

MARIE-EVE BERTRAND

**ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS GÉLIFIANTES ET  
VISCOSIFIANTES DE SYSTÈMES MIXTES ISOLAT  
DE PROTÉINES DE LACTOSÉRUM-  
POLYSACCHARIDES EN CONDITIONS  
ASSOCIATIVES**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en Sciences et technologie des aliments  
pour l'obtention du grade de philosophiæ docteur (Ph.D)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2008

© Marie-Eve Bertrand, 2008

## Résumé

Les interactions entre protéines et polysaccharides dépendent des conditions environnementales et de leurs propriétés intrinsèques. La cosolubilité, la complexation et l'incompatibilité en sont le résultat. La complexation et l'incompatibilité ont démontré une amélioration des propriétés fonctionnelles de systèmes mixtes comparativement aux biopolymères pris individuellement. L'incompatibilité étant souvent la règle, cette recherche a pour but d'approfondir les connaissances sur les propriétés fonctionnelles des systèmes mixtes protéines-polysaccharides en conditions de compatibilité ou d'interactions associatives et de caractériser les nouvelles fonctionnalités qui en découlent.

Un premier système isolat de protéines de lactosérum-xanthane a été étudié pour ses aptitudes à la gélification en conditions de compatibilité induites suite à une variation de pH et du ratio protéines-polysaccharides. Suivant l'application d'un traitement thermique, la solution est passée de compatible à incompatible. Les gels démontraient une augmentation du module élastique ( $G'$ ) due à l'incompatibilité telle qu'observée par microscopie confocale à balayage laser. L'ajout de NaCl a augmenté cette incompatibilité et l'a rendue excessive au-delà d'une concentration critique entraînant une chute du  $G'$ .

La compatibilité a ensuite été étudiée sur un système isolat de protéines de lactosérum-pectine. Suite à une variation de pH, de la concentration en biopolymères et du ratio protéines-polysaccharides, des conditions de compatibilité ont été confirmées par les mesures d'absorbance et du nombre de charges. Cette compatibilité a mené à une diminution de la viscosité en solution diluée due à la formation de complexes solubles alors qu'en solution concentrée, la complexation l'a plutôt augmentée.

Un système modèle de yogourt ferme a finalement été étudié suite à l'incorporation de isolat de protéines de lactosérum et de pectine préalablement complexés et stabilisés. Les concentrations en protéines et en solides totaux ont été maintenues constantes. Les mélanges laitiers ont été acidifiés au glucono-delta-lactone. Les résultats démontrent que l'incorporation de complexes à différentes concentrations entrave la formation d'un réseau protéique homogène provoquant une diminution de la fermeté du gel et une augmentation de la synérèse. Les observations microscopiques appuient ces résultats.

Les solutions mixtes permettent de développer de nouvelles propriétés fonctionnelles. Cependant, une meilleure connaissance de ces mélanges est nécessaire pour en arriver à des propriétés fonctionnelles variées et précises dans les formulations alimentaires.

## Abstract

Protein polysaccharide interactions depend on both environmental conditions and intrinsic properties. Results are co-solubility, complexation and incompatibility. Complexation and incompatibility have demonstrated improvement of functional properties of mixed systems compared to those of the individual components. Incompatibility being the rule, the aim of this study is to widen knowledge on functional properties of mixed protein-polysaccharide systems in presence of compatibility or associative interactions and to characterise the new emerging functional properties.

A first mixed system of whey protein isolate-xanthan has been studied for its gelling abilities following pH and protein-polysaccharide ratio variations. Following application of a thermal treatment, the solution passed from compatible to incompatible. Gelation was demonstrated by an increase in elastic modulus ( $G'$ ) due to incompatibility as observed by confocal laser scanning microscopy. Addition of NaCl increased this incompatibility and made it excessive at a certain critical concentration leading to loss in  $G'$ .

Compatibility has then been studied on a whey protein isolate-pectin system. Varying pH, biopolymer total concentration and protein-polysaccharide ratio allowed soluble complex formation which was confirmed with the measurement of absorbance and the number of charge. This compatibility led to a decrease in viscosity in diluted solution due to soluble complex formation while in concentrated solution, complexation rather increased it.

A model system of firm yogurt was finally studied following incorporation of whey protein isolate and pectin first complexed and stabilised. Protein and total solid concentrations were kept constant. Milky solutions were acidified with glucono-delta-lactone. Results demonstrate that incorporation of complexes at different concentrations hampers the formation of a homogenous protein network provoking a decrease in gel stiffness and an increase in syneresis. Microscopic observations supported these conclusions.

Mixed solutions prepared by carefully conducting complex formation allow the design of new functional properties. However, a better knowledge of these mixes is necessary in order to achieve varied and precise functional properties in food formulation.

## Avant-Propos

La présente thèse se divise en 6 chapitres. L'introduction générale et la présentation de la problématique précèdent le premier chapitre dédié à la mise à jour des connaissances explorées dans cette thèse. De cette revue de littérature découlent le but, l'hypothèse et les objectifs du présent travail qui font l'objet du chapitre 2. Les réponses à ces objectifs sont rédigées sous forme d'articles scientifiques.

Le premier article, le chapitre 3, rapporte les résultats de la formation d'un gel d'isolat de protéines de lactosérum additionné de xanthane et s'intitule : « *Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum* ». Cet article a été publié cette année dans la revue *Food Hydrocolloids* numéro 21 (pp.159-166).

Un deuxième système mixte isolat de protéines de lactosérum-pectine a été étudié pour ses propriétés d'écoulement en solution concentrée et en solution après dilution. Ce 4<sup>e</sup> chapitre a pour titre : « *Impact of protein-polysaccharide interaction on flow behaviour of diluted and bulk mixed solutions* ».

Le dernier volet de résultats, chapitre 5, concerne l'étude d'un système modèle simplifié de yogourt ferme suite à l'addition de complexes isolat de protéines de lactosérum-pectine. Le gel acide laitier résultant fut analysé pour ses propriétés gélifiantes, sa microstructure et ses propriétés de rétention d'eau. Ce chapitre a pour titre « *Characterization of acid milk gels incorporating protein-polysaccharide complexes towards their rheological, structural and syneresis behaviour* ».

Je suis le principal auteur des trois articles énumérés précédemment. J'ai effectué les manipulations au laboratoire avec l'aide des stagiaires Yolande Kougioumoutsakis (chapitre 3) et Judith Barrière (chapitre 4) que j'ai supervisé. J'ai également fait l'interprétation des résultats et la rédaction. Les coauteurs, Dr. Daniel St-Gelais et Dr. Sylvie Turgeon ont contribué à l'élaboration et à la supervision des travaux de recherche des chapitres 4 et 5 alors que le chapitre 3 s'est effectué sous la supervision du Dr. Turgeon.

Suite à la présentation des résultats, les conclusions générales de l'ensemble du présent travail seront présentées au dernier chapitre soit au chapitre 6. L'avancement des connaissances suite à cette thèse sera mis en évidence par la présentation des principaux résultats de recherche. Les questions restées sans réponse fourniront des pistes pour des travaux futurs.

## Remerciements

Cette thèse n'aurait pu être réalisée sans la collaboration de plusieurs personnes et organismes. Dans un premier temps, je tiens à remercier infiniment ma directrice de mémoire et de thèse Dr. Sylvie Turgeon. Ses qualités humaines et sa confiance m'ont permis de cheminer de façon enthousiaste durant toutes ces années. La rigueur de mon co-directeur, Dr. Daniel St-Gelais m'a remise à quelques reprises sur le droit chemin. La synergie de ces deux importants individus a contribué à parachever ma formation.

L'aboutissement de ce parcours n'aurait pu avoir lieu sans la contribution du Dr. Michel Britten pour sa prélecture et des docteurs Paul Paquin et Milena Corredig pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Plusieurs étudiants d'été ont concouru au cheminement de cette thèse. Je remercie premièrement Judith Barrière qui fut d'une aide exceptionnelle et avec qui j'ai développé une belle amitié. Dans un deuxième temps, Yolande Kougioumoutsakis a effectué un travail rigoureux. Finalement, Julie Parent m'a permis de compléter mes dernières expérimentations et d'éviter d'incommoder l'être que je portais en moi.

Plusieurs personnes faisant partie du personnel ALN et INAF/STELA sont remerciées pour leur aide technique. Je pense à Bernard Béliveau et Gaétan Desnoyers. Un merci particulier à Anne-Françoise Allain autant pour son support technique incomparable que pour ses nombreuses qualités personnelles.

Je tiens à souligner l'importance des partenaires financiers. Pour le volet portant sur l'étude des systèmes mixtes et de leur incorporation à un produit, merci à Parmalat Canada et à son représentant lors de nos réunions, Peter Vanesh. Le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour le volet des gels protéines-polysaccharides.

Finalement, un merci à mon père, Pierre, sans qui je n'aurais probablement pas abouti à la complétude d'études de cycles supérieurs. Également à ma mère Louise qui m'encourage, me soutient et me guide par sa sagesse depuis ma tendre enfance à travers mes nombreux projets qu'ils soient petits ou grands. Je ne pourrais conclure sans remercier

l'être le plus précieux à mes yeux, mon conjoint, Alain Sanfaçon. Cet homme a croisé ma route au début de mon parcours. C'est avec lui que j'ai pu échanger sur mes états d'âme qui ont fluctués au cours de mon avancement. Nos échanges ont été, et sont toujours, aussi précieux...tout comme l'est notre petite Coralie.



*À l'amour qui engendre la vie...*

# Table des matières

<i>Résumé</i> .....	<i>II</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>IV</i>
<i>Avant-Propos</i> .....	<i>V</i>
<i>Remerciements</i> .....	<i>VII</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>X</i>
<i>Liste des équations</i> .....	<i>XIII</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>XIV</i>
<i>Liste des schémas</i> .....	<i>XVI</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>XVII</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>XVIII</i>
<i>Introduction</i> .....	<i>1</i>
<i>Chapitre 1 Revue de littérature</i> .....	<i>3</i>
<b>1.1 Le lait</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 Les caséines</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Les protéines du lactosérum</b> .....	<b>5</b>
1.3.1 Structure de la $\beta$ -lactoglobuline.....	5
1.3.2 Influence de facteurs extrinsèques sur la structure de la $\beta$ -lactoglobuline .....	6
1.3.2.1 Nature et concentration des ions.....	6
1.3.2.2 pH .....	7
1.3.2.3 Température.....	7
1.3.3 Structure de l' $\alpha$ -lactalbumine.....	9
1.3.4 Influence de facteurs extrinsèques sur la structure de l' $\alpha$ -lactalbumine .....	10
1.3.4.1 Nature et concentration des ions.....	10
1.3.4.2 pH .....	10
1.3.4.3 Température.....	10
<b>1.4 Pectine</b> .....	<b>11</b>
1.4.1 Structure.....	11
1.4.2 Caractéristiques physicochimiques .....	13
1.4.3 Caractéristiques en solution.....	13
<b>1.5 Xanthane</b> .....	<b>13</b>
1.5.1 Structure .....	14
1.5.2 Caractéristiques physicochimiques .....	14
1.5.3 Caractéristiques rhéologiques.....	15
<b>1.6 Les solutions mixtes protéines-polysaccharides</b> .....	<b>15</b>
1.6.1 Les interactions intermoléculaires.....	17
1.6.2 Facteurs influençant les interactions protéines-polysaccharides .....	17
1.6.2.1 pH .....	17
1.6.2.2 Force ionique .....	18
1.6.2.3 Facteurs intrinsèques .....	18
1.6.2.4 Concentration en solides totaux et ratio protéines-polysaccharides .....	19
1.6.2.5 Température.....	20

1.6.3 Le système protéines de lactosérum-pectine .....	21
1.6.4 Le système protéines de lactosérum-xanthane .....	21
<b>1.7 Les propriétés fonctionnelles des protéines et des polysaccharides et des solutions mixtes résultantes.....</b>	<b>22</b>
1.7.1 Les propriétés d'écoulement.....	22
1.7.1.1 Les biopolymères individuels .....	23
1.7.1.2 Les systèmes mixtes P-PS .....	24
1.7.2 Propriétés gélifiantes des protéines .....	24
1.7.2.1 Gels thermiques à base de protéines de lactosérum.....	26
1.7.2.1.1 pH .....	27
1.7.2.1.2 Force ionique .....	27
1.7.2.1.3 Ajout d'un polysaccharide .....	27
1.7.2.2 Gels acides laitiers .....	29
1.7.2.2.1 Formation d'un gel acide laitier (gel de caséines).....	29
1.7.2.2.2 Texture.....	30
1.7.2.2.3 Rôle des ingrédients sur la texture des yogourts.....	32
1.7.2.2.4 Concentration en solides totaux et en protéines.....	33
1.7.2.2.5 Polysaccharides.....	35
<b>Chapitre 2 But, hypothèse et objectifs.....</b>	<b>36</b>
<b>Chapitre 3 Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Résumé.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Abstract .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3 Introduction.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4 Materials and methods .....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Material .....	42
3.4.1.1 Preparation of solutions .....	43
3.4.2 Methods.....	43
3.4.2.1 Dynamic oscillatory measurements .....	43
3.4.2.2 Confocal laser scanning microscope (CLSM).....	44
<b>3.5 Results and discussion .....</b>	<b>44</b>
3.5.1 Gelation of whey proteins .....	44
3.5.1.1 Effect of pH .....	44
3.5.1.2 Effect of salt .....	45
3.5.2 WPI gels following incorporation of xanthan .....	45
3.5.2.1 Effect of xanthan addition and pH.....	46
3.5.2.2 Effect of salt .....	48
<b>3.6 Conclusion .....</b>	<b>50</b>
<b>3.7 Acknowledgements .....</b>	<b>50</b>
<b>Chapitre 4 Impact of protein-polysaccharide interaction on flow behaviour of diluted and bulk mixed solutions .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Résumé.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2 Abstract .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3 Introduction.....</b>	<b>60</b>
<b>4.4 Materials and methods .....</b>	<b>61</b>
4.4.1 Material .....	61

4.4.1.1 Whey protein isolate powder free of insoluble proteins .....	62
4.4.1.2 Preparation of stock and mixed solutions .....	62
4.4.2 Analytical methods .....	63
4.4.2.1 Absorbance .....	63
4.4.2.2 Dynamic viscosity .....	63
4.4.2.3 Zeta potential measurements .....	64
4.4.2.4 Capillary viscosity .....	64
4.4.2.5 Statistical analysis .....	65
<b>4.5 Results .....</b>	<b>65</b>
4.5.1 Absorbance .....	65
4.5.2 Dynamic viscosity .....	65
4.5.3 Zeta potential measurements .....	67
4.5.4 Capillary viscosity .....	67
<b>4.6 Discussion .....</b>	<b>68</b>
4.6.1 Mixed system behaviour and related flow behaviour in bulk solutions .....	68
4.6.2 Diluted systems and related reduced viscosity .....	71
<b>4.7 Conclusion .....</b>	<b>74</b>
<b>4.8 Acknowledgments .....</b>	<b>74</b>
<b><i>Chapitre 5 Characterization of acid milk gels incorporating protein-polysaccharide complexes towards their rheological, structural and syneresis behaviour .....</i></b>	<b><i>82</i></b>
<b>5.1 Résumé .....</b>	<b>83</b>
<b>5.2 Abstract .....</b>	<b>84</b>
<b>5.3 Introduction .....</b>	<b>85</b>
<b>5.4 Materials and methods .....</b>	<b>86</b>
5.4.1 Materials .....	86
5.4.1.1 Preparation of mixed solutions and complexes .....	86
5.4.1.2 Preparation of acid milk gel .....	87
5.4.2 Analytical Methods .....	88
5.4.2.1 Dynamic oscillatory measurements .....	88
5.4.2.2 Confocal laser scanning microscope (CLSM) .....	88
5.4.2.3 Syneresis .....	88
5.4.2.4 Statistical analysis .....	89
<b>5.5 Results .....</b>	<b>89</b>
<b>5.6 Discussion .....</b>	<b>91</b>
<b>5.7 Conclusion .....</b>	<b>97</b>
<b>5.8 Acknowledgments .....</b>	<b>97</b>
<b><i>Chapitre 6 Conclusion .....</i></b>	<b><i>103</i></b>
<b><i>Bibliographie .....</i></b>	<b><i>105</i></b>

## Liste des équations

Équation 1.1 Réciproque de la température de changement de conformation du xanthane.....	15
Équation 4.1 Absorbance.....	63
Équation 4.2 Power law model.....	63
Équation 4.3 Viscosité relative.....	64
Équation 4.4 Viscosité réduite.....	64
Équation 5.1 Pourcentage de synérèse.....	88

## Liste des figures

Figure 1.1 Composition globale du lait. ....	3
Figure 1.2 Structure quaternaire d'un monomère de $\beta$ -lactoglobuline.....	6
Figure 1.3 Structure de l' $\alpha$ -lactalbumine.....	9
Figure 1.4 Chaîne principale d'une molécule de pectine.....	12
Figure 1.5 Structure primaire d'un pentasaccharide de xanthane.....	14
Figure 1.6 Systèmes mixtes protéines-polysaccharides.....	16
Figure 1.7 Diagramme de phases d'un système mixte protéines-polysaccharides. ....	20
Figure 1.8 Gélification des protéines de lactosérum suite à un traitement thermique ( $T^{\circ}\text{C}$ ). .....	26
Figure 1.9 Relation entre la texture et la microstructure. ....	31
Figure 1.10 Comportement viscoélastique d'un gel en formation.....	32
Figure 3.1 Elastic modulus ( $G'$ ) of gels as a function of increasing xanthan concentration mixed with 12.5% (v/v) WPI. ....	51
Figure 3.2 Confocal microscopy pictures of WPI gels (12.5 %v/v) and mixed WPI-xanthan gum gel (12.5-0.03 % v/v) with 0.1M and 0.5 M of NaCl and without salt. ....	53
Figure 3.3 Elastic modulus ratios. ....	54
Figure 3.4 Gelling time of WPI (12.5% v/v) solution and WPI-xanthan mixed solutions depending on pH (0M NaCl) . ....	55
Figure 4.1 Absorbance measurements of the whey protein isolate (WPI) solutions and mixed protein-polysaccharides solutions at pH 5.0. ....	75
Figure 4.2 Apparent viscosity curves for shear rates values between 1 to $500\text{ s}^{-1}$ . ....	76
Figure 4.3 Apparent viscosity values (at $500\text{ s}^{-1}$ ) as a function of whey protein isolate (WPI) concentration present in solution for WPI controls and WPI-pectin solutions. ....	78
Figure 4.4 Reduced viscosity of mixed whey protein isolate (WPI)-pectin. ....	80
Figure 5.1 Elastic modulus ( $G'$ ) of acid gels as a function of "pectin equivalent". ....	99

Figure 5.2 Elastic modulus ( $G'$ ) of acid milk gels incorporating 0.2% pectin or “pectin equivalent” .....	100
Figure 5.3 CSLM observation of acid milk gels.....	101

## Liste des schémas

Schéma 1 Structure schématisée d'une molécule de pectine.....	12
---	----



## Liste des tableaux

Tableau 1.1	Caractéristiques physico-chimiques des principales protéines du lait bovin.....	4
Tableau 1.2	Catégories de gels multicomposants protéines-polysaccharides reliées au nombre d'agent gélifiant et à l'état des solutions mixtes avant gélification. ...	28
Table 3.1	Elastic modulus ( $G'$ ) of the solutions analysed with and without addition of NaCl (whey protein isolate is present at a concentration of 12.5% v/v. ....	52
Table 4.1	Flow behaviour index of pectin and whey protein isolate (WPI) controls and mixed protein-polysaccharide (protein:polysaccharide ratios) solutions determined from the apparent viscosity with the power law equation..	77
Table 4.2	Apparent viscosity values of pectin and whey protein isolate (WPI) controls and mixed protein-polysaccharide (protein:polysaccharide ratios) solutions at 1 and 500 $s^{-1}$ . ....	78
Table 4.3	Zeta potential values of pectin and whey protein isolate (WPI) controls and mixed protein-polysaccharide (protein:polysaccharide ratios) solutions.....	79
Table 5.1	Protein and lactose concentration and whey protein/casein ratio present in milk mixes..	99
Table 5.2	Syneresis of acid milk gels. ....	102

## Liste des abréviations

$\beta$ -lg :	beta-lactoglobuline	
$\kappa$ -caséine :	kappa-caséine	
AMG :	acid milk gel	Gel acide laitier
C :	concentration d'une solution	
C* :	concentration d'une solution au début du chevauchement des molécules	Coil overlapping concentration
C <sup>‡</sup> :	concentration d'une solution à l'atteinte de la dimension theta ( $\theta$ )	
Ca <sup>2+</sup> :	ion calcium	
-COOH :	groupement carboxylique	
-COOCH <sub>3</sub> :	groupement méthyl ester	
CSLM :	microscopie confocale à balayage laser	Confocal laser scanning microscope
DE :	degré d'estérification	
Dimension $\theta$ :	dimension imperturbable des molécules	
G' :	module élastique	elastic modulus
GDL :	glucono-delta-lactone	
HM :	hautement méthylée	high-methoxyl
Ip :	point isoélectrique	isoelectric point
LM :	faiblement méthylée	low methoxyl
NaCl :	chlorure de sodium	sodium chloride
-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> :	amide	
PC :	pectine	
PE :	équivalent pectine	pectin equivalent
pH <sub>c</sub> :	pH de début de formation de complexes	
pH <sub>φ</sub> :	pH de séparation de phases associative	
p/p :	poids/poids	
P-PS :	protéines-polysaccharides	
p/v :	poids/volume	
SMP :	skim milk powder	poudre de lait écrémé

WHC :	capacité de rétention d'eau	water holding capacity
WPI :	isolat de protéines de lactosérum	whey protein isolat
w/v :	poids/volume	weight/volume
w/w :	poids/poids	weight/weight

## Introduction

Aujourd'hui, les aliments retrouvés sur le marché présentent une variété grandissante de texture. Les protéines et les polysaccharides sont les molécules les plus souvent responsables de ces nouveautés. Ils sont utilisés pour leurs propriétés fonctionnelles variées. Les interactions intermoléculaires peuvent cependant conduire à plusieurs effets désirables ou indésirables.

Du à leur nature ionique, plusieurs types de solutions mixtes découlent des interactions entre les protéines et les polysaccharides: la cosolubilité, la complexation (interactions attractives) ou l'incompatibilité (interactions répulsives). La complexation produit des complexes solubles ou insolubles. L'incompatibilité mène plutôt à une séparation de phases ségrégative. Ces différents systèmes sont donc homogènes (1 phase) ou hétérogènes (2 phases).

Les interactions électrostatiques régissent majoritairement les interactions protéines-polysaccharide (P-PS). Elles dépendent des facteurs environnementaux tels que le pH et la force ionique, le ratio P-PS et la concentration en solides totaux (Schmitt et al., 1998; Tolstoguzov, 1997). La nature et la densité de charges, la conformation et la rigidité sont parmi les facteurs intrinsèques dont dépendent ces interactions.

Les interactions P-PS peuvent conduire à des effets synergiques (Bryant & McClements, 2000; Cai & Arntfield, 1997; Sánchez et al., 1995; Sanchez et al., 1997; Weinbreck & Wientjes, 2004) ou antagonistes (Bertrand & Turgeon, 2007; Cai & Arntfield, 1997; Sanchez et al., 1997) sur les propriétés fonctionnelles résultantes. Les propriétés fonctionnelles de chacun des biopolymères sont bien connues. Les systèmes en mélange sont de plus en plus documentés mais beaucoup de travail reste à faire pour caractériser leurs propriétés fonctionnelles. Le besoin de propriétés fonctionnelles variées et précises des industriels peut trouver réponse dans le contrôle des interactions P-PS. La relation composition-structure-propriétés désirée des aliments se forme en cours des procédés et s'avère la clé pour le développement de nouveaux produits (Tolstoguzov, 1996).

Dans l'industrie laitière, le yogourt est un exemple de produit très important contenant des protéines et des polysaccharides. Au Canada, la production et la consommation de yogourt ont plus de doublé en 10 ans. La consommation par personne est passée de 2,28 L/année en 1994 à 4,6 L/année en 2004. Les effets santé combinés aux bénéfices thérapeutiques associés aux produits fermentés ont contribué à augmenter leur popularité (Lucey & Singh, 1998). Le yogourt a été étudié depuis plusieurs années dans le but de comprendre sa formation et sa structure mais les défauts tels que la synérèse et la variation de viscosité (Keogh & O'kenedy, 1998) maintiennent l'intérêt des scientifiques. Les ingrédients laitiers et les polysaccharides sont utilisés depuis longtemps afin d'améliorer la texture et réduire la synérèse des yogourts. La volonté des consommateurs de se nourrir de produits « tout naturel » (Savello & Dargan, 1997) amène les chercheurs à exploiter de nouveaux domaines. L'utilisation de systèmes mixtes protéines-polysaccharides est proposée comme nouvelle voie pour l'amélioration des propriétés texturales. Le but général de ce projet est d'améliorer la compréhension des fonctionnalités des systèmes mixtes P-PS en conditions de formation de complexes solubles.

# Chapitre 1 Revue de littérature

## 1.1 Le lait

Le lait est un environnement complexe constitué de glucides, de lipides, de protéines et de minéraux dans une phase aqueuse (*Figure 1*). Le lactose est le principal glucide. Ce disaccharide se compose de D-glucose et du D-galactose. Parmi les lipides, les triglycérides sont majoritaires en étant présents à 98,3%. Les minéraux se divisent en sels solubles, retrouvés dans la phase liquide qu'est le lactosérum et en sels insolubles associés aux protéines que sont les caséines (Walstra et al., 1999). Les protéines du lait sont probablement les mieux caractérisées de toutes les protéines alimentaires. Elles se classent en deux principales catégories soit les caséines et les protéines de lactosérum, représentant respectivement 80% et 20% des protéines totales.

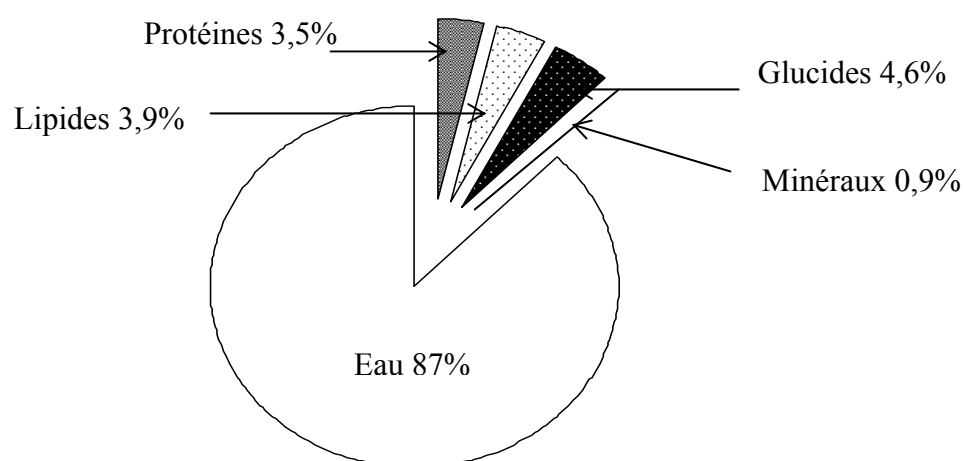


Figure 1.1 Composition globale du lait.

Adapté de Cayot & Lorient (1998).

## 1.2 Les caséines

Les caséines se définissent comme la fraction protéique précipitée du lait à pH 4,6 à 20°C (Fox, 2003). Cette classe de protéines en regroupent quatre principales :  $\alpha_{s1}$  (38%),  $\alpha_{s2}$

(10%),  $\beta$  (35%), et  $\kappa$  (15%). Quelques caractéristiques physico-chimiques sont rapportées dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 Caractéristiques physico-chimiques des principales protéines du lait bovin. Données tirées de Caussin & Bouhallab, 2004; Kinsella & Whitehead, 1989; Walstra et al., 1999.

Protéine	Poids moléculaire Da	Pourcentage approximatif dans un lait écrémé g/100g protéines	Point isoélectrique
<b>Sériques</b>		<b>19</b>	
$\beta$ -lactoglobuline	18 600	9,8	5,3
$\alpha$ -lactalbumine	14 299	3,7	4,2-4,5
Albumine sérique	66 000	1,2	4,8-5,1
Immunoglobuline	15,0-96,0 x 10 <sup>4</sup>	2,4	5,5-6,8
Lactoferrine	76 500		N/A
<b>Caséines</b>		<b>78,5</b>	<b>4,6</b>
$\alpha_{s1}$	23 614	31	
$\alpha_{s2}$	25 230	8	
$\beta$	23 983	28	
$\kappa$	19 023	10	

Dans le lait (pH 6,6), les caséines se présentent sous une forme micellaire stable (Cayot & Lorient, 1998). La micelle est composée de 92% de protéines et de 8% de minéraux. De ces 8% de minéraux, 90% se retrouve sous forme de phosphate de calcium micellaire ou colloïdal et 10% sous forme d'ions citrate et d'ions magnésium (Cayot & Lorient, 1998). Plusieurs modèles ont été proposés pour présenter la structure de la micelle de caséines. Le plus récent a été proposé par Horne en 1998 et se base sur un modèle de polymérisation (condensation). Il avance que la micelle est stabilisée par une double fixation. Les caséines individuelles seraient liées à la fois par leurs régions hydrophobes et par le pontage induit par la présence du phosphate de calcium colloïdal. L'intégrité de la micelle dépend donc d'un équilibre entre les forces attractives (hydrophobes) et répulsives (électrostatiques). Un autre aspect du modèle « double fixation » est que la caséine  $\kappa$  se retrouve à la surface de la micelle due à son habileté à se lier aux autres caséines seulement par des interactions hydrophobes. Les micelles de caséines peuvent être vues comme des sphères rigides

enveloppées d'une couche de « cheveux » de  $\kappa$ -caséines hydrophiles (Nishinari et al., 2000).

### 1.3 Les protéines du lactosérum

Les protéines de lactosérum se définissent comme la fraction protéique soluble obtenue lors de la précipitation des caséines à pH 4,6 à 20°C. Elles sont un coproduit de la fabrication fromagère. Les protéines de lactosérum sont principalement commercialisées sous trois différentes formes (Soupe, 2004):

- Les concentrés contenant entre 35 et 80% de matière azotée totale sur matière sèche;
- Les isolats contenant plus de 90% de matière azotée totale sur matière sèche;
- Les sérums délactosés contenant entre 24 et 40% de matière azotée totale sur matière sèche.

Leurs excellentes propriétés fonctionnelles et nutritionnelles en font des protéines de choix (de Wit, 1998). Ces protéines ont fait l'objet d'innombrables études et sont très bien documentées. Les protéines de lactosérum sont principalement composées de la  $\beta$ -lactoglobuline (50%), l' $\alpha$ -lactalbumine (20%), les immunoglobulines (10%), l'albumine de sérum bovin (10%) et la lactoferrine (2,8%) (Cayot & Lorient, 1998). Les protéines majeures, la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) et l' $\alpha$ -lactalbumine, dictent les propriétés fonctionnelles des protéines de lactosérum (Ziegler & Foegeding, 1990).

#### 1.3.1 Structure de la $\beta$ -lactoglobuline

La ( $\beta$ -lg) est une protéine globulaire. Sa structure primaire comprend 162 acides aminés totalisant un poids moléculaire de  $\sim 18\,000$  Da. Au pH physiologique, cette protéine est présente sous forme de dimère. La structure ordonnée de la  $\beta$ -lg démontre la présence de 45% de feuillets- $\beta$ , 10% d'hélices- $\alpha$  et 45% d'enroulements au hasard. Un monomère de  $\beta$ -lg contient 1 mole de cystéine ou 5  $\frac{1}{2}$  cystéine dont quatre sont impliquées pour la formation de deux ponts disulfures maintenant la structure tertiaire. Le cinquième apparaît sous forme de thiol libre. Dans la structure tridimensionnelle compacte s'enfouissent les chaînes latérales hydrophobes, alors que les chaînes latérales polaires se localisent à l'extérieur de la structure (Fig. 1.1) (Fox, 1989).



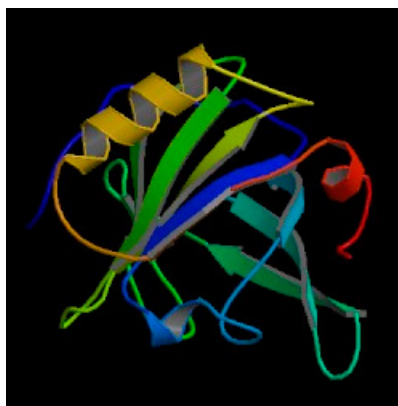


Figure 1.2 Structure quaternaire d'un monomère de  $\beta$ -lactoglobuline.

Source : Protein Data Bank (Qin et al., 1998).

### **1.3.2 Influence de facteurs extrinsèques sur la structure de la $\beta$ -lactoglobuline**

La structure tridimensionnelle native des protéines provient d'une balance entre les différentes forces attractives et répulsives. Ces forces sont présentes à la fois à l'intérieur de la molécule de même qu'entre la molécule et le solvant. La structure est stabilisée par les liens principalement non covalents soit les interactions hydrophobes, les ponts hydrogène et les interactions électrostatiques et de van der Waals.

#### **1.3.2.1 Nature et concentration des ions**

L'ajout d'un sel à une solution de protéines natives altère l'équilibre des interactions électrostatiques et hydrophobes. Le changement de conformation des protéines natives serait dû à une rupture des ponts hydrogène des molécules d'eau en solution de même qu'aux molécules d'eau entourant les groupements apolaires des chaînes latérales des protéines (Relkin, 1996). L'effet des ions diffère et varie selon leur concentration et leur nature. Leur effet stabilisateur provient de leur capacité à augmenter les interactions hydrophobes entre les groupements apolaires. Les sels stabilisant la structure tendent cependant à réduire la solubilité de la protéine.

La présence d'ions en solution influence la structure quaternaire de la  $\beta$ -lg. À pH 2, l'ajout de NaCl provoque l'association des monomères en dimères alors qu'à pH 7, les dimères passent à une association supérieure (Cayot & Lorient, 1998). Cette réaction pourrait s'expliquer par une diminution des répulsions électrostatiques ou encore par une modification de la couche d'hydratation de la protéine (Caussin & Bouhallab, 2004).

### **1.3.2.2 pH**

La structure quaternaire de la  $\beta$ -lg varie aussi en fonction du pH (Cayot & Lorient, 1998; de Wit, 1989). Le dimère retrouvé au pH physiologique du lait existe sous cette forme entre pH 5,5-7,5. Entre pH  $\sim$ 3,0-5,2, les dimères s'associent en octamères. Une diminution de pH en deçà de 3,0 favorise la formation de monomères due aux fortes répulsions électrostatiques. À ce pH, la dissociation ne s'accompagne d'aucun changement de conformation du monomère. À des pH supérieurs à 7,5, la formation de monomères est réversible et s'accompagne d'une réactivité accrue du groupement thiol. À un pH supérieur à 9,0, elle devient irréversible. Les répulsions électrostatiques à pH élevé augmentent ce qui pourrait conduire à une ouverture de la structure protéique et à une plus grande disponibilité de la fonction thiol.

### **1.3.2.3 Température**

Les conséquences structurales de l'application d'un traitement thermique à une solution de  $\beta$ -lg dépendent non seulement de la température appliquée mais aussi du pH et de la force ionique. Un léger changement de conformation survient par un chauffage à 40°C. Une augmentation de la température à 50-60°C provoque un dépliement et une exposition des groupements thiol et des acides aminés hydrophobes (Kinsella & Whitehead, 1989). La dénaturation de la  $\beta$ -lg débute à une température autour de 78°C. Un traitement thermique entraîne dans un premier temps une dénaturation et dans un deuxième temps une agrégation. Les effets d'un traitement thermique reposent non seulement sur la température mais aussi sur la durée de son application.

Le pH initial d'une solution est un troisième facteur dictant les effets d'un traitement thermique. À un pH  $\geq$ 6,5, la réactivité accrue du groupement thiol entraîne la formation

d'oligomères suite à un échange de ponts disulfures (Cayot & Lorient, 1998). La formation d'agrégats de grande taille suivrait, sans intervention des thiols mais plutôt due aux interactions hydrophobes favorisées par le dépliement et l'exposition des groupements apolaires de la protéine. Les interactions hydrophobes sont également favorisées par l'augmentation de la température. L'application d'un traitement thermique à pH acide (pH <3,5), démontre la présence de monomères non agrégés solubles. Cependant, ces molécules deviennent insolubles suite à une augmentation du pH à 4,5 dénotant une dénaturation. Autour du point isoélectrique (Ip) (4,5-6,0), des températures de 60-70°C ne provoquent qu'une très faible dénaturation alors que pour des températures de 80-90°C, une augmentation de pH contribue à l'augmentation de la dénaturation protéique (Donovan & Mulvihill, 1987).

La force ionique d'une solution protéique soumise à un traitement thermique a trois principales conséquences (au pH physiologique du lait) (Caussin & Bouhallab, 2004):

- Elle conditionne la dissociation des dimères et donc l'accessibilité du groupement thiol libre qui influence la capacité de polymérisation de la  $\beta$ -lg par échange de ponts disulfures
- Elle influence les interactions électrostatiques intramoléculaires et par conséquent la stabilité thermique de la protéine
- Elle influence la nature et la taille des agrégats de même que leur cinétique d'agrégation

La nature des ions joue un rôle important dans le comportement des solutions de  $\beta$ -lg. L'ajout de NaCl aurait un effet protecteur face à la dénaturation thermique et semblerait augmenter la taille des agrégats (Caussin & Bouhallab, 2004). L'augmentation de la température de dénaturation observée en présence de NaCl s'expliquerait par l'aptitude de cet ion à former des dimères lesquels se dissocient lors de la première étape de dénaturation. La diminution des répulsions électrostatiques en présence de sel ainsi que l'augmentation de la solubilité provoquent un dépliement et facilitent l'agrégation à la source de l'augmentation de la taille des agrégats. L'ajout d'ions bivalents tel le calcium occasionne une diminution de la température de dénaturation de la  $\beta$ -lg contrairement à l'ajout d'ions monovalents. Li et al. (1994) ont démontré que le calcium induit un

changement de conformation de la  $\beta$ -lg permettant de faciliter sa dénaturation et d'augmenter la cinétique de formation des agrégats.

### 1.3.3 Structure de l' $\alpha$ -lactalbumine

L' $\alpha$ -lactalbumine est une petite protéine globulaire compacte. Sa structure primaire comprend 123 acides aminés (Fox, 2003). Une molécule d' $\alpha$ -lactalbumine contient 8 cystéines toutes impliquées dans la formation de ponts disulfures. Sa structure secondaire est faiblement organisée. Elle comprend 14% de feuillets- $\beta$ , 26% d'hélices- $\alpha$  et 60% d'enroulements au hasard. La structure tertiaire de l' $\alpha$ -lactalbumine est stabilisée par ses 4 ponts disulfures et un ion calcium et comprend un cœur hydrophobe. L' $\alpha$ -lactalbumine existe sous forme de monomère au pH physiologique (Fox, 1989).

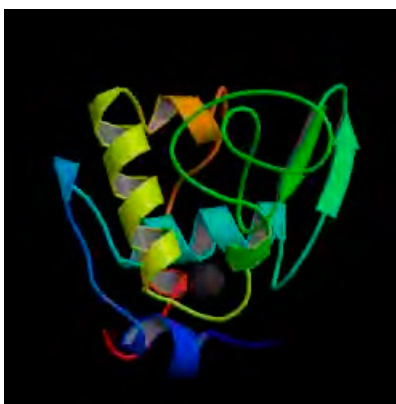


Figure 1.3 Structure de l' $\alpha$ -lactalbumine.

Source: Protein Data Bank (Pike et al., 1996).

En présence d'un ion calcium, l' $\alpha$ -lactalbumine existe sous sa forme native. L'holo- $\alpha$ -lactalbumine est une forme contenant plutôt 2  $\text{Ca}^{2+}$  et l'apo- $\alpha$ -lactalbumine la forme qui n'en contient aucun.

### **1.3.4 Influence de facteurs extrinsèques sur la structure de l' $\alpha$ -lactalbumine**

#### **1.3.4.1 Nature et concentration des ions**

Le passage de la forme native à la forme apo- $\alpha$ -lactalbumine s'accompagne de changements de la structure tertiaire. L'absence de l'ion calcium n'affecte cependant pas la structure secondaire (Dufour, 2004). L'ion calcium est essentiel au maintien de la structure tertiaire. L' $\alpha$ -lactalbumine démontre d'ailleurs la meilleure stabilité thermique de toutes les protéines du lactosérum.

#### **1.3.4.2 pH**

Le pH affecte l'agrégation des monomères d' $\alpha$ -lactalbumine (Dufour, 2004). À des pH acides (< 4,5) s'effectue une association réversible des monomères et une agrégation lente. Entre pH 6,0 et 8,5 l'association est faible et au dessus de pH 9,5, il y a absence d'agrégation mais présence d'une expansion des monomères. L' $\alpha$ -lactalbumine est dépouillée de son ion calcium à des pH inférieurs à 4 et supérieurs à 9, provoquant sa dénaturation.

#### **1.3.4.3 Température**

L'holo- $\alpha$ -lactalbumine présente un changement de conformation débutant à une température de 58°C à pH 7,0 (Caussin & Bouhallab, 2004). La dénaturation survient ensuite à des températures de 65-70°C. L' $\alpha$ -lactalbumine a la particularité de retrouver sa forme native suite à un refroidissement d'où sa réputation d'être une protéine très résistante à la dénaturation. Cette renaturation est de l'ordre de 80-90% pour l'holo- $\alpha$ -lactalbumine et d'environ 50% pour l'apo- $\alpha$ -lactalbumine. La dénaturation devient irréversible à des traitements thermiques au-delà de 10 min à 100°C, entraînant le largage de  $\text{Ca}^{2+}$  et la formation d'agrégats protéiques de grosse taille. L'apo- $\alpha$ -lactalbumine est beaucoup plus sensible à la chaleur. Sa température de dénaturation avoisine les 42-44°C à pH 7,0. À une température de 90°C, elle forme des agrégats.

Boye et al. (1997) rapportent l'effet d'un traitement thermique à des pH variant de 3-9 pour un mélange apo/holo- $\alpha$ -lactalbumine. Ils ont démontré que la protéine s'agrège aux pH 3 et

5 mais non aux pH 7 et 9. Cette agrégation serait le résultat d'une exposition de résidus tryptophane qui augmente l'hydrophobicité de la protéine dans l'état globulaire fondu (pH acide) et permet les interactions intermoléculaires à pH acide.

Tel que mentionné précédemment, la présence de calcium est essentielle à la stabilité thermique de l' $\alpha$ -lactalbumine. Le NaCl a aussi été identifié comme un stabilisateur pour les formes native et apo en augmentant leur température de dénaturation d'une dizaine de degrés (Boye et al., 1997; Dufour, 2004). Au contraire, la présence de zinc conduit à une déstabilisation suite à un traitement thermique.

## 1.4 Pectine

La pectine est un polysaccharide de structure, hétérogène et complexe retrouvé dans les fruits et les légumes (Rolin et al., 1998). La pectine commerciale provient principalement des écorces de citron ou des résidus de la fabrication du jus de pommes. Ses propriétés gélifiantes en font un polysaccharide de choix pour la fabrication de confitures qui constitue sa principale utilisation en industrie alimentaire. L'utilisation de la pectine est également très répandue dans les produits laitiers acides tels les yogourts (Voragen et al., 1995).

### 1.4.1 Structure

Ce polysaccharide anionique linéaire est constitué majoritairement d'unités  $\alpha$ -D-acide galacturonique reliées en (1 $\rightarrow$ 4) (Fig. 1.4). Des molécules de L-rhamnose (1-4%) sont parfois introduites dans la chaîne en  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2) produisant des irrégularités. Plusieurs glucides neutres tels le galactose, le glucose, le rhamnose, l'arabinose et le xylose participent à sa structure par la formation de chaînes latérales.

Les recherches ont démontré que les glucides neutres sont concentrés en blocs principalement dans les régions où les acides galacturoniques sont substitués par les rhamnoses (Voragen et al., 1995). Ils forment les régions hérissées (*Schéma 1*) alors que les séquences d'homogalacturonans forment la région lisse. Sa structure secondaire prend une forme allongée et d'hélice (Cros et al., 1996).

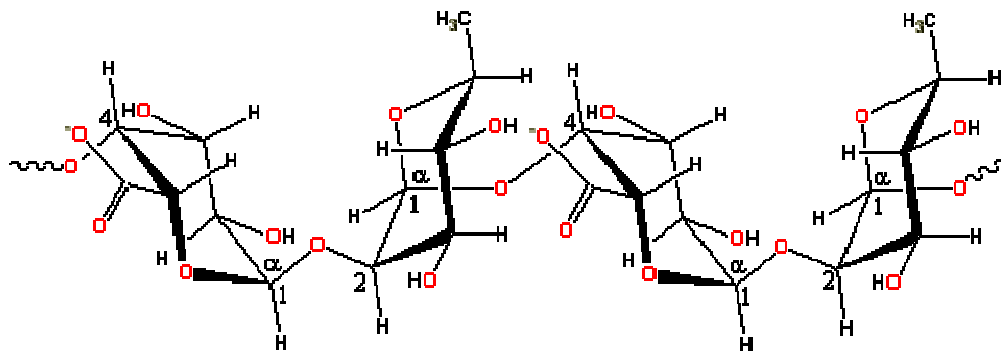


Figure 1.4 Chaîne principale d'une molécule de pectine.

Source : (<http://www.lsbu.ac.uk/water/hypec.html>)

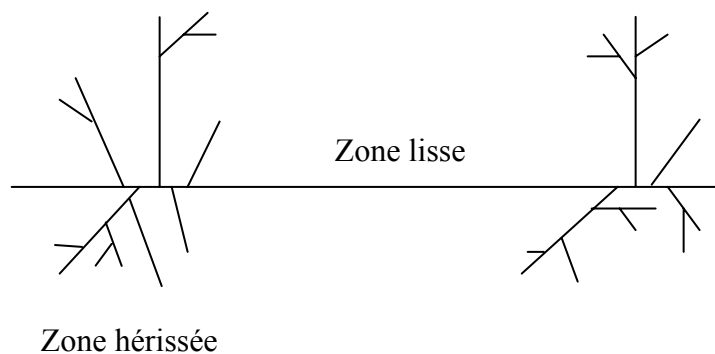


Schéma 1 Structure schématisée d'une molécule de pectine.

Adapté de Voragen et al., 1995.

La pectine brute comporte environ 55-75% d'acide galacturonique méthyl-estérifié ( $-\text{COOCH}_3$ ) (Rolin et al., 1998). Parce qu'elle renferme plus de 50% d'esters sur ses groupements carboxyliques, cette pectine est dite « hautement méthylée » (HM). Quand cette proportion diminue en deçà de 50%, la pectine est dite « faiblement méthylée » (LM). Lors du processus de déstérification de la pectine HM, l'utilisation d'ammoniaque en milieu alcalin conduit à l'intégration de groupements amides ( $\text{NH}_2$ ) à la pectine LM. Le degré d'estérification (DE), défini comme le pourcentage d'acides galacturoniques méthyl-estérifiés, est une caractéristique importante de la pectine étant donné qu'il dicte ses propriétés fonctionnelles. Le DE définit la densité de charge de la molécule de pectine.

### 1.4.2 Caractéristiques physicochimiques

La pectine est un acide polycarboxylique dont le poids moléculaire varie entre 50 000-200 000 Da (Voragen et al., 1995). La charge induite par la présence de groupements COOH est fonction du pH et de la force ionique. À pH neutre, la molécule est chargée négativement. Cette charge diminue avec une diminution de pH et une augmentation du DE. Le  $pK_a$  de la pectine a une valeur entre 3,5-4,5 (Rolin et al., 1998). Une augmentation de la force ionique masque les charges de la pectine, effet observé avec l'ajout d'ions monovalents et bivalents (Voragen et al., 1995). Cependant, les ions bivalents causent aussi la dimérisation des chaînes d'acides galacturoniques par le modèle « boîte d'œuf ». Les cations se fixent dans la série de cavités électronégativement chargées des chaînes. L'affinité des cations diffère :  $Mg^{2+} \ll Ca^{2+} \sim Sr^{2+} < Ba^{2+}$  (Thibault & Rinaudo, 1986). Ces interactions sont d'une grande importance dans la gélification de la pectine LM.

### 1.4.3 Caractéristiques en solution

En solution, la pectine conduit à une augmentation de viscosité ou à la gélification dépendamment de sa concentration, de son DE, du pH et de la concentration en solides totaux. La gélification de la pectine HM et LM diffère. La formation d'un gel est possible avec une pectine HM à pH acide en présence d'une quantité minimale de sucre (Voragen et al., 1995). Ces deux éléments favorisent les interactions pectine-pectine plutôt que les interactions pectine-eau premièrement suite à la diminution des répulsions électrostatiques (pH acide) et deuxièmement par la diminution de l'activité de l'eau (présence de sucre). La pectine LM gélifie quand à elle en présence d'ions calcium à pH acide. Les ions calcium permettent la formation de jonctions entre les différentes chaînes de pectine menant ainsi à la formation d'un réseau.

## 1.5 Xanthane

Le xanthane est un polysaccharide bactérien utilisé dans plusieurs sphères de fabrication industrielle. En alimentaire, ses nombreuses propriétés en font un ingrédient de choix. Le xanthane est reconnu pour sa très grande stabilité à différentes conditions de pH et de températures en plus d'être soluble à chaud et à froid. Ses propriétés épaississantes et stabilisantes sont largement exploitées dans le domaine des émulsions.



### 1.5.1 Structure

Le xanthane est un exopolysaccharide produit par *Xanthomonas* principalement l'espèce *campestris*. La structure primaire du xanthane est un assemblage de pentasaccharides. La chaîne principale relie en (1→4) des unités de β-D-glucose sur laquelle une chaîne latérale (D-mannose, D-acide glucuronique, D-mannose) apparaît aux deux unités de glucose (Fig. 1.4). Environ la moitié des mannoses terminaux portent des groupements acétyle alors que les mannoses reliés à la chaîne principale incluent un groupement pyruvate. Les chaînes latérales s'alignent près de la chaîne de glucose. La structure secondaire qu'adopte le xanthane fait toujours l'objet d'un débat à savoir si sa conformation est une hélice simple ou double (Pelletier et al., 2001).

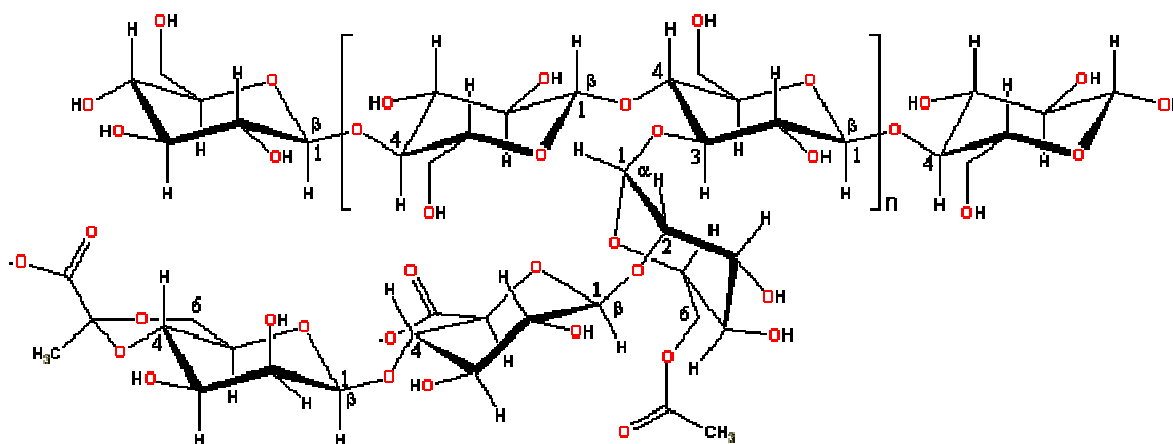


Figure 1.5 Structure primaire d'un pentasaccharide de xanthane.

Source <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyxan.html>

### 1.5.2 Caractéristiques physicochimiques

Le xanthane possède un caractère anionique et un poids moléculaire variant entre 2-20 x 10<sup>6</sup> Da (Garcia-Ochoa et al., 2000). La conformation adoptée par la molécule de xanthane influence ses diverses propriétés physico-chimiques. Sa conformation subit une transition de la forme d'hélice (ordonnée) à pelote (désordonnée) à une température donnée dépendamment de sa concentration en solution et de la force ionique (Rinaudo, 2001). Plusieurs recherches tentent toujours d'élucider la structure secondaire adoptée dans ces différentes conditions environnementales (Camesano & Wilkinson, 2001; Lee & Brant,

2002; Pelletier et al., 2001). Sous la forme d'hélice, les chaînes latérales sont incorporées et associées à la chaîne de glucose alors que sous la forme désordonnée, les chaînes latérales sont dissociées et éloignées de la chaîne principale (Pelletier et al., 2001).

Les différentes recherches s'entendent pour dire que le xanthane adopte une conformation d'hélice à l'état natif, c'est-à-dire en absence de traitement thermique et à faible force ionique (Camesano & Wilkinson, 2001). Suite à un traitement thermique, la conformation du xanthane passe à la forme désordonnée pour laquelle la concentration en ions détermine la température de transition. La relation suivante a été établie par Rinaudo et al. (1999) pour le xanthane en présence de NaCl :

$$T_m^{-1} \text{ (K)} = 2,16 \times 10^{-3} - 0,5 \times 10^{-3} \log C_t \quad (1.1)$$

où  $T_m^{-1}$  est la réciproque de la température de changement de conformation en kelvin et  $C_t$  est la concentration ionique totale de la solution (charge équivalente/litre). La concentration de xanthane en solution contribue à la force ionique totale de la solution due au caractère ionique de la molécule. Une augmentation de la concentration en xanthane augmente  $T_m$  (Lee & Brant, 2002). La thermoréversibilité de la dénaturation du xanthane reste débattue en littérature (Camesano & Wilkinson, 2001).

### 1.5.3 Caractéristiques rhéologiques

La conformation qu'adopte le xanthane en solution affecte ses propriétés rhéologiques. Le xanthane produit des solutions très visqueuses à faible concentration. La viscosité dépend de la température, de la concentration en xanthane, de la force ionique et du pH (García-Ochoa et al., 2000). La structure même du xanthane empêche la formation de gel (Kang & Pettitt, 1992). La gélification n'est possible qu'en présence d'autres polysaccharides tels que les galactomananes ou en présence d'ions métalliques (Stokke et al., 1998).

## 1.6 Les solutions mixtes protéines-polysaccharides

En mélange, les protéines et les polysaccharides engendrent trois phénomènes : la cosolubilité, la complexation (interactions attractives) et l'incompatibilité (interactions répulsives) (*Fig. 1.5*) (Tolstoguzov, 1991). Le comportement de ces mélanges en solution

est un équilibre entre les différentes interactions possibles dans un mélange protéines-polysaccharides-solvant.

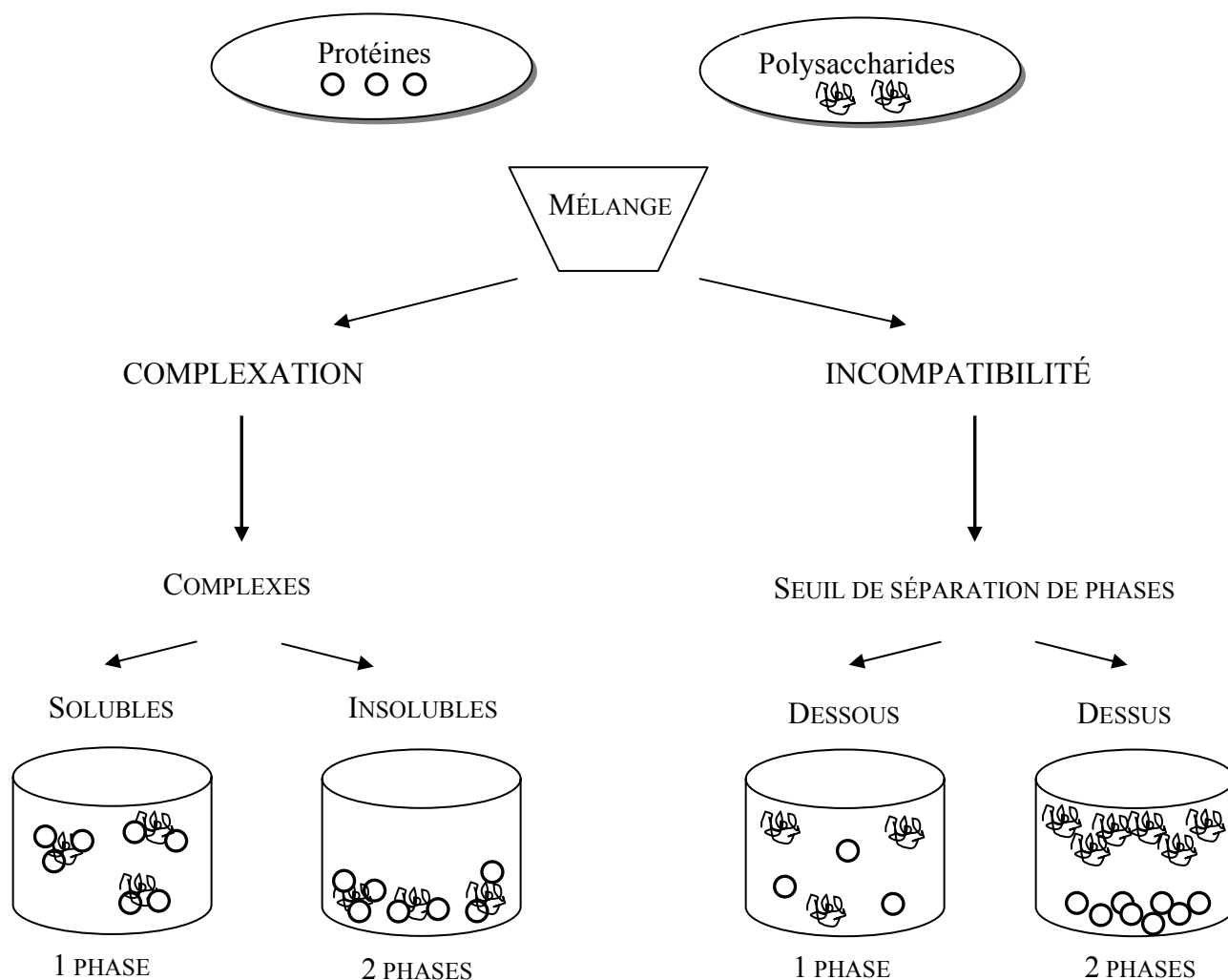


Figure 1.6 Systèmes mixtes protéines-polysaccharides.

Source : Adapté de Tolstoguzov, 1991.

La complexation prend naissance suite aux interactions entre les molécules de charge opposée (Sanchez & Renard, 2002). La solubilisation des complexes survient lorsque les charges opposées portées par les protéines et les polysaccharides sont non équivalentes (1 phase). La neutralisation des charges lors de la complexation produit des complexes insolubles et une solution à 2 phases où les complexes se retrouvent dans la phase inférieure et le solvant dans la phase supérieure (Schmitt et al., 1998 ; Tolstoguzov, 1997).

Cette formation de complexes insolubles fait souvent référence à la séparation de phases associative.

L'incompatibilité des protéines et des polysaccharides produit deux types de solutions dépendamment que leur concentration se retrouve dessous ou dessus le seuil de séparation de phases. Une séparation de phases ségrégative survient lorsque la concentration des biopolymères se retrouve au-dessus du seuil de séparation de phases et les deux biopolymères portent une charge nette de même signe. La solution mixte se sépare pour produire 2 phases dans lesquelles chacun des biopolymères se retrouve concentré individuellement. Tous les systèmes protéines-polysaccharides possèdent un seuil de séparation de phases respectif, c'est-à-dire une concentration minimale en biopolymères à laquelle survient une séparation de phases. Dessous ce seuil de séparation de phases, l'état de cosolubilité ou de miscibilité implique que les interactions attractives et répulsives s'équivalent entre les protéines et les polysaccharides. Les interactions entre les biopolymères de même nature sont équivalentes aux interactions entre les protéines et les polysaccharides. Un tel système peut demeurer homogène même à concentration élevée (Syrbe et al., 1998).

### **1.6.1 Les interactions intermoléculaires**

Le caractère ionique des protéines et des polysaccharides favorise les interactions électrostatiques lesquelles sont prédominantes dans les systèmes mixtes (Girard et al., 2002a; Turgeon et al., 2003). Le pH, la force ionique, la distribution de charges, la concentration en solides totaux et le ratio P-PS sont autant de facteurs affectant la qualité des interactions électrostatiques. La présence de ponts hydrogène a aussi été identifiées mais joue un rôle de moins grande importance (Girard et al., 2002a).

### **1.6.2 Facteurs influençant les interactions protéines-polysaccharides**

#### **1.6.2.1 pH**

Le pH est un facteur clé dans le comportement des solutions mixtes dû à son effet sur le nombre de charges portées par les groupements ionisables des molécules. À un pH supérieur au  $I_p$ , les protéines portent une charge nette négative alors qu'à un pH inférieur,

la charge nette est positive. La formation de complexes est réalisée dans une gamme de pH située entre le  $I_p$  des protéines et le  $pK_a$  des polysaccharides (Syrbe et al., 1998; Tolstoguzov, 1997). La formation de complexes a cependant été observée à plusieurs reprises à un pH au dessus du  $I_p$  des protéines tel qu'il sera expliqué dans la section 1.6.3.3. La formation de complexes P-PS débute par la création de complexes solubles au  $pH_c$  (Mattison et al., 1995). Lorsque ces complexes interagissent entre eux pour former des complexes interpolymériques, une séparation de phases associative se produit au  $pH_\phi$ .

### 1.6.2.2 Force ionique

La présence de sel en solution a un effet à la fois sur les molécules prises individuellement et sur les interactions entre elles. Les ions ont pour effet de masquer les charges des molécules ce qui affecte leur conformation et leur compatibilité. À faible force ionique, les charges des biopolymères sont suffisantes pour induire une complexation. Au contraire, une séparation de phases est favorisée par les concentrations élevées en ions (Schmitt et al., 1998; Tolstoguzov, 1996).

### 1.6.2.3 Facteurs intrinsèques

Plusieurs facteurs intrinsèques orientent le comportement des solutions mixtes et leurs interactions : la nature et la densité de charges, la conformation et la rigidité sont parmi les plus importants. Les protéines et les polysaccharides portent différents groupements ionisables. Dans le cas des protéines ce sont les groupements carboxyliques, amines et les groupements ionisables des chaînes latérales des acides aminés alors que pour les polysaccharides ce sont principalement les groupements carboxyliques (pectine, xanthane, gomme arabique, alginate) et sulfatés (carraghénane). L'attraction moléculaire entre les groupements amides ( $-NH_3^+$ ) est plus importante avec les groupements sulfatés ( $-OSO_3^-$ ) qu'avec les groupements carboxyliques ( $COO^-$ ) (Dickinson, 1998). De même, la distribution des charges sur les protéines étant inhomogène, à un pH supérieur au  $I_p$ , la présence de zones (« patch ») positives induit une densité de charge supérieure à la charge nette de la molécule permettant une attraction P-PS (Doublier et al., 2000).

La conformation des molécules est un élément important dans le comportement des systèmes mixtes. Elle dépend de plusieurs facteurs soit de la structure primaire, de la force ionique et des traitements physiques tels que le traitement thermique. La conformation affecte les points de jonction ou les zones de contact entre les protéines et les polysaccharides. Une protéine native comporte des groupements ionisables enfouis dans sa structure et non disponibles pour interagir. La force ionique est particulièrement importante dans le cas des polysaccharides alors que les ions masquent les charges, diminuent les répulsions et provoquent la contraction de la molécule. De même, la rigidité d'une molécule limite aussi le nombre de jonctions. Des interactions P-PS optimales seraient observées à une balance critique entre la densité de charges du biopolymère et sa rigidité (Doublier et al., 2000). Le seuil de séparation de phases diminue avec l'augmentation de la rigidité des macromolécules (Tolstoguzov, 1997).

#### **1.6.2.4 Concentration en solides totaux et ratio protéines-polysaccharides**

La concentration en solides totaux de même que le ratio P-PS sont des facteurs commandant le comportement des solutions mixtes. Chaque système P-PS possède un diagramme de phases permettant de déterminer les conditions du système (*Fig. 1.7*). La binodale ou la courbe de cosolubilité sépare les états monophasiques, sous la binodale, et biphasiques, au-dessus de la binodale. À faible concentration, un système mixte est donc stable alors qu'à une concentration élevée, la compétition pour le solvant favorise la séparation de phases (Tolstoguzov, 1986; Tolstoguzov, 1997).

Les concentrations en protéines et en polysaccharides déterminent le ratio P-PS retrouvé en solution. L'importance de ce ratio provient de son effet à la fois sur le type d'interactions privilégiées (protéines-protéines, polysaccharides-polysaccharides ou P-PS) et sur le ratio de charge nette des biopolymères dans les cas d'interactions attractives. Un ratio P-PS élevé favorise les interactions protéines-protéines au détriment des interactions P-PS. Dans le cas du phénomène de complexation, le ratio de charge dicte la solubilité des complexes (Tolstoguzov, 1997).

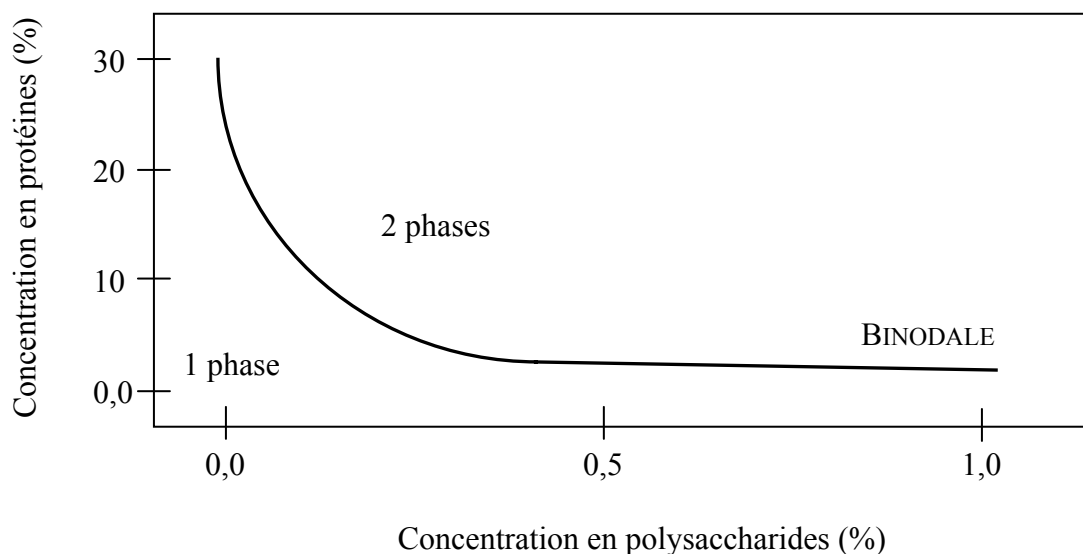


Figure 1.7 Diagramme de phases d'un système mixte protéines-polysaccharides.  
Adapté de Grinberg & Tolstoguzov, 1997.

#### 1.6.2.5 Température

La température peut influencer les interactions protéines-polysaccharides de plusieurs façons. Des températures élevées favorisent les interactions hydrophobes alors que les basses températures favorisent la formation de ponts hydrogène (Schmitt et al., 1998). Le dépliement et la dénaturation des protéines causent l'exposition d'un nombre accru de groupements réactifs, en plus d'induire des changements de conformation du polysaccharide. Une étude de Le Hénaff (1996) a démontré que le nombre de complexes protéines de lactosérum-xanthane était plus important après un traitement thermique à 85°C, 20 min. Le traitement thermique pourrait stabiliser les complexes dû à une interaction optimale entre les protéines et les polysaccharides suivant l'ajustement conformationnel des deux molécules (Imeson et al., 1977; Ledward, 1994).

Plusieurs facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques affectent directement ou indirectement les interactions protéines-polysaccharides. Chaque système mixte répond différemment à ces combinaisons de facteurs et cette revue de littérature rapportera les principales études des systèmes d'intérêt soit les systèmes protéines de lactosérum-pectine et protéines de lactosérum-xanthane.

### 1.6.3 Le système protéines de lactosérum-pectine

Les résultats de tous systèmes mixtes peuvent être rapportés selon deux niveaux de compréhension:

1. Compréhension et caractérisation **directe** des solutions mixtes au niveau fondamental requérant des études sur des systèmes en solutions diluées;
2. Compréhension **indirecte** des solutions mixtes par l'étude de propriétés fonctionnelles qui découlent de leur présence dans une solution concentrée.

Quelques systèmes mixtes ont fait l'objet d'études fondamentales plus approfondies tels que le système  $\beta$ -lg-gomme acacia (Mekhloufi et al., 2005; Sanchez & Renard, 2002; Sanchez et al., 2002; Sanchez et al., 2006; Schmitt et al., 1999; Schmitt, 2000; Schmitt et al., 2000; Schmitt et al., 2001a; Schmitt et al., 2001b) et gélatine-gomme arabique (de Kruif et al., 2004).

Les systèmes mixtes protéines-pectine en solutions diluées ont principalement été étudiés par Girard et collaborateurs. Girard et al. (2002a) ont établi la nature des interactions puis quantifié le nombre de molécules de  $\beta$ -lg complexées à la pectine (Girard et al., 2003a). Deux autres études ont porté sur la détermination de paramètres thermodynamiques (Girard et al., 2003b) et cinétiques (Girard et al., 2004). Les interactions électrostatiques sont les forces majeures d'interaction alors que les ponts hydrogène sont aussi présents mais de moindre importance. Le pH de début de formation de complexes, le  $\text{pH}_c$ , a été établi à 6,0 et 5,5 pour les systèmes mixtes avec la pectine LM et HM respectivement. La pectine LM complexe un plus grand nombre de molécules de protéines que la pectine HM.

### 1.6.4 Le système protéines de lactosérum-xanthane

Le système protéines de lactosérum-xanthane n'a pas fait l'objet d'études aussi spécifiques ou détaillées que dans le cas précédent. Cependant, une étude importante de Laneuville et al. (2005) rapporte des données essentielles pour ce système mixte. Ces chercheurs ont déterminé le  $\text{pH}_c$  (5,78-5,75) et le  $\text{pH}_\Phi$  (5,10-5,47) pour différents ratios (2:1 à 15:1)  $\beta$ -lg-xanthane. Ils ont aussi mis en évidence le changement de structure des complexes face à



une diminution de pH de même que l'importance du ratio, entre autres, vis-à-vis la taille de ces complexes.

L'étude des systèmes mixtes protéines-polysaccharides nécessite encore beaucoup de travail pour caractériser chaque système. Cependant, les nombreuses recherches permettent de mettre en évidence le rôle de plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques pouvant affecter les interactions protéines-polysaccharides. Ces connaissances permettent de généraliser le comportement des systèmes afin de mieux comprendre les propriétés fonctionnelles qui en découlent.

## **1.7 Les propriétés fonctionnelles des protéines et des polysaccharides et des solutions mixtes résultantes**

Les protéines de lactosérum et les polysaccharides possèdent plusieurs propriétés fonctionnelles exploitées dans le monde alimentaire. Les propriétés d'écoulement (viscosité) et de gélification en sont deux d'une grande importance. Les polysaccharides et les protéines répondent différemment à un écoulement dû principalement à leur taille. Les protéines de lactosérum ne sont pas très efficaces pour augmenter la viscosité mais sont très aptes à la gélification. Les propriétés gélifiantes des protéines sont largement affectées par plusieurs facteurs environnementaux tels que le pH, la force ionique et la présence d'un polysaccharide.

### **1.7.1 Les propriétés d'écoulement**

Les propriétés d'écoulement, ou la viscosité, se définissent comme la résistance à l'écoulement. C'est-à-dire que la viscosité est la résistance d'une solution à une force appliquée. Les propriétés d'écoulement des polysaccharides et des protéines diffèrent à cause de leurs natures moléculaires différentes. Les polysaccharides sont reconnus pour augmenter la viscosité des solutions à de faibles concentrations alors que les protéines de lactosérum la hausse faiblement même à concentrations élevées.

### 1.7.1.1 Les biopolymères individuels

La viscosité d'une solution est directement reliée à la taille moléculaire ou plus précisément au volume hydrodynamique d'une molécule (Clegg, 1995). La viscosité sera donc dictée par les facteurs modelant la taille d'une molécule en solution (Bourne, 2002; Whistler & BeMiller, 1997) soit:

- La conformation
- La flexibilité ou la rigidité
- Le degré d'hydratation
- La présence et le nombre de charges

Les protéines et les polysaccharides diffèrent au niveau structural. Les protéines de lactosérum sont de petites molécules de faible poids moléculaire dont la taille en solution est considérée comme une sphère rigide leur accordant un faible pouvoir viscosifiant. Les polysaccharides pour leur part adoptent plutôt une forme de pelotes flexibles aléatoires favorisant une augmentation de la viscosité des solutions.

La concentration des molécules en solution est un facteur additionnel qui modifie la taille des molécules. Elle affecte également les interactions intermoléculaires. La concentration des molécules en solution se divise principalement en trois régimes : (1) dilué ( $C < C^*$ ); (2) semi-dilué ( $C^* < C < C^\ddagger$ ); (3) concentré ( $C > C^\ddagger$ ) où  $C$ ,  $C^*$  et  $C^\ddagger$  représentent la concentration respectivement de la solution, du début du chevauchement et de l'atteinte de la dimension theta ( $\theta$ ). En solution diluée, les molécules existent sous forme de pelote indépendante et donc en absence d'interactions entre elles. En solution semi-diluée, les pelotes commencent à se chevaucher puis finissent par se contracter. Finalement, en solution concentrée, les pelotes ont atteint leur dimension theta et leur contraction maximum. En augmentant la concentration des molécules en solution, plusieurs particules peuvent interagir simultanément causant une augmentation de la viscosité (Mewis & Macosko, 1994). Sous la concentration critique pour l'obtention d'une solution semi-diluée (Launay et al., 1984; Rochefort & Middleman, 1987; Southwick et al., 1981), l'ajout d'un électrolyte masque les charges portées par un polyélectrolyte causant la diminution du volume hydrodynamique et donc de la viscosité (Pelletier et al., 2001). À une concentration en polyélectrolyte supérieure à  $C^\ddagger$ , la présence de sel provoque des associations intermoléculaires facilitées par la réduction des charges augmentant ainsi la viscosité.

### **1.7.1.2 Les systèmes mixtes P-PS**

Aucune étude systématique de solutions mixtes P-PS n'a été réalisée sur la viscosité induite par les différents régimes de concentration en solides totaux. La littérature recense à la fois des effets synergiques et antagonistes sur la viscosité des solutions mixtes selon les différents régimes de concentration.

En solution diluée, autant une diminution qu'une augmentation de la viscosité ont été rapportées. Une augmentation de viscosité a été observée par Sánchez et al. (1995) suite à la formation d'interactions attractives dans un mélange xanthane-gomme guar–protéines de soya. Ces auteurs suggèrent la formation d'un réseau et donc une augmentation de la taille des particules. Au contraire, la complexation peut favoriser la compaction du polysaccharide causée par la neutralisation de ses charges et par le phénomène de « fixation coopérative » des protéines. Lorsque les interactions protéines-protéines sont favorisées, ces dernières vont interagir avec les protéines complexées au polysaccharide donnant lieu à la fixation coopérative (Tolstoguzov, 1997). La complexation peut aussi réduire le nombre de charges portées par les biopolymères causant une diminution de la viscosité tel que rapportée pour des systèmes protéines-polymère synthétique par des mesures de viscosité réduite (Xia & Dubin, 1994).

Lors de l'augmentation de la concentration, soit en solution concentrée, une séparation de phases produit une augmentation de la viscosité. D'une part, Sanchez et al. (1997) et Bryant & McClements (2000) ont rapporté cette observation pour un système mixte isolat de protéines de lactosérum (WPI)-xanthane en conditions de séparation de phases ségrégatives. D'autre part, en solution concentrée, Weinbreck & Wientjes (2004) rapportent que les coacervats (phase concentrée de protéines et de polysaccharides complexés) de protéines de lactosérum-gomme arabique, produits au pH optimum de complexation (pH 4,0), démontrent une augmentation de la viscosité de 45 fois comparativement au même système mixte à pH 7,0.

## **1.7.2 Propriétés gélifiantes des protéines**

Cette étude porte sur l'effet de l'ajout de polysaccharides et de complexes P-PS sur la formation de gels acides laitiers et de gels de protéines de lactosérum. Cette section traitera

donc des gels de protéines de lactosérum avec incorporation d'un polysaccharide non gélifiant et la section suivante traitera des gels acides laitiers soit des gels de caséines avec incorporation entre autres de protéines, de polysaccharides et de complexes P-PS (*section 1.8*).

La caractérisation des gels suscite de l'intérêt depuis des années. Cependant, aucun auteur ne s'accorde sur une définition d'un gel. Ziegler & Foegeding (1990) définissent un gel comme « un réseau continue structuré de dimension macroscopique retenant la phase liquide et n'exhibant aucun écoulement à l'état statique (*steady-state flow*) ». Les gels se divisent en 4 principales catégories sur une base d'éléments de structure (Horne, 1999) :

1. Les structures lamellaires ordonnées;
2. Les réseaux de polymères covalents;
3. Les réseaux polymériques formés par l'agrégation physique;
4. Les structures désordonnées particulières.

Les classes 1 et 2 se retrouvent plus particulièrement dans les gels synthétiques ou non alimentaires. La classe 3 comprend les gels physiques généralement à base de polysaccharides et de gélatine. Ces gels sont physiquement associés (comparativement aux liaisons chimiques impliquées précédemment) en un réseau (Kavanagh & Ross-Murphy, 1998). Les forces impliquées sont de faible énergie (Coulombique, dipole-dipole, van der Waals, ionique, hydrophobe et ponts hydrogène). Dans la dernière catégorie de gel, le réseau continu est bâti d'amas de particules sphériques agrégées qui s'étend à travers le volume tel le cas des gels acides laitiers. Les gels de protéines de lactosérum entrent dans la quatrième catégorie.

L'intégrité d'un gel résulte d'une balance entre les interactions attractives et répulsives des molécules, ici protéiques alors que le mécanisme de gélification est aussi déterminé par ces dernières et par les interactions protéines-solvant (Totosaus et al., 2002). Le processus de gélification protéique comprend 2 étapes : (1) une dénaturation; (2) une agrégation. La nature des protéines dicte les différents moyens physiques (traitement thermique, hautes pressions) ou chimiques (acidification) d'induire la gélification. Pour les protéines de

lactosérum, les gels induits par un traitement thermique sont les plus fréquemment rencontrés car ils reflètent la réalité de plusieurs produits alimentaires.

### 1.7.2.1 Gels thermiques à base de protéines de lactosérum

Les protéines de lactosérum traitées thermiquement conduisent à 2 types de gels dépendamment du pH et de la force ionique: (1) les gels filamenteux et (2) les gels particulés ou agrégés (Doi, 1993; Foegeding, 2005). Les gels filamenteux sont formés dans des conditions favorisant les répulsions électrostatiques entre protéines. Ces gels sont translucides et présentent une bonne capacité de rétention d'eau (WHC). Les gels particulés sont formés dans des conditions favorisant l'agrégation des protéines. Une structure compacte opaque en découle possédant de piètre qualité de rétention d'eau (*Fig. 1.8*).

L'ajout d'un polysaccharide modifie les caractéristiques des gels de protéines de lactosérum mais le passage de translucide à opaque repose principalement sur le pH et la force ionique lesquels affectent les interactions protéines-protéines et protéines-solvant.

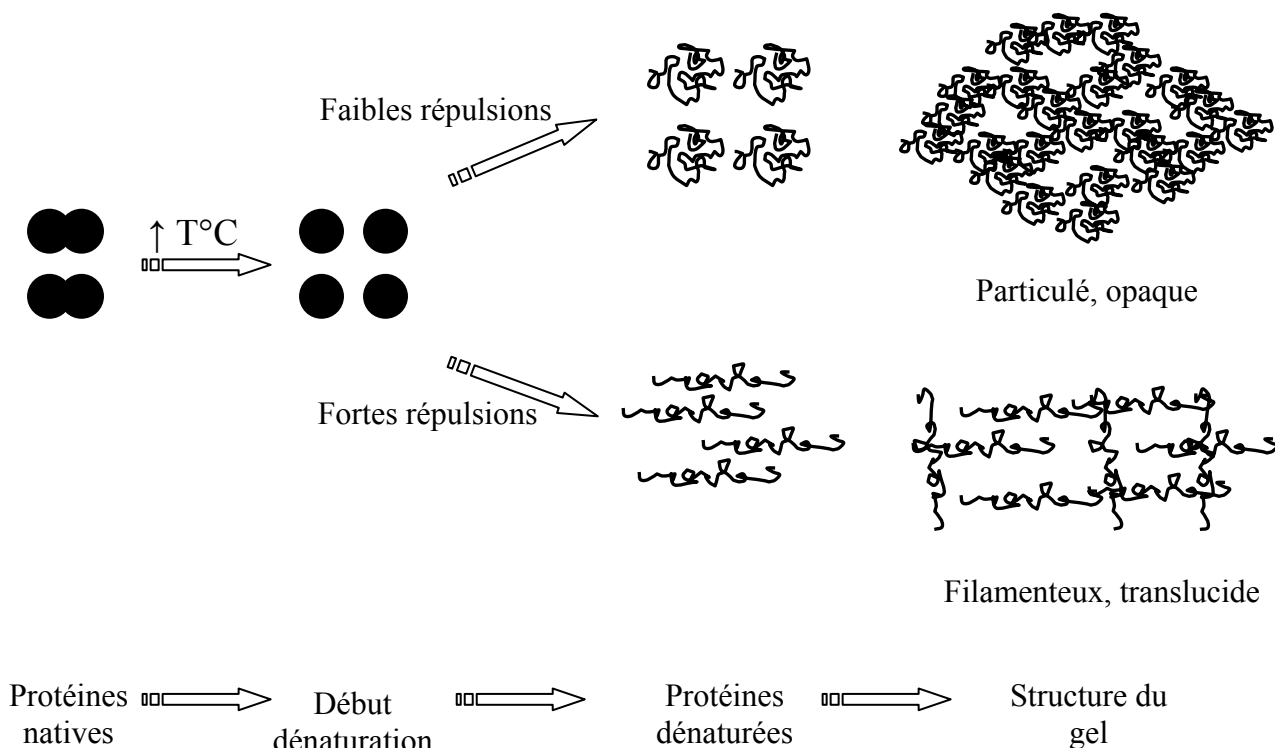


Figure 1.8 Gélification des protéines de lactosérum suite à un traitement thermique (T°C).

Source : Adapté de Foegeding, 2005.

#### *1.7.2.1.1 pH*

Le pH joue un rôle fondamental dans la formation des gels de protéines de lactosérum. Le pH influence la conformation des protéines (voir 1.3.2.2), leur dénaturation (voir 1.3.2.3) et les interactions entre les molécules dû à la présence plus ou moins importante de charges. Les gels filamenteux s'obtiennent à des pH éloignés du  $I_p$  soit à des pH en deçà de 4 et/ou au-delà de 6-7 (Stading et al., 1993). Les gels particulés sont plutôt formés entre pH 4-6 près du  $I_p$ .

#### *1.7.2.1.2 Force ionique*

La nature et la concentration en ions sont deux paramètres distincts modifiant les propriétés gélifiantes des protéines de lactosérum. La présence d'ions monovalents ou divalents diminue les répulsions électrostatiques en masquant les charges. Cette diminution de charge provoque une augmentation de la force des gels jusqu'à une concentration optimale. Cette concentration est beaucoup plus faible dans le cas d'ions bivalents tels que le calcium (10mM) (Mulvihill & Kinsella, 1988) que pour le NaCl (100mM) (Barbut, 1995; Chantrapornchai & McClements, 2002; de Wit et al., 1988; Turgeon & Beaulieu, 2001). Les ions bivalents réticulent les protéines dénaturées alors que les ions monovalents stabilisent la structure native.

#### *1.7.2.1.3 Ajout d'un polysaccharide*

La présence d'un polysaccharide, gélifiant ou non, en mélange avec des protéines modifie la structure et les propriétés de ces nouveaux gels multicomposants. Les gels multicomposants se divisent en deux catégories dépendamment de leur participation ou non au réseau (*Tableau 1.2*). La première catégorie, type I, regroupe les gels avec un agent gélifiant actif qui participe au réseau et un agent inactif qui ne participe pas à la formation de ce dernier. Cette catégorie peut aussi paraître sous le nom de gels inclus (*filled gels*) (Tolstoguzov, 1996). La deuxième catégorie, type II, résulte de la participation active des deux composantes au réseau et se subdivise en trois classes : (1) interpénétrés, (2) couplés et (3) à phases séparées (Brownsey & Morris, 1988). Ces gels sont le résultat respectivement de cosolubilité (interpénétrants), d'interactions attractives (couplés) et d'interactions répulsives (phases séparés).

Tableau 1.2 Catégories de gels multicomposants protéines-polysaccharides reliées au nombre d'agent gélifiant et à l'état des solutions mixtes avant gélification.

Type de gel multicomposants	Nombre d'agent gélifiant*	État de la solution mixte
<b>Type I ou inclus</b>	1	Complexation ou Séparation de phases
<b>Type II</b>		
▪ <b>Interpénétré</b>	2	Cosoluble
▪ <b>Couplé</b>	2	Complexation
▪ <b>Phases séparées</b>	2	Séparation de phases

Source : Brownsey & Morris (1988).

\* Un agent gélifiant est défini comme une molécule « active » qui participe à la formation du réseau mais qui ne possède pas obligatoirement des propriétés gélifiantes en solution pure.

La formation et la caractérisation des gels multicomposants font toujours l'objet de nombreuses études. L'ajout d'un polysaccharide à un gel de protéines produit soit un effet de synergie ou un effet antagoniste sur les propriétés du gel résultant. Des effets antagonistes ont premièrement été identifiés lorsqu'une séparation de phases ségrégative excessive limite l'agrégation protéique ou plus spécifiquement la connexion inter-amas (*inter-cluster*) d'agrégats de protéines (Bertrand & Turgeon, 2007; Sanchez et al., 1997). Ces effets sont aussi identifiés en présence d'interactions attractives lors de la neutralisation des complexes formés (complexes insolubles) (Cai & Arntfield, 1997). La compaction des complexes P-PS suite à une neutralisation des charges et leur insolubilité favorise la formation d'agrégats au détriment de la formation d'un réseau. Ce type de formation de réseau est dénommé « fixation particulière » (*particle binding*). La formation de complexes solubles produit plutôt un effet de synergie. Ces gels gélifient selon le modèle « fixation segmentale en chaîne » (*chain segment binding*) (Cai & Arntfield, 1997). Très peu de gels sont obtenus dans ces conditions. Le polysaccharide permet la réticulation des protéines et donc une augmentation de la densité du réseau. Les effets synergiques en condition de séparation de phases ségrégative proviennent de la concentration en protéines. Finalement, aucune recherche ne rapporte la formation de gels interpénétrés dans le domaine des interactions P-PS.

La formation de gels P-PS est un vaste domaine. De multiples combinaisons de facteurs conduisent à des gels de structure et de caractéristiques diverses. Ces gels sont encore étudiés au niveau fondamental. L'étude de systèmes gélifiant suivant l'incorporation de complexes n'a à ce jour jamais été rapporté dans la littérature. Le gel acide est un bon système modèle pour l'incorporation de complexes solubles. Ce produit contient déjà des protéines et des polysaccharides avant gélification et son comportement rhéologique est sensible aux changements de structure induits par des variations de composition.

### **1.7.2.2 Gels acides laitiers**

#### *1.7.2.2.1 Formation d'un gel acide laitier (gel de caséines)*

Les gels acides laitiers naissent de la formation d'un réseau caséique suite à un traitement thermique et une acidification. En industrie, le traitement thermique est requis afin de permettre une pasteurisation des ingrédients de même que pour améliorer la texture des produits (Varnan & Sutherland, 1994). Un traitement thermique au-dessus de 70°C mène à la dénaturation irréversible de la majorité des protéines de lactosérum (Cayot & Lorient, 1998). Conséquemment, la  $\beta$ -lg subit un changement de conformation et une exposition de ses parties hydrophobes et de ses groupements thiols réactifs. Des ponts disulfures se manifestent entre les protéines du lait comportant des groupements thiol réactifs et plus particulièrement entre la  $\beta$ -lg et la  $\kappa$ -caséine présente à la surface extérieure de la micelle de caséines. Le lait traité thermiquement est un mélange complexe de protéines de lactosérum présentes à l'état natif ou dénaturé et de micelles de caséines dans lequel les agrégats de protéines de lactosérum dénaturées s'associent aux micelles ou apparaissent en tant qu'agrégats indépendants (Vasbinder et al., 2003).

Suite au traitement thermique, l'acidification permet une diminution de pH vers le  $I_p$  (pH 4,6) des caséines (Fox, 2003). Les micelles de caséines perdent leur stabilisation stérique et leur attraction de van der Waals causant ainsi leur floculation. Cependant, la présence de protéines de lactosérum dénaturées liées sur les micelles cause une augmentation du  $I_p$  passant de 4,6 à 5,2 ( $I_p$  des protéines de lactosérum) affectant les propriétés physiques des gels résultants (Vasbinder et al., 2003).



La micelle de caséines subit des changements spécifiques durant l'acidification (Cayot & Lorient, 1998) dont la dissolution du phosphate de calcium colloïdal, la diminution du potentiel zeta conduisant à l'agglomération des micelles (pH 6,7-5,5), la dissociation de tous les monomères de caséine (pH 6,7-4,9) et les interactions attractives entre les micelles due à la disparition de la chevelure stabilisante (pH 5,2-4,6). Ces modifications dépendent de la température.

Le yogourt est un gel acide laitier étant donné que, par définition, c'est un réseau à trois dimensions de brins (*strands*) de caséines agrégées suivant une précipitation isoélectrique induite par des bactéries lactiques. Le yogourt se forme durant une fermentation lente du lactose par des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*) (Lucey, 2002). Ce produit existe sous deux principales formes : brassée et ferme (Varnan & Sutherland, 1994).

Les caractéristiques physiques importantes des yogourts fermes sont des caractéristiques liées à leur texture : la fermeté des gels et l'absence de synérèse (Zoon, 2003).

#### 1.7.2.2.2 *Texture*

La texture est l'un des aspects les plus importants à la fois face à la qualité des aliments mais aussi face à l'acceptation des produits par les consommateurs (Pereira et al., 2003). Szczesniak (2002) rapporte la définition suivante de la texture : « *texture is the sensory and functional manifestation of the structural, mechanical and surface properties of foods detected through the senses of vision, hearing, touch and kinesthetics* ». Due à son caractère sensoriel, la description de la texture ne peut s'effectuer que par l'homme. Quelques paramètres physiques seulement peuvent faire l'objet d'une détection et d'une quantification par les instruments d'analyse. La texture représente un sujet complexe pouvant être étudié à travers des analyses structurales et rhéologiques.

La structure d'un aliment repose sur sa composition chimique (Stanley & Tung, 1976). Des forces physiques prennent place entre les composants. La structure formée est associée aux propriétés physiques desquelles découlent la texture et la caractérisation structurale du matériel (*Fig. 1.9*) (Stanley, 1987). La structure d'un gel est évaluée directement par des

observations microscopiques ou indirectement par la capacité de rétention d'eau (WHC) de la matrice gélifiée (Sodini et al., 2004).

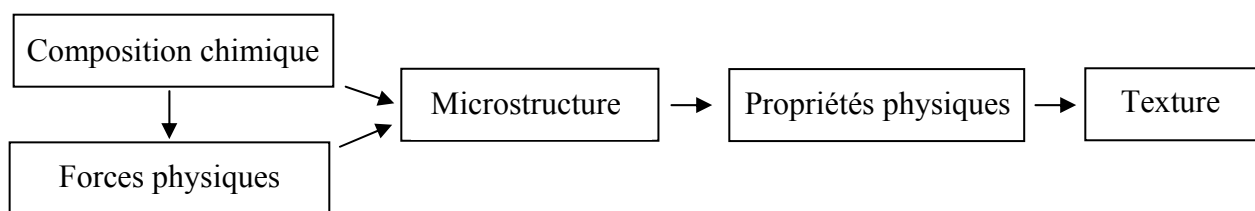


Figure 1.9 Relation entre la texture et la microstructure.

Source : Adapté de Stanley (1987); Stanley & Tung (1976).

La structure tridimensionnelle des gels acides laitiers peut être soumise à des réarrangements et/ou des dommages structuraux due aux forces contractionnelles à l'intérieur du gel (temps ou vieillissement) ou à des forces externes telles celles subies lors du brassage résultant en une séparation du lactosérum. La WHC représente la faculté d'une structure tridimensionnelle (gel) à retenir une phase liquide (lactosérum) (Hermansson, 1986). La WHC fait aussi référence à la synérèse, terme d'usage courant se définissant comme la compaction ou la contraction d'un gel suite à un bris des brins et accompagné d'une expulsion de liquide (Lucey & Singh, 1998; Mellema et al., 2002). Toutes les conditions promouvant l'agrégation protéique favorisent la synérèse et sa vitesse est fortement relié à la taille des pores du gel.

L'analyse de la structure des gels fait aussi appel à la rhéologie qui se définit comme la science de l'écoulement et de la déformation de la matière. La rhéologie étudie la réponse d'un matériel à la force et à la déformation appliquées. Elle se base sur deux principes : la contrainte (force/aire) et la déformation. Les faibles déformations permettent de conserver la structure des gels ainsi que de maintenir le caractère de viscoélasticité linéaire nécessaire à l'application des équations mathématiques en analyse dynamique (Steffe, 1996). Les gels acides laitiers peuvent être caractérisés en rhéologie dynamique entre autres par leur module élastique ou de conservation ( $G'$ ) et leur module visqueux ou de perte ( $G''$ ) (Lucey & Singh, 1998; Sodini et al., 2004). Les mesures à faibles déformations (*small-oscillatory*)

permettent de suivre la formation d'un gel et de détecter la transition entre le comportement liquide et le comportement solide (Figure 1.10). Le paramètre  $G'$  repose sur le degré de réticulation d'un réseau (Clark, 1987; Ross-Murphy, 1995) et peut être relié à la fermeté (stiffness) d'un gel (Lucey, 2001).

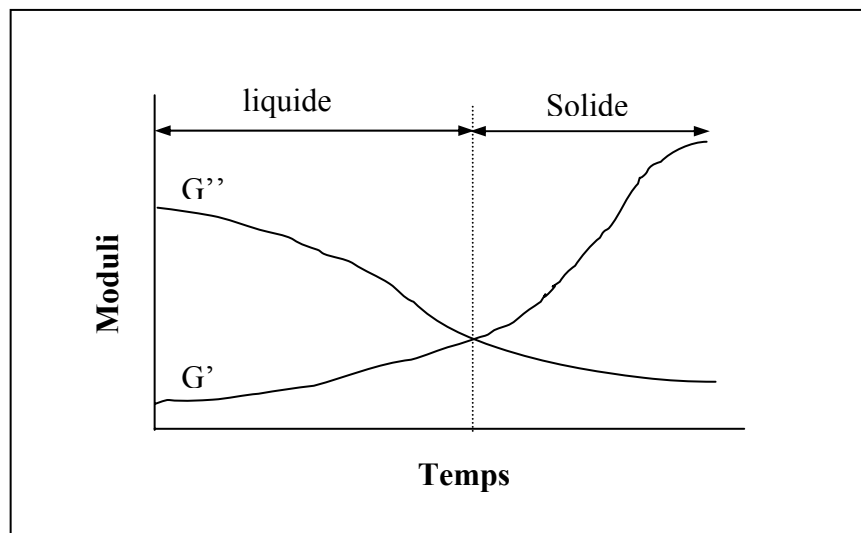


Figure 1.10 Comportement viscoélastique d'un gel en formation.

Source : Adapté de Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas, 2005.

La rhéologie, la microscopie et la mesure de la rétention d'eau rendent possible l'analyse de la texture d'un gel acide laitier. Cette texture s'associe directement aux ingrédients composant le mélange initial préalablement à la gélification.

#### 1.7.2.2.3 Rôle des ingrédients sur la texture des yogourts

Afin d'obtenir la texture et la saveur désirées en plus de répondre aux exigences légales de fabrication du yogourt, un mélange d'ingrédients est requis (Tamine & Robinson, 1999). Le lait s'avère l'ingrédient principal mais des poudres de protéines lactières, des stabilisants (gélatine, gum guar, pectine, carraghénane), des agents sucrants, des colorants, des saveurs, des fruits et des agents de conservation font partie du mélange (Varnan & Sutherland, 1994; Tamine & Robinson, 1999). La formation du yogourt est affectée par la quantité de solides

totaux et par tous les ingrédients ajoutés dans la formulation dont les protéines et les polysaccharides (stabilisants).

#### *1.7.2.2.4 Concentration en solides totaux et en protéines*

Accroître la concentration en solides totaux d'une solution menant à la formation d'un gel acide peut s'effectuer de diverses façons : en concentrant physiquement les solutions (évaporation), par l'ajout d'agents sucrant, de stabilisants ou encore de poudres protéiques telles le lait entier ou écrémé, le concentré de protéines de lactosérum, le babeurre ou les caséines. La concentration en solides totaux de même que la concentration en protéines jouent sur les propriétés physiques des gels acides laitiers. Les contenus en protéines et en solides totaux sont intimement reliés et les recherches modifient rarement ces variables de façon indépendante.

Une augmentation des solides totaux parallèlement à une augmentation en protéine augmente la viscosité apparente, la capacité de rétention d'eau (WHC) et la fermeté des gels. Une augmentation de la viscosité a été rapportée par quelques chercheurs (Rohm & Schmidt, 1993; Wachter-Rodarte et al., 1993). Une recherche par Harwalkar et Kalab (1986) rapporte l'augmentation de la WHC avec l'augmentation de poudre de lait écrémée (SMP) dans la formulation. L'augmentation en solides totaux influence la texture des gels acides en augmentant leur fermeté (Harwalkar & Kalab, 1986). Ces résultats sont tous reliés à une augmentation de la concentration en protéines. L'ajout de caséines hausse le nombre d'interactions possibles entre les particules présentes; de plus petites chaînes de caséines, une diminution de la taille des pores et une augmentation de la densité du réseau sont observées. Amatayakul et al. (2006a), arrivent à la même conclusion suite à l'observation de l'amélioration de la WHC et de la fermeté des gels après avoir contrôlé le contenu en protéines.

Ces résultats impliquent aussi qu'en augmentant la concentration en solides totaux par l'ajout de diverses poudres tirées du lait, les ratios protéines/solides totaux et protéines de lactosérum/caséines sont affectés. La capacité de rétention d'eau d'un gel à base de poudre de lait écrémé est accrue par une augmentation du ratio protéines/solides totaux (Aguilera & Kessler, 1989; Cheng et al., 2000, Amatayakul et al., 2006a) et du ratio protéines de

lactorésum/caséines (Guinee et al., 1995; Guzmán-González et al., 1999; Guzmán-González et al., 2000). La fermeté des gels acides est aussi influencée par ces différents ratios. L'augmentation du ratio protéines/solides totaux accroît leur fermeté (Cheng et al., 2000; Lankes et al., 1998; Savello & Dargan, 1995) alors que les effets du ratio protéines de lactosérum/caséines dépendraient de la source de protéines ajoutées. Aguilera & Kessler (1989) concluent à une augmentation de la fermeté d'un gel de SMP et de concentré de protéines de lactosérum (ratios protéines de lactorésum/caséine de 2,6 et protéines/solides totaux de 0,52). D'un autre côté, Tamime et al. (1984) rapportent que pour un ratio protéines/solides totaux de 0,35-0,42, un gel enrichi en caséinate de sodium (protéines de lactosérum/caséines = 0,22) présente une fermeté plus élevée qu'un gel de SMP (protéines de lactosérum/caséine = 0,30) et ce, même avec une concentration en solides totaux plus faible pour le gel de caséinate de sodium. Ces derniers expliquent leurs résultats par une différence de microstructure. Le gel de SMP présente la structure la plus dense composée de courtes chaînes de micelles et de petits agglomérats micellaires (*micellar clusters*). Le gel de caséinate de sodium présentait une structure plus ouverte composée de robustes chaînes de particules de caséines et de larges agglomérats et était dépourvu de pointes (*spikes*) notables sur la surface des micelles de caséines. Selon Cho et al. (1999), le caséinate de sodium a la faculté de s'adsorber à la surface des membranes des globules de gras et de favoriser leur agrégation près du  $I_p$  des caséines de même que leur incorporation dans la matrice. En augmentant la concentration en protéines de lactosérum, plusieurs recherches démontrent que des protéines de lactosérum dénaturées agissent comme d'importants agents réticulants envers les micelles de caséines et les globules de gras, améliorant la texture suite à l'augmentation de la viscosité complexe (Cho et al., 1999).

Un ratio protéines/solides totaux élevé a un effet positif sur les WHC et les propriétés viscoélastiques des yogourts. Cependant, une texture granuleuse se développe. D'un autre côté, le ratio protéines de lactosérum/caséine présente un portrait ambigu dû à son interaction avec d'autres paramètres (solides totaux, concentration en protéines, traitement thermique). Des effets positifs et négatifs sont observés sur la texture des gels. Les études sont difficiles à comparer mais font ressortir l'existence d'un ratio protéines de lactosérum/caséines optimal face aux propriétés physiques du yogourt. Finalement, la saveur engendrée par l'ajout de poudres protéiques limite leur utilisation (Tamime &

Robinson, 1999). Un maximum de 3-4% de poudre de lait est recommandé alors que ce maximum varie de 1-2% pour les protéines de lactosérum.

#### *1.7.2.2.5 Polysaccharides*

Une grande variété d'agents stabilisants est utilisée dans la fabrication du yogourt dont les polysaccharides. Le choix d'un polysaccharide repose sur les fonctionnalités recherchées, sur la législation tout en prenant en considération les effets indésirables tels le goût et les arômes laissés dans le produit (Tamime & Robinson, 1999). Dépendamment de sa concentration et de ses propriétés fonctionnelles, un polysaccharide peut mener à la gélification ou à l'augmentation de la viscosité permettant ainsi de limiter la synérèse, de créer une texture soyeuse et d'améliorer la structure du gel (Sodini et al., 2004).

L'amélioration de la texture trouve ses explications dans l'observation de la structure des gels engendrés par l'incorporation de polysaccharides. La microstructure des yogourts diffère dépendamment de la nature gélifiante ou viscosifiante du polysaccharide ajouté et de sa concentration (Kalab et al., 1975; Sanchez et al., 2000). Les polysaccharides gélifiants donnent naissance à un réseau secondaire alors que les polysaccharides viscosifiants modifient le réseau primaire de caséines. Sanchez et al. (2000) attribuent ces résultats à la présence d'une séparation de phases ségrégative due aux interactions répulsives entre les polysaccharides et les caséines dans le cas des polysaccharides viscosifiants. La formation d'un réseau secondaire limiterait cette séparation de phases ségrégative. La microstructure serait un équilibre entre la séparation de phases ségrégative, l'agrégation/gélification des caséines et possiblement les interactions non spécifiques entre polysaccharides et caséines. La carraghénane est un cas particulier d'interactions avec la  $\kappa$ -caséine. Une recherche récente démontre que ce polysaccharide se complexe à la protéine pour augmenter la fermeté des gels couplés résultant (Arltoft et al., 2007).

Le yogourt est un bel exemple de produit dont les caractéristiques physiques sont affectées par les interactions protéines-polysaccharides.

## Chapitre 2 But, hypothèse et objectifs

Les propriétés fonctionnelles occupent une place cruciale dans le monde alimentaire. Les propriétés fonctionnelles des protéines et des polysaccharides sont souvent très bien caractérisées ce qui n'est pas le cas pour leurs propriétés en mélange. Ce travail vise à améliorer la compréhension des fonctionnalités des systèmes mixtes P-PS en conditions de formation de complexes solubles.

Suite à la mise à jour des connaissances sur le sujet, l'hypothèse suivante a été élaborée :

*« Le contrôle de paramètres extrinsèques (pH, concentration en solides totaux et ratio P-PS) permet la formation de complexes solubles protéines-polysaccharides lesquels bonifient les propriétés fonctionnelles des biopolymères pris individuellement. »*

Afin de vérifier l'hypothèse, les objectifs sont :

1. De déterminer les caractéristiques rhéologiques et structurales d'un gel protéique additionné d'un polysaccharide en conditions de formation de complexes solubles et d'étudier l'effet du pH et du ratio protéines-polysaccharide sur la structure gélifiée.
2. D'établir des conditions pour la formation de solutions mixtes protéines-polysaccharides permettant la formation de complexes solubles en variant le pH, le ratio protéines-polysaccharide et la concentration en solides totaux.
3. D'étudier les propriétés d'écoulement en solutions diluées et concentrées des solutions mixtes aux conditions établies à l'objectif 2.
4. D'étudier les caractéristiques rhéologiques, structurales et de rétention d'eau d'un gel acide laitier auquel a été ajouté un complexe soluble isolat de protéines de lactosérum-pectine stabilisé.

Les résultats de l'objectif 1 sont rapportés dans le chapitre suivant, soit le chapitre 3. Le chapitre 4 est consacré aux résultats de l'objectif 2 et 3 et finalement, les résultats de l'objectif 4 sont présentés au chapitre 5.

### Volet 1

Le xanthane est un polysaccharide de haut poids moléculaire. De très faibles concentrations sont nécessaires pour conduire à une complexation avec les protéines de lactosérum. Dans un premier volet, les propriétés d'un gel thermique protéique sont étudiées suite à l'ajout de xanthane afin de déterminer l'impact des interactions protéines-polysaccharides sur un gel d'isolat de protéines de lactosérum.

Le premier objectif est donc de :

*« Déterminer les caractéristiques rhéologiques et structurales d'un gel protéique additionné d'un polysaccharide en conditions de formation de complexes solubles et étudier l'effet du pH et du ratio protéines-polysaccharides sur la structure gélifiée. »*



## **Chapitre 3 Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum**

**Marie-Eve Bertrand, Sylvie L. Turgeon**

Centre de recherche en sciences et technologie du lait STELA, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec, Qc., GIK 7P4, Canada.

Article publié dans « *Food Hydrocolloids* », 21 (2007) 159-166.

### 3.1 Résumé

Les effets du pH (6,5, 6,0 et 5,5), de la concentration de xanthane (0,01, 0,03, 0,06% v/v) et de la présence de NaCl (100 et 500mM) sur la formation d'un gel d'isolat de protéines de lactosérum-xanthane ont été étudiés dans le but d'obtenir un effet synergique. La rhéologie dynamique à faible déformation a été appliquée à une fréquence de 1 Hz, une déformation de 0,5% et une augmentation graduelle de la température pour suivre la formation du gel. Les modules élastiques ( $G'$ ) à la fin de la gélification ont été comparés. La microscopie confocale à balayage laser a permis de visualiser la microstructure. Un effet de synergie sur la force du gel a été observé à pH 6,5 et 6,0 pour toutes les concentrations en xanthane. À ces pH, une séparation de phases a été constatée entre les protéines de lactosérum dénaturées et le xanthane suite au traitement thermique. Les protéines de lactosérum étaient concentrées dans une phase et conséquemment, les gels mixtes étaient plus fermes que les gels d'isolat de protéines de lactosérum. D'un autre côté, un effet antagoniste a été observé à pH 5,5 pour toutes les concentrations en xanthane. L'addition de sel a démontré à la fois un effet de synergie et un effet antagoniste dépendamment de la combinaison pH-sel menant à différentes microstructures de gels. De petits changements dans la formulation du mélange peuvent résulter en un système instable. Une meilleure connaissance de la microstructure de ces systèmes et du type de gels mixtes obtenus sous différentes conditions (pH, force ionique, etc.) permettra une utilisation optimale des systèmes mixtes protéines-polysaccharides dans les formulations alimentaires.

### **3.2 Abstract**

The effect of pH (6.5, 6.0 and 5.5), concentration of xanthan gum (0.01, 0.03 and 0.06% v/v) and presence of NaCl (100 and 500mM) on the formation of whey protein isolate (WPI)-xanthan gum gels was studied in the hope of obtaining a synergistic effect. Small-deformation oscillatory measurements were performed at a frequency of 1Hz, a strain of 0.5%, and a gradually increasing temperature, to follow gel formation. The elastic modulus ( $G'$ ) values at the end of the gelling test were compared. Confocal microscopy allowed visual examination of the microstructure. A synergistic effect on the gel strength was observed at pH 6.5 and 6.0 for all concentrations of xanthan gum added. At these pH values, phase separation was also observed between the denatured whey proteins and the xanthan gum when heat was applied. Whey proteins were concentrated in their phase, and consequently mixed gels were stiffer than WPI gels. On the other hand, an antagonist effect was observed at pH 5.5 for all concentrations of xanthan gum added. The addition of salt demonstrated both a synergistic and an antagonist effect depending on the pH and salt combination, which would lead to different gel microstructures. Small changes in mixture formulation can result in unstable systems. A better knowledge of the microstructure of these systems and of the type of mixed gels obtained under different conditions (pH, ionic strength, etc.) will allow for a more optimal use of mixed protein-polysaccharide systems in food formulation.

**Keywords:** Mixed gels; Rheology; Confocal microscopy

### 3.3 Introduction

Food products are complex systems in which texture is mainly dictated by the presence of proteins and polysaccharides. Functional properties of individual components are well-known. However, the functional behavior of mixed protein-polysaccharide systems is still little known (Dickinson & McClements, 1996). Among the various functional properties of proteins and polysaccharides, gelling is one commonly exploited by the food industry. Mixed gels are obtained from solutions of biopolymers, which are either complex (intermolecular attraction) or incompatible (intermolecular repulsion). The macromolecular distribution in solution leads to either antagonist or synergistic effects on the formation of these mixed gels. Improved gelling properties have been reported following both types of interactions (Cai & Arntfield, 1997; Ganz, 1974; Ould Eleya & Turgeon, 2000; Sanchez et al., 1997; Shim & Mulvaney, 2001; Smith et al., 1962; Wang & Qvist, 2000). Protein-polysaccharide interactions are mainly electrostatic in nature and rely greatly on pH, ionic strength (Girard et al., 2002a; Ledward, 1994; Weinbreck et al., 2003a) and protein-polysaccharide ratio (Turgeon et al., 2003).

Whey proteins have been chosen because they have been studied extensively; they are well-known and have excellent functional properties (de Wit, 1998; Kinsella & Whitehead, 1989). Whey proteins represent 20% of total milk proteins and are composed of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) (~50%),  $\alpha$ -lactalbumin (~20%), serum albumin (BSA), immunoglobulin and minor proteins in addition to lactose and minerals (de Wit, 1989). Being the main constituent of whey protein,  $\beta$ -lactoglobulin dictates its functional properties (Ziegler & Foegeding, 1990).

The compact three-dimensional structure of  $\beta$ -lg contains amino acid hydrophobic lateral chains on the inside while polar lateral chains are located on the outside of the structure. Gelation of  $\beta$ -lg is the result of a thermal treatment applied to the solution which provokes partial unfolding exposing hydrophobic amino acid groups leading to aggregation of proteins partially or completely denatured (Totosaus et al., 2002).

Xanthan is an anionic bacterial polysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* whose molecular weight exceeds  $10^6$  Da. Its primary structure is a cellulose backbone. It is composed of three saccharides (D-glucose, D-mannose and D-gluconate) in addition to acetyl and pyruvate groups (Stokke et al., 1998; McNeely & Kang, 1973). Xanthan in solution behaves as a pseudoplastic polymer and can only form a gel by two means: through interactions with other polysaccharides, such as galactomannans, and by cross-linkages in the presence of metallic ions (Stokke et al., 1998). The molecular structure of xanthan by itself prohibits gel formation (Kang & Pettitt, 1992).

Certain systems such as WPI-acacia gum,  $\beta$ -lg-pectin and  $\beta$ -lg-carrageenan have been studied more extensively over the past years as compared to WPI-xanthan gum systems. Laneuville et al. (2000) have studied  $\beta$ -lg-xanthan complexes size in solution. Sanchez et al. (1997) looked at the rheological properties using large deformation of WPI-xanthan systems and found a synergistic effect at a  $\text{pH} \geq 7$ , and an antagonist effect at a  $\text{pH} \leq 6.5$ . Both phenomena were related to phase separation. Bryant and McClements (2000) also found a synergistic effect, but on a heat-denatured-whey protein-xanthan gum system after cold gelation. Finally, Zasytkin et al. (1996) observed an antagonist effect of xanthan addition on  $\beta$ -lg gel formation for a protein concentration higher than 10% w/w. In this paper, the effect of addition of very low concentration of xanthan ( $\leq 0.06\%$ ) on WPI gels has been studied using small deformation measurements. The effect of pH and salt concentration on the type of systems and their microstructure are presented.

## **3.4 Materials and methods**

### **3.4.1 Material**

Whey protein isolate (BIPRO<sup>TM</sup>) was purchased from Davisco Foods Intl. Inc., MN, US. It is composed of 85.4% w/w protein, 4.76 mg/g of sodium, 0.87 mg/g of potassium and 0.67 mg/g of calcium. Xanthan gum (Keltrol F) was purchased from Kelco Co. San Diego, Ca, US. It is composed of 96% sugar and 4.02% protein. Its molecular weight is  $26.3 \times 10^6$  Da (Lagoueyte & Paquin, 1998). All other chemicals used are analytical grade (ACS, Fisher Scientific, US).

### **3.4.1.1 Preparation of solutions**

Solutions of 16% (w/v) WPI powder were prepared using deionised water, agitated for 2 hours at room temperature and refrigerated overnight for a complete hydration. Centrifugation of the WPI solution (pH 7.4) (Sorval, DuPont, Wilmington, Delaware, U.S.) was performed at 19 679 g for 30 minutes to eliminate insoluble particles before use. About 2.0% proteins were lost after centrifugation. Xanthan was dissolved in deionised water at room temperature under vigorous agitation. Mixed solutions were obtained by adding xanthan solution (final solid concentrations 0.01, 0.03 and 0.06%) to WPI solution (final solid concentration 12.5%). For solutions containing sodium chloride (0.1 and 0.5M) the salt was added to the WPI solution before incorporation of xanthan. Only one final concentration of added xanthan (0.03%) was investigated with the presence of salt. Acidification to pH 6.5, 6.0 and 5.5 was performed using hydrochloric acid 0.5 and 0.1N. Fibrous complexes of WPI-xanthan tended to appear after drops of HCl were added. Mixed solutions were left under vigorous agitation, before each addition of HCl drop, until the fibrous complexes were no longer visible. Solutions were ready to be analysed when no visible fibrous complexes were present at the desired pH. Pure WPI (12.5%) and xanthan (0.01, 0.03 and 0.06%) solutions were made for individual analysis as control.

## **3.4.2 Methods**

### **3.4.2.1 Dynamic oscillatory measurements**

A controlled-strain rheometer (ARES 100 FRT, Rheometric Scientific, Piscataway, NJ, USA) was used to perform small-deformation oscillatory measurements at a frequency of 1Hz and a strain of 0.5% with the plate-plate geometry (25mm). Couette geometry with a cup (33.93 mm diameter) and a bob system (32.05 mm diameter, 33.29 mm length) had to be used for WPI-xanthan 0.01% pH 6.5 due to the variability of the gel strength with the plate-plate geometry. Solutions were directly poured onto the geometry at room temperature (21°C). Samples were covered with castor oil (Laboratoire MAT, MTL, Canada) to avoid evaporation during measurements. Solutions were heated to 85°C and held at this temperature for 30 min, followed by a cooling to 21°C where the gels were kept for 30 minutes. Heating and cooling were performed at a rate of 1.5°C/min. Solutions were degassed before being analysed. Each data is a mean value of at least triplicate values.

Gelling time was determined by rheological measurements and associated to the first value of  $\tan \delta$  lower than 1.

#### **3.4.2.2 Confocal laser scanning microscope (CLSM)**

The CLSM (Jena, Germany) consists of a Carl Zeiss LSM 310. Argon laser was the light source with emission maxima of 488 and 514 nm. Solutions were poured in a 5 ml tube and the same ramp temperature as for the determination of the  $G'$  value was applied. Gels were cut and proteins stained with a 0.03% (w/v) Fast Green FCF (Sigma, Saint-Louis, Mo, USA) solution before microscopic observation. Excitation was performed at 514 nm and emission was recorded above 590 nm.

### **3.5 Results and discussion**

#### **3.5.1 Gelation of whey proteins**

##### **3.5.1.1 Effect of pH**

Rheological properties of whey protein gels were mainly influenced by pH. Gel properties rely on pH by affecting the net charge carried by the protein (Tang et al., 1995). Results demonstrate that the elastic modulus increases as the pH decreases between 5.5-6.5 (Fig. 3.1). Results are in agreement with Stading et al. (1993) who came to the same conclusion for  $\beta$ -lg gels (pH 6.5-5.58). The balance between protein-protein and protein-solvent interactions dictates the microstructure and consequently the  $G'$  (Stading et al., 1993). Near the isoelectric point ( $I_p$ ), there will be an excess of protein-protein interactions and as the pH is increased above the  $I_p$ , protein-solvent interactions increase. McGuffey & Foegeding (2001) reported a maximum shear stress at fracture at pH 5.5 and related it to an optimal balance between protein-protein and protein-solvent interactions.

Resulting gels can be either particulate, between pH 4-6, or fine-stranded, under or above the previous pH values (Stading et al., 1993). Particulate gels present a high storage modulus because of the thick strands of aggregates formed (Stading et al., 1993) compared to fine-stranded gels composed of ordered linear polymers where aggregation is limited by the repulsive electrostatic forces (Barbut, 1995; Doi, 1993). The microstructure of the

aggregated gel can be seen at pH 5.5 (Fig. 3.2(C)) where proteins form aggregates which interact to form the gel matrix. At pH 6.5 and 6.0, in absence of salt (Fig. 3.2(A, B)), the microstructure could not be seen as the fine-stranded structure is optically transparent (Chantrapornchai & McClements, 2002).

### **3.5.1.2 Effect of salt**

Gelation and texture properties of WPI gels are greatly influenced by the concentration of NaCl present in solution (Ju & Kilara, 1998). Addition of 0.1 and 0.5M NaCl increased the elastic modulus of WPI gels at pH 6.5 and 6.0 compared to the WPI gels without salt (Table 3.1). The elastic modulus with 0.1M of NaCl was higher than with 0.5M. Many publications report a maximum gel strength in the presence of about 0.1M of NaCl (Barbut, 1995; Chantrapornchai & McClements, 2002; de Wit et al., 1988; Turgeon & Beaulieu, 2001). These results can be explained by the screening of the negative charges carried by proteins, which allowed for an increase in protein-protein interactions. At NaCl concentrations higher than 0.2M, Chantrapornchai & McClements (2002) found a decrease in  $G'$  that they attributed to either an increase in particle size or to a decrease in the number of protein-protein contact. Microscopic observations (Fig. 3.2(M-O vs G-I)) also showed protein particulate domains that are less dense or compact with 0.5M of salt compared with gels with 0.1M NaCl.

### **3.5.2 WPI gels following incorporation of xanthan**

Proteins and ionic polysaccharides both possess charge densities, which are related to their composition in, respectively, amino acid (Kinsella et al., 1989) and uronic acid and pyruvate groups (Whistler & BeMiller, 1997). Moreover, this function relies on pH (de Kruif et al., 2004) and ionic strength (Weinbreck et al., 2003a). In solution, mixtures of macromolecules present different organizations: complexation, co-solubility or phase separation (Tolstoguzov, 1991). Because protein-polysaccharide interactions are mainly based on electrostatic interactions, pH is a key factor in their organisation. Proteins carry a net positive charge below their isoelectric ( $I_p$ ) point and form complexes with anionic polysaccharides as xanthan. Above their  $I_p$ , the net negative charge leads to phase



separation. However, the presence of positive patches on the protein above the  $I_p$  allows complexation to take place with anionic polysaccharides (Schmitt et al., 1998).

### 3.5.2.1 Effect of xanthan addition and pH

Xanthan concentration and pH have both a synergistic and an antagonist effect on the formation of whey protein isolate gel depending on the conditions. Xanthan solutions resulted in a low elastic modulus (maximum of 3.4 Pa) over all pH and salt conditions. Incorporation of xanthan at all concentrations tested led to synergistic effects at pH 6.5 and 6.0 (Fig. 3.1). The elastic modulus of WPI gel increased with the increase of xanthan concentration added. The synergistic effect is more important at pH 6.5 than at pH 6.0. Figure 3.3 compares the ratios of elastic moduli of mixed gels over the elastic moduli of WPI gels. Addition of 0.06% of xanthan increased the  $G'$  of WPI by 2-fold at pH 6.0, whereas at pH 6.5,  $G'$  increased by nearly 4-fold. The opposite was observed at pH 5.5. Addition of xanthan decreased the elastic modulus of WPI gels, which was about 60% less (ratio of 0.4) with 0.06% of xanthan.

At pH 6.5, the increase in elastic modulus can be attributed to a segregative phase separation. The microstructures show darker zones that could be a result of liquid inclusions that are rich in xanthan (Fig. 3.2(D)). This affirmation can also be supported by the decrease in the gelling time observed (Fig. 3.4) for all concentrations of xanthan added to WPI. At this pH, Olsson et al. (2002) and Tavares & Lopes da Silva (2003) observed the same phenomena for their mixed gels of, respectively,  $\beta$ -lg-amylopectin and galactomannan-whey protein gels. Protein denaturation and aggregation, after heating, increases incompatibility with xanthan, as depicted by the second principle of thermodynamics (Tolstoguzov, 1991), by increasing its molecular volume or size (Tolstoguzov, 1997; Syrbe et al., 1995). Phase separation concentrates protein leading to an increased  $G'$ . This result is in agreement with Sanchez et al. (1997) who found a synergy in WPI-xanthan gel at  $\text{pH} \geq 7$  and for xanthan concentrations of 0.05 and 0.1 %w/w. However, this type of behaviour is found at lower xanthan concentration (0.01%).

At pH 6.0, segregative phase separation can also be observed with a microstructure with a continuous phase of protein with inclusions of xanthan (Fig. 3.2(E)). Plucknett et al. (2001)

reported the same microstructure for phase separated gels of gelatin-maltodextrin and gelatin-agarose. Phase separation is more pronounced at pH 6.5 than at pH 6.0 because of the higher net negative charge carried by the protein, as the pH is higher than the  $I_p$ . Gel formation is significantly faster for mixed solutions at pH 6.5 compared to WPI at the same pH. WPI gel is formed within 75 minutes at pH 6.5 (Fig. 3.4) while 55 minutes is required to gel mixed solutions. At pH 6.0, no significant difference is seen between mixed solutions and WPI as they both gel within 45 minutes.

Around pH 6.0, near  $pH_c$  (pH at which begins the formation of soluble complexes), formation of electrostatic soluble complexes between WPI and xanthan could decrease the effect of segregative phase separation. However, phase separation is still predominant in the gel behaviour (Fig. 3.2(E)). Weinbreck et al. (2003a) determined a  $pH_c$  of  $\sim 6.0$  for a mixed solution of whey protein-exopolysaccharide B40 while Girard et al. (2002a) found the same  $pH_c$  for  $\beta$ -lactoglobulin-low methoxyl pectin solution. Laneuville et al. (2005) found a  $pH_c$  of around 5.75 for a mixed solution of WPI-xanthan. This  $pH_c$  is independent of the protein-polysaccharide ratio (Laneuville et al., 2005; Girard et al., 2002a). Interaction would take place between a single protein molecule and one polysaccharide chain (Mattison et al., 1995). However,  $pH_c$  depends on ionic strength, charge density of polyelectrolyte and protein isoelectric point (Mattison et al., 1995). Considering the multiple factors affecting  $pH_c$ , the WPI-xanthan solution at pH 6.0 could be at the limit of complexation/phase separation behaviour explaining the lack of difference in the time of gelation between the mixed solution and the control (Fig. 3.4).

At pH 5.5, interactions between WPI-xanthan are assumed to be present and more important than at pH 6.0 as the pH is lower than  $pH_c$  (Laneuville et al., 2005). The formation of soluble complexes near the  $I_p$  of  $\beta$ -lg ( $\sim 5.2$ - $5.3$ ) was demonstrated by de Vries (2004). The positive patches present on the protein structure are heterogeneously distributed allowing complexation at pH value higher than the  $I_p$ . The formation of WPI-xanthan complexes could decrease the possible protein-protein interaction. Larger aggregates are however observed (Fig. 3.2(F)) suggesting that segregative phase separation takes over complexation in the gel behaviour. Zasytkin et al. (1996) also observed, by scanning electron microscopy, an increased in the aggregates size promoted by xanthan

addition (9.7 and 14.5%w/w  $\beta$ -lg, 0.9% w/w xanthan, pH 6.85-7.0). The high protein-polysaccharide ratios will leave an excess of protein in solution after complexation favouring interactions among them as the pH approaches the  $I_p$ . In this case, protein gel is weakened by reducing the connection between clusters and/or aggregates (Olsson et al., 2002) as observed in the microstructures (Fig. 3.2(F vs C)). The gelling time does not decrease at this pH for mixture as compared with WPI gels.

Higher  $G'$  values are observed as the concentration of xanthan increases under phase separation conditions (pH 6.5 and 6.0) (Fig. 3.1). The opposite is also observed:  $G'$  decreases as the concentration of xanthan increases suggesting the presence of more complexes and increasing associative phase separation. The higher the xanthan concentration, the more important is the complexation and/or phase separation phenomenon present in mixed solutions. In the same order, the lower the pH, the lower the elastic modulus caused by the decreasing phase separation.

### **3.5.2.2 Effect of salt**

Presence of NaCl in solution before gelling affected the formation of mixed gels (Table 3.1). The addition of 0.1M of NaCl increased  $G'$  at pH 6.5 and 6.0 but decreased  $G'$  at pH 5.5. For 0.5M of NaCl, only pH 6.5 presents an increased  $G'$  while pH 6.0 and 5.5 show a  $G'$  value lower than the  $G'$  of WPI (Table 3.1). For systems with higher  $G'$  values with additional salt, the microstructure show a dense protein matrix with larger phase separated xanthan zones (Fig. 3.2(D, J, P and E, K)). If the total charge on protein is dictated by the pH of solutions, the degree of interactions among the charges is dictated by the ionic strength (Dill, 1990). Incorporation of salt in a mixed protein-polysaccharide solution screens the charges present on the biopolymers and consequently reduces their electrostatic interactions (Weinbreck et al., 2003a). In other words, segregative phase separation is favored by the addition of salt and was visible in mixed solutions after centrifugation (result not shown) where the presence of two liquid layers could be observed.

The same phenomenon appears at pH 6.0 with 0.5M NaCl (Fig. 3.2(Q)). The presence of salt combined with a decreasing pH will increase segregative phase separation (Dumay et al., 1999). Protein-protein interactions are favoured as pH gets closer to  $I_p$  and with

addition of salt. At pH 5.5, larger aggregates loosely connected to each other appear with the addition of salt weakening the gel structure and thus  $G'$  (Fig. 3.2(L, R)). The lack of interactions between protein clusters is amplified by the presence of xanthan and addition of NaCl, as pH decreases. The microstructure changes from a continuous system to a loosely connected protein aggregates matrix (Fig. 3.2(J and L, P and R)). At pH 5.5, with addition of salt, there is probably no protein-polysaccharide complexes. A correlation between pore size and the reduction of gel strength for WPI gel in the presence of sodium has been assumed before (Barbut, 1995). Factors increasing phase separation as a decreasing pH and an increasing salt concentration, will lead, to different degrees, to an increasing lack of protein-protein and aggregates interactions and an increased pore size, which will affect gel structure and their rheological properties.

### **3.6 Conclusion**

WPI gels can be improved by addition of xanthan. Xanthan has a significant effect at concentration as low as 0.01%. The impacts on the microstructure and rheological properties of the gel formation depend on pH and NaCl concentration. The balance between complexes formation and segregative phase separation in mixed systems lead to either a synergistic or an antagonist effect. A synergy is observed for gels where the protein structure is reinforced by segregative phase separation. However, an antagonist effect is obtained for gels where phase separation leads to a lack of protein cluster contact combined to a lack of protein-protein interactions caused by either protein-polysaccharide complex formation or excessive phase separation in the presence of salt. Further investigation on the localization of xanthan in the gel matrix would eliminate all assumptions on the complex formation. A great challenge remains to visualize both protein and polysaccharide at the same time without affecting any of the gel's characteristics such as the elastic modulus.

### **3.7 Acknowledgements**

NSERC is acknowledged for its financial support on the protein/polysaccharide study along with Anne-Françoise Allain and Yolande Kougioumoutsakis for their technical support.

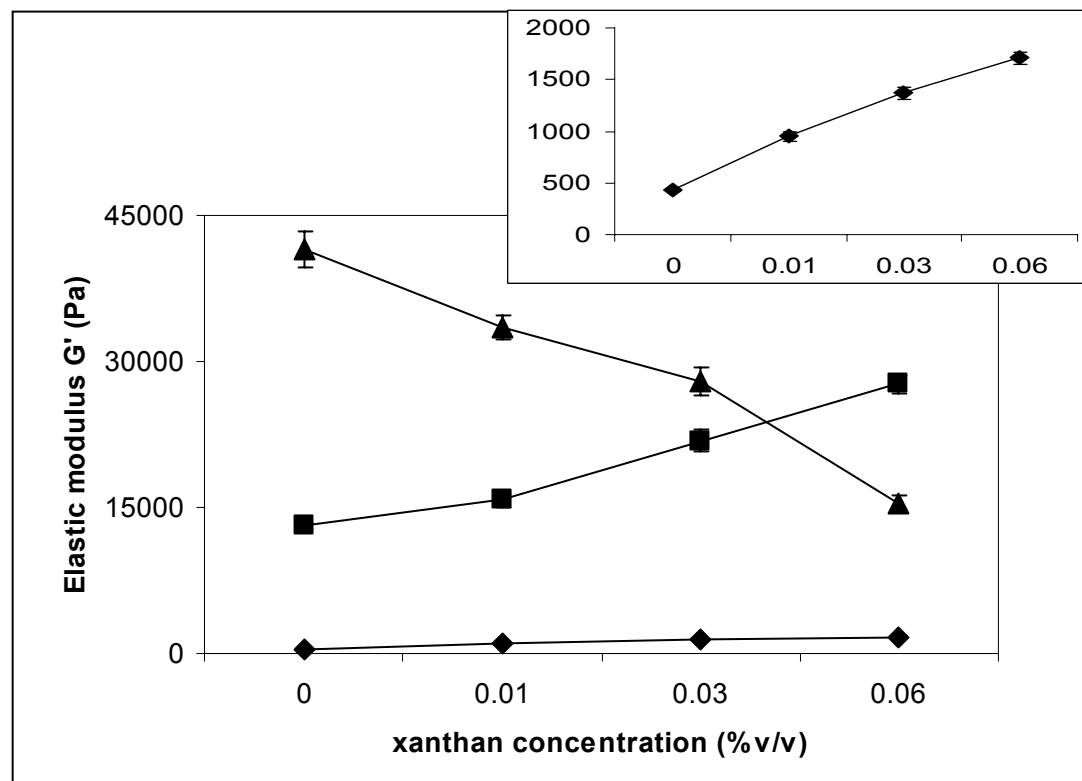


Figure 3.1 Elastic modulus ( $G'$ ) of gels as a function of increasing xanthan concentration mixed with 12.5% (v/v) WPI. The result of gels at pH 6.5 is outline with the enlargement of the graph curve.  $\blacklozenge$  pH 6.5,  $\blacksquare$  pH 6.0,  $\blacktriangle$  pH 5.5.

Table 3.1 Elastic modulus ( $G'$ ) of the solutions analysed with addition of NaCl (whey protein isolate is present at a concentration of 12.5% v/v).

pH	Solution	0.1M NaCl		0.5M NaCl	
		Mean Pa	SD	Mean Pa	SD
6.5	WPI	84 980	4633	30 523	782
	WPI-X 0.03%	105 385	5120	82 532	1251
6.0	WPI	51 728	2848	26 543	802
	WPI-X 0.03%	153 687	7132	18 160	143
5.5	WPI	33 156	842	15 252	1309
	WPI-X 0.03%	17 336	610	11 431	660

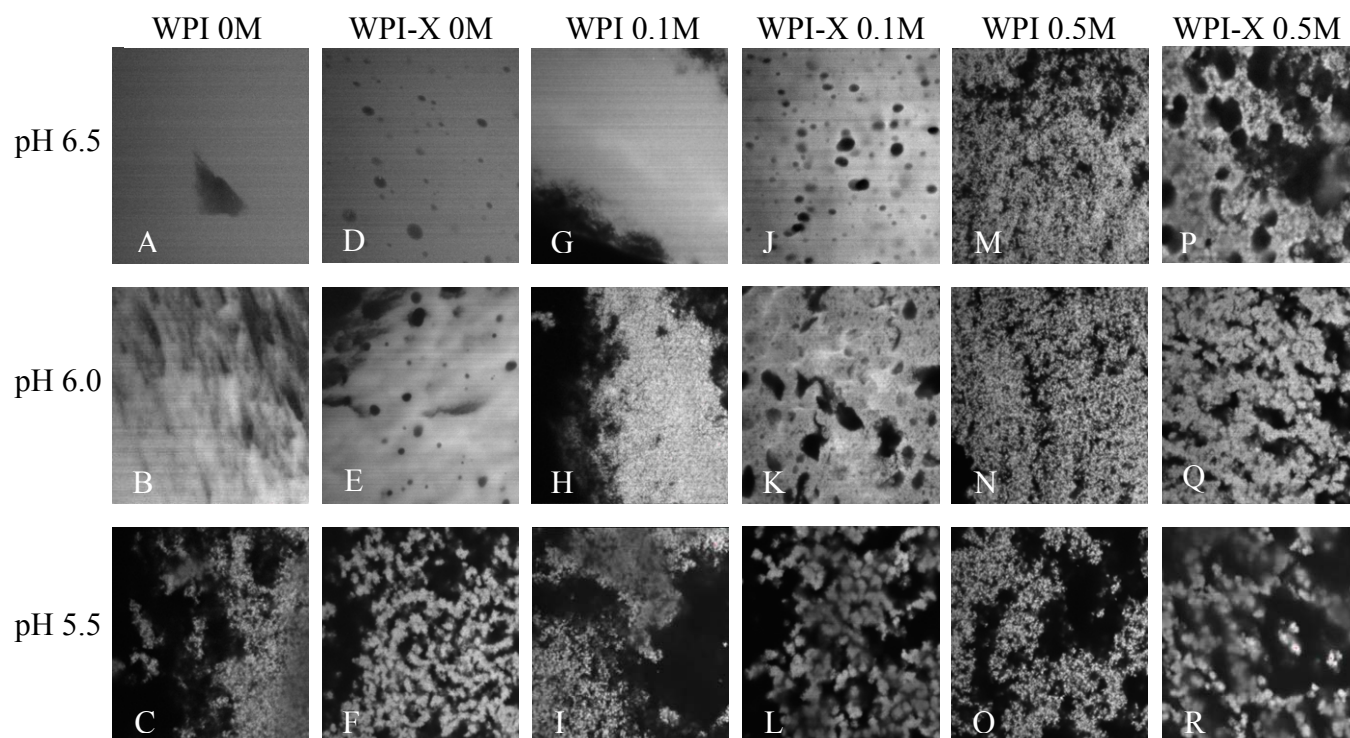


Figure 3.2 Confocal microscopy pictures of WPI gels (12.5 %v/v) and mixed WPI-xanthan gum gel (12.5-0.03 % v/v) with 0.1M and 0.5 M of NaCl and without salt. Magnification 100X.



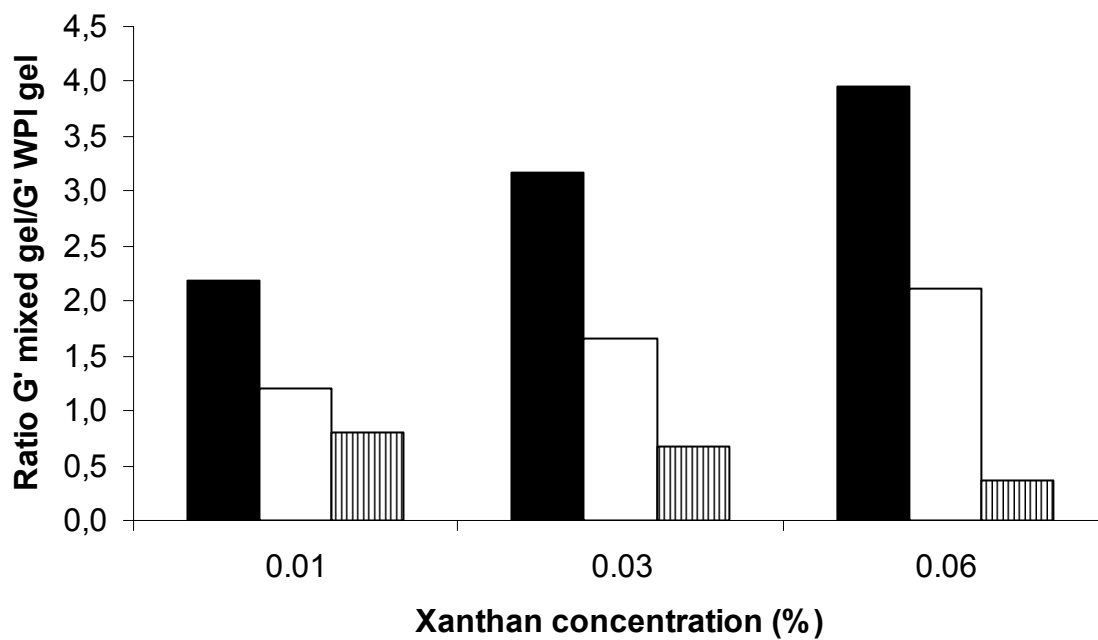


Figure 3.3 Elastic modulus ratios. Numerical numbers indicated demonstrate the synergistic (ratio above 1) or antagonist (ratio under 1) effect when xanthan is added at different concentrations to WPI 12.5% (v/v). Ratios are calculated by dividing the  $G'$  of mixed solution by the  $G'$  of WPI. ■ pH 6.5, □ pH 6.0, ▨ pH 5.5.

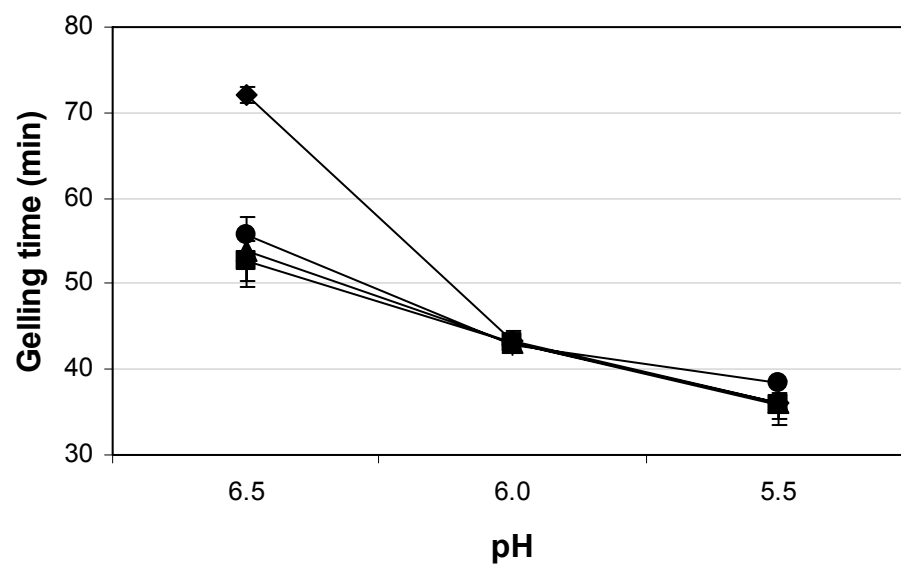


Figure 3.4 Gelling time of WPI (12.5% v/v) solution and WPI-xanthan mixed solutions depending on pH (0M NaCl) .  $\blacklozenge$  WPI,  $\blacksquare$  WPI-X 0.01%,  $\blacktriangle$  WPI-X 0.03%,  $\bullet$  WPI-X 0.06%

### Volet 2

Les résultats du chapitre précédent ont démontré que l'ajout de très faibles concentrations de xanthane (0.01% p/p) favoriserait les interactions protéines-protéines (séparation de phases ségrégative) plutôt qu'une association des protéines et du polysaccharide (pH 6,5 et 6,0). La formation de complexes à pH 5,5 ne peut être déduite sans aucun doute. Suite à ces résultats, l'utilisation d'un polysaccharide de plus faible poids moléculaire (pectine) ainsi qu'une diminution de la concentration en protéines favoriseront les interactions protéines-polysaccharides ou la formation de complexes solubles.

Les objectifs du second article sont :

*« D'établir des conditions pour la formation de solutions mixtes protéines-polysaccharides permettant la formation de complexes solubles en variant le pH, le ratio protéines-polysaccharide et la concentration en solides totaux. »*

*« D'étudier les propriétés d'écoulement en solutions diluées et concentrées des solutions mixtes aux conditions établies à l'objectif précédent. »*

## **Chapitre 4 Impact of protein-polysaccharide interaction on flow behaviour of diluted and bulk mixed solutions**

**Marie-Eve Bertrand<sup>1</sup>, Daniel St-Gelais<sup>2</sup>, Sylvie L. Turgeon<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>STELA/INAF-Dairy Science Center  
Pavillon Paul-Comtois,  
Université Laval, Québec, Qc, Canada  
G1K 7P4

<sup>2</sup>Food Research and Development Centre  
Agriculture and Agri-Food Canada,  
3600 Casavant Blvd. West  
Saint-Hyacinthe, Qc, Canada  
J2S 8E3

## 4.1 Résumé

Le présent travail se penche sur le comportement face à l'écoulement, de solutions diluées et non-diluées (*bulk*), de mélanges protéines-polysaccharide. L'objectif était d'étudier l'effet du pH (6,0, 5,5 et 5,0), de la concentration en solides totaux (8.5 à 2.1 g/dl) et du ratio massique protéines-polysaccharide (80 :1 à 4 :1) sur la formation de complexes isolat de protéines de lactosérum (WPI)-pectine et leur comportement visqueux résultant. Des tests en écoulement ont été utilisés pour mesurer la viscosité en solution non-diluée suivant un balayage de cisaillement de 1-500 s<sup>-1</sup>. La viscosité capillaire a été utilisée pour les solutions diluées. Les deux méthodes ont été réalisées à 20°C. La formation de complexes a été suivie en mesurant l'absorbance, les propriétés rhéologiques et le potentiel zeta. Un effet synergique sur le comportement visqueux en solution non-diluée a été observé à tous les pH pour les solutions mixtes comportant 0,5% de pectine (faibles ratios protéines-polysaccharide) alors que les solutions mixtes avec 0,1% de pectine (hauts ratios protéines-polysaccharide) ont mené à une viscosité similaire à celle des protéines. L'effet de synergie est renforcé aux faibles ratios protéines-polysaccharide ( $\leq 16:1$ ) par une diminution du pH due à l'augmentation de la formation de complexes WPI-pectine. Les hauts ratios protéines-polysaccharide ( $\geq 20:1$ ) favorisent les interactions protéines-protéines au détriment des interactions protéines-polysaccharide. La viscosité résultante suit le comportement pseudoplastique de la protéine. À l'opposé, la viscosité réduite est diminuée par la formation de complexes et par les facteurs intrinsèques et extrinsèques. Une meilleure connaissance des mélanges non-dilués est essentielle pour la compréhension et le contrôle des formulations alimentaires.

## 4.2 Abstract

The present work lingers over the flow behaviour, of bulk and diluted solutions, of protein-polysaccharide mixtures. The objective of this study was to determine the effect of pH (6.0, 5.5 and 5.0), total solid concentration (8.5 to 2.1 g/L) and protein to polysaccharide mass ratio (80:1 to 4:1) on the formation of whey protein isolate (WPI)-pectin complexes and their subsequent flow behaviour. Steady sweep tests were performed on concentrated solutions at shear rates between 1-500 s<sup>-1</sup>. Capillary viscometry was employed for diluted systems. Both methods were performed at 20°C. Complex formation was followed measuring absorbance, rheological properties and zeta potential. A synergistic effect on flow behaviour in bulk solutions was observed at all pH for mixed solutions containing 0.5% pectin (low protein-polysaccharide ratios) while mixed solutions with 0.1% pectin (high protein-polysaccharide ratios) led to a flow behaviour similar to protein controls. The synergistic effect at low protein to polysaccharide ratios ( $\leq 16:1$ ) is reinforced as the pH decreases because of the WPI-pectin complex formation. Complexation probably led to an increased particle size and consequently, an increased viscosity. High protein-polysaccharide ratios ( $\geq 20:1$ ) favour protein-protein interactions to the detriment of protein-polysaccharide complex formation. The reduced viscosity decreased with complex formation and depends on intrinsic and extrinsic factors. This work demonstrate that a better knowledge of the concentrated mixtures is essential for understanding and controlling the final properties of food as small changes in formulation can result in different structure and rheological properties.

**Keywords:** Whey protein isolate; amidated pectin; dynamic viscosity; electrostatic complexes; capillary viscosity

### 4.3 Introduction

In the food industry, texture is mainly dictated by the presence of proteins and polysaccharides while the functional properties of biopolymers in isolation are well known, the functional properties of mixed systems have been under investigation only in the past years. Formation of protein-polysaccharide (P-PS) complexes relies on many factors such as pH, ionic strength, protein to polysaccharide ratio, total solid concentration, charge density molecular weight and conformation (Schmitt et al., 1998; Tolstoguzov, 1997). Mixed P-PS solutions demonstrate either complexation (intermolecular attraction) or incompatibility (intermolecular repulsion). The macromolecular distribution in solution leads to either antagonist or synergistic effects on their functional properties. Improved functional properties have been reported following both types of interactions: complexation (Girard et al., 2002b; Laneuville et al., 2000; Mleko et al., 1997; Ould Eleya & Turgeon, 2000; Shim & Mulvaney, 2001) and incompatibility (Bertrand & Turgeon, 2007; Bourriot et al., 1999; Sanchez et al., 1997).

Whey proteins have been chosen because they have been studied extensively; they are well known and have excellent functional properties (de Wit, 1998). Whey proteins represent 20% of total milk proteins and are composed of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) (~50%),  $\alpha$ -lactalbumin (~20%), serum albumin (BSA), immunoglobulin and minor proteins in addition to lactose and minerals (de Wit, 1989). Being the main constituent of whey proteins,  $\beta$ -lactoglobulin dictates their functional properties (Ziegler & Foegeding, 1990). Compact three-dimensional structure of  $\beta$ -lg holds amino acid hydrophobic lateral chains while polar lateral chains are located on the outside of the structure (Kinsella & Whitehead, 1989; Ziegler & Foegeding, 1990). The rheological properties of proteins rely on many factors such as composition, molecular mass, size, shape, flexibility, degree of hydration and intermolecular interactions. In return, concentration, temperature, pH, ionic strength and previous processing treatments will influence the factors previously enumerated (Tang et al., 1993).

Pectin is an anionic plant polysaccharide usually obtained from citrus peel or apple pomace (Rolin et al., 1998). This polysaccharide is widely used for its thickening and gelling ability

in the jam and jellies industry or as a stabilizer in milk beverages. Its structure consists of a linear sequence of galacturonic acids in which some carboxyl groups are esterified with methanol. Functional properties of pectin greatly depend on the degree of methyl esterification (DE) and divide the gum in terms of low and high methoxyl (LM and HM). Production of amidated pectin will be the result of ammonia incorporation in the production of low methoxyl pectin. Polysaccharides rheological properties rely on their structure such as their length in solution, their shape, their stiffness and the presence of ionisable groups (Lapasin & Pricl, 1995). The solvent characteristics (ionic strength, nature of counterions and temperature) must be taken into consideration as they influence the conformation adopted by polysaccharides in solution.

In the field of whey protein and pectin systems, many studies have been done for the past years. Girard et al. (2002a; 2003a) have quantified the stoichiometry of the  $\beta$ -lg-pectin complexes and the thermodynamics (Girard et al., 2003b) and kinetic (Girard et al., 2004) parameters. Mixed  $\beta$ -lg-pectin gels have been studied by Dumay et al. (1999) and Beaulieu et al. (2001).  $\beta$ -lg-pectin complexation was studied towards its role in protein digestibility by Nacer et al. (2004).

Aside from gelling properties, functional behaviours of concentrated regime undergo a lack of attention and studies. Most researches are performed on diluted mixed systems. However, industrial applications for food formulation rely on functional properties of concentrated solutions. The objective of this work was to highlight the different behaviour of mixed (WPI-pectin) solutions through dynamic viscosity and reduced viscosity as a function of pH, protein to polysaccharide ratios and total solid content.

## **4.4 Materials and methods**

### **4.4.1 Material**

Whey protein isolate-BIPRO™ LE-050-3-420 (94.70% total solid, 87.94% protein, 2.08% ash) was purchased from Davisco Foods International, Inc. (MN, US) and citrus pomace pectin-Genu® gum X-917-02 (88.47% total solid, 22% nitrogen and 2.87% ash, 30% DE, 17% DA) was graciously donated by CP Kelco APS (Skensved, Denmark).



#### **4.4.1.1 Whey protein isolate powder free of insoluble proteins**

A whey protein isolate powder free of insoluble proteins was produced from the original whey protein isolate powder by eliminating the denatured and/or insoluble proteins resulting from processing (Weinbreck et al., 2003b). Protein denaturation increases incompatibility with polysaccharide as depicted by the second principle of thermodynamics (Tolstoguzov, 1991), by increasing its molecular volume or size (Tolstoguzov, 1997; Syrbe et al., 1995). A 10% (w/w) WPI solution was made with deionised water, agitated for 2 hours at room temperature once the powder in solution, and refrigerated overnight under stirring for a complete hydration. The solution was put under agitation in order to reach room temperature before acidification to pH 5.0 with HCl (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, as for all bases and acids) 6N. This pH was determined to be the lowest solubility of the WPI, measured by nitrogen determination (LECO FP-528, Leco Corporation, St-Joseph, MI, USA). The solution was refrigerated overnight before centrifugation at 10 400g for 1 hour at 10°C. Supernatant was freeze-dried and the resulting powder (97.9% total solid, 94.2% protein, 2.5% ash) stored at 4°C.

#### **4.4.1.2 Preparation of stock and mixed solutions**

Stock solutions of 16% (w/w) powder of WPI were made with dionized water. They were agitated for 2 hours at room temperature, once the powder in solution, and refrigerated (7°C) overnight under gentle stirring for a complete hydration. As this solution is the source of protein for our mixed solutions, WPI and “protein” will be used indifferently in the sections results and discussion. Pectin was dissolved in dionized water at room temperature under a high agitation at a powder concentration of 1.5% (w/w) and then heated at 85°C for 5 minutes for a complete hydration. Solutions were cooled down at room temperature before they were refrigerated (7°C) under gentle agitation overnight. Stock solutions were taken out of the fridge in order to reach room temperature before making mixed solutions.

Before mixing, pH of individual substrate solution were adjusted to pH 6.5 (NaOH 2N) for WPI and to pH 6.0 (NaOH 2N and 0.5N) for pectin. WPI, pectin and dionized water were mixed in order to obtain different total solid (8.5 to 2.1 g/dl). WPI and pectin were mixed according to the following protein-polysaccharide percentage (w/w): 8:0.5, 8:0.1, 5:0.5, 5:0.1, 2:0.5, 2:0.1. The mixed solutions were acidified to pH 6.0, 5.5 and 5.0 with

hydrochloric acid 0.5N under vigorous agitation. Visible complexes of WPI-pectin appeared after addition of a drop of HCl. Mixed solutions were kept under vigorous agitation, before each addition of HCl drop, until the visible aggregates disappeared visually. The mixtures were kept under gentle stirring at 7°C overnight to minimize time effects. Solutions were brought to room temperature, under gentle stirring, before analysis. WPI and pectin solutions were also prepared as controls.

## 4.4.2 Analytical methods

### 4.4.2.1 Absorbance

Presence of aggregates and/or complexes in solutions was measured by optical density at 650 nm with a UV-visible spectrophotometer (Agilent/HP 8453, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (adapted from Schmitt, 2000). At this wavelength, no energy is absorbed by the biomolecules so absorbance can be related to particles appearing in solution (Schmitt, 2000). Absorbance is defined as:

$$A_{\lambda} = -\log(I/I_0) \quad (4.1)$$

where I the transmitted intensity and  $I_0$  is the incident intensity.

### 4.4.2.2 Dynamic viscosity

A controlled-strain rheometer (ARES 100 FRT, Rheometric Scientific, Piscataway, NJ, USA) was used to perform steady rate sweep test. Couette geometry with a cup (33.93 mm diameter) and a bob system (32.05 mm diameter, 33.29 mm length) was used at shear rates between 1-500  $s^{-1}$  (adapted from Laneuville et al., 2000). Apparent viscosity was fitted to the power law model:

$$\sigma = K \dot{\gamma}^n \quad (4.2)$$

where  $\sigma$  is the shear stress ( $\text{N/m}^2$ ),  $K$  is the consistency index,  $\dot{\gamma}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) the shear rate and  $n$  the flow behaviour index (dimensionless) indicating the closeness to the Newtonian flow (Bourne, 2002).

#### 4.4.2.3 Zeta potential measurements

Zeta potential measurements were performed with a Zetasizer 2000 (Malvern instruments, UK) (adapted from Ducelet al., 2004). Solutions were diluted 150 times in dionized water except pectin which was measured undiluted. The pH of the diluted solutions was readjusted with 0.01M HCl and let under stirring for one hour before analysis. An electric field of 200 mV was applied.

#### 4.4.2.4 Capillary viscosity

Solutions were analysed with an automated microviscometer (AMV-200, Anton Paar, Graz, Austria) to measure relative viscosity at 20°C at an angle of 20° (method adapted from Xia & Dubin, 1994 and Weinbreck et al., 2003a). Pectin and mixed solutions were diluted with deionized water in order to obtain final pectin concentrations of 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 and 0.10 g/dl. WPI dilutions were based on the amount of protein related to mixed solutions with 0.1% pectin concentrations leading to concentration between 1.9-6.0 g/dl. Precipitation did not allow measurement at pH 5.0. The pH of all dilutions was readjusted with HCl 0.1 and/or 0.01N before analysis. Results are based on the determination of the reduced viscosity calculated as follow:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t\rho}{t_0\rho_0} \quad (4.3)$$

$$\text{Reduced viscosity} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (4.4)$$

where  $\eta_{rel}$  is the relative viscosity,  $\eta$  the viscosity of the polymer solution,  $\eta_0$  the viscosity of solvent,  $t$  and  $t_0$  represent the time for the ball to cross the capillary for the polymer solution and the solvent respectively,  $\rho$  and  $\rho_0$  are their densities,  $C$  is the total solid

concentration (g/dl) and  $\eta_{sp}$  is the specific viscosity ( $\eta_{rel} - 1$ ) (Harding, 1997; Lapasin & Prich, 1995). Density values were considered equivalent and consequently not taken into account in the calculation.

#### **4.4.2.5 Statistical analysis**

Analysis of variance according to a complete randomized factorial design was applied to determine the effect of protein (0, 2, 5 and 8%), pectin (0, 0.1 and 0.5%) and pH (6.0, 5.5 and 5.0) on absorbance, flow behaviour index, apparent viscosity, zeta potential and capillary viscosity values. Experiments were performed in triplicate. Apparent viscosity curves were also duplicated. The statistical analyses were performed with general linear models procedure of SAS (SAS/STAT language, SAS Institute Inc, Cary, NC.)

## **4.5 Results**

### **4.5.1 Absorbance**

Absorbance measurements of all solutions (WPI, pectin and mixed) were low (under 0.5) and showed no significant difference between them and between pH 6.0 and 5.5 (results not shown). At pH 5.0, absorbance of pectin solutions were low and equivalent for both concentrations. An increased absorbance was observed at pH 5.0 for all the WPI solutions with a significant difference between protein concentrations (Fig. 4.1). When adding pectin to the WPI solutions, decreasing pH to pH 5.0 showed a significant increase in absorbance for mixed solutions (Fig. 4.1(A, B)). These absorbance values were in general less than WPI control solution values, except for the mixture containing 2:0.1 WPI-pectin.

### **4.5.2 Dynamic viscosity**

Dynamic viscosity curves are presented in figure 4.2. In order to characterize objectively the resulting flow behaviour, the flow behaviour index ( $n$ ) (Table 4.1) and the apparent viscosity at 100 and 500s<sup>-1</sup> were quantified and analysed statistically. As the values at 100 and 500s<sup>-1</sup> were statistically equivalent for the pH and the solution composition factors, apparent viscosity is only reported for shear rates at 500s<sup>-1</sup> (Table 4.2). Apparent viscosity was used because the consistency index results were not significantly different. The flow

behaviour index indicates the closeness of a solution to the Newtonian behaviour. A value of  $n = 1$  is a Newtonian solution,  $< 1$  is associated to a pseudoplastic solution and  $> 1$  to a solution which is dilatant (Bourne, 2002).

The apparent viscosity curves demonstrated a pseudoplastic behaviour, a decreasing viscosity with increasing shear rate, for the WPI controls at the three concentrations and pH (Fig. 4.2(A, B, C)).  $n$  value was influenced by solution composition, but not by the pH, demonstrated a significant difference ( $P < 0.0001$ ) while a significant interaction ( $P < 0.0001$ ) was observed between the pH and the solution composition for the apparent viscosity. WPI solutions'  $n$  ranges from 0.861 to 0.964, with a significant difference between 5 and 8%. WPI apparent viscosities were similar for all concentrations and all pH (Fig. 4.3). Pectin solutions presented equivalent  $n$  values (Table 4.1). As compared to 0.1% pectin, 0.5% pectin solutions demonstrated a higher apparent viscosity at  $500\text{s}^{-1}$  in addition to a decrease in viscosity when decreasing pH from 6.0 to 5.0 (Fig. 4.3).

Incorporation of 0.1 and 0.5% pectin in mixed solutions increased un-significantly the  $n$  value when decreasing protein concentration giving  $n$  values between 0.964 and 0.908 (Table 4.1). Difference in the  $n$  values was observed between mixed solutions and the pectin control while no difference was observed with the respective protein control. Exceptions are the 2:0.1 P-PS ratio which was significantly different from both protein and pectin control as well as the 2:0.5 solution which did not differ from its pectin control (Table 4.1).

At a shear rate of  $500\text{s}^{-1}$ , apparent viscosity of mixed solutions with 0.1% pectin had higher values than their protein controls at the 3 pH (Fig. 4.3). Compared to pectin controls, only the 8-0.1 mixed solution at pH 5.0 had an apparent viscosity higher while other mixed solutions were equivalent. Apparent viscosity increased when increasing P-PS from 2-0.1 to 8-0.1 at each pH.

In the presence of 0.5% pectin in mixed solutions, apparent viscosity of mixed solutions had higher values than their protein controls at the 3 pH (Fig. 4.3). Compared to pectin controls, mixed solutions had higher apparent viscosity value except for 2-0.5 pH 6.0 and

5.5 which are equivalent. Apparent viscosity increased when increasing P-PS ratios at each pH.

Following the results from the previous analyzes, the main difference in the variable for bulk solutions were observed between pH 6.0 and 5.0 and between the lowest (with 0.5% pectin) and highest P-PS ratios (with 0.1% pectin). At pH 6.0, miscibility or complexation take place depending on the method of analysis while at pH 5.0 complexation and/or protein aggregation dominates depending on the total solid concentration and/or P-PS ratio. For this reason, only these two pH and P-PS ratios have been studied on diluted solutions.

### **4.5.3 Zeta potential measurements**

The zeta potential of WPI solutions was around -25mV at pH 6.0 and decreased to near zero at pH 5.0, pH near the  $I_p$  (Table 4.2). Zeta potential was equivalent between protein concentrations at pH 5.0 but was lower for 2% WPI than for 8% WPI at pH 6.0. Each pectin controls demonstrated equivalent zeta potential values at pH 6.0 and 5.0 (Table 4.2) and between each other at pH 5.0. Addition of 0.1% pectin to protein increased the negative zeta potential value compared to the protein controls but decreased it compared to the pectin itself (Table 4.2). No difference was observed between 2:0.1 and 8:0.1 mixed solutions at both pH 6.0 and 5.0. Mixed 0.5% solutions exhibited a lowering of the zeta potential compared to protein but an increase when compared to pectin controls as for the mixed solutions with 0.1% pectin. Thus, the 2:0.5 solution demonstrated lower zeta potential values than the 8:0.5 solution (Table 4.2). Zeta potential decreased with decreasing pH for mixed solutions.

### **4.5.4 Capillary viscosity**

The reduced viscosity of the 2% and 8% WPI solution pH 6.0 lied under 0.1 dl/g (Fig. 4.4(A, B)) and stayed constant over dilutions. Pectin's reduced viscosity presented values much higher than WPI solutions at pH 6.0 with values between 28 and 12.5 dl/g for the 0.01 and 0.1 g/dl of pectin (Fig. 4.4(A, B)). Pectin's reduced viscosity decreased with increasing concentration.

For mixed solutions, reduced viscosity behaved differently depending on the P-PS ratio. All mixed solutions had lower reduced viscosity than pectin but higher values than WPI at both pH (Fig. 4.4(A-C)). The higher the P-PS ratio, the lower the reduced viscosity.

## 4.6 Discussion

### 4.6.1 Mixed system behaviour and related flow behaviour in bulk solutions

In the visible range, absorbance is associated to either an increasing number of particles or their increasing molecular weight (Mattison et al., 1999). As pH decreases towards the  $I_p$ , the net charge on protein decreases favouring aggregation (Fox, 1989; Kinsella & Whitehead, 1989) provoking an increase in absorbance (Fig. 4.1(A, B)). The equivalent absorbance values between protein concentrations at pH 6.0 and 5.5 could result from equilibrium between the number of protein aggregates and their size. Increasing protein concentration increases their rate of interaction and consequently increases their aggregate size while decreasing their number (Hunter, 2001c). At pH further from the  $I_p$ , repulsive interactions limit particle formation keeping absorbance equivalent for all protein solutions. The high absorbance values at pH 5.0 do not obey the Beer-Lambert law and the method would require dilution. Dilution changes the absorbance of bulk solutions and could not be performed in order to keep intact the initial particle formation. Absorbance cannot be related in a linear matter to the concentration of particles in solution. However, the difference between WPI and mixed solutions at pH 5.0 was significant and allowed concluding of a difference (Fig. 4.1(A, B)).

According to theoretical approach, mixed biopolymer solutions can present compatibility (attractive interactions), incompatibility (repulsive interactions) or miscibility (repulsive interactions equal attractive interactions) (de Kruif & Tuinier, 2001; Syrbe, et al., 1998; Tolstoguzov, 2003). Miscibility takes place when interactions between like-polymer are similar to interactions between unlike-polymers (Syrbe et al., 1998). As mentioned previously, complexation between two molecules is related to many factors including pH. Complexation starts at  $pH_c$ , the pH where soluble or primary complexes first take form, resulting in a small increase in turbidity or absorbance as demonstrated by many researches

(Mattison et al., 1999; Mekhloufi et al., 2005; Weinbreck et al., 2003a; Xia & Dubin, 1994). The increase in turbidity is caused by an increase in the concentration and/or the molecular weight of the scattering particles. The equivalent absorbance values of all solutions at pH 6.0 and 5.5 could be the consequence of miscibility or the presence of complexes could not be detected by the absorbance measurement due to a lack of sensitivity. Previous studies from Girard et al. (2002a; 2004) have established the  $pH_c$  of mixed  $\beta$ -lactoglobulin-low-methoxyl pectin to lie between 6.0 and 6.45 for P-PS ratios between 2:1 to 10:1 in diluted solutions (0.5% total solid). Coulombic interactions are possible through positive “patches” present on protein. At  $pH_c$ , complex formation is independent of the P-PS ratio (Mattison et al., 1995; Mattisson et al., 1999). In the formation of electrostatic complexes, interactions take place between one molecule of protein and one single polysaccharide chain.

Decreasing pH to 5.0 advantages both complexation and protein-protein interactions. The decreasing negative net charge on pectin molecules will play a role in favouring complexation (Semenova., 1996; Tolstoguzov, 2003) as this phenomenon leads to an increase in the polysaccharide chain flexibility. Pectin amidation could also favour compatibility as hydrogen bonding can grow in number between the biomolecules as observed by Einhorn-Stoll et al. (2001). Consequently, more molecules can be included in the complexes. The outstanding increase in absorbance of the 2:0.1 pH 5.0 solution compared to its WPI control could be explained by the complexation that could be more important than in the 5-0.1 and 8-0.1 due to dilution of ions coming from the WPI mother solution. Decreasing the ionic strength increases complexation. Complexation causes condensation of the complex following WPI-pectin interaction (Dubin & Oteri, 1983; Tolstoguzov, 2003). Protein aggregation will take place between free proteins as well as with proteins involved in the complexes leading to the so-called cooperative binding (Tolstoguzov, 1997). Condensation of the 2:0.1 solution leads to an increase of the molecular weight of the complex and consequently to an increase in absorbance. In mixed solutions, protein aggregation is nevertheless less important than in protein solutions. Complexation decreases the possible size of protein aggregates as observed by the lower absorbance value of mixed solutions toward their WPI controls. Nacer et al. (2004) have observed the same phenomena for  $\beta$ -lactoglobulin-low-methoxyl and low methoxyl



amidated pectin interactions around the  $I_p$  of the protein. To summarize, absorbance of mixed solutions at pH 6.0 and 5.5 reflects miscibility while complexation is observed at the lowest pH.

Regarding the flow curves, WPI concentrated solutions, demonstrated a pseudoplastic behaviour with  $n$  values lying between 0.861 and 0.942 (Table 4.1). This behaviour does not corroborate with the literature. Bazinet et al (2004) and Tang et al. (1993) have found that WPI and whey protein concentrate respectively have a Newtonian behaviour up to about 10% protein. Higher concentrations lead to non-Newtonian flow resulting from protein aggregation. The procedure to eliminate protein aggregates present in the WPI implies acidification to pH 5.0. Solutions were let at this pH for subsequent treatments. At the whey protein  $I_p$  (pH  $\sim$ 5.0), proteins tend to associate due to their neutral net charge and form unstable solutions. Due to Brownian motion, protein association will be favoured with time (Hunter, 2001a) as well as under stirring by increasing the rate of collision (Hunter, 2001c). Shearing will break protein aggregates and lower viscosity. Pectin Newtonian flow behaviour ( $n = 1.013$  and  $1.035$  for the 0.1% and 0.5% pectin solution respectively and Fig. 4.2 (except A-C)) agrees with Rolin et al. (1998). Viscosity increased with concentration as entanglement increases and decreases with pH due to less electrostatic repulsions and contraction of the coil. The Newtonian behaviour of 0.5% pectin solution still reflects the behaviour of a polysaccharide at low concentration (Rolin et al., 1998). The logarithmic plot of  $\eta_{sp}$  versus  $C[\eta]$  (result not shown) results in a slope of about 1.6. A value of 1.4 is reported by Rolin et al. (1998) for low concentration regime with a sharp increase of the slope (3.3) for concentrated solution.

The flow behaviour index as well as the apparent viscosity reflect the importance of protein-protein interactions to the detriment of protein-polysaccharide interactions with 0.1% pectin. The values of  $n$  lower than 0.964 (Table 4.1) represent a pseudoplastic behaviour as for protein solutions (Fig. 4.2(D-F)). As a general trend, the decreasing apparent viscosity with increasing shear rate approximately followed the pattern of the respective protein controls. This dependence of apparent viscosity on shear rate could be explained by the dissociation of aggregates and/or particles and/or complexes as previously observed for globular proteins (Mleko & Foegeding, 1999) leading to an apparent viscosity

value at  $500\text{s}^{-1}$  similar to the pectin. In pseudoplastic fluids, shear forces cause the disruption of weak interactions, distortion of particle shape or arrangement of aggregates along force lines.

A Pseudoplastic behaviour also came out from the results for the mixed solution with 0.5% pectin (Fig. 4.2(G-I)). As protein concentration increases, the pseudoplastic behaviour tends to accentuate due to the protein aggregation and/or presence of complexes. Rheological behaviour highlights complexation of WPI and 0.5% pectin. The increasing viscosity of mixed solutions compared to their controls as pH decreases and as P-PS ratio increases can be attributed to: (1) a higher total solid content and/or (2) an increased size of molecules due to complexation and to proteins interaction with both pectin molecules and proteins on complexes (Laneuville et al., 2000; Sanchez & Paquin, 1997). The lower P-PS ratios would favour complexation as a consequence of the higher apparent viscosity at  $500\text{s}^{-1}$ . Even though 0.5% pectin is considered to be in the diluted regime, increasing total solid concentration of mixed solutions restricts conformational change of pectin, same for complex condensation, leading to a main phenomenon of growing complex size. Weinbreck & Wientjes (2004) have observed for whey protein/gum acacia coacervates an increase in viscosity depending on pH, and consequently on the strength of electrostatic interaction. A maximum viscosity was found at the maximum of coacervation. Increasing complexation change the flow behaviour.

#### **4.6.2 Diluted systems and related reduced viscosity**

One factor dictating the zeta potential on protein is pH (Fox, 1989; Kinsella & Whitehead, 1989). Decreasing pH decreased the net charge in order to reach neutrality at the  $I_p$ . The polysaccharide's zeta potential also relies, among other on pH, as it affects dissociation of carboxyl groups (Rolin et al., 1998). The zeta potential should be lower at pH near the  $pK_a$  ( $\sim 3.5-4.5$ ). In this study, measurements have been performed on undiluted solutions. Zeta potential is in fact the measurement of the electrophoretic mobility of particle as express by the Smoluchowski equation:  $U_E = \varepsilon\zeta/\eta$  where  $\varepsilon$  is the dielectric constant,  $\zeta$  the zeta potential and  $\eta$  the viscosity (Hunter, 2001b). Viscosity is inversely proportional to

electrophoretic mobility. The viscosity induced by pectin may have caused an underestimation of the zeta potential.

Reduced viscosity of pectin is related to the charges carried by the molecules. Pectin behaves as a polyelectrolyte in solution. Its reduced viscosity increases with dilution as depicted by the third electroviscous effect (Conway & Dobry-Duclaux, 1960). Dilution increases repulsive interaction of pectin molecule by lowering the ionic strength of the solution. Pectin extends and viscosity increases. Reduced viscosity refers to the size or the conformation of molecules in solution. As for the WPI, it is considered as a hard sphere in solution and its viscosity increases according to Einstein equation.

Even though reduced viscosity of WPI solution was not measurable at pH 5.0, due to precipitation, we could expect viscosity values above the ones measured at pH 6.0. Precipitation, result of protein aggregation or protein attraction, brings a reduction in viscosity in the case of colloidal systems as the free volume for structural rearrangement increases (Parker et al., 2005).

Viscosity of diluted solutions compared to bulk solutions led to a completely different picture for mixed solutions. It was demonstrated in the previous section that bulk solutions at high total solid concentration (i.e. with 0.5% pectin) and low P-PS ratios can lead to complexation in the case of interactions between WPI and low amidated pectin. As the total concentration is lowered, complexation is favoured as the entropy of mixing is increased (Schmitt et al., 1998). Complexation between a protein and a polysaccharide lowers the net charge of the complex. As the pH is lowered, complexes tend to reach neutralization (Mattison et al., 1995) due to electrostatic complexation. Complexation decreasing not only the net charge of particles but also the viscosity of diluted solutions. Both the zeta potential and the reduced viscosity are however sensitive to the ionic strength in solution which has not been controlled and the decreasing zeta potential and the decreasing reduced viscosity have to be attributed to a combination of factors: (1) To complexation due to charge neutralization (Xia & Dubin, 1994; Weinbreck, et al., 2003a) and subsequent relarging of counterions (Syrbe et al., 1998); (2) To the addition of ions when readjusting pH of dilutions (Weinbreck et al., 2003a); (3) To the presence of more solid and consequently more ions in the presence of protein compared to the pectin alone. Weinbreck et al. (2003a)

observed a slight decrease in viscosity (0.6-1.0 mPa s) at the same time than a decrease in radius of gyration and an increase in molecular weight of whey protein-exopolysaccharide EPS B40 solution without added salt at pH between  $pH_c$  ( $\sim 5.3$ ) and pH of phase separation ( $pH_\phi \sim 4.4$ ). Results were attributed to the increased salt concentration at pH around  $pH_c$  and to the formation of condensed complexes at pH around  $pH_\phi$ . Our results demonstrate a more important difference between mixed solutions and the polysaccharide than Weinbreck (2003a). Decreased reduced viscosity must be attributed to a combination of the previous factors.

An important behaviour towards viscosity in diluted and bulk solution must be highlighted for mixed solutions. In diluted solutions, the decrease of reduced viscosity demonstrated that the size of molecules decreased for all mixed solution with either 0.1 or 0.5% pectin. Apparent viscosity in bulk solution is related to many factors including particle size (Bourne, 2002). Apparent viscosity increases with increasing the particle size. In bulk solution, the apparent viscosity at  $500s^{-1}$  increased for mixed solutions with 0.5% pectin compared to controls while the latest was similar to pectin viscosity with 0.1% pectin. Knowing that complexes are present in all solutions, the overlapping concentration ( $C^*$ ) must be an importance factor in the behaviour of the complexes towards their resulting functional properties. That is to say that under the  $C^*$ , the compaction of the complexes would take place, decrease the size of the pectin molecule and decrease the apparent viscosity. Around  $C^*$ , overlapping would either restricts the pectin contraction after complexation and rather increase its size or lead to interaction between complexes which would also result in an increased apparent viscosity. The overlapping concentration could be attained depending on the method of determination. Using the relation  $C^* \sim 1/[\eta]$  (Mewis & Macosko, 1994) would lead to a  $C^*$  of 0.25 g/dl for the present pectin molecule. Tolstoguzov (1996) reported that the phase separation threshold would be determined by  $C^*$ . However, complex formation would be observed in the present case above  $C^*$ . These different concentration regimes should be taken into consideration when studying complexes functional properties and get more attention from scientists as no one has ever reported its impact.

## 4.7 Conclusion

Soluble complex formation between protein and polysaccharide, that is to say attractive interactions not leading to associative phase separation or precipitation, is possible in bulk and diluted solutions. Total solid concentration, protein-polysaccharide ratio and pH will however be determinant factors in the flow behaviour of the mixed solutions. High protein-polysaccharide ratios ( $\geq 20:1$ ) and low total solid concentration favour protein-protein interactions to the detriment of protein-polysaccharide interactions leading to flow behaviour similar to protein behaviour in bulk solutions. In the absence of large amount of free proteins in the lower protein-polysaccharide ratios ( $\leq 16:1$ ) at high total solid concentration, complex formation and associated molecular volume control flow behaviour by increasing viscosity. In diluted solutions, viscosity is reduced, among others, by complexation. Lowering pH will favour complex formation for bulk solutions increasing viscosity. Concentrated mixed solutions should have more attention from scientists as they represent industrial reality. It is however a challenge as most analytical techniques used in mixed solutions studies require diluted solutions. Indirect method such as the study of functional properties can be used to investigate the impact of mixed solutions but are not reliable for fundamental understanding of mixed protein-polysaccharide behaviour. Acid milk gel or yoghurt could be an interesting model for functional properties study as their structure is sensitive to formulation. Incorporation of concentrated protein-polysaccharide complexes with a minimal free protein in solution and absence of gelation by itself following a heat treatment (P-PS ratio 2:0.5 pH near  $I_p$ ) will be investigated.

## 4.8 Acknowledgments

NSERC and Parmalat Canada are acknowledged for their financial support on protein-polysaccharide study and Anne-Françoise Allain for her technical support. This work couldn't have been realized without the technical help of Judith Barrière.

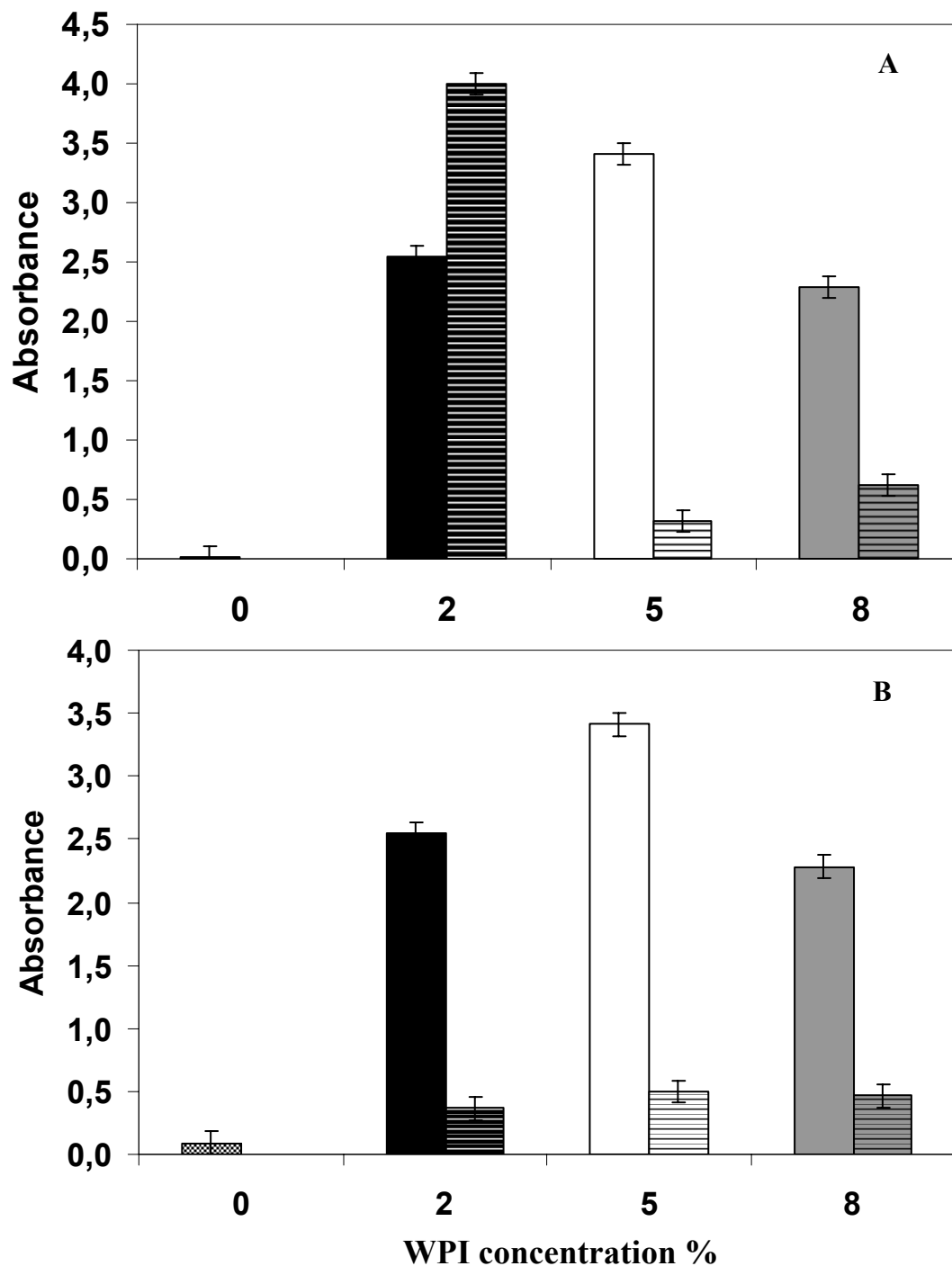


Figure 4.1 Absorbance measurements of the whey protein isolate (WPI) solutions and mixed WPI-pectin solutions at pH 5.0 with (A) 0.1% pectin, WPI controls: 2% WPI (■), 5% WPI (□), 8% WPI (■), protein:polysaccharide ratios 2:0.1 (■), 5:0.1 (■), 8:0.1 (■) and (B) 0.5% pectin (■), 2% WPI (■), 5% WPI (□), 8% WPI (■), protein:polysaccharide ratios 2:0.5 (■), 5:0.5 (■), 8:0.5 (■). Error bars represent the standard error of the means (0.09).

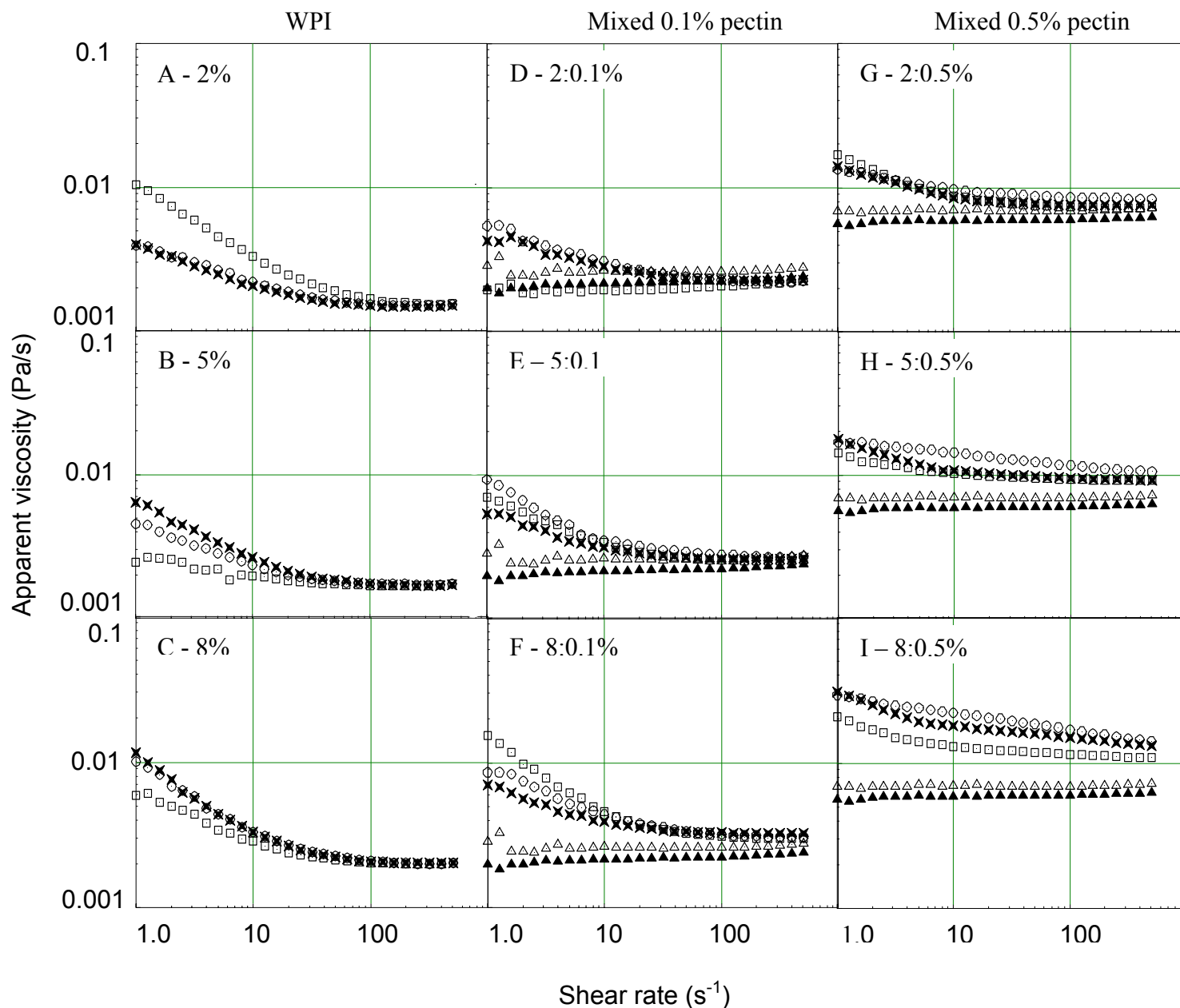


Figure 4.2 Apparent viscosity curves for shear rates values between 1 to 500  $\text{s}^{-1}$ . Whey protein isolate (WPI) controls (A) 2% WPI, (B) 5% WPI, (C) 8% WPI. Mixed WPI-pectin solutions with 0.1% pectin protein:polysaccharide ratio (D) 2:0.1, (E) 5:0.1, (F) 8:0.1 and with 0.5% pectin protein:polysaccharide ratio (G) 2:0.5, (H) 5:0.5, (I) 8:0.5. pH 6.0 ( $\square$ ), pH 5.5 ( $\times$ ) and pH 5.0 ( $\odot$ ) and pectin control pH 6.0 ( $\triangle$ ) and 5.0 ( $\blacktriangle$ ).

Table 4.1 Flow behaviour index of pectin and whey protein isolate (WPI) controls and mixed WPI-pectin (protein:polysaccharide ratios) solutions determined from the apparent viscosity with the power law equation. The lowest value of  $r^2 = 0.97$ .

Solution	$n^1 \pm 0.020$
Pectin 0.1%	1.035 <sup>A</sup>
Pectin 0.5%	1.013 <sup>AB</sup>
WPI 2%	0.888 <sup>EF</sup>
WPI 5%	0.942 <sup>CDE</sup>
WPI 8%	0.861 <sup>F</sup>
2:0.1	0.964 <sup>BC</sup>
2:0.5	0.955 <sup>BCD</sup>
5:0.1	0.917 <sup>CDE</sup>
5:0.5	0.941 <sup>CDE</sup>
8:0.1	0.910 <sup>CDEF</sup>
8:0.5	0.908 <sup>DEF</sup>

<sup>1</sup> Flow behaviour index  $\pm$  standard error of the means



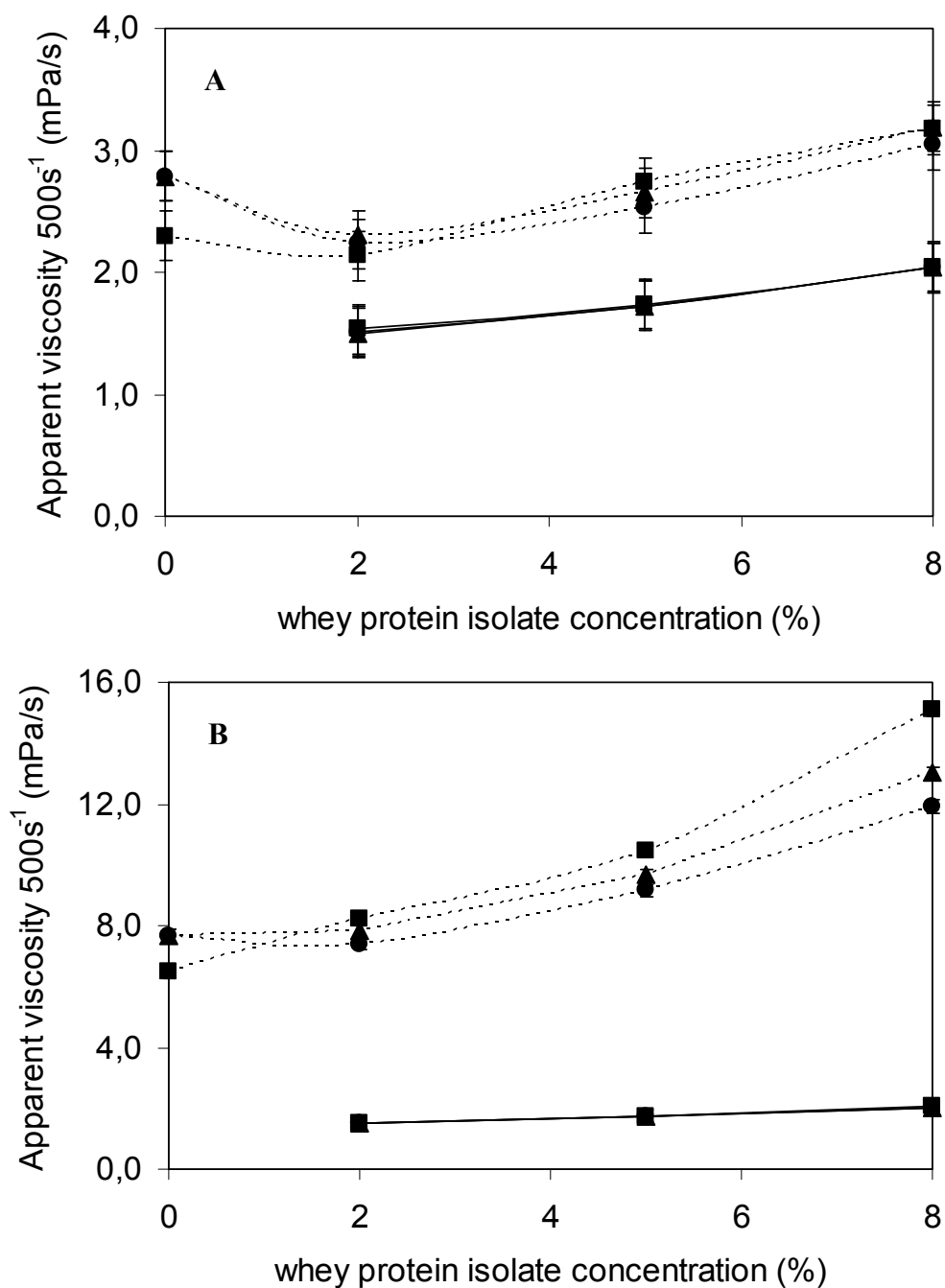


Figure 4.3 Apparent viscosity values (at 500 s<sup>-1</sup>) as a function of whey protein isolate (WPI) concentration present in solution for WPI controls (straight line) and WPI-pectin solutions (dotted lines) pH 6.0 (●), 5.5 (▲) and 5.0 (■). (A) Mixed solutions and their controls (0.1% pectin); (B) Mixed solutions and their controls (0.5% pectin). Error bars represent the standard error of the means (0.0002)

Table 4.2 Zeta potential values of pectin and whey protein isolate (WPI) controls and mixed WPI-pectin (protein:polysaccharide ratios) solutions.

Solution	pH	Zeta potential value $\pm 1.6$ <sup>1</sup>
Pectin 0.1%	5.0	-56.9 <sup>M</sup>
Pectin 0.1%	6.0	-59.5 <sup>M</sup>
Pectin 0.5%	5.0	-53.5 <sup>LM</sup>
Pectin 0.5%	6.0	-52.8 <sup>L</sup>
WPI 2%	5.0	-0.2 <sup>A</sup>
WPI 2%	6.0	-26.2 <sup>EFG</sup>
WPI 8%	5.0	-0.3 <sup>A</sup>
WPI 8%	6.0	-20.7 <sup>D</sup>
2:0.1	5.0	-13.8 <sup>BC</sup>
2:0.1	6.0	-33.2 <sup>HI</sup>
2:0.5	5.0	-28.9 <sup>GH</sup>
2:0.5	6.0	-41.8 <sup>K</sup>
8:0.1	5.0	-13.5 <sup>BC</sup>
8:0.1	6.0	-29.6 <sup>GH</sup>
8:0.5	5.0	-16.0 <sup>C</sup>
8:0.5	6.0	-35.5 <sup>IJ</sup>

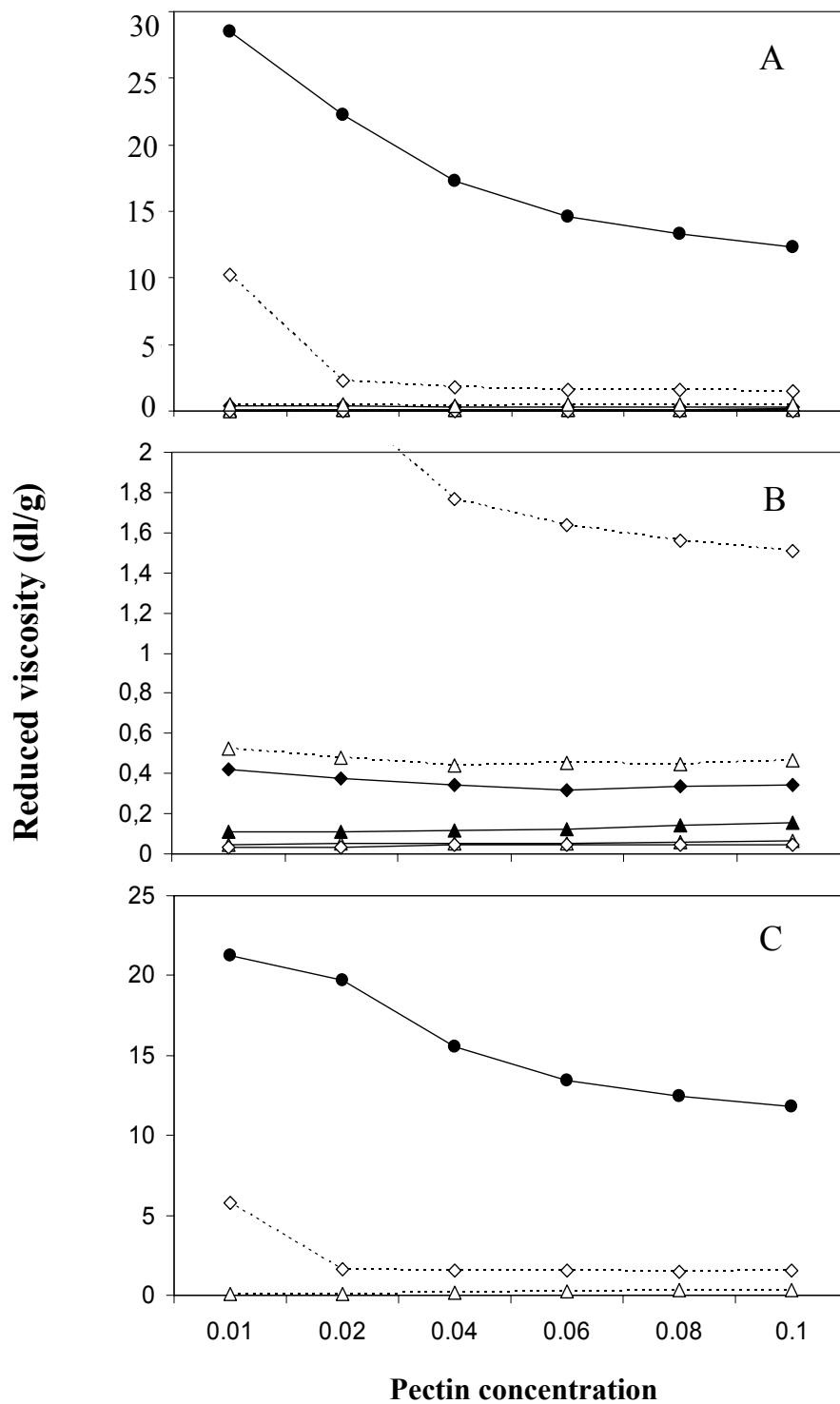


Figure 4.4 Reduced viscosity of mixed whey protein isolate (WPI)-pectin at pH 6.0 ((A) including pectin control and (B) excluding pectin control) and pH 5.0 (C). Pectin control (—●—), WPI controls: 2% WPI (—◇—) and 8% WPI (—△—) and mixed WPI-pectin solutions: protein:polysaccharide ratio 2:0.1 (—◆—), 2:0.5 (···◇···), 8:0.1 (—▲—) and 8:0.5 (···△···). Error bars represent the standard error of the means (0.4).

L'article précédent a démontré la formation de complexes solubles protéines de lactosérum-pectine. Leur incorporation dans des gels acides laitiers permet d'étudier les fonctionnalités induites par ce nouvel ingrédient.

Le dernier article de cette thèse vise à chercher à répondre au dernier objectif fixé :

*« D'étudier les caractéristiques rhéologiques, structurales et de rétention d'eau d'un gel acide laitier auquel a été ajouté un complexe soluble isolat de protéines de lactosérum-pectine stabilisé. »*

## **Chapitre 5 Characterization of acid milk gels containing protein-polysaccharide complexes: rheological properties, structure and syneresis behaviour**

**Marie-Eve Bertrand<sup>1</sup>, Daniel St-Gelais<sup>2</sup>, Sylvie L. Turgeon<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> STELA/INAF-Dairy Science Center  
Pavillon Paul-Comtois,  
Université Laval, Québec, Qc, Canada  
G1K 7P4

<sup>2</sup> Food Research and Development Centre  
Agriculture and Agri-Food Canada,  
3600 Casavant Blvd. West  
Saint-Hyacinthe, Qc, Canada  
J2S 8E3

## 5.1 Résumé

Cette étude démontre l'impact de complexes protéines-polysaccharide sur le comportement rhéologique, la microstructure et la synérèse de gels acides laitiers. La poudre de lait écrémé et le lactose ont été utilisés comme ingrédients de base pour contrôler la concentration en solides totaux (15% p/p) et la concentration en protéines (3,5% p/p) des gels acidifiés à pH 4,6 au glucono-delta-lactone. L'ajout de complexes d'isolat de protéines de lactosérum-pectine faiblement méthylée, préalablement stabilisés par un traitement thermique, à des concentrations en pectine de 0,05, 0,1 et 0,2% p/p a été étudié par rhéologie dynamique oscillatoire, microscopie confocale à balayage laser et synérèse sur les gels acides laitiers résultant. L'incorporation de complexes révèle une diminution de la fermeté du gel suivant l'augmentation du taux d'incorporation. Ce comportement est supporté par les observations microscopiques qui démontrent un manque grandissant d'interactions entre les agrégats et les amas de protéines. La synérèse est augmentée. Le comportement des complexes protéines-polysaccharide serait une balance entre leur impact sur le taux de protéines de lactosérum dénaturées et leur taux d'agrégation sur la formation du gel acide laitier.

## 5.2 Abstract

This study demonstrates the impact of protein-polysaccharide complexes on the rheological behaviour, microstructure and syneresis of acid milk gels. Skim milk powder and lactose were used as basic ingredients to control the total solid concentration (15% w/w) and protein concentration (3.5% w/w) of the gels acidified with glucono- $\delta$ -lactone to pH 4.6. Addition of whey protein isolate-low-methoxyl pectin complexes, first stabilized by a heat-treatment, at pectin concentration between 0.05, 0.1 and 0.2% w/w was studied using dynamic oscillatory measurements, confocal laser scanning microscope and the extent of syneresis of the final gels was also quantified. Complex incorporation reveals a decrease in the gel stiffness as the rate of incorporation increases. This behaviour is supported by microscopic observations demonstrating an increasing lack of interactions both between protein aggregates and clusters. Hence, syneresis is enhanced. Protein-polysaccharide complexes behaviour would be a balance between their impact on the rate of denatured whey proteins and the rate of aggregation of the latter on the formation of an acid milk gel.

**Keywords:** Whey proteins isolate; pectin; electrostatic complexes; CLSM

### 5.3 Introduction

Acid milk gels refer to popular products such as set and stirred yoghurts. In order to achieve a desirable texture, flavour and legal requirements, a mix of ingredients is required (Tamine & Robinson, 1999). The principal ingredient is certainly milk but milk protein powders (full cream or skim milk, whey protein concentrate, buttermilk, casein, etc.), stabilizers (gelatin, guar gum, pectin, carrageenan, etc.), sweeteners, colouring, flavouring and preservatives are part of the mixture (Varnan & Sutherland, 1994; Tamine & Robinson, 1999). Yoghurt formation and texture will be affected by the different physical processing parameters as well as by the various ingredients. Consumers expect good quality yogurt to have optimal texture and show no syneresis (Amatayakul et al., 2006a) the latter is considered a major physical defect (Lucey, 2002).

Acid milk gels form after an extensive heat treatment and acidification leading to interactions between denatured whey protein and casein, between denatured whey proteins and between caseins (Anema et al., 2004; Schorsch et al., 2001; Vasbinder et al., 2003). Denatured whey proteins play a key role in acid milk gel structuring by increasing the number of cross-links in the whole network. Gel strength, microstructure and syneresis are improved in milks containing denatured proteins (Sodini et al., 2004). Addition of polysaccharides can also improve the texture and water retention (Tamine & Robinson, 1999).

A new avenue was viewed in the use of mixed protein-polysaccharide solutions as ingredients already incorporated in yoghurt manufacture. Mixed solutions have demonstrated improvement of many functional properties as gelling and viscosifying (Bertrand & Turgeon, 2007; Cai & Arntfield, 1997; Ould Eleya & Turgeon, 2000; Sanchez et al., 1997; Shim & Mulvaney, 2001; Wang & Qvist, 2000; Weinbreck & Wientjes, 2004). The use of mixed protein-polysaccharide has never been studied neither toward their capacity to limit syneresis nor in model systems as an ingredient in yogurt manufacture. What is the impact of incorporating a stabilized complex of whey protein isolate and pectin first complexed on gel formation and the resulting characteristics of the gel? Are mixed protein-polysaccharide solutions able to reduce syneresis of an acid milk gel? In order to



answer part of these questions, the objectives of this work were: (1) to study the rheological characterization of an acid milk following addition of whey protein isolate-pectin complexes; (2) to visualize their impact on the microstructure; (3) to measure resulting syneresis.

## **5.4 Materials and methods**

### **5.4.1 Materials**

Low heat skim milk powder (SMP) (95.87% total solid, 36.75% protein, 9.14% ash) was donated by Parmalat Canada and lactose (97.76% carbohydrates) obtained from Saputo Canada. Whey protein isolate (WPI) BIPRO™ LE-050-3-420 (94.70% total solid, 87.94% protein, 2.08% ash) was purchased from Davisco Foods International, Inc. (MN, US). Citrus pomace pectin-Genu® gum X-917-02 batch 4150027 (88.47% total solid, 22% nitrogen and 2.87% ash, 30% DE, 17% DA) was graciously donated by CP Kelco APS (Skensved, Danmark).

#### **5.4.1.1 Preparation of mixed solutions and complexes**

Stock solutions of 16% (w/w) powder WPI were made with deionised water. They were agitated for 2 hours at room temperature and refrigerated (4°C) overnight for a complete hydration. Pectin was dissolved in deionised water at room temperature under a high agitation at a powder concentration of 1.5% (w/w) and then heated at 85°C for 5 minutes for a complete hydration. Solutions were cooled down at room temperature before they were refrigerated (4°C) overnight. Stock solutions were taken out of the fridge in order to reach room temperature before making mixed solutions.

Before mixing, pH of pectin solution was adjusted to ~ 6.0 with NaOH (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) 2N and 0.5N. The final WPI powder concentration was 2% (w/w) and pectin powder concentration 0.5% (w/w). A control 2:0.5 sample containing protein:polysaccharide at pH 7.0 was also prepared to be incorporated in milk mixes. Complexes of WPI and pectin were prepared by acidification to pH 4.5 with hydrochloric acid (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) 0.5N under vigorous agitation. Complexes were

visible to the eye after addition of a drop of HCl. Mixed solutions were let under vigorous agitation before each addition of HCl drop until the complexes had disappeared visually. Once pH 4.5 was reached and the solution homogenous, complexes were heat-treated at 90°C for 2 minutes and then rapidly cooled down to 4°C in an ice bath (Gentès, 2007). Solutions were let in the fridge at 4°C until utilization. Complexes were taken out of the fridge and let at room temperature under stirring until they reached room temperature before acid gel making.

#### **5.4.1.2 Preparation of acid milk gel**

Milk mixes were prepared from a base of SMP and lactose. Lactose was used to keep protein and total solid concentrations constant at 3.5% w/w and 15.0% w/w respectively (Table 5.1). WPI, pectin, complexes of 2:0.5% w/w protein-polysaccharide (P-PS) ratio at pH 7.0 and 2:0.5% w/w protein-polysaccharide ratio at pH 4.5 were added to enrich reconstituted milk. SMP was first dispersed in water under agitation. Lactose was then added. For the WPI and pectin controls, the protein and polysaccharide powders were first dispersed in water under agitation before addition of SMP and lactose. Mixed solutions were added once all powders had been dispersed. Milk mixes were kept under good agitation for 20 minutes and then heat treatment in a water bath at 90°C for 2 minutes (timed once the target temperature was reached in the control beaker). Heat treated solutions were rapidly cooled down to 43°C in an ice bath. A 20% solution of glucono- $\delta$ -lactone (GDL) (Sigma) was freshly prepared just before adding to the cooled milk mixes. Solutions were agitated for 20 seconds after addition of GDL before proceeding to the first analysis. GDL concentrations varied between solutions in order to reach a final pH of  $\sim 4.6$  ( $4.64 \pm 0.09$ ) after 10 hours at 43°C. Milk mixes included incorporation of 0.05, 0.1 and 0.2% w/w pectin based on the 2:0.5 WPI-pectin solution. This P-PS ratio was used to calculate the corresponding amount of protein needed for WPI control. The term “pectin equivalent” (PE) is then more appropriate and will be used throughout the paper. The different acid milk gels will be referred to: SMP-base gel (SMP and lactose), WPI-gel (SMP, lactose and WPI), pectin-gel (SMP, lactose and pectin), 2:0.5 7.0-gel (SMP, lactose and 2:0.5 WPI:pectin ratio pH 7.0) and 2:0.5 4.5-gel (SMP, lactose and 2:0.5 WPI:pectin ratio pH 4.5 or stabilized complexes).

## 5.4.2 Analytical Methods

### 5.4.2.1 Dynamic oscillatory measurements

A controlled-strain rheometer (ARES 100 FRT, TA Instrument, USA) was used to perform a dynamic time sweep test. Solutions were directly poured into the geometry (a couette with a cup of 33.93 mm diameter and a bob of 32.05 mm diameter, 33.29 mm length) at 43°C. Samples were covered with castor oil (Laboratoire MAT, MTL, Canada) to avoid evaporation during measurements. Gelification was followed during 10 hours at a frequency of 0.1Hz and a strain of 0.01%. Acid milk gels were then cooled to 20°C at 1.5°C/min, The method was adapted from Lucey et al. (1997)..

### 5.4.2.2 Confocal laser scanning microscope (CLSM)

The CLSM (Jena, Germany) consisted of a Carl Zeiss LSM 310. Argon laser was the light source with emission maxima of 488 and 514 nm. A 15ml centrifugal tube was filled with the milk mixes used for the previous tests. The tube was left in a water bath at 43°C for 10 hours and then cooled to 5°C within 1 hour and let at 5°C (for 6-7 hours) until microscopic observation. The resulting gels were cut the next day and proteins stained with a 0.03% (w/v) Fast Green FCF (Sigma, Saint-Louis, Mo, USA) solution before microscopic observation. Excitation was performed at 488 nm and emission was recorded above 590 nm (adapted from Turgeon & Beaulieu, 2001).

### 5.4.2.3 Syneresis

Syneresis (adapted from Keogh & O’Kennedy, 1998) was measured on 6 centrifugal tubes filled with ~10ml of the solution previously used for dynamic oscillatory measurements in triplicate. Solutions were poured in the tubes right after the rheological measurements were started. Tubes were left in the same water bath used for CSLM. Tubes were left at 5°C (for 6-7 hours) until centrifugation (1600g, 10 min., 4°C). Syneresis liquid was carefully poured and weighted. Syneresis was calculated as follows:

$$\% \text{ syneresis} = \frac{\text{weight of syneresis liquid (g)}}{\text{weight of total solution (g)}} \times 100 \quad (5.1)$$

The series of experiments was performed following the same schedule each day to avoid time effects.

#### **5.4.2.4 Statistical analysis**

Analyse of variance according to a complete randomized factorial design was applied to determine the effect of different type of acid milk gels on the elastic modulus and syneresis values. The experiment was performed in triplicate. The statistical analyses were performed with general linear models procedure of SAS (SAS/STAT language, SAS Institute Inc, Cary, NC.)

## **5.5 Results**

SMP-base gel presented an intermediate elastic modulus ( $G'$ ) value of 273 Pa (Fig. 5.1) when compared to other gels for all PE (0.05, 0.1 and 0.2). A slight inflexion around 4 ks was observed during the time sweep test (Fig. 5.2). Addition of WPI into SMP-base gel reinforced the gel stiffness increasing  $G'$  for all pectin equivalents compared to SMP-base gel. However,  $G'$  values were statistically similar for the WPI lower (0.05 and 0.1 PE) and higher (0.1 and 0.2 PE) concentrations. An inflexion was also noticed around 4 ks for the lower WPI concentration (result not shown). Addition of pectin in SMP-base gels presented a different behaviour from WPI addition. Elastic moduli were equivalent for 0.05 and 0.1% pectin compared to SMP-base gel control (Fig. 5.1) while 0.2% did not allow gel formation demonstrated by the fluctuation of  $G'$  over time (Fig. 5.2). Incorporation of WPI and pectin (2:0.5 7.0) to SMP-base gels resulted in an increased elastic modulus for all pectin equivalent concentration compared to SMP-base gel (Fig. 5.1). A maximum  $G'$  was observed at 0.1% PE. At the lowest concentration of pectin equivalent (0.05%),  $G'$  value of the mixed 2:0.5 7.0-gel was slightly higher than the  $G'$  value of WPI-gel at the same concentration. At 0.2% PE,  $G'$  of the 2:0.5 7.0-gel was lower than  $G'$  of WPI-gel but higher than pectin-gel at the same PE concentration (Fig. 5.1). The rate of protein gelation was qualitatively faster as compared to all the other gels at identical pectin equivalent concentration (Fig. 5.2). When stabilized 2:0.5 4.5 complexes were added to milk,  $G'$  decreased as the PE was increased but showed an equivalent value to SMP-base gels at 0.1% PE (Fig. 5.1).

Confocal microscopic observations of the SMP-base gel presented an aggregated network with small pores within the clusters and large pores with no protein (Fig. 5.3(A)). Incorporation of WPI clearly increased the density and the connectivity of the network as the whey protein concentration increased (Fig. 5.3(B-D)). Keeping the total solid and protein concentration constant, increasing the whey/casein ratio led to the formation of smaller aggregates, a denser cross-linking of the network and smaller pores (Puvanenthiran, et al., 2002). Pectin at a concentration of 0.05% (Fig. 5.3(E)) had a structure similar to the SMP-base gel control. As pectin concentration is increased (Fig. 5.3(F, G)), the structure became more open thus, with larger pores. Denser and smaller clusters than the SMP-base gel control were observed with 0.1% pectin while higher concentration showed diffuse aggregation in clusters which were not homogenous. The microstructure of the 2:0.5 7.0-gel presented an intermediate behaviour between WPI-gel and pectin-gel. At the lowest mixed solution concentration (0.05% PE) (Fig. 5.3(H)), dense aggregated protein clusters were present showing large pores between clusters. This microstructure was still present at 0.1% PE with larger clusters (Fig. 5.3(I)). At 0.2% PE, the connectivity between protein aggregates was lessened and the microstructure demonstrated large undefined protein aggregates loosely connected (Fig. 5.3(J)). The stabilized mixed solution (2:0.5 4.5) led to a different microstructure. At 0.05% PE, microstructure can be related to the SMP-base gel and pectin-gel (Fig. 5.3(K vs A and E) with protein aggregates showing different pore size within the network structure. Adding 0.1% PE of the 2:0.5 4.5 revealed formation of protein clusters with loose protein aggregates connectivity within the clusters (Fig. 5.3(L)). As the PE is further increased, protein aggregates floated in the liquid phase. No cluster formation was observed and the connectivity between protein aggregates further decreased (Fig. 5.3(M)). The formation of a network was inhibited. Compared to pectin-gels for which proteins aggregates clusters were denser but with larger pores and thus less cross-linking throughout the gel, sample with stabilized complexes presented a more important cross-linking of protein aggregates in the whole “gel”.

Syneresis of most acid milk gels under study is equivalent to the SMP-base gel (Table 5.2) which has an average syneresis of 4.79%. WPI in acid milk gel increases syneresis at a level of 0.05% PE, compared to SMP-base gel, while higher concentrations are equivalent to SMP-base gel. It could be highlighted that the presence of WPI has a tendency to limit

syneresis as its concentration is increased. The presence of pectin in acid milk gels tended to enhance syneresis as pectin concentration increases. A significant difference is observed, compared to SMP-base gel only at 0.2% pectin. The 2-0.5 7.0-gel possess syneresis values equivalent to SMP-base gel for all PE concentration. The 2-0.5 4.5-gel tended to enhance syneresis with an increasing in PE concentration.

## 5.6 Discussion

Acid milk gels textural attributes rely among others on the total solid and protein concentration and both protein/total solid and whey/casein ratio (Sodini et al., 2004). Incorporation of WPI will affect the whey/casein ratio. As more WPI (low casein, high whey concentration) is added, SMP (high casein, low whey concentration) concentration decreases to maintain constant protein concentration. Whey and casein interaction in milk after a heat treatment is influenced by the initial pH of the solution (Anema et al., 2004; Vasbinder & de Kruif, 2003). At pH 6.5, the majority of denatured whey proteins (~70%) are associated to casein micelles (our SMP and lactose base had a pH around 6.5 before heat treatment). It is known that heated milk is a complex mixture of whey proteins, either native or denatured, and casein micelles in which the denatured whey protein aggregates associate with casein micelles or occur as independent aggregates. Whey proteins are known to link caseins and reinforce the casein network (Vasbinder et al., 2003). Results demonstrate that increasing whey protein concentration increases the rate of gelation but not the  $G'$  value when considering only the WPI-gel (Fig. 5.1  $G'$  after 10 hours). The increasing rate of gelation can be explained by the inclusion of denatured whey proteins in the network construction as their concentration is increase (Puvanenthiran et al., 2002). The elastic modulus can be related to both the number and strength of interacting particles (van Vliet & Keetels, 1995). Acid milk gels are acidified to pH 4.6 in order to obtain a gel network composed of caseins and whey proteins due to reduced electrostatic repulsion at pH close to the  $I_p$ . Increasing WPI or whey protein concentration increases the number of cross-linking in casein gels (Fig. 5.3(B-D)) but as pH is decreased below their isoelectric point ( $I_p$ ) of pH~5.0, a repulsion result as whey protein gain positive charges affecting the strength of the interacting particle.

Whey proteins affect the microstructure by making the network finer with smaller pores and should reduce the tendency to syneresis of the gels (Puvanenthiran et al., 2002). Different studies report an improvement of water retention capacity of acid milk gels with addition of whey proteins (Amatayakul et al., 2006a; Guzmán-González et al., 1999; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006) and/or related to increasing whey/casein ratio (Amatayakul et al., 2006a; Amatayakul et al. 2006b; Puvanenthiran et al., 2002). However, SMP-base gel syneresis is not lowered by addition of WPI in the present results. Before going further, the behaviour of SMP-base gel to limit considerably syneresis in this study has to be highlighted. Comparing to other researches, SMP syneresis could reach around 20-25% for about the same SMP concentration (Isleten & Karagul-Yuceer, 2006; Pereira et al., 2003). These authors measured the spontaneous syneresis that it to say the syneresis appearing due to gravitational forces only and without application of any external force which would increase the amount of whey expelled from the matrix (Lucey and Singh, 1998). In our research, addition of lactose to SMP would hinder syneresis. Schorsch et al. (2002) reported that sucrose prevents syneresis of micellar caseins by producing a finer and more homogenous network. In addition, lactose enhances the serum viscosity and decrease syneresis (Schkoda et al., 1997). Our results agree with Amatayakul et al. (2006b) who reported syneresis for set yoghurt formulation based on SMP and whey protein concentrate being around 4% for a casein-whey protein ratio of 4:1 and a total solid content of 14%.

Our result could be explained first by the analytical method used to measure syneresis which presented great variability within and between repetitions. This resulted in large standard errors of the means hiding significant differences between the samples. Syneresis is defined as the shrinkage (compaction or contraction) of a gel following breakage of stands and accompanied by expulsion of liquid (Lucey & Singh, 1998; Mellema et al., 2002). Syneresis is favoured by all conditions that promote aggregation while its rate is strongly related to the size of the gel pores. The very high wheying-off value for the 0.05% WPI-gel could come from the detachment of the gel from the tube wall (experimental observation) after shrinkage. Microstructure demonstrates the presence of many pores (Fig. 5.3(B)) and proteins aggregates which are dense and small and less interconnected than in the presence of more WPI. This structure is more prone to rearrangement and to syneresis than structure with small pores and more interconnections (Lee & Lucey, 2004). The

greater number of cross-linking from incorporation of WPI (higher  $G'$ ) compared to SMP-base gel could explain the shrinkage of the latter. In general, gels can rearrange over time due to incorporation of more particles into the network and/or due to the formation of extra bonds between them, reinforcing the strands (van Vliet, 2000). Acidification induces protein fusion, strand breakage and pore size variation and could be the explanation of the inflection of the SMP-base gel and WPI-gels (Auty et al., 2005). Investigation of the microstructure in this particular time region would need to be studied to highlight this behaviour.

Addition of a polysaccharide to protein favours segregative phase separation (or thermodynamic incompatibility) when both biopolymers carry like charges (Tolstoguzov, 1991). Girard et al. (2002a) have established to pH 6.0 the pH at which complexation starts between  $\beta$ -lactoglobulin-low-methoxyl pectin for a P-PS ratio of 4:1. As for casein-pectin interaction, they have been found to occur around pH 5.0-5.3 (Marozienne & de Kruif, 2000; Tuinier et al., 2002). Many factors could increase the incompatibility or segregative phase separation of protein and polysaccharides in the present system: (1) Protein denaturation and aggregation, after heating, increases incompatibility with pectin as depicted by the second principle of thermodynamics (Tolstoguzov, 1991), by increasing its molecular volume or size (Tolstoguzov, 1997; Syrbe et al., 1995); (2) Increasing either protein or pectin concentration and/or total solid concentration (Tolstoguzov, 1997) and (3) binding of calcium ions by pectin could change its conformation and reduce the number and the distribution of the charged groups in addition to increase viscosity of the . Segregative phase separation accelerates aggregation of protein (Capron et al., 1999; Croguennoc et al., 2001; Zhang & Foegeding, 2003) and concentrates protein, increasing  $G'$  (Bertrand & Turgeon, 2007; Tolstoguzov, 1995). Segregative phase separation is competing with gelation. The faster the gelation, the less time for phase separation to occur. Determination of the gel point (either  $\tan \delta < 1$  or the cross-over of  $G'$  and  $G''$ ) was not possible due to the immediate cross-linking of particles after GDL addition. Capron et al. (1999) noted that the more important is the segregative phase separation, the coarser is the network structure at the gel point. Addition of pectin increases solution's viscosity resulting in a decrease in the aggregation kinetic of protein systems (Schreiber, 2002) and thus, to a decreasing  $G'$ . The results could also be interpreted as a consequence of pectin electrostatic adsorption on



casein micelles and/or whey proteins. Both phenomena lead to the reduction of interconnectivity between protein aggregates clusters and the formation of larger pores as the pectin concentration is increased (Fig. 5.3(F-G)) result in a lack of water retention capacity from the network. Above a critical pectin concentration, the polysaccharide prevents the formation of the protein network (Fig. 5.3(G)) due to steric stabilization (Matia-Merino et al., 2004) or to electrostatic stabilization. A gel implies the formation of continuous network in order to trap liquid (Ziegler & Foegeding, 1990). This structure being absent at 0.2% pectin, wheying-off is inevitable. Gelation and microstructure of pectin-gel could be (1) a balance between phase separation and the kinetic of aggregation (or protein aggregation) (Croguennoc et al., 2001) which, in the former case increases and in the latter decreases with increasing pectin concentration affecting protein cross-linking density or (2) the result of pectin electrostatic adsorption on protein limiting the formation of the casein network.

In the presence of both whey protein and pectin (pH 7.0), the impact of whey protein (increasing whey protein/casein ratio) is retraced. The impact of pectin could be once again viewed in the two different ways explained for the pectin-gels. When pectin concentration is low enough, segregative phase separation or pectin electrostatic adsorption could be limited and restricts protein aggregation. As more pectin and WPI are added (0.1% PE),  $G'$  acquires the highest value due to both segregative phase separation or pectin adsorption and incorporation of whey protein in the gel network. The presence of additional whey protein, compared to the SMP-base gel or pectin-gels, increase the protein network density. However, pectin concentration of 0.2% in the presence of more WPI could limit protein aggregation due to high viscosity or to pectin electrostatic adsorption. The large pores observed by microscopy at 0.05 and 0.1% PE (Fig. 5.3(H-I)), could lead to extensive syneresis but the presence of a polysaccharide, or stabilizer, counteracts this behaviour by, among others, binding and increasing viscosity of the serum liquid (Tamine & Robinson, 1999).

The whey protein/casein ratio seems to play a dominant role in acid milk gel formation of our systems. The pectin-gel has a constant whey protein/casein ratio of 0.25 (Table 1) while the same ratio increases with increasing the WPI concentration in the 2-0.5 7.0-gel (0.27 to

0.37). For the same pectin concentration, these two gels behave differently if hypothesis is made on electroadsorption of pectin on proteins. Adsorption of pectin would hinder protein aggregation and hence reduce the  $G'$  (pectin-gel) or pectin molecules could be integrated into the protein network and increase the  $G'$  in the case of 2-0.5 7.0-gels (Harte et al., 2007). Thus, attention should be given to the whey protein/casein ratio.

Stabilizing mixed WPI-pectin solution before incorporation to the acid milk gels reveals that whey proteins do not play the same role as when they are not stabilized. Before the stabilizing heat treatment, pectin and whey protein at pH 5.0 are forming soluble complexes. Our previous work (chapter 4) highlights the formation of complexes for the system under study between pH 5.0 to 6.0 demonstrating that their number increases as pH decreases. Preliminary works (Gentès, 2007) studied the impact of a stabilizing heat treatment (65°C and 90°C, 2 min.) and pH of formation of WPI-pectin complexes (4.5-6.0) towards their dissociation following a pH readjustment (pH 7.0). Phase content determination allowed to establish that complexes (2-0.5 %w/w WPI-pectin) heat treated (90°C, 2 min.) at pH 4.5 and readjusted to pH 7.0 led to a partial stabilization. We assumed that the heat treatment brought a stabilization of the complexes and limited the aggregation of the free or uncomplexed whey proteins. Kazmierski et al. (2003) observed a similar behaviour after a pH readjustment (to pH 6.0) of a system of  $\beta$ -lactoglobulin-modified high-methoxyl pectin pH 3.8 heated at 90°C for 20 minutes. They concluded that the insoluble protein-polysaccharide complexes were strongly associated by heating without further explanation. It could be mentioned that the strength of protein-polysaccharide interaction is related to the number and distribution of the charged sites in addition to the overall charge of the protein (Ledward, 1994). The presence of amide groups on the pectin reinforces protein-polysaccharide interaction as both hydrogen bonds and electrostatic interactions can take place (Einhorn-Stoll et al., 2001).

Incorporation of stabilized complexes affects differently the behaviour of acid milk gels. The decreasing  $G'$  following addition of stabilized complexes (Fig. 5.1) could result from the reduction of WPI integration to the gelled network. WPI increases the elastic modulus as observed previously and the presence of a polysaccharide is the result of segregative phase separation or electrostatic adsorption thus resulting in an improvement of the elastic

modulus of the SMP-base gel. Many factors would lead to a decreasing  $G'$  for stabilized complexes: (1) the milk mix's pH (<6.4 because complexes were added at pH 4.5 without further pH readjustment) before the heat treatment for gelation results in more denatured whey protein aggregates formation interacting with the casein micelles decreasing the number of contact point in the network and thus,  $G'$  (Anema, et al., 2004; Schorsch et al., 2001); (2) The double heat treatment of the stabilized complexes (firstly for stabilization and secondly for milk preparation) could lead to extensive protein denaturation and aggregation and end up to the same conclusion as the first point; (3) complexed and stabilized whey proteins would not participate to the acid milk gel network as they are constricted in the pectin molecular structure; (4) complexed pectin molecules could not adsorb on protein forming the network; (5) free pectin could create steric hindrance (Matia-Merino et al.; 2004) or electrostatic stabilization and limit protein aggregation (Ibanoglu, 2005; Ledward, 1979); (6) the viscosity induced by the presence of free polysaccharide decreases protein kinetic aggregation rate (Schreiber, 2002). More investigation would need to be done on the composition of the complexes, especially for their native and denatured whey protein proportion, before, during and after the stabilizing heat treatment. To summarize: pectin integrated first into stabilized complexes could not be integrated into the network, more whey proteins are denatured and/or form aggregates and/or protein aggregation is limited either by the complexation of WPI and pectin or by the increased viscosity induced by the polysaccharide. When increasing the number of denatured whey proteins aggregates in presence of casein micelles, a reduction in the network junction zones as been demonstrated by Anema, et al. (2004) and Schorsch et al. (2001). Whey protein aggregates would only interact with casein micelles leading to a network made of whey protein aggregates-casein complexes while the presence of soluble denatured whey protein (or non interacting particles) allows multiple interactions i.e. with themselves, with casein micelles and between casein micelles. Cross-linking of protein aggregates forming the clusters is weak compared to the unstabilized mixed solution. The loose aggregation of protein in clusters reveals more pores than the mixed 2:0.5 7.0-gels (for all PE concentration) and had a tendency to increase syneresis.

## **5.7 Conclusion**

The behaviour of protein and polysaccharide complexes diverges from the impact of their individual components on gel rheological properties and microstructure. Complexation and stabilization would limit aggregation of denatured whey protein and/or restrict their interaction with other protein of the network. A lower cross-linking density is observed through the lower elastic modulus as well as on the microstructure which is more opened with loose connection between protein aggregates.

## **5.8 Acknowledgments**

NSERC and Parmalat Canada are acknowledged for their financial support on protein-polysaccharide study and Anne-Françoise Allain, Gaétan Desnoyers and Bernard for their technical support. This work couldn't have been realized without the help of Julie Parent.

Table 5.1 Protein and lactose concentration and whey protein/casein ratio present in the milk mixes.

<b>Milk mix</b>	<b>EP</b>	<b>lactose</b>	<b>SMP</b>	<b>WPI</b>	<b>WP/casein</b>
2-0.5 4.5	0.2	6.56	7.75	0.878	0.37
	0.1	5.84	9.04	0.439	0.30
	0.05	5.48	9.68	0.219	0.27
2-0.5 7.0	0.2	6.56	7.75	0.878	0.37
	0.1	5.84	9.04	0.439	0.30
	0.05	5.48	9.67	0.219	0.27
Bipro	0.2	6.76	7.75	0.878	0.37
	0.1	5.93	9.04	0.439	0.30
	0.05	5.52	9.68	0.219	0.27
Pectin	0.2	4.91	10.31	0	0.25
	0.1	5.01	10.31	0	0.25
	0.05	5.06	10.31	0	0.25
Skim milk powder		5.120	10.318		0.25

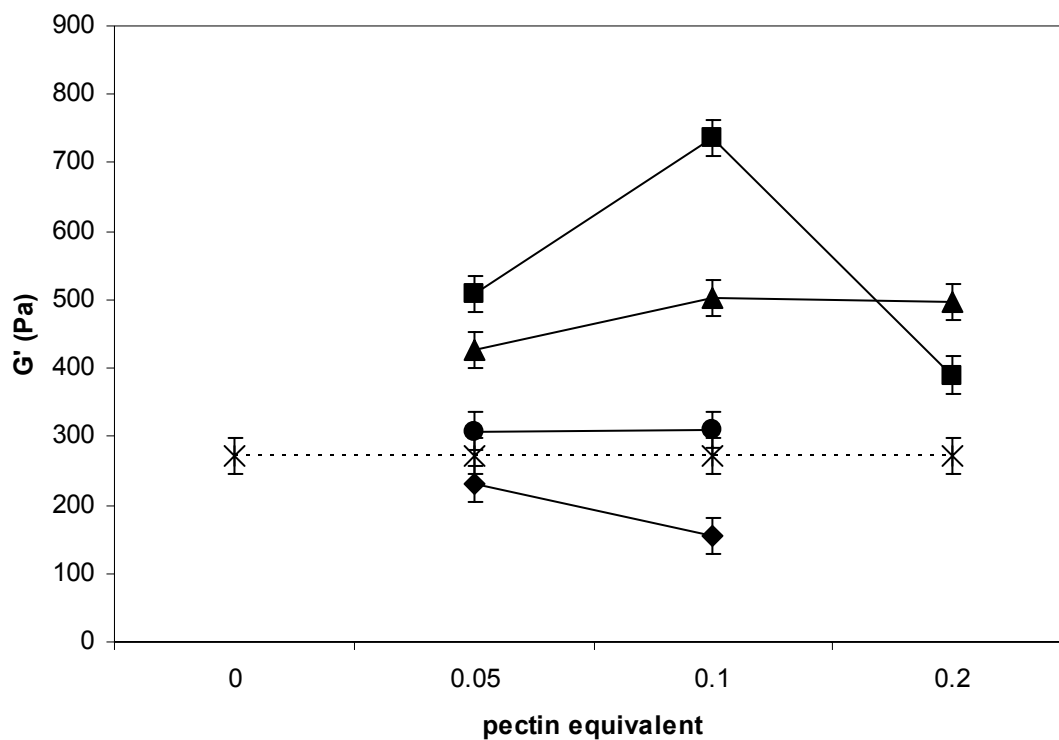


Figure 5.1 Elastic modulus ( $G'$ ) of acid gels as a function of “pectin equivalent”. The reported  $G'$  value corresponds to the final value recorded at the end of the 10 hour-dynamic time sweep test. Skim milk powder-base gel (×), Whey protein isolate (WPI)-gel (▲), pectin-gel (●), WPI:pectin ratio 2:0.5 pH 7.0 (■) and 2:0.5 pH 4.5 (◆). Error bars represent the standard error or the means.

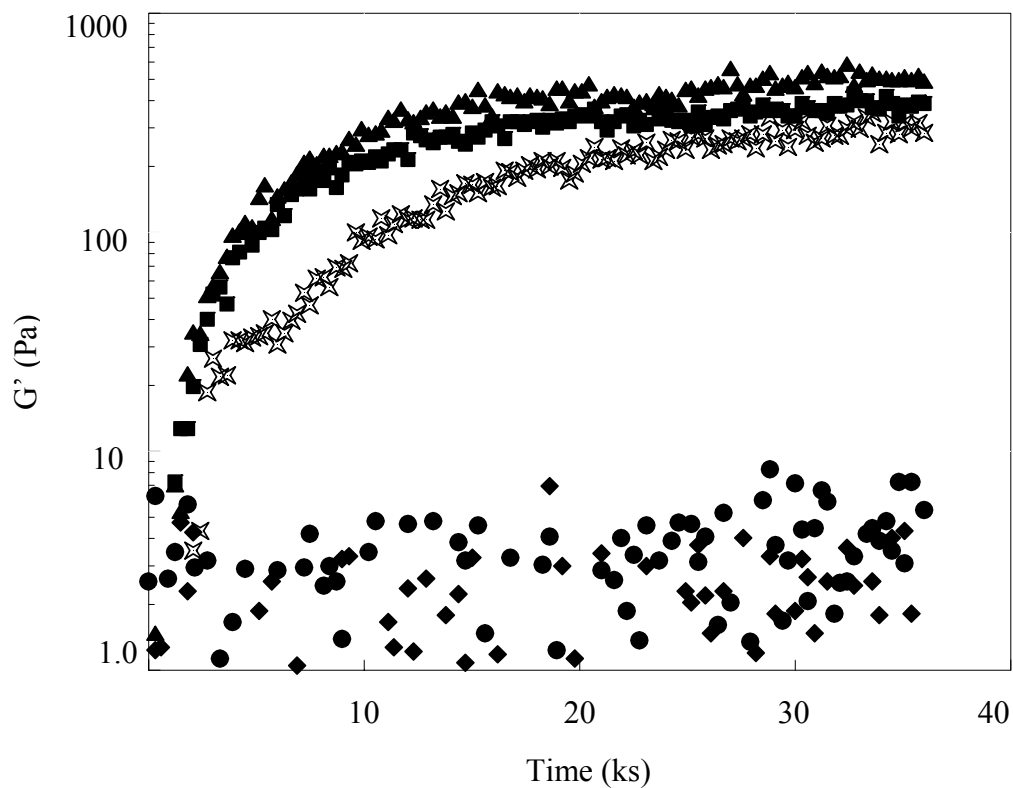


Figure 5.2 Elastic modulus ( $G'$ ) of acid milk gels incorporating 0.2% pectin or “pectin equivalent”. Skim milk powder-base gel ( $\star$ ), Whey protein isolate (WPI)-gel ( $\blacktriangle$ ), pectin-gel ( $\bullet$ ), WPI:pectin ratio 2:0.5 pH 7.0 ( $\blacksquare$ ) and 2:0.5 pH 4.5 ( $\blacklozenge$ ).

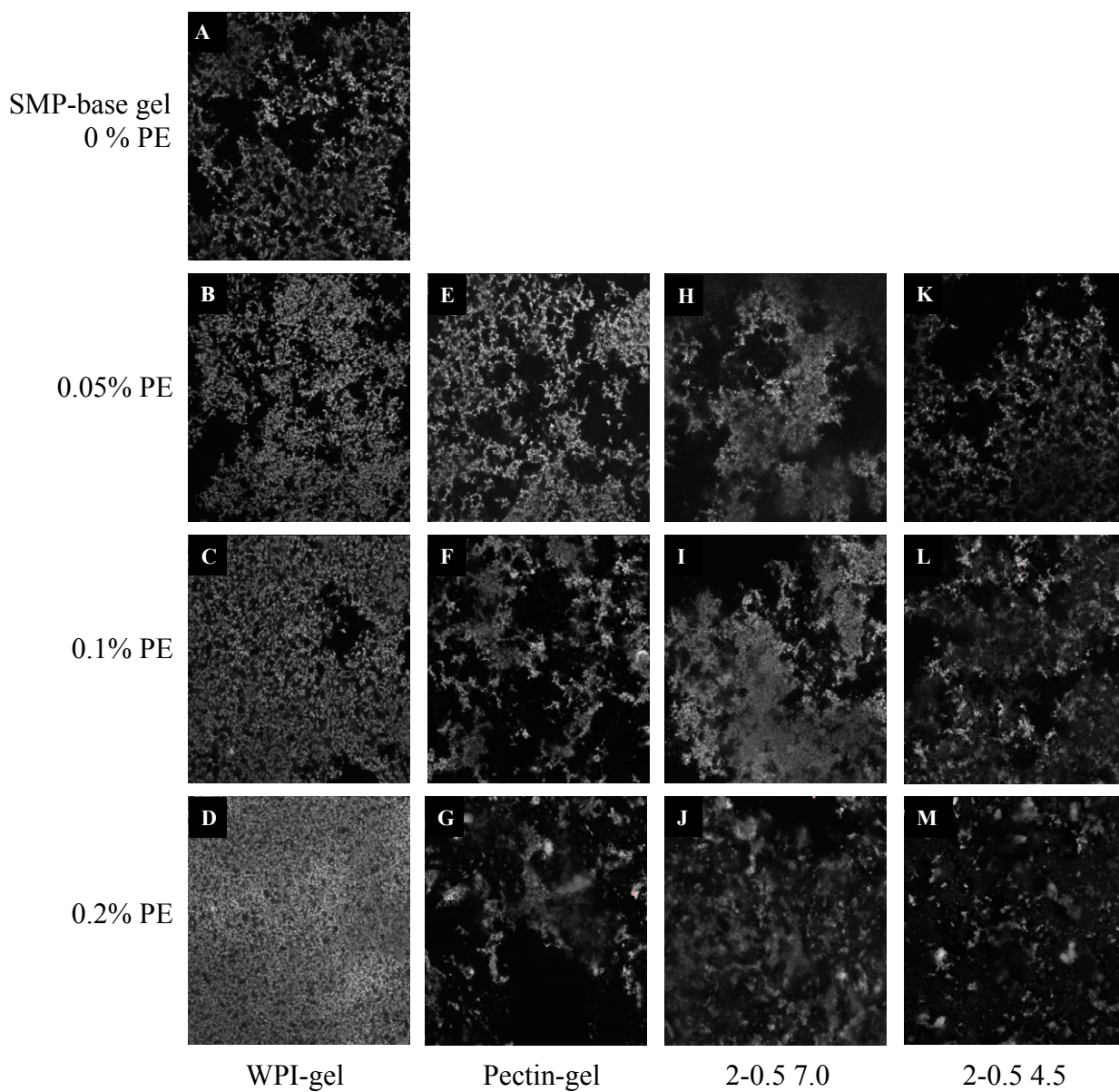


Figure 5.3 CSLM observation of acid milk gels. Light zones refer to proteins while dark zones to other components. Skim milk powder (SMP)-base gel (A) 15% total solid and 3.5% protein invariable control, whey protein isolate (WPI)-gel (B-D), pectin-gel (E-G), WPI:pectin ratio 2:0.5 pH 7.0 (H-J) and 2:0.5 pH 4.5 (K-M). Pectin equivalent (PE) 0.05% (B, E, H, K) 0.1% (C, F, I, L), 0.2% (D, G, J, M). Magnification 100X.



Table 5.2 Syneresis of acid milk gels.

<b>Acid milk gel</b>	<b>Pectin equivalent</b>	<b>Syneresis % <math>\pm</math> 3.08<sup>1</sup></b>
<b>Skim milk powder base gel (SMP)</b>	0.00	4.79 <sup>BCD</sup>
<b>Whey protein isolate (WPI)</b>	0.05	13.17 <sup>B</sup>
	0.10	8.88 <sup>BCD</sup>
	0.20	2.44 <sup>D</sup>
<b>Pectin</b>	0.05	2.89 <sup>CD</sup>
	0.10	11.49 <sup>BC</sup>
	0.20	28.89 <sup>A</sup>
<b>2:0.5 7.0<sup>2</sup></b>	0.05	1.89 <sup>D</sup>
	0.10	2.38 <sup>D</sup>
	0.20	2.85 <sup>CD</sup>
<b>2:0.5 4.5<sup>3</sup></b>	0.05	5.58 <sup>BCD</sup>
	0.10	8.86 <sup>BCD</sup>
	0.20	13.55 <sup>B</sup>

<sup>1</sup> Standard error of the means

<sup>2</sup> WPI:pectin ratio of 2:0.5 at pH 7.0

<sup>3</sup> Stabilized complex for a WPI:pectin ratio of 2:0.5 at pH 4.5

## Chapitre 6 Conclusion

Le travail présenté dans cette thèse a permis d'atteindre le but visé soit d'améliorer la compréhension reliée aux nouvelles fonctionnalités des systèmes mixtes P-PS. Chacun des paramètres extrinsèques contrôlés a permis de mettre en évidence leur importance sur le comportement des solutions mixtes et sur la formation de complexes solubles de même que sur l'amélioration des propriétés fonctionnelles résultantes permettant de confirmer notre hypothèse.

Le contrôle des facteurs externes (pH, concentration en solides totaux et ratio P-PS) a conduit à la formation de solutions mixtes exemptes de séparation de phases ségrégative. Aux pH supérieurs au point isoélectrique les solutions sont cosolubles ou forment des complexes solubles. Les résultats obtenus permettent de confirmer que les solutions mixtes ne présentent pas de séparation de phases ségrégative. En acidifiant, plus près du  $I_p$ , la formation de complexes solubles a été décelée directement par mesure d'absorbance et indirectement par mesures de viscosité. L'application d'un traitement de chaleur de même que l'augmentation de la force ionique ont contribué à basculer vers des conditions de séparation de phases ségrégative.

L'état des solutions mixtes a généré diverses propriétés fonctionnelles distinctes de celles des biopolymères témoins. Dépendamment des solutions mixtes, des effets antagonistes et synergiques ont été observés sur les propriétés fonctionnelles. Les effets antagonistes sur la viscosité en solution diluée proviennent, entre autres, de la diminution de la taille et de la charge de la pectine suite à la formation de complexes solubles. Sur les propriétés gélifiantes, une séparation de phases ségrégative excessive, la formation de complexes *in situ* ou la présence de complexes stabilisés thermiquement préalablement à leur incorporation diminuent la densité du réseau protéique et conséquemment la fermeté des gels.

Des effets synergiques ont été notés sur la viscosité en solution concentrée suite à la présence de complexes en solution qui augmenteraient la taille de la molécule de pectine. L'augmentation de la fermeté des gels protéiques provient quant à elle de la présence d'une

séparation de phases ségrégative provoquant la concentration en protéines sans toutefois inhiber la formation du réseau protéique.

La viscosité induite par la présence d'un polysaccharide est un facteur extrinsèque important qui influence l'état des solutions mixtes. La viscosité affecte la vitesse de séparation de phases, la formation du réseau gélifié et donc les propriétés des gels résultant.

La formation et l'utilisation de complexes solubles représentent un défi. L'obtention de ces complexes prend place sur des plages restreintes de conditions environnementales et dépend également des biopolymères utilisés. L'étude de leur fonctionnalité devient donc difficile. Ce facteur est aussi limitant pour leur utilisation d'où l'importance de mettre au point des conditions optimales de complexation et de stabilisation. L'utilisation de traitement thermique a été une alternative étudiée dans ce travail cependant, le chauffage favorise l'agrégation et résulte en des complexes (ou agrégats) de grande taille, modifiant leurs fonctionnalités. De plus, la vérification de l'intégrité des complexes dans différentes conditions (pH et force ionique élevés) est difficile à mesurer par des dosages. Pour en arriver à l'application des complexes dans les aliments, leur stabilité dans des conditions industrielles devra être démontrée.

Plusieurs défis restent à relever dans l'univers des systèmes mixtes protéines-polysaccharides. L'ultime compréhension viendrait de la visualisation indépendante des deux polymères. Toutefois, les méthodes de microscopie impliquent présentement l'ajout de ligands qui ont pour conséquence d'affecter les interactions P-PS. Les méthodes analytiques requièrent l'utilisation de solutions diluées pour l'étude fondamentale des solutions mixtes cependant, cette situation n'est pas le reflet du monde industriel. Aucune étude ne s'est attardée au rôle systématique de la concentration en polysaccharide dans la formation de complexes. Est-ce que la l'atteinte de la concentration critique  $C^*$  induit une séparation de phases ségrégative ou mène plutôt à la formation de complexes de plus grande taille et/ou de plus haut poids moléculaire produisant de nouvelles propriétés fonctionnelles?

## Bibliographie

- Aguilera, J.M. & Kessler, H.G. (1989). Properties of mixed and filled-type dairy gels. *Journal of Food Science*, 54, 1213-1217.
- Amatayakul, T., Sherkat, F. & Shah, N.P. (2006a). Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. *Food Hydrocolloids*, 20, 314-324.
- Amatayakul, T., Sherkat, F. & Shah, N.P. (2006b). Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. *Food Hydrocolloids*, 20, 314-324.
- Anema, S.G., Lee, K.S., 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.
- Arltoft, D., Ipsen, R., Madsen, F. & de Vries, J. (2007). Interactions between carrageenan and milk proteins: A microstructural and rheological study. *Biomacromolecules*, 8, 729-736.
- Auty, M.A.E., O'Kennedy, B.T., Allan-Wojtas, P. & Mulvihill, D.M. (2005). The application of microscopy and rheology to study the effect of milk salt concentration on the structure of acidified micellar casein systems. *Food Hydrocolloids*, 19, 101-109.
- Barbut, S. (1995). Effect of sodium level on the microstructure and texture of whey protein isolate gels. *Food research international*, 28(5), 437-443.
- Bazinet, L., Trigui, M. & Ippersiel, D. (2004). Rheological behaviour of WPI dispersion as a function of pH and protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5366-5371.
- Beaulieu, M., Turgeon, S.L. & Doublier, J.-L. (2001). Rheology, texture and microstructure of whey proteins/pectin mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*, 11, 961-967.
- Bertrand, M.-E. & Turgeon, S.L. (2007). Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 21, 159-166.
- Bourne, M.C. (2002). Physics and texture. Dans : *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement* (pp.59-106) (2<sup>nd</sup> edition). London, San Diego : Academic Press.

- Bourriot, S., Garnier, C. & Doublier, J.-L. (1999). Phase separation, rheology and structure of micellar casein-galactomannan mixtures. *International Dairy Journal*, 9, 353-357.
- Boye, J.I., Alli, I. & Ismail, A.A. (1997). Use of differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy in the study of thermal and structural stability of  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 1116-1125.
- Brownsey, G.J. & Morris, V.J. (1988). Mixed and filled gels-models for foods. Dans : J.M.V. Blanshard & J.R. Mitchell, *Food Structure-Its Creation and Evaluation* (pp.7-23). Butterworths : London.
- Bryant, C.M. & McClements, D.J. (2000). Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids*, 14, 383-390.
- Cai, R. & Arntfield, S.D. (1997). Thermal gelation in relation to binding of bovine serum albumin-polysaccharide systems. *Journal of Food Science*, 62(6), 1129-1134.
- Camesano, T.A. & Wilkinson, K.J. (2001). Single molecule study of xanthan conformation using atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, 2, 1184-1191.
- Capron, I., Nicolai, T. & Durand, D. (1999). Heat induced aggregation and gelation of  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of  $\kappa$ -carrageenan, *Food Hydrocolloids*, 13, 1-5.
- Caussin, F. & Bouhallab, S. (2004). Environnement minéral et propriétés fonctionnelles des protéines sériques. Dans : F. Gaucheron, *Minéraux et produits laitiers* (pp.343-390). Paris : TEC & DOC.
- Cayot, P. & Lorient, D. (1998). Rappel sur la composition globale du lait de vache. Dans : P. Cayot, *Structures et technofonctions des protéines du lait* (pp.15-23). Paris : Airlait Recherches: TEC & DOC-Lavoisier.
- Chantrapornchai, W. & McClements, D.J. (2002). Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 16, 467-476.
- Cheng, L.J., Augustin, M.A. & Clarke, P.T. (2000). Yogurts from skim milk-whey protein concentrate blends. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(2), 110.
- 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, 537-545.
- Clark, A.H. (1987). The application of network theory to food systems. Dans : J.M.V. Blanshard & P. Lillford, *Food Structure and Behaviour* (pp.113-34). Florida : Academic Press.

- Clegg, S.M. (1995). Thickeners, gels and gelling. Dans : S.T. Beckett, *Physico-chemical Aspects of Food Processing* (pp.117-141). Glasgow : Blackie Academic & Professionnal.
- Conway, B.E. & Dobry-Duclaux, A. (1960). Viscosity of suspensions of electrically charged particles and solutions of polymeric electrolytes. In: F.R. Eirich, *Rheology*, (vol.3) (pp.83-120). New York: Academic Press.
- Croguennoc, P., Nicolai, T. & Durand, D. (2001). Phase separation and association of globular protein aggregates in the presence of polysaccharides: 2. Heated mixtures of native  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -carrageenan. *Langmuir*, 17, 4380-4385.
- Cros, S., Garnier, C., Axelos, M.A.V., Imberty, A. & Pérez, S. (1996). Solution Conformations of pectin polysaccharides: Determination of chain characteristics by small angle neutron scattering, viscometry, and molecular modeling. *Biopolymers*, 39, 339-352.
- de Kruif, C.G. & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15, 555-563.
- de Kruif, C.G., Weinbreck, F. & de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 340-349.
- de Vries, R. (2004). Monte Carlo simulations of flexible polyanions complexing with whey proteins at their isoelectric point. *Journal of Chemical Physics*, 120(7), 3475-3481.
- de Wit, J.N., Hontelez-Backx, E. & Adamse, M. (1988). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 3. Functional properties in aqueous solution. *Netherland Milk Dairy journal*, 42,155-172.
- de Wit, J.N. (1989). Functional properties of whey proteins. Dans : P.F. Fox, *Developments in Dairy Chemistry* (Vol.4) (pp. 285-321). New York : Elsevier Applied Science.
- de Wit, J.N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81, 597-608.
- Dickinson, E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 347-354.
- Dickinson, E. & McClements, D.J. (1996). Protein-Polysaccharide interactions. Dans: E. Dickinson, & D.J. McClements, *Advances in Food Colloids* (pp. 81-101). Glasgow: Blackie Academic & Professional an imprint of Chapman & Hall.
- Dill, K.A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29, 7133-7155.

- Doi, E. (1993). Gels and gelling of globular proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 4, 1-5.
- Donovan, M. & Mulvihill, D.M. (1987). Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11, 87-100.
- Doublier, J.-L., Garnier, C., Renard, D. & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 202-214.
- Dubin, P.L. & Oteri, R. (1983). Association of polyelectrolytes with oppositely charged micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 95(2), 453-461.
- Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y. & Boury, F. (2004). Evidence and characterization of complex coacervates containing plain proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A*, 232, 239-247.
- Dufour, E. (2004). Structure des protéines solubles majeures. Dans : *Minéraux et Produits Laitiers* (pp.151-177). Paris : Lavoisier.
- Dumay, E., Laligant, A., Zasytkin, D. & Cheftel, J.C. (1999). Pressure- and heat-induced gelation of mixed  $\beta$ -lactoglobulin/polysaccharide solutions: scanning electron microscopy of gels. *Food Hydrocolloids*, 13, 339-351.
- Einhorn-Stoll, U., Salazar, T., Jaafar, B. & Kunzek, H. (2001). Thermodynamic compatibility of sodium caseinate with different pectins. Influence of the milieu conditions and pectin modifications. *Nahrung/Food*, 45(5), 332-337.
- Foegeding, E.A. (2005). Rheology, structure and texture perception in food protein gels. Dans : E. Dickinson, *Food Colloids: Interactions, Microstructure and Processing* (pp.3-15). The Royal Society of Chemistry : Cambridge.
- Fox, P.F. (1989). The milk protein systems. Dans : *Developments in dairy chemistry-4* (pp.1-53). New York : Applied science publishers.
- Fox, P.F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. Dans : P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins* (3<sup>e</sup> édition, pp.1-48). New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Ganz, J.A. (1974). How cellulose gum reacts with proteins. *Food Engineering*, June, 67-69.
- García-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A. & Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18, 549-579.
- Gentès, M.-C. (2007). *Application de complexes formés de pectine et d'isolat de protéines sériques dans la formulation de yogourts brassés*. Mémoire, Université Laval, Québec, Canada.

- Girard, M., Turgeon, S.L. & Gauthier, S.F (2002a). Interbiopolymer complexing between  $\beta$ -lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. *Food Hydrocolloids*, 16, 585-591.
- Girard, M., Turgeon, S.L. & Paquin, P. (2002b). Emulsifying properties of whey protein-carboxymethylcellulose complexes. *Journal of Food Science*, 67(1), 113-119.
- Girard, M., Turgeon, S.L. & Gauthier, S.F (2003a). Quantification of the interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and pectin capillary electrophoresis analysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 6043-6049.
- Girard, M., Turgeon, S.L. & Gauthier, S.F (2003b). Thermodynamic parameters of  $\beta$ -lactoglobulin-pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 4450-4455.
- Girard, M., Sanchez, C., Laneuville, S.I., Turgeon, S.L. & Gauthier, S.F. (2004). Associative phase separation of  $\beta$ -lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35, 15-22.
- Grinberg, V. Y. & Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11(2), 145-158.
- Guinee, T.P., Mullins, C., Reville, W.J. & Cotter, M.P. (1995). Physical properties of stirred-curd unsweetened yoghurts stabilised with different dairy ingredients. *Milchwissenschaft*, 50(4), 196-200.
- Guzmán-González, M., Morais, F., Ramos, M. & Amigo, L. (1999). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1117-1122.
- Guzmán-González, M., Morais, F. & Amigo, L. (2000). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low-fat set-type yoghurt model system. Use of caseinates, co-precipitate and blended dairy powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 433-438.
- Harding, S. (1997). The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. *Progress in biophysics and molecular biology*, 68(2/3), 207-262.
- Harte, F. M., Montes, C., Adams, M. & San Martin-Gonzalez, M.F. (2007). Solubilized micellar calcium induced low methoyl-pectin aggregation during milk acidification. *Journal of Dairy Science*, 90, 2705-2709.



- Harwalkar, V.R. & Kalab, M. (1986). Relationship between microstructure and susceptibility to syneresis in yogurt made from reconstituted nonfat dry milk. *Food Microstructure*, 5, 287-294.
- Hermansson, A.-M. (1986). Water- and fat holding. Dans : J. R. Mitchell & D. A. Ledward, *Functional properties of food macro-molecules* (pp. 273). New York : Elsevier Applied Science.
- Horne, D.S. (1998). Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8, 171-177.
- Horne, D.S. (1999). Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 9, 261-268.
- Hunter, R.J. (2001a). Nature of colloidal dispersions. Dans : *Foundations of Colloid Science* (2<sup>e</sup> edition) (pp. 1-43). New York : Oxford University Press.
- Hunter, R.J. (2001b). Electrokinetics and zeta potential. Dans : *Foundations of Colloid Science* (2<sup>e</sup> edition) (pp. 373-433). New York : Oxford University Press.
- Hunter, R.J. (2001c). Double layer interaction and particle coagulation. Dans: *Foundations of Colloid Science* (2<sup>e</sup> edition) (pp. 581-637). New York: Oxford University Press.
- Ibanoglu, E. (2005). Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. *Food Chemistry*, 90, 621-626.
- Imeson, A.P., Ledward, D.A. & Mitchell, J.R. (1977). On the nature of the interactions between some anionic polysaccharides and proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 669-672.
- Isleten, M & Karagul-Yuceer, Y. (2006). Effects of dried dairy ingredients on physical and sensory properties of nonfat yogurt. *Journal of Dairy Science*, 89, 2865-2872.
- Ju, Z.Y. & Kilara, A. (1998). Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates. *Journal of Food Science*, 63(2), 288-292.
- Kalab, M, Emmons, B.D. & Sargant, A.G. (1975). Milk gel structure. IV. Microstructure of yogurts in relation to the presence of thickening agents. *Journal of Dairy Research*, 42, 453-458.
- Kang, K. S. & Pettitt, D. J. (1992). Xanthan, Gellan, Wellan & Rhamsan. Dans: R.L. Whistler & J.N. BeMiller, *Industrial Gums : Polysaccharides and Their Derivatives*, 3<sup>e</sup> édition (pp. 341-397). New York : Academic Press.
- Kavanagh, G.M. & Ross-Murphy, S.B. (1998). Rheological characterization of polymer gels. *Progress in Polymer Science*, 23, 533-562.

- Kazmierski, M, Wicker, L. & Corredig, M. (2003). Interactions of  $\beta$ -lactoglobulin and high-methoxyl pectins in acidified systems. *Journal of Food Science*, 68(5), 1673-1679.
- Keogh, M.K. & O'Kennedy, B.T. (1998). Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. *Journal of Food Science*, 63(1), 108-112.
- Kinsella, J.E. & Whitehead, D.M. (1989). Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33, pp. 343-438.
- Kinsella, J.E., Whitehead, J.B. & Bringe, N.A. (1989). Milk proteins: possible relationships of structure and function. Dans : P.F. Fox, *Developments in dairy chemistry* (vol. 4) (pp.55-95). New York : Elsevier Applied Science.
- Lagoueyte, N. & Paquin, P. (1998). Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 12, 365-371.
- Laneuville, S.T., Paquin, P. & Turgeon, S.L. (2000). Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein-xanthan gum complexes. *Food Hydrocolloids*, 14(4), 305-314.
- Laneuville, S.I., Sanchez, C., Turgeon, S.L., Hardy, J. & Paquin, P. (2005). Small-angle static light-scattering study of associative phase separation kinetics in  $\beta$ -lactoglobulin+ xanthan gum mixtures under shear. Dans : E. Dickinson, *Food Colloids: Interactions, Microstructure and Processing* (pp.443-465). The Royal Society of Chemistry : Cambridge.
- Lankes, H., Ozer, H.B. & Robinson, R.K. (1998). The effect of elevated milk solids and incubation temperature on the physical properties of natural yogurt, *Milchwissenschaft*, 53, 510-513.
- Lapasin, R. & Prici, S. (1995). The polysaccharides: Sources and structure. Dans : *Rheology of Industrial Polysaccharides : Theory and Application* (pp.1-133). Grande-Bretagne : Blackie Academic & Professionnal.
- Launay, B., Cuvelier, G. & Martinez-Reyes, S. (1984). Xanthan gum in various solvent conditions : Intrinsic viscosity and flow properties. Dans : G.O. Phillips, D.J. Wedlock & P.A. Williams, *Gums and Stabilisers for the Food Industry 2: Applications of Hydrocolloids* (pp.79-98). New York : Pergaman Press.
- Ledward, D.A. (1979). Protein-polysaccharide interactions. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 12(1), A-16-A16.
- Ledward, D.A. (1994). Protein-polysaccharide interactions protein. Dans : N.S. Hettiarachchy & G.R. Ziegler, *Protein functionality in food systems* (pp.225-259). IFT basic-symposium series. New York : Marcel Dekker Inc.

- Lee, H.-C. & Brant, D.A. (2002). Rheology of concentrated isotropic and anisotropic xanthan solutions : 3. Temperature dependence. *Biomacromolecules*, 3, 742-735.
- Lee, W.-J. & Lucey, J.A. (2004). Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yogurt: effects of heating temperature and incubation temperature. *Journal of Texture Studies*, 34, 515-536.
- Le Hénaff, S. (1996). *Microparticules de complexes de protéines de lactosérum et de xanthane comme substitut de matière grasse : mise en place du protocole de fabrication et fonctionnalité dans une émulsion modèle allégée*. Thèse, Université Laval, Québec, Canada.
- Li, H., Harding, C.C. & Foegeding, E.A. (1994). NMR studied of thermal denaturation and cation-mediated aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 2411-2420.
- Lucey, J.A, Tet Teo, C., Munro, F.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, J.A. & Singh, H. (1998). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 30(7), 529-542.
- Lucey, J.A. (2001). The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. *Food Hydrocolloids*, 15, 603-608.
- Lucey, J.A. (2002). Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85 (2), 281-294.
- Marozziene, A. & de Kruif, C.G. (2000). Interaction of pectin and casein micelles. *Food Hydrocolloids*, 14, 391-394.
- Matia-Merino, L., Lau, K. & Dickinson, E. (2004). Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. *Food Hydrocolloids*, 18, 271-281.
- Mattison, K.W., Brittain, I.J. & Dubin, P.L. (1995). Protein-polyelectrolyte phase boundaries. *Biotechnology Progress*, 11, 632-637.
- Mattison, K.W, Wang, Y., Grymonpré, K & Dubin, P.L. (1999). Micro- and macro-phase behavior in protein-polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Symposia*, 140, 53-76.
- McGuffey, M.K. & Foegeding, E.A. (2001). Electrostatic effects on physical properties of particulate whey protein isolate gels. *Journal of Texture Studies*, 32, 285-305.

- McNeely, W.H. & Kang, K.S. (1973). Xanthan and some other biosynthetic gums. Dans : R.L. Whistler and J.N. BeMiller, *Industrial Gums: polysaccharides and their derivatives* (pp. 473-497). New York : Academic Press.
- Mekhloufi, G., Sanchez, C., Renard, D., Guillemin, S. & Hardy, J. (2005). pH-induced structural transitions during complexation and coacervation of  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum. *Langmuir*, 21, 386-394.
- Mellema, M., Walstra, P., van Opheusden, J.H.J. & van Vliet, T. (2002). Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloids and Interface Science*, 98, 25-50.
- Mewis, J. & Macosko, C.W. (1994). Rheology of polymeric liquids. Dans : C.W. Macosko, *Rheology: Principles, Measurements and Applications* (pp.475-514). Wiley-VCH : Toronto.
- Mleko, S., Li-Chan, E.C.Y. & Pikus, S. (1997). Interactions of  $\kappa$ -carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. *Food Research International*, 30(6), 427-433.
- Mleko, S. & Foegeding, E.A. (1999). Formation of whey protein polymers: effects of a two-step heating process on rheological properties. *Journal of Texture Studies*, 30, 137-149.
- Mulvihill, D.M. & Kinsella, J.E. (1988). Gelation of  $\beta$ -lactoglobulin : Effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels.. *Journal of Food Science*, 53, 231-236.
- Nacer, A., Sanchez, C., Villaume, C., Mejean, L. & Mouecoucou, J. (2004). Interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and pectins during *in Vitro* gastric hydrolysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 355-360.
- Nishinari, K., Zhang, H. & Ikeda, S. (2000). Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 195-201.
- Olsson, C., Langton, M. & Hermansson, A-M. (2002). Dynamic measurements of  $\beta$ -lactoglobulin structures during aggregation, gel formation and gel bread-up in mixed biopolymer systems. *Food Hydrocolloids*, 16, 477-488.
- Ould Eleya, M.M & Turgeon, S.L. (2000). The effects of pH on the rheology of  $\beta$ -lactoglobulin/ $\kappa$ -carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 14, 245-251.
- Parker, R., Noel, T.R, Brownsey, G.J., Laos, K. & Ring, S.G. (2005). The nonequilibrium phase and glass transition behavior of  $\beta$ -lactoglobulin. *Biophysical Journal*, 89(2), 1227-1236.

- Pelletier, E., Viebke, C., Meadows, J. & Williams, P.S. (2001). A rheological study of the order-disorder conformational transition of xanthane gum. *Biopolymers*, 59, 339-346.
- Pereira, R.B., Singh, H., Munro, P.A. & Luckman, M.S. (2003). Sensory and instrumental textural characteristics of acid milk gels. *International Dairy Journal*, 13, 655-667.
- Pike, A.C., Brew, K. & Acharya, K.R. (1996). Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine alpha-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure*, 4, 691-703.
- Plucknett, K.P., Pomfret, S.J., Normand, V., Ferdinando, D., Veerman, C., Frith, W.J. & Norton, I.T. (2001). Dynamic experimentation on the confocal laser scanning microscope: application to soft-solid, composite food materials. *Journal of Microscopy*, 201(2), 279-290.
- Puvanenthiran, A., Williams, R.P.W. & Augustin, M.A. (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 12, 383-391.
- Qin, B.Y., Bewley, M.C., Creamer, L.K., Baker, H.M., Baker, E.N. & Jameson, G.B. (1998). Structural basis of the Tanford transition of bovine beta-lactoglobulin. *Biochemistry*, 37, 14 014-14 023.
- Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 36(6), 565-601.
- Rinaudo, M., (2001). Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids*, 15, 433-440.
- Rinaudo, M., Milas, M, Bresolin, T. & Ganter, J. (1999). Physical properties of xanthan galactomannan and their mixtures in aqueous solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics Macromolecular Symposia*, 140, 115-124.
- Rocheffort, W.E. & Middleman, S. (1987). Rheology of xanthan gums : Salt, temperature, and strain effects in oscillatory and steady shear experiments. *Journal of Rheology*, 31(4), 337-369.
- Rohm, H. & Schmidt, W. (1993). Influence of dry matter fortification on flow properties of yogurt. 1. Evaluation of flow curves. *Milchwissenschaft*, 48, 556-560.
- Rolin, C., Nielsen, B.U. & Glahn, R-E. (1998). Pectin. Dans : Dumitriu, S. *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility* (pp.377-431). New York : Marcel Dekker.

- Ross-Murphy, S.B. (1995). Rheological characterization of gels. *Journal of Texture Studies*, 26, 391-400.
- Sánchez, V.E., Bartholomai, G.G. & Pilosof, A.M.R. (1995). Rheological properties of food gums as related to their water binding capacity and to soy protein interaction. *Lebensmittel-Wissenschaft*, 28, 380-385.
- Sanchez, C., Schmitt, C., Babak, V.B. & Hardy, J. (1997). Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration. *Nahrung*, 41, 336-343.
- Sanchez, C. & Paquin, P. (1997). Protein and protein-polysaccharide microparticles. Dans : Damodaran, *Food Proteins and their Applications* (pp.503-528). New York : Marcel Dekker.
- Sanchez, C., Zuniga-Lopez, R., Schmitt, C., Despond, S. & Hardy, J. (2000). Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. *International Dairy Journal*, 10, 199-212.
- Sanchez, C. & Renard, D. (2002). Stability and structure of protein-polysaccharide coacervates in the presence of protein aggregates. *International Journal of Pharmaceutics*, 24, 319-324.
- Sanchez, C. Mekhloufi, G., Schmitt, C., Renard, D., Robert, P., Lehr, C.-M., Lamprecht, A & Hardy, J. (2002). Self-assembly of  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum in aqueous solvent: Structure and phase-ordering kinetics. *Langmuir*, 18, 10 323-10 333.
- Sanchez, C., Mekhloufi, G. & Renard, D. (2006). Complex coacervation between beta-lactoglobulin and Acacia gum: A nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299(2), 867-873.
- Savello, P.A. & Dargan, R.A. (1995). Improved yogurt physical properties using ultrafiltration and very-high temperature heating. *Milchwissenschaft*, 50, 86-89.
- Savello, P.A. & Dargan, R.A. (1997). Reduced yogurt syneresis using ultrafiltration and very-high temperature heating. *Milchwissenschaft*, 52(10), 573-577.
- Schkoda, P. Stumpf, A. & Kessler, H.G. (1997). Stability of texture of fermented milk products in relation to composition. Dans : *Texture of fermented milk products and dairy desserts* (pp.115-121). Proceedings of the IDF symposium, Vicenza, Italy.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S. & Hardy, J. (1998). Structure and techofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 686-753.

- Schmitt, C., Sanchez, C. & Thomas, F. (1999). Complex coacervation between beta-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 13(6), 483-496.
- Schmitt, C. (2000). *Étude de la coacervation complexe entre la  $\beta$ -lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse*. Thèse, Institut National polytechnique de Lorraine, France.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Despond, S., Renard, D., Thomas, F. & Hardy, J. (2000). Effect of protein aggregates on the complex coacervation between beta-lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, 14(4), 403-413.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Despond, S., Renard, D., Robert, P. & Hardy, J. (2001a). Structural modification of  $\beta$ -lactoglobuline as induced by complex coacervation with acacia gum. Dans : E., Dickinson & R., Miller, *Food Colloids: Fundamentals of formulation* (pp.323-331). Cambridge : Royal society of chemistry.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Lamprecht, A., Renard, D., Lehr, C.-M., de Kruif, C.G. & Hardy, J. (2001b). Study of  $\beta$ -lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20(3), 267-280.
- Schorsch, C., Wilkins, D.K., Jones, M.G. & Norton, I.T. (2001). Gelation of casein-whey mixtures: effects of heating whey proteins alone or in the presence of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 68, 471-481.
- Schorsch, C., Jones, M.G. & Norton, I.T. (2002). Micellar casein gelation at high sucrose content. *Journal of Dairy Science*, 85, 3155-3163.
- Schreiber, G. (2002). Kinetic studies of protein-protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 12, 41-47.
- Semenova, M.G. (1996). Factors determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modeling food systems. Dans : N. Parris, A. Kato, L.K. Creamer & J. Pearce, *Macromolecular Interactions in Food Technology* (pp.37-49). ACS Symposium series 650, Washington : American Chemical Society.
- Shim, J. & Mulvaney, S. (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 the Science of Food and Agriculture*, 81, 706-717.
- Smith, A.K., Nash, A.M., Eldridge, A.C. & Wolf, W.J. (1962). Recovery of soybean whey protein with edible gums and detergents. *Agricultural and Food Chemistry*, 10(4), 302-304.

- Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S. & Corrieu, G. (2004). The relative effect of milk base, starter and process on yogurt texture: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 113-137.
- Soupe, J. (2004). Ingrédients laitiers minéralisés industriels. Dans : F. Gaucheron, *Minéraux et produits laitiers* (pp.301-320). Paris : TEC & DOC.
- Southwick, J.G., Jamieson, A.M. & Blackwell, J. (1981). Quasi-Elastic light scattering studies of semidilute xanthan solutions, *Macromolecules*, 14, 1732-1738.
- Stading, M., Langton, M. & Hermansson, A-M. (1993). Microstructure and rheological behavior of particulated  $\beta$ -lactoglobulin gels. *Food hydrocolloids*, 7, 195-212.
- Stanley, D.W. (1987). Food texture and microstructure. Dans : R. Moskowitz, *Food texture: Instrumental and Sensory Measurement* (pp.35-64). New York : Marcel Dekker, Inc.
- Stanley, D.W. & Tung, M.A. (1976). Microstructure of food and its relation to texture. Dans : J.M. DeMan, P.W. Voisey, V.F. Rasper & D.W. Stanley, *Rheology and texture in food quality* (pp.29-78). Wesport : AVI Publishing company Inc.
- Steffe, J.F. (1996). Introduction to rheology. Dans : J.F. Steffe, *Rheological Methods in Food Process Engineering* (pp.1-93). East Lansing : Freeman Press.
- Stokke, B.T., Christensen, B.E. & Smidsrød, O. (1998). Macromolecular properties of xanthan. Dans : S. Dumitriu, *Polysaccharides : Structural diversity and Functional Versatility* (pp.433-472). New York : Marcel Dekker.
- Syrbe, A., Fernandes, P.B. Dannenberg, F. Baver, W. & Klostermeyer, H. (1995). Whey protein + polysaccharide mixtures: Polymer incompatibility and its application. Dans : E. Dickinson, P. Walstra & D. Lorient, *Food macromolecules and colloids* (pp.328-339). Cambridge : The Royal Society of Chemistry.
- Syrbe, A., Bauer, W.J. & Klostermeyer, H. (1998). Polymer science concepts in dairy systems-An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8, 179-193.
- Szczesniak, A.S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13, 215-225.
- Tabilo-Munizaga, G. & Barbosa-Cánovas, G.V. (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67, 147-156.
- Tamime, A.Y., Kalab, M. & Davies, G. (1984). Microstructure of set-style yogurt manufacture from cow's milk fortified by various methods. *Food Microstructure*, 3, 83-92.



- Tamine, A.Y & Robinson, R.K. (1999). Background to manufacture practice. Dans : *Yoghurt science and technology* (2<sup>e</sup> édition) (pp.11-109). Boca Raton : CRC Press LLC.
- Tang, Q., Munro, P.A. & McCarthy, O.J. (1993). Rheology of whey protein concentrate solutions as a function of concentration, temperature, pH, and salt concentration. *Journal of Dairy Research*, 60, 349-361.
- Tang, Q., McCarthy, O.J. & Munro, P.S. (1995). Oscillatory rheological study of the effects of pH and salts on gel development in heated whey protein concentrate solutions. *Journal of Dairy Research*, 62, 469-477.
- Tavares, C. & Lopes da Silva, J.A. (2003). Rheology of galactomannan-whey protein mixed systems. *International Dairy Journal*, 13, 699-706.
- Thibault, J.F. & Rinaudo, M. (1986). Chain association of pectic molecules during calcium-induced gelation. *Biopolymers*, 25, 455-468.
- Tolstoguzov, V.B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. Dans : J.R. Mitchell & D.A. Ledward, *Functional properties of Food Macromolecules* (pp.385-415). New York : Elsevier.
- Tolstoguzov, V.B. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4(6), 429-468.
- Tolstoguzov, V.B. (1995). Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. *Food Hydrocolloids*, 9(4), 317-332.
- Tolstoguzov, V. B. (1996). Structure-property relationship in foods. Dans : A. Kato, L.K. Creamer & J. Pearce, *Macromolecular Interactions in Food Technology* (pp.2-14), ACS Symposium Series 650. Washington : The American Chemical Society.
- Tolstoguzov, V.B. (1997). Protein-polysaccharide interactions. Dans : S. Damodaran & A. Paraf, *Food Proteins and their Applications* (pp171-198). New York : Marcel Dekker.
- Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1-23.
- 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, 589-601.
- Tuinier, R., Rolin, C. & de Kruif, C.G. (2002). Electrosorption of Pectin onto Casein Micelles. *Biomacromolecules*, 3, 632-638.

- Turgeon, S.L. & Beaulieu, M (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 15, 583-591.
- Turgeon, S.L., Beaulieu, M, Schmitt, C. & Sanchez, C. (2003). Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current opinion in colloid & interface science*, 8(4-5), 401-414.
- van Vliet, T. & Keetels, C.J.A.M. (1995). Effect of preheating of milk on the structure of acidified milk gels. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49, 27-35.
- van Vliet, T. (2000). Structure and rheology of gels formed by aggregated protein particles. Dans : K. Nishinari, *Hydrocolloids (Part 1. Physical chemistry and industrial applications of gels, polysaccharides and proteins)* (pp.367-377). Amsterdam : Elsevier.
- Varnan, A.H. & Sutherland, J.P. (1994). Fermented milks. Dans : A.H., Varnan and J.P Sutherland, *Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology* (vol. 1) (pp.346-385), Food product series. London : Chapman & Hall.
- Vasbinder, A.J., Alting, A.C., Visschers, R.W. & de Kruif, C.G. (2003). Texture of acid milk gels: formation of disulfide cross-links during acidification. *International Dairy Journal*, 13, 29-38.
- Vasbinder, A.J. & de Kruif, C.G. (2003). Casein-whey protein interactions in heated milk: The influence of pH. *International Dairy Journal*, 13, 669-677.
- Voragen, A.G.J., Pilnik, W., Thibeault, J.-F., Axelos, M.A.V. & Renard, C.M.G.C. (1995). Pectins. Dans : A.M. Stephen, *Food Polysaccharides and their Applications* (pp.287-339). New York : Marcel Dekker, Inc.
- Wacher-Rodarte, C., Galvan, M.V., Farres, A., Gallardo, F., Marshall, V.M.E. & Garcia-Garibay, M. (1993). Yogurt production from reconstituted skim milk powders using different polymer and non-polymer forming starter cultures. *Journal of Dairy Research*, 60, 247-254.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A. & Van Buckel, M.A.J.S (1999). Milk components. Dans : Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A. & Van Buckel, M.A.J.S, *Dairy technology: principles of milk properties and processes* (pp.27-105). New York : Marcel Dekker.
- Wang, Q. & Qvist, K.B. (2000). Investigation of the composite system of  $\beta$ -lactoglobulin and pectin in aqueous solutions. *Food Research International*, 33, 683-690.
- Weinbreck, F. Nieuwenhuijse, H, Robijn G.W. & de Kruif, C.G. (2003a). Complex formation of whey proteins: exocellular polysaccharide EPS B40. *Langmuir*, 19, 9404-9410.

- Weinbreck, F. de Vries, R., Schrooyen, P. & de Kruif, C.G. (2003b). Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, 4, 293-303.
- Weinbreck, F. & Wientjes, R.H.W. (2004). Rheological properties of whey protein/gum Arabic coacervates. *Journal of Rheology*, 48(6), 1215-1228.
- Whistler, R.L. & BeMiller, J.N. (1997). Polysaccharides. Dans : *Carbohydrate chemistry for food scientists* (pp.63-89). The American Association of Cereal Chemists, Inc. Minnesota: Eagan Press.
- Xia, J. & Dubin, P.L. (1994). Protein-polyelectrolyte complexes. Dans : P. Dubin, J. Bock, R.M. Davies, D.N. Schulz & C. Thies, *Macromolecular complexes in chemistry and biology* (pp. 247-271). Berlin : Springer-Verlay.
- Zasytkin, D.V., Dumay, E. & Cheftel, J.C. (1996). Pressure- and heat-induced gelation of mixed  $\beta$ -lactoglobulin/xanthan solutions. *Food Hydrocolloids*, 10(2), 203-211.
- Zhang, G. & Foegeding, E.A. (2003). Heat-induced phase behaviour of  $\beta$ -lactoglobulin/polysaccharide mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17, 785-792.
- Ziegler G.R. & Foegeding, E.A. (1990). Gelation of proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 34, 203-298.
- Zoon, P. (2003). Viscosity, smoothness and stability of yogurt as affected by structure and EPS functionality. Dans : International Dairy Federation, *Fermented milk: proceedings of the IDF seminar on aroma and texture of fermented* (pp.280-289). Brussel : IDF.