & Li, T. (2011). Combined effect of dynamic high-pressure microfluidization and transglutaminase cross-linking on gel properties of soybean protein isolate. *Food Science*, 233, 95–102.

Youssef, M., Lafarge, C., Valentin, D., Lubbers, S., & Husson, F. (2016). Fermentation of cow milk and/or pea milk mixtures by different starter cultures: Physico-chemical and sensorial properties. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.060>.

Z

Zhang, S., Holmes, M., Ettelaie, R., & Sarkar, A. (2020). Pea protein microgel particles as Pickering stabilisers of oil-in-water emulsions: Responsiveness to pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 10, 105–583. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105583>.

Zhang, S., Huang, W., Feizollahi, E., Roopesh, M. S., & Chen, L. (2021). Improvement of pea protein gelation at reduced temperature by atmospheric cold plasma and the gelling mechanism study. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 67, 102–567. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102567>.

Zhang, Y., & Cremer, P. S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 658–663.

Zhang, Z., & Goff, H. D. (2004). Protein distribution at air interfaces in dairy foams and ice cream as affected by casein dissociation and emulsifiers. *International Dairy Journal*, 14, 647–657.

Zhao, H., Shen, C., Wu, Z., Zhang, Z., & Xu, C. (2020). Comparison of wheat, soybean, rice, and pea protein properties for effective applications in food products. *Journal of Food Biochemistry*, 44(4), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13157>.

Zhu, P., Huang, W., Guo, X., & Chen, L. (2021). Strong and elastic pea protein hydrogels formed through pH-shifting method. *Food Hydrocolloids*, 117, 106–705. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106>, 705.

## Communication et valorisation des travaux

Les travaux de cette thèse ont été valorisés à travers deux publications dont une soumise et une en projet de soumission dans deux revues internationales reconnues dans le domaine des sciences des aliments. Ces résultats ont aussi fait l'objet d'une communication dans un congrès international sous la forme d'une communication orale et d'une affiche.

### ✓ Publications dans des revues internationales à comité de lecture

**Beghdadi, A.**, Picart-Palmade, L., Cunault, C., Marchesseau, S., and Chevalier-Lucia, D. (2022). Impact of two thermal processing routes on protein interactions and acid gelation properties of casein micelle-pea protein mixture compared to casein micelle-whey protein one. *Accepté dans Food Research International*.

**Beghdadi, A.**, Picart-Palmade, L., Cunault, C., Chevalier-Lucia, D and Marchesseau, S. (2021). Impact of Dynamic high-pressure pre-treatment of soluble pea protein on their interaction with casein micelles after a heat treatment: influence on acid gels properties. En projet de soumission à *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.

### ✓ Participation à des congrès internationaux

#### - Communication par voie orale et d'affiche

**Beghdadi, A.**, Picart-Palmade, L., Cunault, C., Marchesseau, S., and Chevalier-Lucia, D. (2021). Comparison of pea or whey protein addition for acid-induced gelation of casein micelles: impact of thermal processing conditions on protein interactions and gel properties, 11th NIZO Plant Protein Functionality Conference, Pays-Bas, Visio conference, 21 - 22 October 2020.



✓ Formations de l'école doctorale GAIA

- Réalisation de 102 heures de formation réparties comme suit :

Catégorie	Intitulé de la formation	Heures
Connaissance de l'Entreprise	Acteurs, leviers, outils pour mener les transitions du système alimentaire	10
Communication	Cérémonie solennelle 2019 de rentrée des doctorants du Collège Doctoral de l'Université de Montpellier	6
Communication	Journée de rentrée des doctorants de l'ED Gaia	2
Développement personnel	Argumenter, débattre, convaincre, réfuter...	21
Enseignement à distance	<b>MOOC Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche</b>	15
Enseignement à distance	MOOC Fondamentaux de l'hygiène et de la sécurité au travail	14
Outils et méthodes	Rédiger et soutenir ses travaux de thèses	10
	Recherche reproductible : principes méthodologiques pour une science transparente	24



## Résumé de thèse

D'importantes préoccupations sanitaires et environnementales se sont développées depuis plusieurs années pour favoriser l'émergence de régimes alimentaires visant à augmenter la part des protéines végétales afin de réduire la consommation de ressources animales. Cependant, la transition vers des régimes plus écologiques est entravée par la mauvaise acceptation des aliments végétaliens par les consommateurs occidentaux. Les alternatives mixtes animales/végétales aux produits laitiers familiers offrent un nouveau champ d'innovation pour produire un produit alimentaire fonctionnel, multi-source et riche en protéines. Les protéines végétales comme celles des pois, bien qu'intéressantes nutritionnellement peuvent être difficiles à utiliser dans les systèmes alimentaires en raison de leur faible solubilité et de leur goût indésirable. Ce travail de thèse a permis de proposer des alternatives à l'utilisation de ces protéines en faisant interagir les protéines solubles de pois avec les micelles de caséine. Ces colloïdes protéiques laitiers ont des propriétés structurales uniques permettant d'interagir avec des protéines solubles après l'application d'un traitement thermique et d'améliorer ainsi leurs propriétés gélifiantes. L'enjeu des travaux de recherche de cette thèse était de proposer des alternatives facilement applicables à l'échelle industrielle. Les étapes du projet ont permis de trouver les conditions de formulation idéales (concentration totale de 4 % (p/p) en protéine avec un ratio de 2.5/7.5 en pois/micelle de caséine) et la voie technologique optimale pour générer des agrégats mixtes à l'origine de gels acides homogènes de type yaourt aux propriétés structurales et fonctionnelles optimisées. L'étude dynamique de l'association des protéines de pois et des micelles de caséine par une approche multi-échelle ciblée a permis une caractérisation approfondie des protéines solubles de pois et de leurs agrégats en termes de taille, de morphologie, de composition et de nature d'interactions qui se sont révélées être de faible énergie contrairement à celles engendrées par le traitement thermique des protéines solubles du lait. Des propriétés mécaniques et texturales intéressantes ont été obtenues pour les gels acides avec une rigidité et une fermeté respectivement 1,4 et 1,9 fois plus importantes pour les mélanges de protéines de pois et de micelles de caséines par rapport aux gels classiques de micelles de caséines et protéines sériques. De plus, l'application du procédé de haute pression dynamique sur les protéines de pois solubles en amont de la gélification a permis de réduire de 35 % la taille des particules de protéines de pois, permettant d'apporter une solution à la variabilité de taille existant dans les isolats commerciaux et de proposer ainsi la production de gels mixtes acides de structure homogène. Ce projet a démontré que les protéines de pois commerciales solubles sont des ressources protéiques intéressantes pour la formulation de matrices protéiques de types gels et que les agrégats hybrides obtenus après chauffage peuvent, selon les procédés utilisés et leur ordre d'enchaînement des technologies, générer de nouvelles matrices augmentant la proportion de protéines végétales au sein des produits laitiers gélifiés.

## Abstract

Major health and environmental concerns have developed for several years to promote the emergence of diets aiming at increasing plant proteins to reduce the consumption of animal resources. However, the transition towards more environmentally diets is hampered by the poor acceptance of vegan foods by Western consumers. Mixed animal/vegetable alternatives offer a new field of innovation to produce functional, multi-source, protein-rich food products. Plant proteins such as pea protein, while nutritionally interesting, can be difficult to use in food systems due to their low solubility and undesirable taste. This thesis proposed alternatives for the use of these proteins by interacting soluble pea proteins with casein micelles. These dairy protein colloids have unique structural properties that allow them to interact with soluble proteins after the application of a heat treatment, and thus improve their gelling properties. The challenge of this thesis was to work with a non-purified commercial isolate to minimize the energy costs of purification and to propose alternatives that could be easily applied at an industrial scale. The steps of the project allowed to find the ideal formulation conditions (total protein concentration of 4 % (w/w) with a ratio of 2.5/7.5 in pea/casein pellet) and the optimal technological pathway to generate mixed aggregates at the origin of homogeneous yoghurt-like acid gels with optimized structural and functional properties. The dynamic study of the association of pea proteins and casein micelles by a targeted multiscale approach allowed an in-depth characterization of the soluble pea proteins and their aggregates formed in terms of size, morphology, composition and nature of interactions which were found to be of low energy in contrast to those generated by the thermal treatment of soluble milk proteins. Interesting mechanical and textural properties were obtained for the acid gels with a stiffness and firmness 1.4 and 1.9 times higher for the pea protein and casein micelle mixtures compared to conventional casein micelle and serum protein gels, respectively. Moreover, the application of the high dynamic pressure process on soluble pea proteins upstream of gelation allowed a 35 % reduction in the particle size of pea proteins, providing a solution to the size variability existing in commercial isolates and thus proposing the production of homogeneous acidic mixed gels. This project demonstrated that soluble commercial pea proteins are interesting protein resources for the formulation of gel-type protein matrices and that the hybrid aggregates obtained can, depending on the processes used and their order of sequencing, generate new gelled matrices increasing the proportion of vegetable proteins in dairy products.