

SANDRA ISABEL LANEUVILLE BALLESTER

**ÉTUDE DE L'INTERACTION ASSOCIATIVE ENTRE
LA β - LACTOGLOBULINE ET LE XANTHANE
NATIF OU LE XANTHANE TRAITÉ AUX HAUTES
PRESSIONS HYDRODYNAMIQUES**

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 Philosophiae Doctor (Ph.D.)

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

DÉCEMBRE, 2004

Résumé court

L'interaction associative entre la β -lactoglobuline et le xanthane (natif ou traité par hautes pressions hydrodynamiques) résultant en la formation de complexes électrostatiques a été étudiée par diverses techniques chimiques et physiques. L'objectif principal était d'approfondir les connaissances fondamentales au niveau moléculaire sur les interactions protéines – polysaccharides anioniques. Il a été trouvé que le mécanisme de séparation de phases associative suivi par ce système est une nucléation et croissance qui résultant en la formation de diverses structures fractales. Notamment, des différences de taille, de structure interne (compacité) et de solubilité ont été obtenues selon, entre autres, le pH et le ratio protéine – xanthane qui dirigent les processus de structuration dans le système en gouvernant, respectivement, la densité de charge des molécules et les effets d'équilibre de masse. L'importance et l'effet des forces de cisaillement appliquées (ou non) ainsi que la méthode d'acidification utilisée pendant la séparation de phases ont aussi été démontrés. Ainsi, lorsque la complexation a lieu sous cisaillement, la taille et la structure des complexes sont déterminées par un processus de restructuration induit par une compétition entre les forces électrostatiques attractives et les forces de rupture dues à l'écoulement. D'autre part, il a été démontré que le degré d'agrégation du xanthane est responsable des différentes structures formées puisque c'est le polysaccharide qui agit comme support lors de la complexation. Particulièrement, à des taux d'acidification lents, la taille des complexes peut être contrôlée en modifiant le poids moléculaire du xanthane. Les propriétés fonctionnelles des complexes obtenus peuvent ainsi être modifiées et façonnées en ajustant divers paramètres initiaux (ratio protéine – xanthane, poids moléculaire du xanthane) ainsi que les conditions présentes lors de leur fabrication (cisaillement, vitesse d'acidification). La fonctionnalité des complexes comme substituts de matière grasse a été évaluée dans des formulations modèles de garniture à biscuit ou glaçage à gâteaux. Les complexes ont conféré de bons attributs de viscosité et de texture aux échantillons faibles en gras.

Résumé long

L'interaction associative entre la β -lactoglobuline (β lg) et le xanthane (natif ou traité par hautes pressions hydrodynamiques) résultant en la formation de complexes électrostatiques a été étudiée par diverses techniques chimiques et physiques. L'objectif principal était d'approfondir les connaissances fondamentales au niveau moléculaire sur les interactions protéines – polysaccharides anioniques. Plusieurs facteurs contrôlent les caractéristiques des structures formées, en particulier le ratio (r) protéine – polysaccharide est très important et détermine, entre autres, la taille et la structure interne des complexes formés. Ainsi à des hauts r , des complexes plus larges et plus compacts sont obtenus.

Des dosages chimiques, et des méthodes telles que la turbidimétrie et la diffusion de la lumière aux petits angles (LALLS) ont permis d'étudier l'interaction associative dans ce système. La méthode LALLS a permis d'identifier et d'établir plusieurs mécanismes d'action mis en place lors de la complexation dès le début des interactions jusqu'aux étapes tardives de structuration du système. Ainsi, il a été trouvé que les complexes β lg – xanthane sont de nature fractale. Particulièrement, à pH_c , qui dénote le pH de début d'interaction, des complexes solubles possédant une structure diffuse et poreuse, avec une dimension fractale (d_f) ~ 1.8 , étaient formés. À $pH\phi$ (pH indiquant une séparation de phases macroscopique) les complexes deviennent plus compacts et ce, de façon presque exponentielle, résultant en la formation de complexes interpolymériques plus denses avec un d_f variant entre 2.23 et 2.53 dépendamment du r . Enfin, il a été déterminé que le processus de restructuration est induit notamment par des forces internes (liaison coopérative de la protéine) et lorsque des forces de cisaillement sont appliquées, par une compétition entre les forces d'attraction électrostatiques et les forces de rupture dues à l'écoulement.

D'autre part, en suivant les cinétiques de croissance, l'existence d'un ratio stœchiométrique entre $r = 2$ et $r = 5$, menant à la formation de complexes stables, a été démontrée. Pour ces ratios, un plateau de la taille des complexes était atteint (e.g. $pH \geq 4.5$ pour $r = 5$), indiquant la stabilisation de la croissance de domaines structuraux grâce à un équilibre électrostatique dans la solution qui empêcherait les protéines en excès de se lier sur le polysaccharide,

forçant ainsi les complexes à atteindre une taille maximale. À des rapports non stœchiométriques ($r > 5$), un déséquilibre du système est induit par une sur-agrégation de la protéine sur le complexe, résultant en la réduction des forces répulsives et en une agrégation secondaire menant à la formation de très larges précipités.

Le poids moléculaire (P_M) et la capacité du xanthane à s'agréger a aussi un impact sur les caractéristiques des complexes formés. Lorsque du xanthane natif est utilisé, des complexes de nature fibreuse sont obtenus. En contrepartie, avec du xanthane microfluidisé, les complexes sont particulés. Une caractérisation poussée des effets de la microfluidisation sur le xanthane a permis de trouver, qu'à de faibles taux de traitement, l'impact principal de la microfluidisation est de briser les agrégats de xanthane et de diminuer leur capacité de re-agrégation. Pour des traitements plus poussés, une dégradation de la chaîne principale du polysaccharide commence à être détectée, résultant en une importante diminution du P_M . Ainsi, il a été établi que le principal facteur, à l'origine de la formation de complexes fibreux, est la capacité d'agrégation du xanthane qui agirait comme support lors de la complexation. De plus, à des taux d'acidification lents, la taille des complexes était proportionnelle au P_M du xanthane.

Finalement, le type de séparation de phases pour ce système a été déterminé comme étant issu d'une nucléation et croissance. Le profil général ressemblerait à celui de la séparation de phases, induite par la polymérisation dans un système de polymères synthétiques. Ce profil diffère de celui d'une nucléation et croissance traditionnelle du fait qu'un pic de corrélation en l'intensité de lumière diffusée est détecté. Ce pic serait relié à la formation de complexes primaires composés d'un noyau riche en xanthane et entouré d'une couche dépourvue en protéine.

La fonctionnalité des complexes, comme substituts de matière grasse, a été évaluée dans des formulations modèles de garniture à biscuit ou de glaçage à gâteaux. Les complexes ont conféré de bons attributs de viscosité et de texture aux échantillons faibles en gras.

Abstract

The associative interaction between β -lactoglobulin and xanthan gum (native or treated by high hydrodynamic pressures) resulting in the formation of electrostatic complexes was studied by several chemical and physical techniques. The main objective was to develop a fundamental knowledge of this system at a molecular level, to better understand the interactions between proteins and anionic polysaccharides. The associative phase separation in this system proceeded via a nucleation and growth mechanism that resulted in the formation of distinct fractal structures. Namely, differences in size, internal structure (compactness), and solubility were obtained depending principally on the pH and initial protein to polysaccharide ratio; which, in turn governed molecular charge density and mass action equilibrium effects determining the structuration processes. The important effects of the acidification method and the shearing forces applied during complexation were also identified. Particularly, it was revealed that when shear forces were applied during complexation the size and the structure of interpolymeric complexes were determined by restructuring processes set by a competition between attractive electrostatic forces and rupture forces caused by flow. Moreover, it was found that the aggregation pattern of xanthan gum was responsible for the formation of the different structures since it is the polysaccharide that acts as the support during complexation. Accordingly, at slow rates of acidification, a modification of the molecular weight of xanthan gum can control the size of the complexes. Therefore, the characteristics and functional properties of the complexes can be modified and tailored by adjusting the initial parameters and the conditions present during their manufacture.

Avant-Propos

Cette thèse comporte 7 chapitres dont cinq sont écrits sous forme d'articles scientifiques qui sont ou seront publiés dans des revues scientifiques. Je suis l'auteure principale de ces cinq publications pour lesquelles j'ai contribué en planifiant et en accomplissant la totalité des manipulations en laboratoire à l'Université Laval (Québec) au centre STELA, à l'usine pilote du département des sciences des aliments et de nutrition (chapitres 2, 3 et 6), ou dans le laboratoire de physico-chimie et génie alimentaires de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA) à Vandœuvre-lès-Nancy, France (Chapitres 4 et 5), ainsi qu'en effectuant l'analyse des résultats et la rédaction des articles. Les manipulations, en France, ont été réalisées sous la supervision du professeur Christian Sanchez. Le Dr. Hardy étant le directeur du laboratoire apparaît comme co-auteur. Le Dr. Sylvie Turgeon (directrice) et Dr. Paul Paquin (co-directeur) ont apporté leur soutien scientifique et leurs conseils selon leur expertise.

Le premier chapitre intitulé «*Introduction générale*» inclut une revue de littérature portant sur les biopolymères à l'étude, la nature des interactions protéine – polysaccharide et les facteurs qui les influencent, ainsi qu'une introduction aux différents types de séparation de phases et aux mécanismes d'agrégation fractale. Ensuite, l'hypothèse de recherche, le but et les objectifs spécifiques de cette étude sont présentés.

Le deuxième chapitre «*Effect of a Dynamic High-pressure Treatment on the Physical Properties of Xanthan Gum*», a été soumis au journal «*Macromolecules*». Cet article vise à identifier l'effet de la microfluidisation sur le xanthane tant au niveau chimique, pour déterminer l'ampleur de la dégradation, qu'au niveau physique, notamment pour mesurer l'effet sur l'état d'agrégation et la conformation moléculaire du polysaccharide. Les résultats obtenus ont permis de déterminer et d'expliquer l'impact des modifications subies par le xanthane sur les différentes structures formées avec la protéine. Les mesures en microcalorimétrie ont été effectuées chez SETARAM à Lyon, France, et les mesures de RMN ont été faites au département de chimie de l'Université Laval.

Le troisième chapitre «*Effect of Preparation Conditions on the Characteristics of Whey Protein – Xanthan Gum Complexes*» est publié dans le journal «*Food Hydrocolloids*» 2000 (14) 305–314. Ce chapitre porte sur la détermination de l'effet du ratio protéine – polysaccharide et d'un traitement aux hautes pressions dynamiques du xanthane sur les caractéristiques des complexes. Ces travaux sont à l'origine de plusieurs questions étudiées dans la suite des travaux.

Le quatrième chapitre «*Small angle static light scattering study of the associative phase separation kinetics in β -lactoglobulin - xanthan gum mixtures under shear*» sera publié, sous forme de chapitre, dans les proceedings du Congrès Food Colloids 2004 intitulé «*Food Colloids : Interaction, Microstructure and Processing*». Le mécanisme de séparation de phases, que suit le système β -lactoglobuline - xanthane sous cisaillement, a été déterminé par des mesures de diffusion de la lumière. Cette technique a aussi permis de déterminer la cinétique d'agrégation des complexes ainsi que leur structure interne. Ces résultats ont permis d'approfondir les résultats obtenus par les dosages chimiques présentés dans le chapitre 3.

Le cinquième chapitre «*Cold gelation of β -lactoglobulin induced by electrostatic attractive interaction with xanthan gum*» sera soumis à la revue «*Food Hydrocolloids*» ou «*Macromolecules*». Cette étude a permis de déterminer le mécanisme conduisant à la formation d'un gel stabilisé par des interactions électrostatiques attractives entre la β -lactoglobuline et le xanthane. L'évolution tant de la structure interne que de la viscoélasticité au cours de la gélification ont aussi été déterminées. Les résultats obtenus lors des travaux réalisés sous des conditions quiescentes et l'obtention d'un gel stabilisé par des interactions électrostatiques ont conduit au dépôt d'un brevet provisoire intitulé «*Cold gelation of proteins induced by electrostatic attractive interaction with polysaccharides*».

Le sixième chapitre a comme titre «*Formulae Optimization of a Low-Fat Food System Containing Whey Protein Isolate - Xanthan Gum Complexes as Fat Replacer*» et a été soumis à la revue «*Journal of Food Science*». Cette étude a permis de tester les propriétés fonctionnelles des complexes protéine - xanthane comme substitut de matière grasse dans un système alimentaire modèle à pH neutre.

Enfin, une «*Conclusion générale*» est présentée au septième chapitre. Ce chapitre comporte une discussion globale de l'ensemble des résultats obtenus dans ce projet, leur importance dans le domaine des études sur le sujet et conclut avec la présentation des perspectives de recherche pour des travaux futurs.

Remerciements

Au cours de mes études de doctorat, j'ai eu l'occasion de rencontrer des gens qui, d'une façon ou de l'autre, ont contribué à mon apprentissage et ont rendu cette expérience plus agréable.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude envers ma directrice de recherche, Sylvie Turgeon, pour son encouragement, sa patience, son appui en tout, et pour m'avoir donné une grande liberté d'action dans ce projet. Merci Sylvie pour avoir toujours eu confiance en moi et pour m'avoir appuyé, de façon continue, tant au niveau professionnel que personnel.

J'aimerais remercier mon codirecteur, Paul Paquin, pour m'avoir donné l'opportunité de faire partie de ce groupe de recherche et de travailler au sein de la Chaire Industrielle sur les protéines sériques. Je remercie aussi Christian Sanchez, pour m'avoir accueilli pendant mon séjour en France, au laboratoire de Physico-Chimie et Génie Alimentaires à l'ENSAIA, et m'avoir présenté la méthode de diffusion de la lumière, mais surtout pour son avidité de savoir et comprendre, son enthousiasme et son énergie contagieuse qui ont su m'inspirer.

Je tiens également à remercier Michel Britten qui a bien voulu agir en tant que prélecteur et qui m'a fourni de précieux conseils dans la rédaction de cette thèse. Je remercie aussi Michel Pouliot, qui a accepté d'être jury de cette thèse et je voudrais vous faire part d'un de mes premiers souvenirs de travail en laboratoire au Québec: quelqu'un m'avait alors dit: « si t'as des questions ou des doutes, va voir Michel Pouliot! ».

Je remercie aussi les professionnels de recherche pour leur précieuse aide technique et leurs conseils pratiques dans le laboratoire et dans l'usine pilote. Je pense tout particulièrement à Anne-Françoise Allain, Louise Tremblay, Karl Turcotte, Jocelyne Giasson et Claude Gosselin. Merci également à mes stagiaires d'été, Mélanie Gagnon et Annie Parent. Merci aussi à M. Gérard Charlet, du Département de chimie de l'Université Laval, qui m'a permis d'utiliser un appareil de calorimétrie.

Un remerciement spécial à mes proches et à ma famille. À mon époux Clemente dont l'appui, la tendresse et la compréhension ont joué un rôle incontestable dans l'accomplissement de ce projet. À mon petit garçon Paulo qui, avec son rire et ses demandes de « gros câlins!!! », m'ont aidé à relaxer et finir chacune de ces longues journées de rédaction en gaieté. À mes parents, Genoveva et Diego, pour leur soutien inestimable. Maman, merci pour ton amour inconditionnel et pour m'encourager toujours! À mon frère Pablo qui a toujours été une source d'inspiration pour moi, par son émerveillement et son amour envers la vie; à mes amies d'enfance, Claudia González et Alejandra Mérida, pour leur continuelle présence dans ma vie et à Mónica Araya pour sa gentillesse et générosité.

Je remercie le Fond Québécois sur la Nature et les Technologies (FCAR) pour la bourse doctorale qu'il m'a octroyé, de même que la Chaire Industrielle du CRSNG sur les propriétés fonctionnelles des protéines sériques, dont le titulaire est le Dr. Paul Paquin, et ses partenaires financiers (Agropur, Novalait et Parmalat) qui ont appuyé financièrement la réalisation de ce projet.

*Para ti mamá
con cariño*

Table des matières

Résumé court	ii
Résumé long	iii
Abstract	v
Avant-Propos	vi
Remerciements	ix
Table des matières	xii
Liste des tableaux	xviii
Liste des figures	xx
Introduction	1
Chapitre 1 : Revue de Littérature	4
1.1. BIOPOLYMÈRES À L'ÉTUDE.....	4
1.1.1. <i>Les protéines du lactosérum</i>	4
1.1.2. <i>La β-lactoglobuline bovine</i>	5
1.1.2.1. Structure moléculaire.....	6
1.1.2.2. États d'agrégation de la β lg.....	10
Effet du pH.....	10
Effet de la Température.....	11
1.1.2.3. Gélification de la β -lactoglobuline.....	13
1.1.2.4. Propriétés interfaciales	16
1.1.3. <i>La gomme xanthane</i>	16
1.1.3.1. Structure moléculaire.....	16
1.1.3.2. Transition conformationnelle hélice rigide – brin flexible.....	19
1.1.3.3. Le xanthane en solution.....	24
1.1.3.4. Gélification induite du xanthane	25
1.1.4. <i>Traitements de dégradation physique du xanthane</i>	26
1.1.4.1. L'hydrolyse acide.....	26
1.1.4.2. Les traitements aux hautes pressions dynamiques	27
1.1.4.3. La microfluidisation	28
1.1.4.4. Les hydrolyses enzymatiques.....	29
1.1.4.5. Traitement par ultrasons.....	30
1.1.5. <i>Dégradation contrôlée pour la fabrication d'ingrédients fonctionnels</i> ...	30

1.2. MÉLANGE DE PROTÉINES ET POLYSACCHARIDES EN MILIEU AQUEUX	31
1.2.1. <i>Diagrammes de phase</i>	32
1.3. INCOMPATIBILITÉ THERMODYNAMIQUE	34
1.3.1. <i>Séparation de phases ségrégative</i>	34
1.3.1.1. Applications alimentaires	35
1.4. COMPATIBILITÉ THERMODYNAMIQUE	36
1.4.1. <i>Co-solubilité</i>	36
1.4.2. <i>Séparation de phases associative</i>	36
1.4.3. <i>Formation de complexes électrostatiques</i>	37
1.4.3.1. Applications alimentaires des complexes électrostatiques	40
1.4.4. <i>Facteurs influençant la complexation</i>	41
1.4.4.1. Facteurs intrinsèques	41
Charge et densité de charge	41
Conformation et poids moléculaires	42
1.4.4.2. Facteurs environnementaux	43
Ratio protéine – polysaccharide	43
Concentration en solides totaux	43
Force ionique.....	44
pH.....	44
Température	44
1.5. LES COMPLEXES PROTÉINES SÉRIQUES - XANTHANE	45
1.6. TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES	46
1.6.1. <i>Concepts de base en optique</i>	46
1.6.1.1. La lumière.....	46
1.6.1.2. Concepts de réfraction, transmission et diffusion de la lumière	48
1.6.1.3. L'indice de réfraction	48
1.6.2. <i>Concepts d'isotropie, anisotropie et biréfringence</i>	50
1.6.3. <i>La rhéologie optique : biréfringence induite par le cisaillement</i>	53
1.6.3.1. Règle tensio-optique	55
1.6.3.2. Origine de la biréfringence dans les polymères	58
1.6.4. <i>La diffusion de la lumière aux petits angles</i>	60
1.6.5. <i>La diffusion statique de la lumière (SLS)</i>	60
1.6.5.1. Diffusion par petites particules.....	61
1.6.5.2. Diffusion par grandes particules.....	62
1.6.6. <i>Les mécanismes de séparation de phases</i>	63
1.6.7. <i>Agrégation fractale</i>	66
1.7. HYPOTHÈSE, BUT ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	70

1.7.1. <i>Hypothèse</i>	70
1.7.2. <i>But</i>	70
1.7.3. <i>Objectifs spécifiques</i>	71
Chapitre 2 : Effect of a Dynamic High-pressure Treatment on the Physical Properties of Xanthan Gum	73
2.1. RÉSUMÉ.....	74
2.2. ABSTRACT	75
2.3. INTRODUCTION.....	76
2.4. MATERIALS AND METHODS.....	79
2.4.1. <i>Chemical Analyses</i>	80
2.4.2. <i>Physical Analysis</i>	80
2.4.2.1. Size exclusion chromatography (HP-SEC)	80
2.4.2.2. Intrinsic viscosity.....	81
2.4.2.3. DSC	81
2.4.2.4. Rheometry	81
2.4.2.5. Flow Birefringence.....	82
2.5. RESULTS AND DISCUSSION.....	83
2.5.1. <i>Chemical characterization</i>	83
2.5.2. <i>Molecular weight and Intrinsic Viscosity</i>	84
2.5.3. <i>Thermal transition</i>	88
2.5.4. <i>Flow behavior</i>	90
2.5.4.1. Viscosity recovery	94
2.5.5. <i>Degradation rate</i>	97
2.6. FLOW BIREFRINGENCE	100
2.6.1. <i>Birefringence relaxation</i>	106
2.7. PROPOSED MECHANISM OF XANTHAN DEGRADATION BY MICROFLUIDIZATION....	108
2.8. CONCLUSIONS	109
2.9. ACKNOWLEDGMENTS	110
Chapitre 3 : Effect of Preparation Conditions on the Characteristics of Whey Protein – Xanthan Gum Complexes	112
3.1. RÉSUMÉ.....	113
3.2. ABSTRACT	114

3.3. INTRODUCTION.....	115
3.4. MATERIALS AND METHODS.....	117
3.4.1. <i>Microfluidization of Xanthan Gum</i>	117
3.4.2. <i>Manufacture of Complexes</i>	117
3.4.3. <i>Characterization of WPI – Xanthan Gum Complexes</i>	118
3.4.3.1. <i>Size of WPI – Xanthan Gum Complexes</i>	119
3.4.3.2. <i>Composition of Complexes</i>	119
3.4.3.3. <i>Flow Curves</i>	120
3.4.4. <i>Statistical Analysis</i>	120
3.5. RESULTS AND DISCUSSION.....	121
3.5.1. <i>Size of WPI – Xanthan Gum Complexes</i>	121
3.5.1.1. <i>Effect of Microfluidization</i>	121
3.5.1.2. <i>Effect of the Protein-to-Polysaccharide Ratio</i>	124
3.5.2. <i>Protein : Polysaccharide Complexes Composition</i>	128
3.5.3. <i>Structure of Complexes</i>	131
3.5.4. <i>Flow Behaviour of WPI – Xanthan Gum Solutions</i>	132
3.5.4.1. <i>Effect of the P:PS ratio and the number of passes</i>	133
3.5.4.2. <i>Effect of Complexation</i>	133
3.6. CONCLUSIONS.....	135
3.7. ACKNOWLEDGMENTS.....	136

Chapitre 4 : Small-angle static light scattering study of associative phase separation kinetics in β -lactoglobulin - xanthan gum mixtures under shear.....138

4.1. RÉSUMÉ.....	139
4.2. ABSTRACT.....	140
4.3. INTRODUCTION.....	141
4.4. EXPERIMENTAL SECTION.....	145
4.4.1. <i>Materials</i>	145
4.4.2. <i>Preparation of Biopolymer Dispersions</i>	146
4.4.3. <i>Time-Resolved Small-Angle Static Light-Scattering (SALS)</i>	147
4.4.4. <i>Temporal Evolution of the Size of Complexes</i>	148
4.5. RESULTS AND DISCUSSIONS.....	149
4.5.1. <i>Temporal Evolution of Turbidity and Reaction Kinetics</i>	149
4.5.1.1. <i>Effect of the M_w of Xanthan Gum on Critical pH_c and pH_ϕ</i>	152

4.5.2. <i>Complex Size Evolution and Coarsening Kinetics</i>	153
4.5.2.1. Effect of the M_w of Xanthan Gum on Complexes Size.....	156
4.5.3. <i>Temporal Evolution of the Scattering Profiles: Phase separation mechanism</i>	158
4.5.3.1. Effect of the M_w of Xanthan Gum on the Scattering Profiles ...	164
4.5.4. <i>Apparent Fractal Dimension and Cluster Morphology</i>	165
4.5.4.1. Effect of the M_w of Xanthan Gum on the apparent d_f	170
4.6. CONCLUSIONS	170
4.7. ACKNOWLEDGEMENTS	171
Chapitre 5 : Cold gelation of β-lactoglobulin induced by electrostatic attractive interaction with xanthan gum	173
5.1. RÉSUMÉ.....	174
5.2. ABSTRACT	175
5.3. INTRODUCTION.....	176
5.4. EXPERIMENTAL SECTION.....	179
5.4.1. <i>Materials</i>	179
5.4.2. <i>Time-Resolved Small Angle Static Light-Scattering (SALS)</i>	180
5.4.3. <i>Dynamic Oscillatory measurements</i>	180
5.4.4. <i>Phase contrast optical microscopy</i>	181
5.5. RESULTS AND DISCUSSIONS	181
5.5.1. <i>Time evolution of viscoelasticity and critical $pH\phi$</i>	181
5.5.2. <i>Temporal Evolution of the scattered light intensity and gelation kinetics</i>	185
5.5.3. <i>Fractal dimension, internal structure development, and gel formation</i>	188
5.6. CONCLUSIONS	192
5.7. ACKNOWLEDGEMENTS	193
Chapitre 6 : Formulae Optimization of a Low-Fat Food System Containing Whey Protein Isolate - Xanthan Gum Complexes as Fat Replacer	195
6.1. RÉSUMÉ.....	196
6.2. ABSTRACT	197
6.3. INTRODUCTION.....	198
6.4. MATERIALS AND METHODS.....	200

6.4.1. <i>Whey proteins isolate – Xanthan gum complexes (WPXC)</i>	200
6.4.2. <i>Sample preparation</i>	200
Reduced fat formulations	201
6.4.3. <i>Experimental Design</i>	202
6.4.4. <i>Instrumental analysis</i>	204
6.4.4.1. Brookfield apparent viscosity	204
6.4.4.2. Texture profile analysis (TPA).....	204
6.4.4.3. Melting profiles	204
6.4.4.4. A_w	204
6.4.5. <i>Statistical Analysis</i>	205
6.4.5.1. Principal Component Analysis (PCA).....	205
6.4.5.2. Response surface analysis (RSM) and formulae optimization ..	205
6.5. RESULTS AND DISCUSSION	206
6.5.1. <i>Main Variation among Samples</i>	206
6.5.2. <i>Response Surface</i>	208
6.5.3. <i>Formulae optimization</i>	211
6.5.4. <i>Melting profiles</i>	213
6.5.5. <i>Water activity</i>	215
6.6. CONCLUSIONS	215
6.7. ACKNOWLEDGEMENTS	215
Chapitre 7 : Conclusions Générales	217
PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	221
Appendice A Statistical Analysis for low-fat products	223
A.1. 160 G/KG FAT COOKIE FILLING AND CAKE FROSTING	223
A.2. 80 G/KG FAT COOKIE FILLING	229
Bibliographie	230

Liste des tableaux

Table 2.1. Summary of the results of M_w , the ratio M_w / M_{w0} , intrinsic viscosity $[\eta]$, Huggins constants k_H , transition temperature T_m , estimated rod length ML , and other physical parameters determined for all studied samples.	85
Table 2.2. Carreau viscosimetric parameters measured for xanthan samples re-dissolved in 10^{-4} M or 0.1 M NaCl aqueous dispersions.	92
Table 3.1. Complexation ratio as a function of the initial P:PS ratio. Percentage of the initial protein or polysaccharide found in the complexed (precipitated) fractions or in the supernatants.....	130
Table 3.2. Cross model parameters for WPI - xanthan gum solutions before and after complexation. NC = not complexed solutions ($pH \approx 7.4$). C = complexed solutions ($pH \approx 5.2$ and heat treatment $80^\circ C/20$ min).	134
Table 4.1. Molecular weight (M_w) and intrinsic viscosity $[\eta]$ of the xanthan gum samples used in this study.....	145
Table 4.2. Critical pH values determined from turbidity measurements for all the studied systems.....	151
Table 4.3. Characteristics of the intermolecular complexes for all the studied systems. ...	157
Table 5.1. Time (t_{gel}) and pH (pH_{gel}) of gelation ; critical $pH\phi$; fractal dimension d_f ; correlation length (Λ_{gel}) of the prevailing structure; and parameter β for the reaction kinetics.....	184
Table 6.1. Characteristics of the WPXC tested in this work	199
Table 6.2. Experimental design with three independent variables: moisture (X_1), icing sugar in the experimental region (X_2) and WPXC (X_3). Actual composition of the mixtures used to replace the fat (g/kg).....	201
Table 6.3. Predictive regression models describing the relationship between textural and viscosity responses with mixtures composition (pseudocomponents). X_1 = moisture, X_2 = icing sugar, and X_3 = WPXC.	208
Table 6.4. Analysis of variance. Fitting of experimental data to surface response models	210
Table 6.5. Desirability specifications for cake frostings and cookie fillings.....	212

Table 6.6. Most desirable formulations (actual composition g/kg) for low fat products with acceptable texture and viscosity attributes. Tested samples that lied inside or close to the optimum.	213
Table A.1. Predictive regression models describing the relationship between textural and viscosity responses with mixtures composition (pseudocomponents) for 50%-less fat products. X_1 = moisture, X_2 = icing sugar, and X_3 = WPXC	226
Table A.2. Analysis of variance. Fitting of experimental data to surface response models	227

Liste des figures

Figure 1.1. Structure moléculaire d'un monomère de β -lactoglobuline.....	7
Figure 1.2. (a) Structure tridimensionnelle du dimère de β -lactoglobuline montrant la répartition de charges sur les molécules. (b) Vue montrant le rayon de van der Waals.	9
Figure 1.3. Structure chimique de l'unité de base du xanthane.....	17
Figure 1.4. Structure hélicoïdale du xanthane (a) vue perpendiculaire (b) vue axiale.....	18
Figure 1.5. Transition du xanthane de l'état ordonné à l'état désordonné.....	20
Figure 1.6. Dissociation incomplète du xanthane et association d'hélices doubles.....	22
Figure 1.7. Diagramme de phases pour un système protéine - polysaccharide.....	33
Figure 1.8. Propagation d'une onde électromagnétique polarisée verticalement.....	47
Figure 1.9. Réfraction de la lumière en passant de l'air à l'eau.....	48
Figure 1.10. Types de phases lyotropes usuellement rencontrés dans les liquides cristallins. (a) Phase nématique avec ordre directionnel, (b) phases smectiques avec ordre directionnel et positionnel (en couches), (c) phase cholestérique.....	51
Figure 1.11. Biréfringence ou double réfraction induite par un cristal de calcite. La flèche sur le bord du cristal indique la direction de l'axe optique.....	52
Figure 1.12. Biréfringence induite par le cisaillement.....	54
Figure 1.13. Diagramme schématique montrant la diffusion d'une lumière polarisée dans le plan xz par (a) une particule ponctuelle (avec un rayon $< \lambda$) et (b) deux parties différentes d'une macromolécule (avec un rayon $\geq \lambda$).....	61
Figure 1.14. Représentation schématique des fluctuations de concentration qui mènent à une séparation de phases, structures formées et courbes typiques obtenues par SLS pour un mécanisme de (a) décomposition spinodale et (b) nucléation et croissance..	64
Figure 1.15. Schéma présentant les agrégats fractals de type DLCA ou RLCA.....	68
Figure 1.16. Diagramme d'intensité de la lumière diffusée pour des complexes de protéines sériques - xanthane exhibant les régions typiquement trouvées lors d'une agrégation fractale.....	69
Figure 2.1. M_w measured by HP-SEC for xanthan gum microfluidized in 10^{-4} M or in 0.1 M NaCl. The transition temperature T_m is also presented.....	84

Figure 2.2. Flow curves for xanthan microfluidized in 10^{-4} M NaCl or 0.1 M NaCl.....	91
Figure 2.3. Flow curves for samples microfluidized in 10^{-4} M NaCl, measurements were made 2 days or two months after treatment. (a) 0 passes and 1 pass; (b) 4 passes and 12 passes.	95
Figure 2.4. Determination of the apparent degradation rate constants for xanthan treated in 10^{-4} M or in 0.1 M NaCl by microfluidization at 75 MPa.	99
Figure 2.5. Rate ramp test (a) flow birefringence and (b) orientation angle measured in 0.1 M and 0.25 wt%. Xanthan samples are : non-treated and microfluidized 1, 4 or 12 passes. The orientation for non-treated sample in 10^{-4} M NaCl is also presented.....	102
Figure 2.6. Transient birefringence. Step rate tests, flow inception begins at $t = 50$ s, shear rate steps were of 0, 1, 10, 50, 100, 500 and 0 s^{-1} (a) flow birefringence and (b) orientation angle, measured in 10^{-4} M and 0.25 wt% for non treated xanthan and xanthan microfluidized 1 or 12 passes.....	104
Figure 2.7. Normalized birefringence relaxation upon flow cessation at time = 0 s from $\dot{\gamma} = 500 \text{ s}^{-1}$ for (a) 0P and (b) 1Pa xanthan samples. Two concentrations were tested 1 wt% and 0.25 wt% in 0.1 M or 10^{-4} M NaCl.....	107
Figure 3.1. Fibrous WPI - native (not microfluidized) xanthan gum complexes fabricated with a P:PS ratio of 20:1, 1% total solids. Optical microscopy (120X).	121
Figure 3.2. WPI - xanthan gum complexes fabricated with xanthan gum microfluidized 4 times and using different P:PS ratios: (a) 5:1; (b) 10:1; (c) 15:1 and (d) 20:1. Optical microscopy (400X).	123
Figure 3.3. Size distribution of complexes fabricated with protein-to-polysaccharide ratios of 5:1 and 20:1. Frequency given on a number-of-particles basis and on an area (μm^2) basis as determined from optical microscopy.....	125
Figure 3.4. Behavior of the complexes size, on an area basis, according to the P:PS ratio. Complexes are classified in $100\text{-}\mu\text{m}^2$ -area intervals to observe general trends.....	126
Figure 3.5. Effect of the P:PS ratio and of complexation on the viscosity of solutions.	127
Figure 3.6. Calculated P:PS ratio in the complexed phase (precipitated) as a function of the initial P:PS ratio.....	128
Figure 3.7. WPI - xanthan gum complexes displaying a cooperative protein-bonding on the polysaccharide. Complexes presented are fabricated with a P:PS ratio of 20:1 and xanthan microfluidized a) 8 times and b) 12 times. Optical microscopy (400X).....	131

Figure 4.1. Temporal evolution of turbidity for $r = 5$ and $r = 15$. The inset shows an enlargement of the initial region for $r = 15$, indicating the positions of pHc and $\text{pH}\phi$..	149
Figure 4.2. Evolution of the averaged scattered light intensity $I_a(q)$ from large ($> 130 \mu\text{m}$), medium-sized ($10\text{-}130 \mu\text{m}$) and small ($\sim 1\text{-}10 \mu\text{m}$) particles for (a) $r = 2$, (b) $r = 5$, (c) $r = 15$, and (d) $r = 5$ with xanthan X12. Critical $\text{pH}\phi$ values, the isoelectric point of βlg (IEP) and of the complexes (EEP) are also indicated.....	155
Figure 4.3. Time evolution of light scattering profiles $I(q)$ for $r = 2$ after onset of interaction ($\text{pHc} \sim 65 \text{ min}$, $\text{pH}\phi \sim 225 \text{ min}$): (a) 100–300 min; (b) 300–900 min.....	159
Figure 4.4. Time evolution of light scattering profile $I(q)$ for $r = 15$ after onset of interaction ($\text{pHc} \sim 50 \text{ min}$, $\text{pH}\phi \sim 115 \text{ min}$): (a) 40–120 min; (b) 120–500 min; (c) 500–900 min.	160
Figure 4.5. Temporal evolution of I_{max} for $r = 5$, $r = 15$, and $r = 5$ with X12.	161
Figure 4.6. Temporal evolution of $I(q)$ for $r = 5$ with native xanthan and for $r = 5$ with xanthan X12 ($\text{pH} \approx 5.1$ to 4.5).	164
Figure 4.7. Time evolution of light scattering profile $I(q)$ for $r = 5$ after $\text{pH}\phi$ in a double logarithmic scale. Inset: dynamic scaling of the same data. The deviation at low q values reveals the breakage due to shear forces on large length scales.	166
Figure 4.8. Temporal evolution of the apparent fractal dimension d_f during associative phase separation and coarsening for $r = 2, 5, 15$ and $r = 5$ with xanthan gum X12 . Critical $\text{pH}\phi$ values and the protein IEP values are shown.....	167
Figure 5.1. Time evolution of the storage modulus (G') for βlg - xanthan gum mixtures at $r = 2, 5, 15$ and 20.	182
Figure 5.2. Time-evolution of the storage modulus G' for βlg - xanthan gum mixtures at $r = 5$, using native xanthan gum with $M_w = 5.1 \times 10^6 \text{ Da}$, or degraded xanthan samples with $M_w = 4.4 \times 10^6 \text{ Da}$ and $M_w = 3.2 \times 10^6 \text{ Da}$	183
Figure 5.3. Evolution of the storage and loss modulus during gelation for βlg - xanthan gum mixtures at (a) $r = 2$ and (b) $r = 5$. The acidification curves are also presented. The gelation time (t_{gel}) is defined as G'/G'' crossover. The IEP of βlg is indicated.....	183
Figure 5.4. Time evolution of the light scattering profile for βlg - xanthan gum mixtures at (a) $r = 5$ and (b) $r = 15$. The secondary peak is attributed to the gel correlation length. $\text{pH}\phi \sim 210 \text{ min}$ for $r = 5$ and $\sim 170 \text{ min}$ for $r = 15$. $t_{\text{gel}} \sim 260$ and 280 min , respectively.	186

Figure 5.5. Temporal evolution of $I_{\max 2}$ for $r = 2$, $r = 5$ and in the second axis $r = 15$. Also indicated are $\text{pH}\phi$ and t_{gel}	187
Figure 5.6. Development of the fractal dimension (d_f) during gelation for βlg - xanthan gum mixtures at (a) $r = 2$ and (b) $r = 5$. The t_{gel} , the βlg IEP, and $\text{pH}\phi$ are also indicated.	188
Figure 5.7. Phase contrast micrographs (40X) of the microstructure of βlg - xanthan gum gels for (a) $r = 2$; (b) $r = 5$ and (c) $r = 15$	191
Figure 5.8. Schematic representation of the structure evolution leading to the formation of a gel from the electrostatic interactions between oppositely charged proteins and polysaccharides.....	192
Figure 6.1. Final experimental designs with the feasible regions (shaded areas) to produce (a) a 160 g/Kg fat product and (b) a 80 g/Kg fat product. Experimental points are marked 1 through 15.....	203
Figure 6.2. Scores and loadings for PC1 and PC2 of texture and viscosity data. Samples with preferred characteristics are shaded.....	207
Figure 6.3. Contour plots for (a) hardness, (b) cohesiveness, (c) adhesiveness and (d) apparent viscosity for a low fat cake frosting (80 g/Kg fat).....	209
Figure 6.4. Overlay contour plot for a low fat cake frosting acceptability (80 g/Kg fat). Shaded area identifies the formulation space that meets the desirability specifications.	212
Figure 6.5. Melting profiles of commercial cake frostings controls and best low fat samples (80g/kg fat) containing WPXC as fat replacer. (a) CFF = commercial full fat control, (b) CLF = commercial low fat control; (c) No. 9 = sample inside the desirability region; (d) No. 2 = sample close to the desirability region.....	214
Figure A.1. Scores and loadings for PC1 and PC2 of texture and viscosity data for a cookie filling. Samples with preferred characteristics are shaded..	224
Figure A.2. Contour plots for (a) hardness, (b) cohesiveness, (c) adhesiveness, and (d) apparent viscosity for a 50% less-fat product.....	225
Figure A.3. Overlay contour plot for a 160g/kg fat (50% less-fat) cookie filling. The shaded region identifies the optimum formulation space.	228
Figure A.4. Overlay contour plot for a 160 g/Kg fat 50% (less-fat) cake frosting. The shaded region identifies the optimum formulation space.	228
Figure A.5. Overlay contour plot for 75% less-fat cookie filling acceptability (80 g/Kg fat). Shaded area identifies the formulation space that meets the desirability specifications.	229

Introduction

Plusieurs études ont démontré que l'interaction associative ou ségrégative entre les protéines et les polysaccharides permet de contrôler la texture, la structure et les propriétés viscoélastiques de nombreux produits alimentaires (Sanchez et al., 1997; Tolstoguzov, 1996; Samant et al., 1993). De ce fait, divers systèmes protéine - polysaccharide ont été étudiés, d'une part, pour leurs applications pratiques en technologie alimentaire telles la séparation des protéines (Tolstoguzov, 1997; Tolstoguzov, 1994), l'augmentation de la stabilité thermique ou acide des protéines (Samant et al., 1993) et la stabilisation d'émulsions (Laplante, 2004; Girard et al., 2002; Dickinson, 1999; Larichev et al., 1983), de mousses (Dickinson, 1999) ou des produits tel le yogourt (Ledward, 1979); et d'autre part, pour la production d'ingrédients fonctionnels tels des substituts de matière grasse (Le Hénaff, 1996; Chen et al., 1989; Chen & Soucie, 1985), des agents texturants (Tolstoguzov, 2003), des analogues de viandes et de caviar (Tolstoguzov, 2003; Soucie et al., 1988; Chen & Soucie, 1985), des films comestibles (Zaleska et al., 2000), et des vitamines et saveurs microencapsulés (Tolstoguzov, 2003; Burova et al., 1999). Plus récemment, ces études ont permis le développement de nouvelles textures et structures gélifiées (Tolstoguzov, 1997).

Une abondante littérature (Tolstoguzov, 2003 et 1996; Ledward, 1994; Xia & Dubin, 1994; Cheftel & Dumay, 1993; Samant et al., 1993) prouve que le caractère des interactions protéine - polyélectrolyte est affecté par des facteurs environnementaux, notamment le pH, la force ionique, la température, le ratio macromoléculaire, et la concentration en solides totaux, ainsi que par des facteurs intrinsèques déterminés par les caractéristiques de chaque molécule tels le poids moléculaire (M_w), la rigidité des chaînes et la densité des charges nette ou relative (Tolstoguzov, 1996; Chen et al., 1989).

Malgré toutes les connaissances de base et les innovations appliquées sur ces systèmes, peu d'études (Girard et al., 2004 et 2003; Butler & Heppenstall-Butler, 2003a, b; Sanchez et al., 2002; Tuinier et al., 2000) ont porté sur le mécanisme et la cinétique de séparation de phases associative ou ségrégative des protéines avec des biomacromolécules. Les gains potentiels qui peuvent surgir suivant la maîtrise de ce processus sont vastes, y compris

l'amélioration des processus courants, le développement de produits avec une stabilité supérieure, des ingrédients ou des produits texturisés novateurs possédant des particules d'une taille, structure, texture et/ou viscosité spécifiques. En vertu de ce potentiel, les interactions protéines – polysaccharides constituent actuellement un domaine d'études en pleine expansion.

L'objectif général de cette recherche est de caractériser les interactions entre les protéines et les polysaccharides anioniques en utilisant le système β lg – xanthane. À notre connaissance, les études effectuées sur le système β lg – xanthane ont porté sur la production d'ingrédients alimentaires à base de complexes électrostatiques (Le Hénaff, 1996; Chen & Soucie, 1985) ou la formation de gels sous des conditions d'incompatibilité thermodynamique (Bryant & McClements, 2000), où le mécanisme de séparation de phases n'était pas considéré. En plus, aucun travail, à part ceux faits au centre STELA (Le Hénaff, 1996; Lefèbvre, 1995), n'ont impliqué la modification des propriétés du xanthane en vue d'élargir ses applications potentielles. La présente étude porte donc, dans un premier temps, sur la compréhension de l'effet de la microfluidisation sur la conformation moléculaire du xanthane. Notamment, la perte de structure secondaire ou tertiaire et le bris de liens covalents ont été déterminés. Dans un deuxième temps, les interactions β -lactoglobuline - xanthane (natif ou microfluidisé) ont été étudiées. L'effet de différents facteurs environnementaux tel le ratio protéine - polysaccharide, le pH, le cisaillement, et la force ionique, ont été étudiés afin de mieux comprendre leur impact sur la cinétique de formation et les caractéristiques des différentes structures complexes formées. Finalement, le mécanisme de séparation de phases de ce système a été déterminé. Le suivi des interactions a été fait par diffusion de la lumière aux petits angles (LALLS), turbidimétrie, et diverses techniques rhéologiques et analyses chimiques.

*“Imagination is more important than
knowledge. Knowledge is limited.
Imagination encircles the world.”*

Albert Einstein (1879-1955)
Physicien américain d'origine allemande

Chapitre 1

Revue de Littérature

1.1. Biopolymères à l'étude

Les molécules utilisées dans cette étude sont la β -lactoglobuline (β lg) et la gomme xanthane. La β lg est une des premières protéines à avoir été cristallisée. Du fait de son importance dans l'industrie alimentaire et de sa structure globulaire, elle a été le sujet d'abondantes études et elle est bien caractérisée physico-chimiquement. Les protéines du lactosérum sont utilisées pour leurs propriétés de solubilité, leur capacité de gélification et d'activité de surface tel l'émulsification et le moussage. Le xanthane est un polysaccharide très stable, insensible aux variations environnementales de pH et de température (Pettitt, 1980) à des forces ioniques > 0.01 M NaCl. C'est la raison pour laquelle l'industrie alimentaire l'utilise abondamment, entre autres, comme agent épaississant et stabilisant.

1.1.1. Les protéines du lactosérum

Le lactosérum était autrefois considéré comme un sous-produit de la production fromagère. Il est, de nos jours, de plus en plus valorisé comme une source de protéines de haute qualité nutritive (riches en acides aminés essentiels), pour la supplémentation en alimentation humaine, et comme ingrédient fonctionnel dans divers produits grâce à leur vaste gamme de propriétés fonctionnelles. Ces protéines sont récupérées sous la forme de concentrés (30-85%) ou d'isolats ($> 95\%$) protéiques en utilisant des techniques d'ultrafiltration et diafiltration ou d'échange d'ions (Fox, 2003). Les protéines du lactosérum constituent environ 20% de l'azote total du lait bovin, le reste étant constitué des différents types de caséines. Les principales caractéristiques des protéines du lactosérum sont présentées dans le Tableau 1.1.

Tableau 1.1. *Protéines du lactosérum du lait bovin.*

<i>Protéine</i>	<i>% d'azote dans le lait</i>	<i>P_M (Da)</i>	<i>IEP</i>	<i>Structure secondaire</i>	<i>Ponts S-S</i>	<i>Thiol (S-H)</i>
β-Lactoglobuline	≈ 12%	18 362	5.2	10% hélices α 45% feuillets β	2	1
α-Lactalbumine	≈ 5.0%	14 174	4.5-4.8	14% hélices α 26% feuillets β	4	0
Bovine sérum albumine (BSA)	≈ 1.2%	69 000	4.7-4.9	54% hélices α 40% feuillets β	17	1
Immuno-globulines (IgG)	≈ 0.8%	150 000 à 1 × 10 ⁶	5.5-8.3	----	32	----

(Cayot & Lorient, 1997; Morr, 1989; Badui, 1990)

D'un point de vue fonctionnel, les deux principales protéines sont la β-lactoglobuline (βlg) et l'α-lactalbumine (α-la). Il s'agit de protéines globulaires possédant une conformation tridimensionnelle très organisée, ce qui les rend thermosensibles. Elles subissent un changement de conformation lorsqu'elles sont exposées à de hautes températures. En l'absence de dénaturation thermique, elles sont solubles dans une large gamme de pH, jusqu'à des pH acides (Badui, 1990).

Les propriétés fonctionnelles de la βlg et de l'α-la sont affectées par la source du lactosérum (variabilité saisonnière, type de fabrication fromagère), par les techniques de fractionnement et par les facteurs environnementaux comme la force ionique, le pH, la concentration et le pourcentage de lipides résiduels (Fox, 2003; Sawyer, 2003). La βlg et l'α-la sont utilisées principalement pour leurs propriétés émulsifiantes, moussantes et gélifiantes. Les protéines du lactosérum possèdent, en outre, de bonnes propriétés nutritionnelles, car elles sont riches en lysine et en tryptophane (Fox, 2003; Robin et al., 1992).

1.1.2. La β-lactoglobuline bovine

La βlg est la principale protéine du lactosérum du lait bovin représentant de 50 à 60% des protéines qui s'y retrouvent (concentration 3.2 g/L; Walstra & Jenness, 1984). De ce fait,

elle gouverne le comportement général de l'ensemble des protéines sériques. La β lg appartient à la famille des lipocalines (Pervaiz & Brew, 1987). Cette famille comporte une ample variété de protéines secrétées qui étaient classifiées par le passé comme des molécules transporteuses, cependant de nos jours il est reconnu qu'elles jouent un rôle dans diverses fonctions biologiques, incluant des fonctions de régulation de la réponse immunitaire, synthèse d'enzymes, transport des phéromones, liaison de pigments et perception des odeurs (Åkerstrom et al., 2000; Flower, 1996). La principale caractéristique des lipocalines est leur capacité, grâce à leur structure, de lier de petites molécules lipophiles en les enfermant dans leur poche hydrophobe pour réduire au minimum le contact avec le solvant (Flower, 1996; Pervaiz & Brew, 1987). Bien que la fonction biologique de la β lg demeure évasive (Kontopidis et al., 2004), cette protéine est connue pour sa capacité à lier des molécules tel que l'acide rétinoïque (Kontopidis et al., 2002), ainsi que divers ligands hydrophobes incluant les acides gras et vitamines liposolubles. De ce fait, il n'est pas surprenant qu'elle puisse aussi lier d'autres molécules hydrophobes tels le cholestérol et les stéroïdes (Kontopidis et al., 2004; Flower et al., 2000; Sawyer & Kontopidis, 2000; Pervaiz & Brew, 1987). Il a été suggéré qu'une des fonctions de la β lg est celle de lier des molécules non polaires pour les protéger et les transporter, à travers l'environnement acide de l'estomac, vers l'environnement basique de l'intestin (Péres & Calvo, 1995).

1.1.2.1. Structure moléculaire

La structure primaire de la β lg est constituée de 162 acides aminés pour donner un poids moléculaire de 18 362 Da (Fox, 2003; Wong et al., 1996; Papiz et al., 1986). Elle est riche en acides aminés sulfatés, d'où sa grande valeur nutritionnelle. La conformation globulaire de la β lg est une conséquence de la répartition uniforme des résidus non-polaires, polaires et ionisés qui permet aux résidus hydrophobes de s'enfouir au sein de la molécule (Cheftel et al., 1985).

La structure secondaire de la molécule a été déterminée par plusieurs techniques incluant le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge et la cristallographie (Hambling et al.,

1992) et comporte 10-15% d'hélices α , 43-50% de feuillets β , et 15 à 20% de coudes β (Cayot & Lorient, 1997). Cette structure se présente sous forme de huit brins de feuillets- β antiparallèles (nommées A à H dans la Figure 1.1) qui s'enroulent pour former un tonneau β antiparallèle en forme de cône aplati ou de calice, dont l'intérieur est hydrophobe (Brownlow et al., 1997; Cayot & Lorient, 1997; Wong et al., 1996).

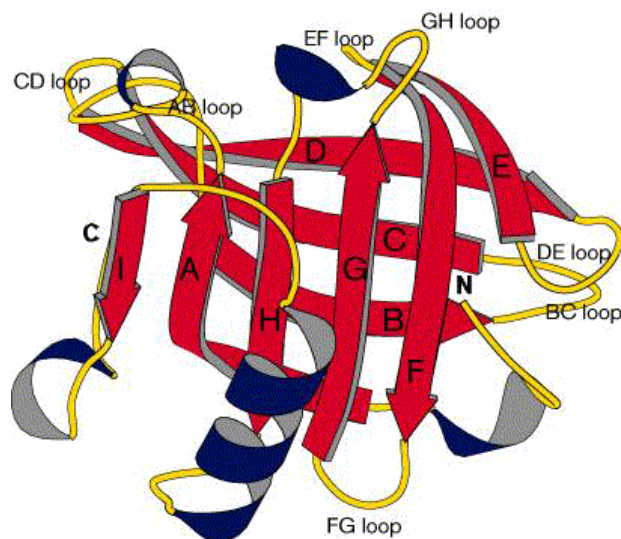


Figure 1.1. Structure moléculaire d'un monomère de β -lactoglobuline.

Source: Brownlow et al. (1997).

C'est dans cette cavité centrale que se trouve le site pour lier les ligands. Un neuvième brin, nommé I, qui ne prend pas part au calice et qui se trouve en position antiparallèle au premier feuillet A, est impliqué dans la formation des dimères (Brownlow et al., 1997). L'hélice α , qui se retrouve vers l'extrémité -COOH de la molécule (résidus 130 - 140), est stabilisée par des interactions hydrophobes et renforcée par des interactions entre les résidus Lys et les résidus acides qui se retrouvent dans l'entourage (Wong et al., 1996). La β lg contient deux ponts disulfures (S-S) entre les résidus Cys66-Cys160 et Cys106-Cys119 et un groupement sulfhydryle libre (-SH) très réactif en position 121, ce dernier est responsable de la saveur cuite présente dans les laits chauffés. La structure secondaire est

stabilisée par des liens hydrogène et les deux ponts disulfures stabilisent la structure tertiaire (Cheftel et al., 1985).

Il existe 7 variants génétiques qui se distinguent les uns des autres par la substitution de certains acides aminés. Les variants A et B sont les plus fréquemment rencontrés et diffèrent aux positions 64 (Asp/Gly), qui se trouvent dans une boucle flexible, et 118 (Val/Ala) au début du feuillet H. Leur séquence complète peut être trouvée dans la littérature (Fox, 2003; Cayot & Lorient, 1997; Wong et al., 1996).

La Figure 1.2 présente la distribution de charges de la β lg. Il est connu que plusieurs régions peptidiques de la β lg sont riches en acides aminés chargés positivement (arginine, histidine et lysine) ou négativement (acide glutamique et asparagine) donnant origine à des zones chargées à la surface de la protéine. D'ailleurs, tous les groupements acides, Asp et Glu, se trouvent en surface, à l'exception de Glu89 qui est lié par un pont hydrogène au groupement Ser116, et le groupement Asp33 qui se trouve dans l'interface qui forme le dimère. De la même façon, les groupements basiques se trouvent tous en positions exposées. De ces groupements, seuls les Lys47 et Lys135 ne sont pas réactifs, dû à la formation de pontages ioniques ou de liens hydrogène (Brownlow et al., 1997).

Des études sur l'interaction entre la β lg et divers polysaccharides anioniques (Girard et al., 2004; Weinbreck et al., 2003a) ont démontré que des interactions électrostatiques peuvent avoir lieu même lorsque les deux molécules portent des charges nettes opposées, ce qui est possible dû à l'existence de ces « zones chargées » (Park et al., 1992). D'ailleurs, des études d'analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (Girard et al., 2003) ont démontré l'existence de 4 peptides chargés, (i.e., 132-148, 76-83, 41-60 et 1-14) situés en surface de la β lg, qui pourraient potentiellement être impliqués lors de son interaction avec des polysaccharides anioniques. Les deux peptides plus réactifs cités dans ce travail étaient le 76-83, qui est situé dans la boucle DE (Figure 1.1), et qui porte deux groupements Lys pour donner une charge nette de +2, et le peptide 132-148, ce dernier correspond à l'hélice- α de la β lg et porte une charge nette de +3 (Girard et al., 2003).

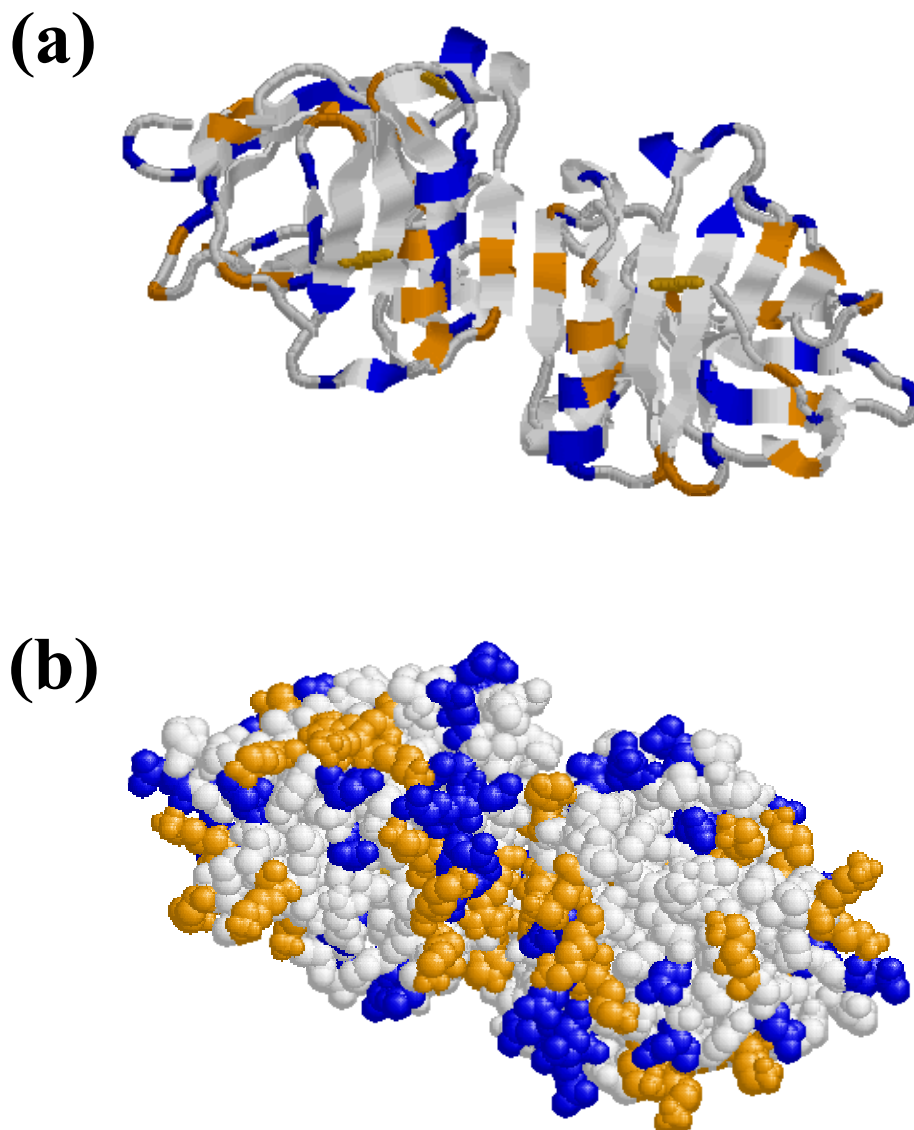


Figure 1.2. (a) Structure tridimensionnelle du dimère de β -lactoglobuline montrant la répartition de charges sur les molécules. En **bleu** les acides aminés acides; en **orange** les acides aminés basiques et en blanc les acides aminés neutres. (b) Vue montrant le rayon de van der Waals. Source: Protein Databank (<http://www.rcsb.org>) PDB id: 1beb, Brownlow et al. (1997). Les images ont été produites en utilisant Protein Explorer.

1.1.2.2. États d'agrégation de la β lg

Effet du pH

Les molécules de β lg bovine peuvent s'associer par des interactions non covalentes et réversibles suivant le pH du milieu. En général, la protéine existe sous forme de dimère stable (Figure 1.2a) entre pH 5.2 (IEP) et pH 6.6 (Fox, 2003; Cayot & Lorient, 1997) avec un rayon hydrodynamique de $31.9 \pm 0.04 \text{ \AA}$, comparativement à un rayon hydrodynamique de $13.9 \pm 0.04 \text{ \AA}$ pour sa forme monomérique (à un pH < 3.0) (Verheul et al., 1999). En conformation dimérique, l'hélice- α d'un des monomères se situe de façon antiparallèle à l'hélice- α de l'autre monomère (Wong et al., 1996). Des études cristallographiques (Brownlow et al., 1997) ont montré que douze liens hydrogène sont impliqués à l'interface du dimère; quatre de ces derniers sont des liens entre les feuillets I (résidus 147-150) des monomères adjacents. Cependant, le plus grand nombre d'interactions se produit entre les boucles AB (résidus 27-41), et particulièrement le lien entre les résidus Asp33 - Arg40* de monomères différents (Brownlow et al., 1997).

Entre pH 3.5 et 5.2, et à froid, la polymérisation continue pour former des octamères ($P_M \sim 144 \text{ kDa}$) constitués de quatre dimères associés dans un tétraèdre. Les octamères se forment dans le cas du variant A principalement (Verheul et al., 1999), néanmoins il peut exister des associations entre les variants A et B (Hambling et al., 1992). Des études ont mis en évidence que les résidus carboxyle sont responsables de l'octamérisation. Ainsi, le résidu Asp64 présent dans le variant A et non dans le variant B serait indispensable pour la stabilisation des octamères (Hambling et al., 1992). L'octamérisation est accompagnée d'une augmentation de l'hydratation : 5 à 6 molécules d'eau de plus par dimère (Cayot & Lorient, 1997; Hambling et al., 1992). Aux pH extrêmes (pH < 3.5 ou pH > 6.6), les octamères ou les dimères se dissocient par répulsion électrostatique et la β lg se retrouve sous forme monomérique (Fox, 1989; Cheftel et al., 1985). À des pH > 8.0 il y a une dénaturation et une augmentation de la réactivité des groupements thiols qui induisent une agrégation par la formation de liens disulfures intermoléculaires. La β lg native résiste à la dénaturation jusqu'à pH 2 (Hambling et al., 1992; Verheul et al., 1998).

Les changements de pH sont aussi responsables des modifications de conformation. Ainsi la β lg présente une transition à pH ~ 7.5 qui peut être détectée, entre autres, par rotation optique et par une diminution des coefficients de sédimentation (Tanford et al., 1959). Cette transition, connue comme la « transition de Tanford », induit un dépliement réversible de la molécule résultant notamment en l'exposition, suivi de l'ionisation, d'un groupement carboxyle (Glu89), et en une augmentation anormale de la réactivité d'un groupement sulphydryle (Cys121) (Qin et al., 1998; Brownlow et al., 1997; de Wit, 1989; Tanford et al., 1959). À noter que la molécule subit un changement de conformation seulement dans une partie localisée de la chaîne polypeptidique (Tanford et al., 1959). L'exposition du carboxyle Glu89 serait importante car elle inclut le mouvement de la boucle EF (résidus 85-90), si clairement démontré par les études cristallographiques de Qin et al. (1998). Il est possible de voir dans leur modélisation que la boucle EF forme un portail sur l'entrée du calice hydrophobe, ce portail étant fermé à pH 6.6 et ouvert à pH 8.0 (Qin et al., 1998; Brownlow et al., 1997). Le « loquet » pour ce portail serait le résidu Glu89, qui est normalement enfoui au sein de la molécule à pH 6.2, et exposé à pH 7.1 et 8.2 (Kontopidis et al., 2004; Qin et al., 1998; Brownlow et al., 1997). La transition de Tanford est importante car elle a lieu à pH physiologique et pourrait être liée à la fonction biologique de la β lg. D'ailleurs il a été trouvé qu'à un pH 6.6 (portail fermé) aucun ligand ne peut être lié à la β lg (Fox, 2003; Qin et al., 1998). Finalement, à mesure que le pH continue d'augmenter, le dépliement de la molécule devient de moins en moins réversible (Wong et al., 1996). À un pH > 8.0 des changements réversibles sont encore présents, mais à pH > 9 la protéine est dénaturée et s'agrège irréversiblement, principalement à cause de l'augmentation de la réactivité des groupements sulphydryles (Fox, 2003). Ceci est accentué par les traitements thermiques qui favorisent l'agrégation des protéines par des interactions hydrophobes.

Effet de la Température

La β lg est dénaturée à des températures supérieures à 65 °C à pH 6.7. En général, le mécanisme de dénaturation inclut une étape initiale rapide avec un dépliement partiel de la structure résultant en une conformation réactive, aussi connu sous le nom de « molten

globule state » (Dickinson & Matsumura, 1994; Ptytsin et al., 1990), suivi de plusieurs réactions d'agrégation plus lentes (Croguennec et al., 2004; Relkin, 1998; Verheul et al., 1998). La première étape de dénaturation, vers 40 °C, est caractérisée par une dissociation des dimères en monomères. À mesure que la température augmente de 50 à 70 °C, une série de modifications conformationnelles se succèdent. Le dépliement partiel causé par la rupture de liens hydrogène démasque le groupement thiol Cys121; ensuite vers 50 °C un des résidus Trp est exposé, le dépliement étant complètement réversible; et finalement à 70 °C un deuxième Trp est exposé, ce dernier dépliement étant irréversible (Wong et al., 1996; Hambling et al., 1992). La molécule dans cette état réactif subit différentes réactions d'agrégation incluant la formation de ponts disulfures intermoléculaires, et d'interactions entre les régions hydrophobes exposées (Relkin, 1998; Verheul et al., 1998). Pour des périodes plus longues de chauffage à 80 °C, des interactions d'oxydation impliquant un échange entre un groupement thiol et un pont disulfure de différentes molécules ont également lieu (Relkin, 1998). Les agrégats sont aussi maintenus par des interactions ioniques et liaisons hydrogène (Wong et al., 1996).

La température critique de dénaturation de la β lg est de 70.4 ± 0.5 °C à pH 6.7 (Wong et al., 1996), mais cela peut varier selon le pH. Aux pH basiques, la stabilité diminue, la température de dénaturation descend alors à 50 °C pour un pH 9. Cela est dû à une augmentation de la réactivité des groupements thiols par la dissociation des protons qui favorisent les réactions d'oxydations et par des répulsions électrostatiques (Verheul et al., 1998; Cayot & Lorient, 1997; Wong et al., 1996; de Wit, 1989). Aux pH acides, la stabilité thermique de la β lg native augmente (Verheul et al., 1998; Hambling et al., 1992; de Wit, 1989) car la molécule est plus compacte et elle est stabilisée par plusieurs liens hydrogène (Hambling et al., 1992). En plus, à pH acides, la plupart des groupements sulfhydryles sont protonés et donc ne sont pas réactifs. Ainsi, les agrégats formés à des pH < 6.5 sont maintenus essentiellement par des interactions hydrophobes et des liens hydrogène. À des pH < 3, la dénaturation thermique est partiellement réversible si le traitement n'est pas trop sévère (e.g. température < 120 °C et temps courts). Par contre, lors d'un traitement thermique à un pH proche du IEP, une forte agrégation, causée par des interactions électrostatiques et hydrophobes, est suivie d'une précipitation (de Wit, 1989; Relkin, 1998).

La dénaturation causée par l'alcali est similaire à celle causée par le chauffage (Hambling et al., 1992).

La force ionique joue un rôle important dans la stabilité thermique de la β lg. En général tous les sels, au dessus d'une certaine concentration, favorisent l'agrégation en incitant les interactions hydrophobes par une diminution des répulsions électrostatiques (Cayot & Lorient, 1997). À des pH acides, une augmentation de la force ionique (0.5 – 1.0 M, selon le type de sel) prévient la dénaturation par un effet stabilisant (*salting-in*) qui stabilise la conformation dimérique (Renard et al., 1998), mais à des concentrations trop élevées (e.g. > 2 M) l'agrégation est favorisée (*salting-out*) (Verheul et al., 1998; Cayot & Lorient, 1997). Finalement, il a été trouvé qu'à des pH > IEP les ions peuvent interagir et se fixer aux groupements carboxyliques de la protéine et affecter la réactivité du groupement thiol (Jeyarajah & Allen, 1994). Pour le cas d'ions divalents, il a été trouvé que l'agrégation thermique à pH neutre augmente avec la concentration en Ca^{2+} . Celui-ci induirait de faibles modifications structurales dans la β lg résultant en une augmentation de son hydrophobicité et favorisant ainsi l'agrégation (Jeyarajah & Allen, 1994). De plus, les ions Ca^{2+} augmentent la réactivité des groupements thiol et pourraient former des ponts divalents entre groupements carboxylés (Cayot & Lorient, 1997; Jeyarajah & Allen, 1994).

1.1.2.3. Gélification de la β -lactoglobuline

La gélification protéique est utilisée non seulement pour la formation de gels viscoélastiques mais aussi pour l'amélioration de l'absorption d'eau, pour la texturation, l'épaississement, la liaison des particules et pour la stabilisation des émulsions et des mousses (Cheftel et al., 1985). La β lg est une des principales protéines gélifiantes présente dans le lactosérum (Fox, 2003; Cheftel et al., 1985), elle conduit à la formation de gels thermiques irréversibles et est très utilisée en industrie alimentaire pour cette propriété.

La formation du réseau protéique est le résultat d'un équilibre entre les interactions protéine – protéine, les interactions protéine – solvant et les forces attractives et répulsives entre chaînes polypeptidiques adjacentes (Bryant & McClements, 1998; Cheftel et al., 1985). Les interactions hydrophobes (accentuées par les températures élevées), électrostatiques (telles

les ponts Ca^{2+}), les liens hydrogène (accrues par le refroidissement) et / ou les liens disulfures, représentent les forces attractives. Leurs contributions respectives peuvent varier selon la nature de la protéine, les conditions du milieu et les diverses étapes du processus de gélification (Cheftel et al., 1985). L'effet de différents paramètres (concentration protéique, pH, force ionique, nature des ions, et température, notamment) sur la gélification a été largement étudié (Clark, 1998). La gélification de la β lg induite par la chaleur peut être divisée en quatre étapes : la dissociation en monomères, l'activation des molécules par un dépliement partiel, la formation d'agrégats, et la fixation du réseau par des interactions non covalentes (Cayot & Lorient, 1997). À la deuxième étape, les protéines commencent à s'agréger pour former des agrégats primaires de forme globulaire qui s'associeront finalement en un réseau tridimensionnel piégeant un grand volume de liquide (Ikeda, 2003; Relkin, 1998; Cheftel et al., 1985).

À des pH loin du IEP ($4.0 > \text{pH} > 6.0$), et à de faibles forces ioniques, des gels appelés « moléculaires » sont formés (Bryant & McClements, 1998; Langton & Hermansson, 1992). Dans ces conditions, les protéines se repoussent car elles sont chargées négativement. L'agrégation induite par la chaleur procède donc lentement, menant à la formation d'un réseau composé par des brins très fins (de l'ordre des microns) avec une apparence transparente ou translucide. Il a été proposé que la formation de brins, à un pH > 6.0 , serait causée par l'échange de liens entre le groupement thiol d'une molécule et un des deux liens disulfures d'une autre molécule, laissant un nouveau thiol libre pour continuer la réaction (Bryant & McClements, 1998). Les gels moléculaires possèdent des textures très différentes selon le pH. À des pH neutres, la texture est caoutchouteuse et déformable, alors qu'à des pH acides les gels formés peuvent présenter de la synérèse et sont plus cassants. Ceci serait un reflet de l'absence de liens disulfures intermoléculaires du fait qu'à pH acide les groupements sulfhydryles sont stables (Ikeda, 2003; Ikeda & Morris, 2002; Clark, 1998; Langton & Hermansson, 1992). Dans ce cas, le gel est maintenu par des forces hydrophobes, interactions ioniques et liens hydrogène (Bryant & McClements, 1998).

À des pH proches du IEP ($\text{pH} \sim 4.0$ à 6.0) ou en augmentant la force ionique, des gels « particuliers » sont formés. Sous ces conditions, les forces électrostatiques répulsives sont

réduites et l'agrégation induite par la chaleur est plus rapide, résultant en la formation de gels opaques avec de grandes structures (de l'ordre du micron) particulières homogènes lorsque le pH est entre 5.0 et 6.0, et plus hétérogènes à des pH entre 4.0 et 5.0 (Ikeda, 2003; Ikeda & Morris, 2002; Clark, 1998; Langton & Hermansson, 1992; Stading et al., 1992). Ces gels sont plus fermes que les gels moléculaires et expulsent l'eau facilement du fait que les interactions sont plus fortes et que leur structure est plus poreuse (Ikeda, 2003; Ikeda & Morris, 2002; Langton & Hermansson, 1992; Stading et al., 1992).

La gélification des protéines sériques peut aussi survenir à froid à condition que les protéines aient été préalablement traitées par un chauffage au-dessus d'au moins 70°C pour former des petits agrégats précurseurs, puis refroidies (Bryant & McClements, 1998). Ce pré-traitement doit se faire à des concentrations protéiques inférieures à celles nécessaires pour former des gels thermiques, à de faibles forces ioniques et à un pH loin du IEP, pour empêcher une sur-agrégation (Bryant & McClements, 1998). La solution contenant les agrégats précurseurs peut ensuite être gélifiée généralement par l'ajout de sels tels le NaCl ou le CaCl₂. (Bryant & McClements, 2000; Hongsprabhas et al., 1999) ou par une acidification (Britten & Giroux, 2001). Dans les deux cas, les gels sont obtenus par une réduction des forces électrostatiques répulsives, amenant les agrégats précurseurs à interagir et à former un réseau (Britten & Giroux, 2001; Bryant & McClements, 1998). Les gels obtenus à froid sont en général plus transparents et plus fermes que les gels qui auraient été obtenus à une même concentration protéique, par une gélification thermique. Leurs propriétés peuvent être grandement modifiées par la concentration et la valence des ions ajoutés. Ainsi, en augmentant la concentration en ions, la gélification est plus rapide et des gels plus opaques et plus fermes sont obtenus. Toutefois, ces gels présentent aussi une capacité de rétention d'eau inférieure et une texture plus cassante (Bryant & McClements, 2000; Bryant & McClements, 1998; Roff & Foegeding, 1996). Finalement, une concentration inférieure d'ions divalents (10-15 mM comparée à 100 mM pour les ions monovalents) est nécessaire pour induire la gélification, car ceux-ci sont plus efficaces pour masquer les répulsions électrostatiques et peuvent former des pontages salins (Britten & Giroux, 2001; Bryant & McClements, 2000; Hongsprabhas et al., 1999; Roff & Foegeding, 1996).

1.1.2.4. Propriétés interfaciales

La β lg possède de bonnes propriétés de surface, et est très utilisée pour la stabilisation d'émulsions et de mousses. La principale force menant à l'absorption des protéines à une surface hydrophobe est celle d'enlever les résidus apolaires du milieu aqueux. L'absorption de la β lg à des surfaces apolaires implique un dépliement et une agrégation qui a une certaine analogie avec la dénaturation thermique (Dickinson, 2003). La capacité émulsifiante de la β lg dépend principalement du pH. À des pH acides la protéine est plus compacte et a donc une activité d'interface plus faible. En augmentant le pH de 3 à 7, la capacité de la protéine de se réarranger à l'interface augmente. Le ratio d'absorption de la protéine est maximal à pH 4.5, pH proche du IEP, car la répulsion électrostatique diminue entre les protéines. Cependant les globules formés entre pH 4.0 et 6.0 sont plus grands que ceux formés à des pH plus alcalins (Cayot & Lorient, 1997; Hambling et al., 1992). D'un autre côté, la stabilité des mousses est maximale à un pH proche du IEP, si la β lg n'est pas dénaturée (Cayot & Lorient, 1997).

1.1.3. La gomme xanthane

1.1.3.1. Structure moléculaire

Le xanthane est un hétéropolysaccharide produit à l'échelle industrielle par la fermentation aérobie de la bactérie *Xanthomonas campestris* (Sutherland, 1990). Sa structure est constituée d'une chaîne principale de β -D-glucoses liés en $\beta(1\rightarrow4)$, semblable à la cellulose. Une molécule de glucose sur deux porte une chaîne latérale trisaccharidique composée d'un α -D-mannose, d'un acide β -D-glucuronique et d'un β -D-mannose terminal (Figure 1.3). Le résidu interne de mannose est généralement acétylé sur le carbone 6. Environ 30% des résidus mannose terminal portent un groupement pyruvate lié sous forme chélatée entre les carbones 4 et 6 (Doublier, 1993; Kang & Pettitt, 1992; Holzwarth, 1976). Les acides glucuroniques et les acides pyruviques chargés sont ionisables, et donc responsables de la nature anionique du xanthane (charge négative jusqu'à pH 1) (Doublier, 1993; Kang & Pettitt, 1992; Richardson & Ross-Murphy, 1987). Le contenu des résidus

pyruvate et acétate varie selon la souche de bactérie (Sutherland, 1981), le procédé de fermentation, les conditions après fermentation et les étapes de purification. (Rao & Sureshkumar, 2001; Flores-Candia & Deckwer, 1999; Shu & Yang, 1990). Ces groupements peuvent être neutralisés dans les produits commerciaux avec des ions Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} (Société SATIA, 1986). La forme neutralisée peut être convertie en forme acide par échange d'ions ou par dialyse d'une solution acide (Jeannes et al., 1961).

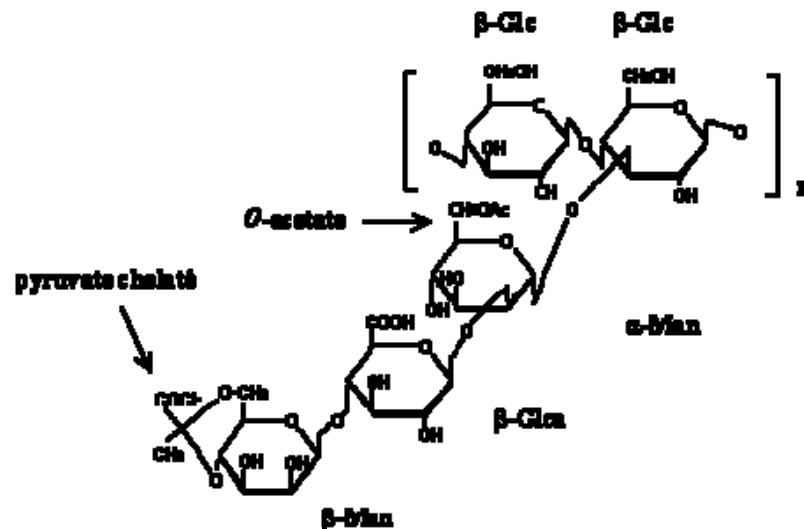


Figure 1.3. Structure chimique de l'unité de base du xanthane.

Source : Christensen et al. (1993b).

Des études de diffraction des rayons X, montrent que la conformation moléculaire du xanthane cristallin consiste en une hélice quintuple 5_1 , et que l'unité répétitive est un pentasaccharide avec une longueur de 4.7 nm (Figure 1.4), correspondant à $1900 \text{ g mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ pour une conformation en double hélice (Okuyama et al., 1980; Moorhouse et al., 1977). En solution aqueuse et hautes forces ioniques, le xanthane adopte une conformation hélicoïdale ordonnée, semblable à celle trouvée dans l'état cristallin (Sato et al., 1984a, b; Morris et al., 1977), avec les chaînes latérales repliées et alignées le long de la chaîne principale (Kang & Pettitt, 1992) (Figure 1.4). Des études en RMN et en dichroïsme circulaire (CD) démontrent que cette conformation est favorisée (Morris et al., 1977). En

effet, la structure en hélice du xanthane est stabilisée par quatre liens hydrogène intramoléculeaires par unité de pentasaccharide : un entre le α -D-mannose et β -D-glucuronate de la chaîne latérale, un entre un glucose de la chaîne principale et la α -D-mannose qui s'y rattache, et les deux autres entre les glucoses adjacents de la chaîne principale (Okuyama et al., 1980). L'alignement des chaînes latérales confère une grande rigidité et stabilise la structure hélicoïdale du xanthane (KELCO Co., 1996; Morris, 1995; Young et al., 1994; Pettitt, 1980), rendant la molécule stable dans une large gamme de pH et de température (KELCO Co., 1996; Pettitt, 1980).

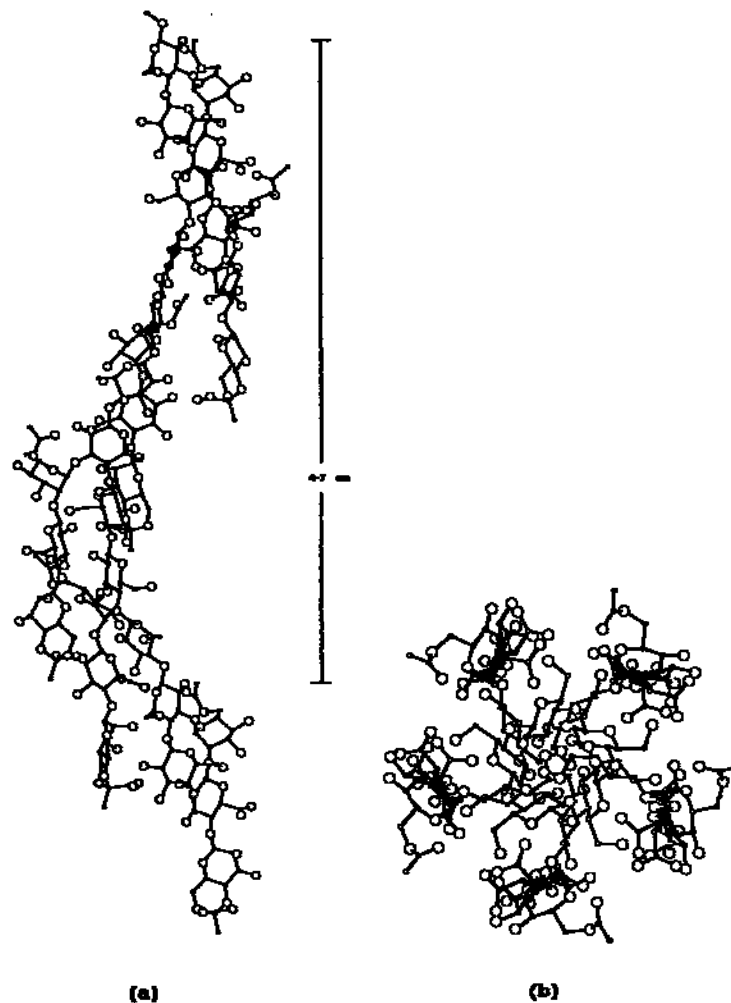


Figure 1.4. Structure hélicoïdale du xanthane (a) vue perpendiculaire (b) vue axiale.

Source: Moorhouse et al. (1977).

De plus, les chaînes latérales protègent la chaîne principale contre l'attaque des acides, des alcalis et des enzymes (Pettitt, 1980). D'autre part, les ponts H intramoléculaires gênent presque complètement la rotation interne autour des oxygènes glucosidiques entre deux glucoses. Ceci a pour effet de raidir la chaîne d'avantage, résultant en une augmentation de ses dimensions et de sa viscosité intrinsèque. Les ponts H peuvent aussi se former entre différentes molécules et former des hélices doubles assemblées de façon parallèle ou antiparallèle (Okuyama et al., 1980).

1.1.3.2. Transition conformationnelle hélice rigide – brin flexible

Il est reconnu de nos jours que la conformation du xanthane peut être celle d'une hélice simple ou d'une hélice double selon la force ionique, la température, le type de solvant et la structure primaire (contenu en pyruvate et en acétate). Un autre facteur particulièrement important est l'histoire thermique de l'échantillon, c'est-à-dire, les traitements subis pendant et après la fermentation (extraction par solvant, pasteurisation, séchage, dialyse, centrifugation, filtration) (Morris, 1990; Lecourtier et al., 1986; Muller et al., 1986).

La conformation hélicoïdale ordonnée peut subir une transition (ordre-désordre) qui résulte en une chaîne flexible et désordonnée (Figure 1.5) (Dentini et al., 1984; Paoletti et al., 1983; Morris et al., 1977; Holzwarth, 1976). Cette transition peut être induite à de faibles forces ioniques ($< 10^{-3}$ M NaCl) ou lors d'un chauffage au-delà d'une certaine température nommée température de transition (T_m). La T_m a été détectée par plusieurs méthodes incluant la rotation optique (Norton et al., 1984). Sous ces conditions de désordre, les répulsions électrostatiques entre les groupements carboxyliques ionisés entraînent un relâchement des chaînes latérales et résultent en une conformation désordonnée (Young et al., 1994; Liu et al., 1987; Norton et al., 1984). Cette transition est accompagnée d'une importante diminution du poids moléculaire et de la viscosité des solutions (Rocherfort & Middleman, 1987; Lecourtier et al., 1986; Muller et al., 1986; Pettitt, 1979).

La T_m se situe autour de ≈ 55 °C pour une solution libre de sels et avec une concentration de 1% p/p de xanthane (Morris, 1990; Sutherland, 1990). La T_m dépend du poids moléculaire (Liu & Norisuye, 1988; Milas et al., 1986a), du contenu en pyruvate et en

acétate (Christensen & Smidsrød, 1991; Shatwell et al., 1990; Dentini et al., 1984; Rees et al., 1982; Smith et al., 1981), de la force ionique et du type d'ions (Kitamura et al., 1991; Milas & Rinaudo, 1986b; Norton et al., 1984; Paradossi & Brant, 1982; Morris et al., 1977). En fait, la T_m augmente toujours linéairement avec le logarithme de la force ionique totale (Kitamura et al., 1991; Rinaudo & Milas, 1982). Ainsi, la présence de faibles quantités d'électrolytes accentue la stabilité thermique de la molécule en réduisant la répulsion électrostatique entre les anions carboxyliques des chaînes latérales qui s'effondrent sur la chaîne principale. La température de transition passe alors de 63 °C à 0.05% NaCl à plus de 100 °C à 5% NaCl (KELCO Co., 1996; Rocherfort & Middleman, 1987; Morris, 1977).

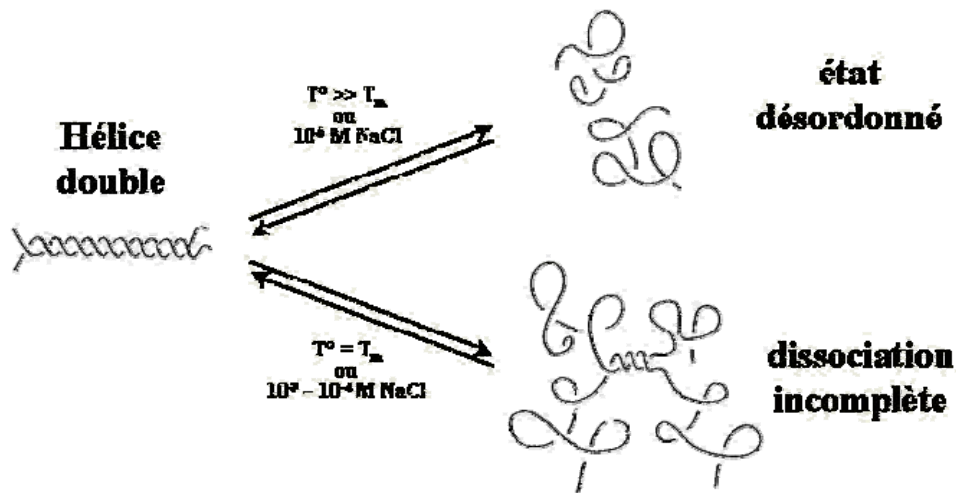


Figure 1.5. Transition du xanthane de l'état ordonné à l'état désordonné.

Adaptée de Morris (1995).

D'autre part, Kitamura et al. (1991) ont trouvé qu'à la même force ionique, le xanthane riche en pyruvate (DS 0.9) est plus sensible à la température ($T_m = 48.8$ °C) que le xanthane faible en pyruvate (DS 0.14) ($T_m = 85.3$ °C). Des résultats similaires ont été trouvés par d'autres auteurs (Muller et al., 1986; Dentini et al., 1984; Norton et al., 1984; Rinaudo et al., 1983; Smith et al., 1981; Holzwarth & Ogletree, 1979) démontrant que le pyruvate cause une déstabilisation de la structure ordonnée par des répulsions électrostatiques et des

contraintes stériques qui s'opposent à la formation d'une hélice compacte (Lecourtier et al., 1986; Dentini et al., 1984; Smith et al., 1981). Les groupements acétate quant à eux, ont un rôle stabilisateur de la conformation ordonnée, car ils sont impliqués dans la formation des liens intermoléculaires avec la chaîne principale, du fait qu'ils possèdent des atomes d'oxygène qui peuvent fonctionner comme accepteurs de liens hydrogène (Dentini et al., 1984; Tako & Nakamura, 1984; Rinaudo et al., 1983; Smith et al., 1981).

L'explication de la transition de conformation du xanthane est reliée à sa structure moléculaire. Selon qu'il s'agisse d'une structure native ou « renaturée », les scénarios suivants pour la transition ont été proposés.

Si la molécule se trouve sous la forme d'une hélice en brin simple (état natif), la transition ordre - désordre est un processus intramoléculaire (hélice rigide → chaîne flexible) (Rocherfort & Middleman, 1987; Milas et al., 1986b; Muller et al., 1986; Norton et al., 1984; Dea, 1982; Frangou et al., 1982; Rees et al., 1982; Rinaudo & Milas, 1978; Morris et al., 1977). Cette théorie est basée sur des études montrant que les changements de conformation sont dus à des arrangements intramoléculaires plutôt qu'intermoléculaires. Les chaînes latérales deviennent alors mobiles (les liens H sont brisés), avant la chaîne principale, résultant en une diminution du volume hydrodynamique et de la viscosité mais sans diminution du P_M (Kang & Pettitt, 1992; Rees et al., 1982). Appuyant ce modèle, Dea (1982) explique le caractère thixotropique du xanthane et sa capacité à stabiliser les émulsions, par une association intermoléculaire des hélices simples et rigides. La diminution de la viscosité, sous l'influence de la température, s'expliquerait par l'effondrement de ce réseau.

Si le xanthane se trouve en forme de double hélice, alors la transition implique une dissociation ordre – désordre en brins simples. Dans ce cas, il y a une diminution du P_M , du volume hydrodynamique et de la viscosité (Christensen et al., 1996; Morris, 1995; Christensen & Smidsrød, 1991; Kitamura et al., 1991; Milas et al., 1985). En ramenant cette solution sous des conditions favorisant une structure ordonnée, les hélices simples se re-associent à nouveau pour former des hélices doubles « renaturées ». Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour la dissociation de la double hélice. Le plus répandu est

celui proposé par Liu & Norisuye (1988) et Milas & Rinaudo (1984) et concerne une dissociation incomplète de l'hélice double à de hautes températures et/ou à de faibles forces ioniques. La double hélice se déferait à partir des extrémités, à cause des répulsions entre les groupements chargés de la molécule, pour donner une conformation de « brin double étendu » présentant quelques segments d'hélice double. La Figure 1.6a illustre ce phénomène. Un arrangement via l'association d'hélices doubles (Figure 1.6b) expliquerait le comportement de gel faible (Morris, 1995). Il a aussi été proposé que les agrégats de xanthane sont formés par des molécules adjacentes qui s'agrègent de façon parallèle (Norton et al., 1984), tel que vu par microscopie en force atomique (Capron et al., 1998).

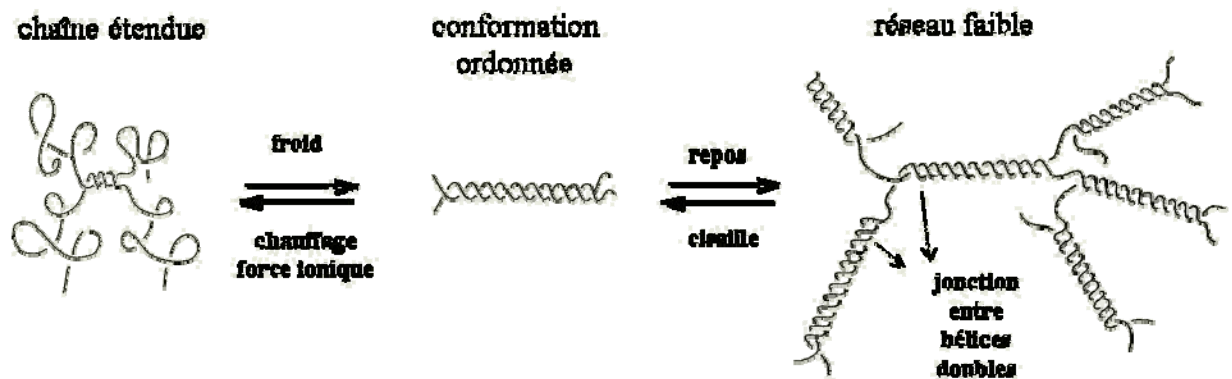


Figure 1.6. Dissociation incomplète du xanthane et association d'hélices doubles.

Adaptée de Morris (1995).

Stokke et al. (1989) suggèrent que la dissociation en brins simples est rarement obtenue quand du xanthane est exposé à des conditions de désordre en solution aqueuse, à moins que des conditions très sévères soient appliquées (i.e. $\leq 10^{-5}$ M NaCl ou exposition à des températures $T^\circ \gg T_m$ pour des périodes prolongés). Muller & Lecourtier (1988) proposent une théorie de dissociation en deux étapes. Dans la première étape (chauffage jusqu'à la T_m ou exposition à 10^{-3} - 10^{-4} M NaCl), l'hélice compacte s'étend en une conformation plus lâche, sans diminution du P_M mais avec une augmentation de la viscosité. En retournant aux conditions de départ, la conformation originale est récupérée. La deuxième étape est plus lente et a lieu seulement à des températures beaucoup plus élevées que la T_m ou des forces

ioniques $\leq 10^{-5}$ M NaCl. Sous ces conditions il y a une séparation complète de la double hélice avec une diminution du P_M . Plusieurs études ont trouvé, qu'entre les deux conformations extrêmes, des conformations intermédiaires peuvent exister (Muller & Lecourtier, 1988) et que des séquences ordonnées ou désordonnées peuvent co-exister dans la même molécule (Norton et al., 1984). Dans ce sens, les études par microscopie électronique (Christensen et al., 1993a, b; Stokke et al., 1989; Holzwarth, 1976) sont particulièrement indéniables.

D'autre part, Milas & Rinaudo (1986) ont trouvé que le xanthane renaturé a une conformation de la chaîne principale plus étendue, présentant le même P_M que le xanthane en double hélice qui n'a jamais été chauffé, mais avec une viscosité plus élevée. Milas & Rinaudo (1986) soutiennent que ceci n'est pas nécessairement lié à la formation d'hélices doubles possédant des régions discontinues ou des extrêmes non appareillés, leur permettant de s'associer entre elles, pour donner des valeurs plus élevées de P_M et de viscosité, comme proposé par d'autres auteurs (Rocherfort & Middleman, 1987). Ce comportement serait plutôt dû à des modifications dans le patron d'interaction entre la chaîne principale et les chaînes latérales, résultant en un volume hydrodynamique plus grand.

Il est de nos jours accepté que le xanthane possède une conformation native en hélice simple, avec un poids moléculaire de 2×10^6 Da (Southwick et al., 1982), mais qu'après les traitements subis pendant sa purification, incluant une pasteurisation et séchage, il se présente sous forme d'une hélice double (Sutherland, 1990; Muller et al., 1986). Donc, en général, les échantillons commerciaux sont considérés sous forme d'hélices doubles (Young et al., 1994; Holzwarth, 1976). En effet, plusieurs études ont trouvé que des traitements tels l'atomisation et la lyophilisation, pratiqués en industrie, induisent la formation d'agrégats intermoléculaires (Lagoueyte & Paquin, 1998; Muller et al., 1986). D'où la grande variabilité des P_M rapportés en littérature pour le xanthane, qui varient entre 2×10^6 et 5×10^7 Da, soit entre 2000–50000 unités répétées. Cette variation est le résultat du phénomène d'association entre les molécules (KELCO Co., 1996; Young et al., 1994; Sutherland, 1990; Holzwarth, 1976).

Les valeurs rapportées en littérature sur la longueur de persistance q (une mesure de la rigidité de la molécule) obtenues à basses températures et hautes forces ioniques, par viscosimétrie à partir des solutions diluées, ou par diffusion de la lumière du xanthane, sont de l'ordre de $q = 110 - 150$ nm (Morris, 1990; Lecourtier et al., 1986; Muller et al., 1986 et 1984; Sato et al., 1984a, b; Paradossi & Brant, 1982; Holzwarth & Prestidge, 1977). Ceci indique que le xanthane est autour de 10 fois plus rigide que la cellulose et comparable à la double hélice de DNA ($q = 150$ nm à des forces ioniques élevées), au polysaccharide schizophyllan ($q = 150-200$ nm) et au polypeptide collagène ($q = 170$ nm). Ces deux dernières macromolécules étant des triple-hélices, cela indique que le xanthane est un des biopolymères les plus rigides dans la nature (Shatwell et al., 1990; Richardson & Ross-Murphy, 1987; Lecourtier et al., 1986; Sato et al., 1984b, c). Toutefois, à de faibles forces ioniques, sa longueur de persistance est plus faible, soit $q = 50-60$ nm, ce qui est relié à une conformation désordonnée (Morris, 1990; Milas & Rinaudo, 1986; Muller et al., 1986; Holzwarth & Prestidge, 1977).

1.1.3.3. Le xanthane en solution

Par la nature anionique des chaînes latérales et les contraintes stériques qu'elles imposent, l'eau peut pénétrer plus facilement dans les espaces intramoléculaires, facilitant ainsi la solubilisation du xanthane (Morris, 1995). D'autre part, toujours par contrainte stérique, les chaînes latérales limitent la formation de liens intermoléculaires évitant ainsi la gélification du xanthane (KELCO Co., 1996; Kang & Pettitt, 1992). Au-dessus d'une certaine concentration, les molécules rigides s'enchevêtrent pour former un réseau stabilisé par des liaisons spécifiques entre les chaînes de xanthane, notamment des liens hydrogène (Richardson & Ross-Murphy, 1987), mais d'autres types d'interactions non-covalentes ont aussi lieu, telles des interactions ioniques (Rocherfort & Middleman, 1987; Frangou et al., 1982). Les propriétés rhéologiques d'un tel système ressemblent plus à celle d'un gel très faible qu'à une solution gouvernée par les enchevêtrements (Capron et al., 1997; Kang & Pettitt, 1992; Norton et al., 1984; Rees et al., 1982). Cette structuration est responsable du seuil d'écoulement et de la viscosité exceptionnellement haute des solutions de xanthane à de faibles forces de cisaillement. Sous une agitation plus forte, le réseau est déstructuré. Les

molécules s'alignent dans le sens du cisaillement et confèrent un important caractère pseudoplastique à la solution. Lorsque l'agitation cesse, le réseau se forme à nouveau très rapidement (Doublier, 1993; KELCO Co., 1996). Ce faible réseau sera à la base de la capacité du xanthane de maintenir des particules en suspension ou de stabiliser une émulsion contre la remontée ou la fusion des gouttelettes de matière grasse pour de longues périodes de temps (Lapasin & Prici, 1995; Kang & Pettitt, 1992; Rees et al., 1982; Morris, 1977). Le caractère rhéofluidifiant réversible permettrait la manipulation et le contrôle des processus tels que le pompage, le remplissage et l'atomisation (Morris, 1995).

Il a été aussi suggéré que les propriétés inusitées du xanthane soient dues à la formation d'une phase nématique en solution (orientation moléculaire) (Carnali, 1991). Ce type de comportement est typique des polymères rigides ou semi-rigides en solution, qui forment spontanément des phases ordonnées au-dessus d'une certaine concentration critique, pour réduire au minimum le volume exclu du polymère (Richardson & Ross-Murphy, 1987).

Finalement, il a été trouvé que les échantillons avec un haut contenu en pyruvate possèdent une viscosité et un caractère pseudoplastique plus élevés car le pyruvate induit des associations intermoléculaires (Flores-Candia & Deckwer, 1999; Hassler & Doherty, 1990; Smith et al., 1981; Sandford et al., 1977). En effet, les associations intermoléculaires sont encouragées par des interactions entre les groupements méthyles localisés à la périphérie des molécules. L'association entre les molécules de xanthane est maximale à de hautes teneurs en pyruvate et quand la répulsion entre chaînes est minimisée par de hautes forces ioniques (Smith et al., 1981). Les groupements acétates possèdent aussi des groupements méthyles, mais ils ne sont pas disponibles, ils interagissent plutôt avec la chaîne principale.

1.1.3.4. Gélification induite du xanthane

Le xanthane forme des gels synergiques et thermoréversibles avec d'autres polysaccharides non gélifiants comme les galactomannanes et certains glucomannanes. Les gels sont stabilisés par des liens non covalents entre molécules de différentes espèces. Avec la gomme caroube, des gels fermes sont formés, tandis qu'avec la gomme tara des gels plus mous sont obtenus. Dans tous les cas, les mélanges gélifient sous des conditions dans

lesquelles les composants individuels ne gélifient pas (Wang et al., 2002; Stokke et al., 1998; Morris et al., 1977 et 1990).

La gélification des dispersions de xanthane peut aussi être induite par l'ajout des ions divalents, trivalents ou des ions de borate, bien que le premier cas est probablement le seul d'importance pour des applications alimentaires (Stokke et al., 1998; Morris, 1990).

1.1.4. Traitements de dégradation physique du xanthane

En dehors des conditions environnementales, plusieurs traitements physiques ont été utilisés pour modifier et étudier la structure et la conformation du xanthane ainsi que pour comprendre le mécanisme de dégradation induit par les différents traitements. Ces études peuvent être divisées en 4 types : les hydrolyses acides ou hydrolyses chimiques, les traitements aux hautes pressions dynamiques, les ultrasons (sonication) et l'hydrolyse enzymatique. La plupart des travaux incluent la mesure du P_M par viscosité intrinsèque, la mesure de la viscosité des solutions à différentes concentrations et forces ioniques et, plus rarement, une analyse de la composition et des changements conformationnels par DSC et activité optique.

1.1.4.1. L'hydrolyse acide

L'acide chlorhydrique attaque les liens covalents de la molécule de façon aléatoire. Il est, cependant, évident que la dégradation survient plus rapidement dans les chaînes latérales que dans la chaîne principale. Ceci est reflété par une diminution de la quantité de pyruvate et du ratio mannose/glucose, le point le plus sensible étant le mannose terminal (Christensen et al., 1996 et 1993a; Christensen & Smidsrød, 1991). La perte de ce résidu n'influence pas la vitesse de dépolymérisation de la chaîne principale, ni la viscosité intrinsèque, ni la T_m (Christensen et al., 1993a, b; Christensen & Smidsrød, 1991). Le mannose terminal n'est probablement pas essentiel pour maintenir la conformation ordonnée de la molécule et n'affecte donc pas la conformation hélicoïdale qui gouverne d'une certaine façon tous ces paramètres (Christensen et al., 1993a, b; Christensen & Smidsrød, 1991). Cependant, il y a une diminution de l'enthalpie de transition lorsque ce

résidu est perdu, indiquant qu'une importante partie de la transition a lieu dans les chaînes latérales (Christensen et al., 1993c). Le contenu en acétate et en pyruvate est aussi perdu lors d'une hydrolyse acide. Toutefois, un haut P_M est conservé ($> 10^5$). Au début, la dégradation est plus lente, du fait que le xanthane se trouve sous conformation de double hélice. Cette conformation est maintenue jusqu'à ce qu'un assez grand nombre de liens soient brisés dans la chaîne principale, indiquant qu'il existe une longueur minimale de la chaîne nécessaire pour maintenir la structure double. Cette longueur minimale est de l'ordre de 10-15 unités de glucose (Christensen et al., 1993b).

La dégradation par hydrolyse acide augmente en se rapprochant de la température de transition. D'autre part, à des forces ioniques élevées (où la stabilité de la forme en hélice double est favorisée) la dégradation acide est plus lente (Christensen & Smidsrød, 1991). Le pH influence aussi le niveau de dégradation mais de façon moins importante. Par exemple à de faibles forces ioniques et $\text{pH} = 4$, la dégradation est très rapide tandis qu'à des forces ioniques élevées et au même pH, la résistance à la dégradation est maximale (Christensen & Smidsrød, 1991).

Le traitement au peroxyde d'hydrogène ($\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{2+}$) (Christensen et al., 1996), diffère du traitement acide car il s'attaque préférentiellement au résidu de mannose interne et enlève toute la chaîne latérale (Christensen et al., 1996). En général, l'hydrolyse acide et l'hydrolyse par H_2O_2 se ressemblent puisque, dans les deux cas, il y a une dépolymérisation extensive, des changements dans la structure des chaînes latérales, ainsi qu'une libération des brins simples d'oligomères (Christensen et al., 1996).

1.1.4.2. Les traitements aux hautes pressions dynamiques

Les traitements aux hautes pressions dynamiques peuvent être effectués avec des appareils capables d'atteindre des pressions allant jusqu'à 2 000 MPa. Ces appareils peuvent ressembler aux homogénéisateurs classiques tel que l'Émulsiflex C-5 (Avestin, Ottawa, Canada). Il existe d'autres appareils qui opèrent sur un principe complètement différent. C'est le cas du Microfluidisateur™.

1.1.4.3. La microfluidisation

La microfluidisation est une technologie à haute pression qui peut atteindre 175 MPa. Sa chambre de réaction ne contient pas de parties mobiles, ce qui la distingue du système conventionnel d'homogénéisation à valves. Dans cet appareil, le liquide sous pression est dirigé vers une chambre de réaction où il est divisé en deux jets qui passent par des microcanaux. Dans la zone de réaction, les deux jets de liquide entrent en contact à un angle de 180°, produisant des phénomènes de cavitation ainsi que des forces de cisaillement et de turbulence (Paquin et al., 1993). Cette technologie est utilisée pour la production des microémulsions pour l'industrie pharmaceutique et alimentaire (Le Hénaff, 1996; Paquin et al., 1993; Silvestri & Gabrielson, 1991).

Peu d'études ont été réalisées concernant le traitement aux hautes pressions dynamiques du xanthane. En fait, les seuls travaux qui ont été repérés dans la littérature sont ceux effectués dans les laboratoires du Centre STELA (Lagoueyte & Paquin, 1998; Le Hénaff, 1996). Cependant, il est possible de trouver des études sur la microfluidisation d'autres polysaccharides tel le tragacanthé (Cencia-Rohan & Silvestri, 1993; Silvestri & Gabrielson, 1991).

La dégradation des polymères à faible ou à haut poids moléculaire, par des procédés de haut cisaillement, a déjà été étudiée théoriquement et expérimentalement par Harrington & Zimm (1965). Ces procédés reçoivent le nom de dégradation mécanique ou dégradation par cisaillement hydrodynamique (Cencia-Rohan & Silvestri, 1993). La microfluidisation produit des forces de cisaillement contrôlées, de la turbulence et de la cavitation qui peuvent causer l'exposition des liens covalents des polymères aux stress mécaniques élevés et aux forces d'élongation rendant les molécules susceptibles à une dépolymérisation (Floury et al., 2002; Harrington & Zimm, 1965). Il a été suggéré que le mécanisme de dégradation mécanique suit une cinétique de scission aléatoire (de premier ordre) et survient seulement une fois que les forces atteintes dépassent une certaine valeur critique particulière à chaque système polymère - solvant. (Cencia-Rohan & Silvestri, 1993; Silvestri & Gabrielson, 1991; Harrington & Zimm, 1965).

Lagoueyte & Paquin (1998) rapportent que la microfluidisation diminue la taille moyenne des molécules de xanthane et qu'après 12 passes à 75 MPa, un plafond de diminution du P_M est atteint. Il a été suggéré que les forces de cavitation et de cisaillement provoquent une transition conformationnelle (ordre - désordre) de la molécule. La réduction du P_M pourrait être due au bris des liens hydrogène entre les molécules agrégées de xanthane. Par contre, Cencia-Rohan & Silvestri (1993) et Silvestri & Gabrielson (1991), rapportent le bris de liens covalents du polysaccharide tragacathe aux forces de haut cisaillement et de turbulence présents dans la chambre du microfluidisateur; indiquant que le seuil critique spécifique pour ce système polymère – solvant avait été atteint (Cencia-Rohan & Silvestri, 1993; Silvestri & Gabrielson, 1991).

Des études préliminaires réalisées au Centre STELA (Laneuville et al., 1997) ont confirmé l'effet de la pression, du nombre de passes, et des paramètres tels la température de solubilisation, sur la viscosité intrinsèque et les caractéristiques d'écoulement du xanthane. Les trois facteurs étudiés avaient pour effet de diminuer le P_M et la viscosité du xanthane. Le P_M obtenu par le traitement mécanique est inversement proportionnel à la pression appliquée et au nombre de passes. La solubilisation du xanthane, à des températures supérieures à 50 °C, permet une réduction plus importante du P_M que lorsque la dilution se fait à 25 °C. Cela correspond à la température de transition de configuration du xanthane à faibles forces ioniques. Cet effet est probablement causé par l'obtention d'une dilution libre de micro - agrégats, lesquels, comme il sera discuté au Chapitre 2, confèrent une plus grande stabilité contre la dégradation mécanique. En conclusion, les résultats obtenus dans le passé sur la microfluidisation du xanthane, laissent prévoir que le contrôle des paramètres du procédé permettra d'obtenir une dégradation contrôlée du xanthane.

1.1.4.4. Les hydrolyses enzymatiques

Les hydrolyses enzymatiques incluent l'utilisation de divers types de xanthanases, qui hydrolysent des liens spécifiques. Par exemple, une enzyme produite par les espèces *Bacillus*, enlève préférentiellement les chaînes latérales. D'autres enzymes travaillent de façon aléatoire, comme diverses dépolymérase qui dégradent le xanthane à différents

niveaux (Christensen & Smidsrød, 1991; Yalpani, 1988). La dégradation enzymatique donne des résultats très variables et résulte en des échantillons très polydisperses, d'où sa faible utilisation.

1.1.4.5. Traitement par ultrasons

Le traitement par ultrasons a pour effet de diminuer le P_M du xanthane, de même que la viscosité des solutions obtenues. Cette dégradation semble être aléatoire et les changements induits n'ont pas une grande influence sur la T_m , montrant que la force ionique et l'état d'agrégation des molécules ont plus d'influence sur la T_m (Kitamura et al., 1991; Milas et al., 1985).

1.1.5. Dégradation contrôlée pour la fabrication d'ingrédients fonctionnels

La presque totalité des études décrites sur la dégradation du xanthane par divers moyens visent à comprendre l'effet « négatif » d'une dépolymérisation. Cependant, dans le présent travail, la dépolymérisation est vue d'un oeil positif. De nos jours, de moins en moins d'ingrédients sont introduits sur le marché, chaque année, étant donné les coûts élevés et le long temps requis pour qu'ils soient testés, jugés sécuritaires et approuvés comme ingrédients alimentaires par les autorités pertinentes. De nouvelles routes sont donc nécessaires pour amplifier la gamme d'ingrédients disponibles dans l'industrie alimentaire. Par exemple, en augmentant les applications potentielles des hydrocolloïdes par une diversification de leurs propriétés fonctionnelles. Une des routes pour atteindre cet objectif est par la dégradation contrôlée des macromolécules (dépolymérisation partielle). Plusieurs exemples sont donnés par Evans & Marr (1997) qui, entre autres, rapportent l'amélioration des propriétés texturales de gels par une réduction du P_M du polysaccharide gélifiant par divers méthodes (hydrolyse enzymatique, acide ou oxydative et même en choisissant un certain batch dans la production). Ainsi, des gels à base de xanthane/gomme caroube partiellement dépolymérisée, ont une rigidité, élasticité, et point de fonte plus bas que ceux avec de la gomme native; ce qui les rend plus souples et avec un caractère de fonte dans la

bouche très désirable. Un autre exemple inclut la production de gels d'alginate partiellement dépolymérisé et calcium qui gélifieraient plus lentement donnant la possibilité d'utiliser l'alginate dans des systèmes riches en calcium comme le lait ou dans des produits où la gélification se ferait à froid. Bref, la plage de structures et textures normalement obtenues avec ces polysaccharides serait élargie, offrant la possibilité de créer de nouvelles textures gélifiées. Une autre étude (Tuinier et al., 2000) rapporte l'effet d'utiliser une gomme guar partiellement dépolymérisée en mélange avec le lait, résultant en une réduction de la zone d'incompatibilité thermodynamique. Il est alors possible d'obtenir une viscosité supérieure sans séparation de phases rendant le système plus stable.

Enfin plusieurs autres études ont porté sur la dégradation contrôlée des polymères, par différents moyens, tant pour comprendre l'effet au niveau moléculaire (Christensen et al., 1996; Stokke & Christensen, 1996; Christensen & Smidsrød, 1991; Milas et al., 1986a) comme pour élargir leurs propriétés fonctionnelles autant dans l'industrie alimentaire (Floury et al., 2002; Corredig & Wicker, 2001) qu'en pharmaceutique (Lii et al., 1999; Silvestri & Gabrielson, 1991; Kojima et al., 1984).

1.2. Mélange de protéines et polysaccharides en milieu aqueux

Lorsque les protéines et les polysaccharides sont mélangés en solution, ils interagissent de différentes façons selon les conditions du milieu. Il en résulte une diversification de leurs propriétés mécaniques et texturales, de gélification, de solubilité, de co-solubilité, ainsi que de leur comportement aux interfaces. En fait, les propriétés fonctionnelles des mélanges de biopolymères sont souvent très différentes des propriétés des solutions des polymères purs (Tolstoguzov, 1997; Ledward, 1994; Dickinson, 1993; Samant et al., 1993).

Du point de vue thermodynamique, les protéines et les polysaccharides peuvent être compatibles ou incompatibles en solution (Ledward, 1994; Samant et al., 1993). Sous des conditions d'incompatibilité thermodynamique, le système subit une séparation de phases dite ségrégative. Un système biphasé est alors obtenu dans lequel les différentes molécules se retrouvent principalement dans des phases séparées. Sous des conditions de compatibilité thermodynamique, deux types de solutions peuvent être obtenus : 1) un

système homogène et stable dans lequel les molécules sont co-solubles; ou 2) un système biphasé où les deux molécules interagissent de façon attractive et se retrouvent essentiellement dans la même phase concentrée, d'où le nom de séparation de phases associative. Dans le dernier système, une complexation ou une coacervation complexe a lieu en raison d'une attraction électrostatique entre les biopolymères.

1.2.1. Diagrammes de phase

La co-solubilité ou de séparation de phases dans un système de polymères en mélange aqueux peut être représentée par le biais des diagrammes de phases. La Figure 1.7 montre un diagramme de phases typique pour un système protéine – polysaccharide – eau. Ce type de diagrammes peut être construit de façon relativement simple et, dans certains cas, une observation directe de la séparation de phases dans un tube est suffisante (Dickinson & McClements, 1996; Tolstoguzov, 1994 et 1991). La concentration des polymères est montrée sur chaque axe. Deux régions principales peuvent être distinguées : la région monophasique, dans laquelle les deux polymères restent co-solubles; et la région correspondant à une séparation de phases. La ligne qui sépare ces deux régions est nommée courbe binodale (trait continu) (Tolstoguzov, 1994 et 1991). Normalement, les biopolymères ont une miscibilité limitée en solution, c'est pourquoi la binodale ne coïncide pas avec les axes du diagramme.

Dans la région monophasique, en dessous de la binodale, les deux polymères coexistent en une seule phase (compatibilité thermodynamique). Dans la région biphasique (\blacktriangle), au-dessus de la binodale, le système est instable et se sépare spontanément en deux phases (incompatibilité thermodynamique) : une phase riche en polysaccharides, dont la composition est présentée par les points (\triangle), et la phase riche en protéines, dont la composition est présentée par les points (∇).

L'analyse de chacune des phases permet de tracer les droites de conjugaison du diagramme. Les mélanges dont la composition se situe sur une même droite de conjugaison se séparent en deux phases ayant les mêmes concentrations, seuls les volumes diffèrent. Les polysaccharides étant des molécules très grandes occupent un volume hydrodynamique

plus large que les protéines compactes. Il n'est donc pas surprenant qu'à des concentrations similaires dans le mélange initial, la concentration finale de la phase riche en protéine soit plus élevée que la concentration finale en polysaccharide de la phase riche en polysaccharide. Ceci équivaut à augmenter la concentration en protéine (Ledward, 1994).

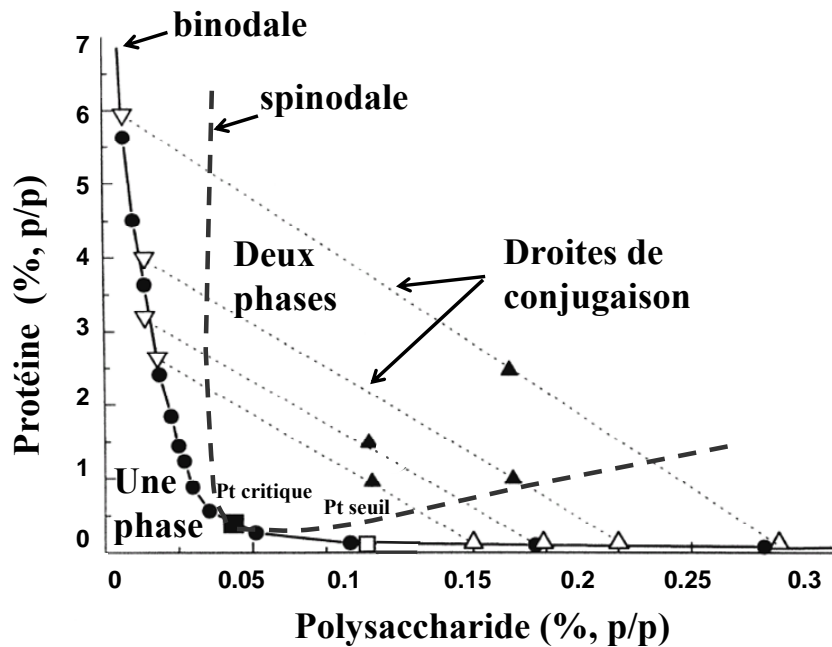


Figure 1.7. Diagramme de phases pour un système protéine - polysaccharide.

Adapté de Bourriot et al. (1997).

Le point critique (■) correspond à la composition d'un système se démixant en deux phases de même composition et de même volume. Le point seuil (□) est défini comme la plus faible concentration totale en biopolymères conduisant à une séparation de phases (Bourriot et al., 1997; Ledward, 1994). La région dans la binodale est séparée, à son tour, en deux régions par la ligne spinodale (trait pointillé). La zone qui se trouve entre les lignes binodale et spinodale est nommée métastable, la séparation de phases dans cette région aura lieu uniquement si certaines conditions spécifiques sont rencontrées. Ce point sera traité davantage dans la section 1.6.6.

Ce type de diagramme peut aussi être construit pour un système qui subit une séparation de phases associative. Dans ce cas, l'une des phases séparées est riche en complexes (contenant les deux molécules) et pauvre en solvant, et l'autre phase est très diluée et contient très peu de biopolymères. Les droites de conjugaison aident alors à calculer la composition des complexes formés ou, d'un autre point de vue, de déterminer le rendement de la complexation. Tolstoguzov (1994) présente un tableau condensé illustrant l'effet de la compatibilité et de l'incompatibilité sur les propriétés fonctionnelles des protéines et sur le potentiel pour diverses applications alimentaires.

Tableau 1.2. Effet de la compatibilité et de l'incompatibilité sur les propriétés fonctionnelles des protéines (Tiré de Tolstoguzov, 1994; traduction libre).

Dessous (compatibilité)	Dessus (incompatibilité)
Binodale	
Augmentation de l'activité thermodynamique des biopolymères dans tout le volume de la solution.	Augmentation de l'activité thermodynamique des biopolymères dans chacune des phases séparées.
Augmentation de l'absorption de la protéine à l'interface huile/eau.	Formation d'une multicouche de protéines à l'interface huile/eau.
Formation de gels mixtes	Formation de gels mixtes ou gels complexes
Augmentation de la vitesse de gélification et du module élastique des gels.	Encapsulation des phases non-polaires.

Dans les prochaines sections, l'incompatibilité et compatibilité thermodynamique seront traitées avec plus de détails.

1.3. Incompatibilité Thermodynamique

1.3.1. Séparation de phases ségrégative

Lors d'une incompatibilité thermodynamique, il y a formation d'un système biphasique liquide – liquide, où la protéine et le polysaccharide se trouvent préférentiellement séparés dans une des deux phases, d'où le nom de séparation ségrégative (Ledward, 1994; Castelain, 1986). L'interaction ségrégative a lieu au-delà d'un seuil de concentration en

polymères et lorsque les conditions environnementales favorisent les interactions intermoléculaires entre molécules du même type, i.e. les molécules portent des charges du même signe et donc se repoussent. En général, l'incompatibilité survient à des forces ioniques élevées ($> 0.3 \text{ M}$), à des pH supérieurs au IEP de la protéine, à des concentrations en solides totaux $> 4\%$, et pour des concentrations protéiques relativement élevées variant de 2 à 20% (Ledward, 1994; Tolstoguzov, 1986).

1.3.1.1. Applications alimentaires

L'incompatibilité thermodynamique est utile pour l'exclusion de protéines, pour induire une gélification des protéines à une concentration inférieure à la concentration nécessaire pour la gélification d'une solution de protéines pure ou pour améliorer les propriétés interfaciales des protéines (Ledward, 1994; Dickinson, 1993; Tolstoguzov, 1991). Ainsi, même s'il n'y a pas de séparation de phases macroscopique, la concentration apparente de la protéine augmente. Elle peut alors gélifier plus facilement ou s'adsorber à une interface non polaire (huile/eau), en présence d'un peu de polysaccharides (Ledward, 1994; Tolstoguzov, 1994). L'incompatibilité permet aussi d'améliorer la texture des produits extrudés (Ledward, 1994; Tolstoguzov, 1994 et 1985).

Ce type de système présente beaucoup d'intérêt du fait que si l'une ou l'autre des macromolécules peut former un gel, il est possible d'obtenir des gels mixtes, dont la phase dispersée est elle-même soit liquide soit gélifiée, donnant la possibilité de créer des produits multi-texturés (Tolstoguzov, 1986). La formation de ce type de gels peut être expliquée par l'incompatibilité thermodynamique et l'effet du volume exclu entre les molécules en solution. De ce fait, la solution d'une des macromolécules constitue, pour la seconde molécule, un solvant pire que le solvant pur. Ceci a pour conséquence de favoriser les interactions intramoléculaires et les interactions avec les molécules d'une même espèce au détriment des interactions avec le solvant. Tout le processus de gélification est donc favorisé et accéléré. Les polymères se comportent comme s'ils étaient dans une solution plus concentrée. En effet, les concentrations critiques de gélification dans les gels mixtes sont plus faibles que dans les gels simples (Tolstoguzov, 1996 et 1985). En revanche, la présence de gouttelettes de phase dispersée a tendance à diminuer la régularité du réseau

gélifié, ce qui produit, dans certains cas, une diminution du module d'élasticité du gel suite à l'augmentation du volume de la phase dispersée (Castelain, 1986).

1.4. Compatibilité Thermodynamique

Dans le cas d'une compatibilité thermodynamique, deux types de solutions peuvent être distingués: 1) une solution monophasique homogène et stable (co-solubilité); et 2) un système biphasique où les deux macromolécules se retrouvent essentiellement dans une des deux phases (Tolstoguzov, 1997 et 1991; Ledward, 1994; Samant et al., 1993).

1.4.1. Co-solubilité

À des concentrations très faibles, un mélange protéine - polysaccharide est stable du fait que l'entropie de mélange domine et les deux molécules restent co-solubles dans un système monophasique et homogène. Ce système est davantage favorisé à de faibles ratios protéine - polysaccharide. Cependant, il est peu fréquent que l'on obtienne une co-solubilité des biopolymères car la nature différente et la variété de leurs groupements fonctionnels laissent présager la présence d'attractions et/ou de répulsions.

1.4.2. Séparation de phases associative

Dans le cas d'une séparation de phases associative, un système biphasique liquide – solide se forme dans lequel les deux molécules se trouvent essentiellement dans la même phase. Sous certaines conditions, les molécules peuvent co-précipiter pour former une phase riche en protéine et polysaccharide et une phase riche en solvant et presque complètement dépourvue de biopolymères (Tolstoguzov, 1991). Lors d'une séparation de phases associative, il y a une complexation électrostatique ou coacervation complexe qui est due à l'association par des forces attractives électrostatiques entre les groupements carboxyliques du polysaccharide et les résidus chargés positivement de la protéine (ϵ -amino, imidazole, guanidine) (Sanchez & Paquin, 1997; Samant et al., 1993). Ces complexes sont davantage stabilisés par des liaisons hydrogène, des forces de van der Waals et des interactions

hydrophobes (Dickinson, 1998; Ledward, 1994; Samant et al., 1993; Imeson et al., 1977; Ganz, 1974).

En général, la complexation électrostatique entre les protéines et les polysaccharides anioniques se produit dans une gamme de pH entre le pH isoélectrique de la protéine (IEP) et le pKa du polysaccharide anionique, et à de faibles forces ioniques (généralement < 0.2-0.3 M). Sous ces conditions, une compatibilité complète existe en vertu des charges nettes opposées que portent les molécules de différentes espèces (Tolstoguzov, 1996; Samant et al., 1993). Les complexes possèdent une solubilité très différente selon le type de molécules, le pH et la force ionique de fabrication (Samant et al., 1993; Ledward, 1979).

1.4.3. Formation de complexes électrostatiques

De façon générale, lors de l'interaction associative deux types de structures peuvent être formés : un coacervat ou un précipité. Les coacervats constituent une deuxième phase liquide riche en polymères. Typiquement, les coacervats se forment quand les polyélectrolytes en mélange sont asymétriques et/ou leur charge est faible (Ahmed et al., 1994). En plus, la coacervation requiert une interaction électrostatique non spécifique qui laisse aux molécules une certaine mobilité (Syrbe et al., 1998). Les complexes précipités correspondent à la formation d'une phase dite « solide ». Typiquement, les complexes se forment quand des polyélectrolytes, possédant des charges opposées et distribuées symétriquement sur leur surface, sont mélangés à de faibles forces ioniques (Ahmed et al., 1994). Les polymères ayant de très hauts poids moléculaires et/ou densités de charge élevées auront aussi tendance à former des complexes précipités (Burgess, 1994). Même si les coacervats et les précipités possèdent des propriétés différentes, ils sont formés par le même processus, et sont influencés de la même façon par différents paramètres. À noter qu'une gamme de structures intermédiaires peut être formée en fonction de la conformation des molécules, de la force d'interaction et des conditions environnementales (e.g. des complexes solubles vs des complexes insolubles). Étant donné que le xanthane et la β lg forment des complexes et pas des coacervats, le terme « complexe électrostatique » est adopté dans ce travail.

Selon la théorie de Tainaka (1979), basée sur les études de Veis et Aranyi (1960), la cinétique de séparation de phases associative entre protéines et polysaccharides procède dans deux étapes délimitées par deux pH critiques nommées pH_c et pH_ϕ (Park et al., 1992; Dubin & Murrell, 1988). Le début d'interaction est démarqué par pH_c . Dans cette étape, les molécules de différentes espèces interagissent principalement dû aux charges opposées qu'elles portent, et forment des complexes primaires, aussi appelés complexes intrapolymériques. Les complexes primaires sont composés d'une seule chaîne de polyion avec de multiples protéines liées; de ce fait ils sont encore chargés et restent solubles (Mattison et al., 1999; Xia et al., 1993). Avant le pH_c , l'interaction n'est pas possible à cause des forces Coulombiques de répulsion. En faisant descendre le pH davantage, et au fur et à mesure que la charge des complexes primaires approche la neutralité, le deuxième pH_ϕ critique est atteint. À ce pH, les complexes primaires interagissent entre eux pour former des complexes interpolymériques et subissent un processus d'agrégation qui mène à une séparation de phases macroscopique (Park et al., 1992; Dubin & Murrell, 1988).

Il a été suggéré que la complexation soit contrôlée par l'interaction entre une seule molécule de protéine et un seul segment de polysaccharide. Conséquemment, le pH_c ne devrait pas être affecté ni par le poids moléculaire du polyion ni par le ratio protéine - polysaccharide en solution, car il dépend exclusivement des densités de charge locales et de la rigidité intrinsèque du polyion. Ces facteurs sont, à leur tour, contrôlés par des facteurs environnementaux tel le pH et la force ionique (Mattison et al., 1999 et 1995).

Durant la complexation, les structures tertiaire et quaternaire de la protéine peuvent changer. La protéine subit un dépliement partiel qui lui permet de mieux interagir avec le polysaccharide (Tolstoguzov, 1991) résultant en la formation de complexes compacts. Ce dépliement modifie les propriétés fonctionnelles de la protéine. Ainsi, par exemple, la température de dénaturation d'une protéine peut être diminuée (Tolstoguzov, 1991). Certains auteurs estiment que lorsqu'un complexe électrostatique est formé, il peut être considéré comme un nouveau polymère dont les propriétés fonctionnelles sont totalement différentes (Samant et al., 1993; Tolstoguzov, 1991).

Il a été suggéré que la structure compacte des complexes soit causée par des effets de volume exclu et des facteurs de perte d'entropie, étant donnée que la liaison protéine – polyion induit une perte d'entropie conformationnelle dans les chaînes du polyion. Cette perte est compensée, jusqu'à un certain point, par le relargage de l'eau attrapée et des contre-ions liés tant sur la protéine que sur le polysaccharide (Burgess, 1994; Li et al., 1994). Ce même fait pousse le polyion à garder sa conformation originale, forçant les protéines à occuper les espaces entre les segments. Le résultat étant la formation d'une structure compacte (Dautzenberg, 2000; Li et al., 1994). Il a aussi été suggéré que la plus haute compacité des complexes comparativement aux molécules de départ est dû au fait que la nature des zones de jonction est moins hydrophile (Tolstoguzov, 1996).

Plusieurs études ont trouvé que la solubilité des complexes électrostatiques dépend de la méthode utilisée pour leur fabrication (Samant et al., 1993; Tolstoguzov, 1991). Les complexes de protéines et de polysaccharides sont généralement produits par un ajustement du pH, soit par l'ajout d'un acide alimentaire ou par dialyse contre un tampon (Larichev, 1983). Cependant, des complexes solubles ou insolubles peuvent être obtenus dépendamment si l'ajustement de pH se fait avant ou après que les solutions des polymères auront été mélangées (Tolstoguzov, 1986).

Si le mélange initial se fait à un pH où les deux molécules ont des charges opposées similaires, et qu'une acidification lente s'ensuit, les complexes obtenus seront probablement solubles. Sous ces conditions, les molécules de protéine se lieront de façon coopérative, c'est-à-dire qu'une protéine additionnelle se liera à côté (ou le plus près possible) d'une protéine qui est déjà liée sur le polysaccharide, car cette liaison est plus favorable d'un point de vue énergétique. La complexation n'est pas alors uniforme. Ceci est surtout applicable quand les protéines utilisées sont dans leur état natif (Ledward, 1994; Tolstoguzov, 1985). Cependant, si la taille de la protéine est grande ou si elle est très flexible, les complexes formés seront, dans tous les cas, insolubles.

Or, si le mélange des molécules se fait à un pH auquel les deux molécules ont une charge opposée, les protéines se lient de façon non coopérative, c'est-à-dire de façon plus ou moins uniforme tout le long du polysaccharide. La charge nette du complexe diminue alors,

jusqu'à ce que celui-ci devienne insoluble et précipite. Cependant, si la quantité de protéines est très faible, les complexes auront encore une charge négative et resteront solubles. Une telle situation peut avoir lieu quand les ratios protéine - polysaccharide sont faibles (e.g. 1:5) (Ledward, 1994; Tolstoguzov, 1991 et 1986). Des études plus récentes (Weinbreck et al., 2003b) ont démontré que ce type de complexes subit un réarrangement spontané dans le temps, pour atteindre l'état où la protéine est liée de façon coopérative, qui est le plus favorable énergétiquement (Mattison et al., 1999; Tolstoguzov, 1986). C'est-à-dire que les protéines migreront et auront tendance à neutraliser la plus grande quantité de molécules de polysaccharide possible, il y aura donc des molécules de polysaccharide qui seront presque ou complètement neutralisées (recouvertes de protéines) et d'autres qui resteront pratiquement dépourvues de protéines liées (Weinbreck et al., 2003b).

1.4.3.1. Applications alimentaires des complexes électrostatiques

Les complexes électrostatiques entre les protéines et les polysaccharides trouvent diverses applications alimentaires. Par exemple, la stabilisation des caséines par la κ -carraghénane afin d'éviter la précipitation dans certains produits laitiers acides; la récupération des protéines laitières des effluents (Ledward, 1994 et 1979); le fractionnement et purification des protéines du lactosérum (e.g. séparation de la β lg par complexation avec la CMC à pH 4.0) (Dickinson, 1993; Ledward, 1994); la diminution de la sensibilité de certaines protéines aux ions Ca^{2+} (Samant et al., 1993), et aux traitements thermiques ou enzymatiques (Ledward, 1994); pour la fabrication de fibres alimentaires pour imiter la viande (Chen & Soucie, 1985); pour la modification de la texture des aliments par gélification ou texturation de la protéine (Samant et al., 1993; Chen & Soucie, 1985) pour la microencapsulation d'ingrédients (Burgess, 1994); la neutralisation d'enzymes (Ledward, 1994), et la production de substituts de matière grasse (Le Hénaff, 1996; Cheftel & Dumay, 1993; Chen et al., 1989). Plusieurs études ont aussi porté sur leur utilité pour augmenter la capacité émulsifiante des protéines et sur l'amélioration de la stabilité des films interfaciaux dans les émulsions (Girard et al., 2002; Dickinson, 1999; Dickinson & Pawlowsky, 1998; Larichev et al., 1983; Ganz, 1974).

1.4.4. Facteurs influençant la complexation

Les facteurs qui influencent la compatibilité entre les protéines et les polysaccharides peuvent être classifiés en deux groupes : les facteurs intrinsèques et les facteurs environnementaux. Les facteurs intrinsèques sont ceux inhérents aux macromolécules en mélange et incluent notamment la charge totale, la densité de charge, la conformation, la flexibilité des chaînes et le poids moléculaire des molécules. Les facteurs environnementaux sont ceux qui peuvent être contrôlés directement lors du mélange de biopolymères et incluent le ratio protéine – polysaccharide, la concentration en solides totaux, le pH, la force ionique, la température et les forces de cisaillement (Sanchez & Paquin, 1997; Tolstoguzov, 1997; Ledward, 1994 et 1979; Dickinson, 1993; Samant et al., 1993).

1.4.4.1. Facteurs intrinsèques

Les plus importants facteurs intrinsèques sont la charge relative et la densité de charges des deux biopolymères, à noter que ces facteurs peuvent être contrôlés en ajustant le pH et la force ionique (Samant et al., 1993; Ledward, 1979), alors il faut toujours les considérer conjointement.

Charge et densité de charge

La force de l'interaction est proportionnelle à la charge et à la distribution des sites réactifs des deux molécules (Tolstoguzov, 1996). À de faibles densités de charge la complexation est supprimée, alors qu'à des densités de charge élevées une précipitation ou une gélification peut survenir. Park et al. (1992) ont trouvé que le pH_c s'éloigne du IEP en augmentant la densité de charge du polyanion, ce qu'ils ont expliqué par une plus forte attraction entre les polyanions densément chargés et les zones chargées positivement de la protéine qui surmontent les répulsions électrostatiques.

D'autre part, diverses études incluant une grande variété de protéines et de polysaccharides (Girard et al., 2003 et 2004; Weinbreck et al., 2003a; Mattison et al., 1999; Schmitt et al., 1999; Park et al., 1992) ont trouvé que l'interaction entre protéines et polyions pouvait

débuter au-dessus du IEP. Cet effet a même été prédit par des simulations de Monte Carlo (Allen & Warren, 2004). D'ailleurs, Girard et al. (2003) ont trouvé que la β lg possède plusieurs régions chargées, incluant l'hélice α , qui sont susceptibles de participer dans la complexation avec les polyanions au dessus du IEP de la protéine. Il a aussi été trouvé, par des mesures en dichroïsme circulaire, que l'hélice α de la β lg était du moins partiellement perdue pendant la coacervation avec la gomme d'acacia (Schmitt et al., 2001). Cet effet serait dû à une forte interaction électrostatique entre le polyion hautement chargé et des régions chargées positivement sur la surface de la protéine qui surpassent la répulsion entre le polyion et la charge totale de la protéine (Xia & Dubin, 1994).

Conformation et poids moléculaires

Les biopolymères à haut poids moléculaire ont une plus grande tendance à induire une séparation de phases à cause de leur volume exclu élevé et des effets stériques. Ceci serait dû à une restriction de mouvement qui résulte en la réduction de l'entropie de mélange et favorise donc une séparation de phases. Ainsi, une plus faible concentration est nécessaire pour induire une séparation de phases du fait que le nombre de points d'interaction entre segments, qu'une chaîne de polymère peut faire, est proportionnel à son P_M et sa flexibilité. Ce sont alors les polysaccharides flexibles (e.g. dextrane sulfate) qui seront plus effectifs pour induire une séparation de phases, comparativement aux polysaccharides plus rigides (e.g. pectine, xanthane) (Dickinson & McClements, 1996).

D'autre part, Shieh & Glatz (1994) ont démontré que les taux de complexation (récupération de protéine) étaient plus élevés avec des polymères de haut poids moléculaire. Cet effet est notable principalement quand la protéine n'a pas une densité de charge assez élevée. Basés sur des résultats en QELS (Quasi-elastic light scattering), Park et al. (1992) ont trouvé que les complexes intramoléculaires ont une dimension similaire à celle du polyion seul. Par la suite, plusieurs autres études (Wang et al., 2000; Li et al., 1994; Shieh & Glatz, 1994), ont démontré que lorsque le polyion possède un poids moléculaire élevé, des complexes primaires plus grands sont formés. Ces complexes s'agrègent par la suite plus rapidement pour former des complexes interpolymériques,

probablement par un gain d'entropie (Tainaka, 1979) ou par des effets de pontage (Shieh & Glatz, 1994). Cependant, quand des polymères de trop haut P_M sont utilisés, les systèmes auront tendance à gélifier ou former des précipités, alors qu'à des P_M trop faibles, les systèmes auront tendance à interagir par pontage ionique au lieu de former des coacervats (Burgess, 1994).

Les changements qui augmentent le poids moléculaire ou la rigidité des molécules favorisent également leur incompatibilité. Par exemple, une transition d'ordre – désordre, comme c'est le cas dans plusieurs polysaccharides tels le xanthane et la κ -carraghénane, affecte les interactions.

1.4.4.2. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux sont ceux qui peuvent être directement contrôlés lors du mélange de biopolymères et incluent le ratio protéine – polysaccharide, la concentration en solides totaux, le pH, la force ionique, la température et les forces de cisaillement.

Ratio protéine – polysaccharide

Le ratio protéine – polysaccharide a un effet important car l'étendue de la complexation sera différent selon la quantité de biopolymères disponibles pour interagir (Burgess, 1994). Le ratio optimal d'interaction variera selon le ratio des charges portées par les biopolymères. Ainsi, les complexes sont neutralisés plus rapidement à de hautes teneurs en protéine du fait que plus de protéines sont disponibles pour interagir (Mattison et al., 1999).

Concentration en solides totaux

À de très hautes concentrations en biopolymères, une auto-suppression de la complexation a lieu. Une fois que la composition du mélange atteint celle du coacervat ou du complexe, la force conduisant à la séparation de phases est complètement perdue car il n'y a plus de gain d'entropie (Burgess, 1994). D'autre part, à de trop faibles concentrations, le système devient co-soluble. Cependant la complexation électrostatique a lieu jusqu'à de très faibles concentrations (10^{-2} mg/ml), si la force ionique est assez faible (< 0.2 M), comparativement

aux concentrations requises pour avoir une séparation de phases ségrégative (Tolstoguzov, 1986).

Force ionique

Les principales forces responsables des interactions entre protéines et polysaccharides anioniques sont de nature électrostatique, donc la force ionique a un grand effet sur l'interaction. À des forces ioniques élevées, la complexation est réduite ou inhibée car l'entropie de mélange, qui aurait été gagnée par le relargage des contre-ions, est perdue. La concentration en sels influence aussi les interactions électrostatiques et la compatibilité des molécules puisque les ions peuvent bloquer les sites réactifs des polymères, réduisant leur densité de charge et favorisant l'association entre protéines, occasionnant une incompatibilité entre les deux polymères (Samant et al., 1993; Tolstoguzov, 1991). Ainsi, une concentration $> 1M$ de NaCl empêche la formation de complexes entre protéines de lactosérum et de xanthane (Chen et Soucie, 1985). En plus, il a été trouvé que les ions peuvent avoir un effet sur les molécules. Par exemple Burgess & Carless (1984) rapportent une augmentation de la stabilité de la protéine à de hautes forces ioniques.

pH

Étant donné que le pH contrôle le degré d'ionisation et la charge nette des polymères, il a un très grand impact sur la complexation. Ainsi les complexes formés peuvent être solubles ou insolubles en fonction du degré de neutralisation des charges opposées (Ledward, 1994; Tolstoguzov, 1991).

Température

La température peut avoir un effet car lorsqu'une protéine est dénaturée ou partiellement dénaturée, les complexes qui en résultent sont plus stables. Plusieurs sites deviennent disponibles pour réagir et les chaînes deviennent plus flexibles. Elles peuvent ainsi ajuster leur conformation qui aide à maximiser les interactions (Sanchez & Paquin, 1997; Ledward, 1994; Dickinson, 1993; Samant et al., 1993). Cependant, si la protéine est complètement dépliée (dénaturée) avant de former les complexes, il y aura formation

d'agrégats trop grands (Sanchez & Paquin, 1997). À des températures faibles, les complexes formés peuvent être stabilisés davantage puisque les liens hydrogène et les interactions solvant-solvant sont favorisées.

1.5. Les complexes protéines sériques - xanthane

Des études préalables réalisées au Centre STELA sur les complexes de protéines sériques - xanthane ont démontré leur potentiel comme substituts de matière grasse (Lefèbre, 1995) car ils peuvent être utilisés dans divers aliments (sauces à salade, soupes, desserts glacés, garnitures à gâteaux) (Sanchez & Paquin, 1997; Le Hénaff, 1996; Cheftel & Dumay, 1993; Chen et al., 1989).

Lors de la complexation, les chaînes latérales du xanthane sont disponibles pour interagir de façon électrostatique avec les protéines. Alors les protéines globulaires s'associent le long de la chaîne principale de la molécule de xanthane et forment des complexes de nature fibreuse (Le Hénaff, 1996). Une micro fragmentation est alors nécessaire pour obtenir un ingrédient de P_M ciblé, capable de simuler les caractéristiques de la matière grasse (sensation de glissement et de lubrification) dans la bouche (Sanchez & Paquin, 1997). Idéalement, les complexes doivent avoir une taille semblable à celle des globules de gras: 0.3 – 3.0 μm . Si la taille est trop élevée, le produit allégé présentera une texture sablonneuse (Chen et al., 1989).

Une étude antérieure a démontré qu'une microfluidisation préalable du xanthane permet la réduction de la taille des complexes en diminuant la taille du xanthane qui sert de support lors de la complexation (Le Hénaff, 1996). D'autre part, la complexation peut être contrôlée par les conditions environnementales, principalement la vitesse d'agitation, le ratio protéine - polysaccharide et le pourcentage en solides totaux (Tolstoguzov, 1997; Chen et al., 1989; Chen & Soucie, 1985).

L'utilisation d'un mélange composite de protéines – polysaccharides, pour la production d'un substitut de matière grasse, présente de nombreux avantages comparativement aux ingrédients composés uniquement de microparticules de protéine. La présence de

polysaccharides aide à contrôler la taille des agrégats en minimisant les interactions entre protéines par un blocage des sites actifs et par une diminution des collisions entre particules. En effet, la coagulation de protéines sériques, en présence de xanthane, produit des particules plus petites ($< 80 \mu\text{m}$) qu'une coagulation de protéines seules qui donne des particules de l'ordre de $385 \mu\text{m}$ (Sanchez & Paquin, 1997). De plus, les particules obtenues sont plus sphériques et donnent une sensation plus crémeuse (Lefèbvre, 1995). Finalement, les polysaccharides aident à donner une sensation de fonte dans la bouche, grâce à leur capacité de lier des grandes quantités d'eau, conférant une meilleure lubricité au produit (Sanchez & Paquin, 1997; Le Hénaff, 1996).

1.6. Techniques expérimentales

L'étude des biopolymères en solution aqueuse peut être réalisée par une multitude de méthodes couramment utilisées dans ce domaine, telles la rhéologie en milieu dilué ou la rhéologie en mode statique, i.e., les mesures d'écoulement. Dans cette section, le principe de base pour une technique moins connue en industrie alimentaire sera présenté : la rhéologie optique. Dans une deuxième partie, la méthode de diffusion statique de la lumière aux petits angles sera expliquée. Cette technique est à la base des travaux réalisés dans cette thèse sur les interactions protéines - polysaccharides et a permis d'étudier le système β -lactoglobuline - xanthane d'un point de vue plus fondamental. Du fait que ces deux techniques mesurent d'une façon ou d'une autre l'interaction de la lumière avec la matière, une brève description des concepts de base en optique sera aussi présentée.

1.6.1. Concepts de base en optique

1.6.1.1. La lumière

La lumière est composée d'ondes électromagnétiques qui se forment grâce à la vibration de charges électriques. Une onde électromagnétique est composée d'un champ électrique et d'un champ magnétique qui se propagent dans la même direction (Figure 1.8). Le champ électrique est le résultat du voltage ou différence de potentiel qui se génère dû à la

différence de concentration d'électrons entre les particules chargées et son entourage. Le champ magnétique résulte du flux de courant, car toute charge électrique en mouvement produit un champ magnétique (Hecht, 2002; Jenkins & White, 1976).

Les ondes électromagnétiques se propagent de façon transversale, c'est-à-dire qu'elles oscillent à des angles droits par rapport à la direction de propagation. Les ondes sur un étang ou une vague sur une corde sont des ondes transversales facilement visualisées. Un autre type d'ondes, sont les ondes longitudinales qui oscillent avec un mouvement de va-et-vient dans la même direction que la propagation, produisant une fluctuation dans la densité des particules sur son passage. D'où elles sont aussi connues sous le nom d'ondes de pression ou ondes de densité. Un exemple d'ondes qui se propagent longitudinalement sont les ondes acoustiques (Jenkins & White, 1976).

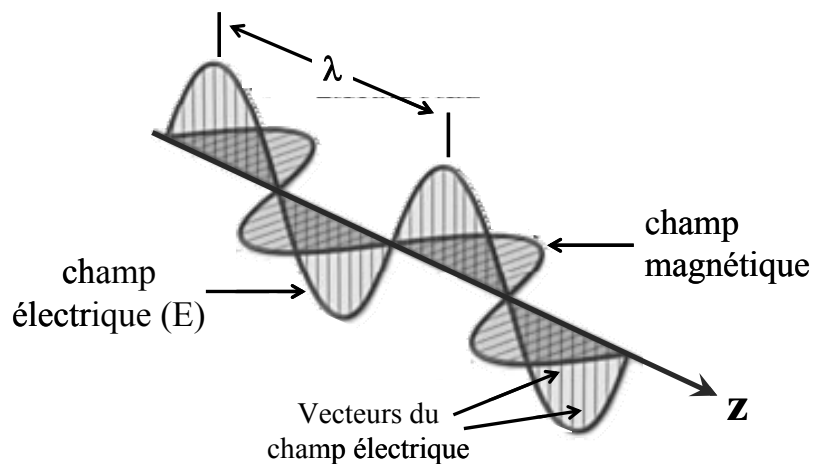


Figure 1.8. Propagation d'une onde électromagnétique polarisée verticalement.

Adapté d'après Hecht (2002).

La lumière ordinaire, telle la lumière émise par le soleil ou par une lampe, est créée par des charges électriques qui vibrent dans une variété de directions et est donc composée d'ondes électromagnétiques qui vibrent dans tous les plans possibles par rapport à la direction de propagation. Ce type de lumière est désigné sous le nom de lumière non-polarisée (Rheometric Scientific, 1998; Jenkins & White, 1976). Cependant, dans les méthodes

spectroscopiques, il s'avère nécessaire d'utiliser une lumière polarisée, c'est-à-dire une lumière dont les ondes électromagnétiques vibrent sur un seul plan (Figure 1.8).

La polarisation est une propriété unique aux ondes transversales. Généralement, la lumière polarisée est créée à l'aide d'un filtre polariseur qui est un instrument qui confine la vibration des vecteurs des champs électriques et magnétiques à un seul plan. Son mode d'action est simple et on peut le visualiser comme étant un tamis qui ne laissera pas passer les ondes qui vibrent à des angles différents de celui du plan de polarisation (Hecht, 2002; Jenkins & White, 1976).

1.6.1.2. Concepts de réfraction, transmission et diffusion de la lumière

1.6.1.3. L'indice de réfraction

Dans un milieu homogène, la lumière voyage en ligne droite. Lorsqu'un rayon de lumière traverse la frontière entre deux milieux (e.g. air et liquide) à un angle autre que perpendiculairement à l'interface, il y a un changement dans sa direction de propagation du fait que la vitesse avec laquelle les ondes lumineuses voyagent dans les deux milieux est différente. Ce changement de direction s'appelle réfraction (Figure 1.9).

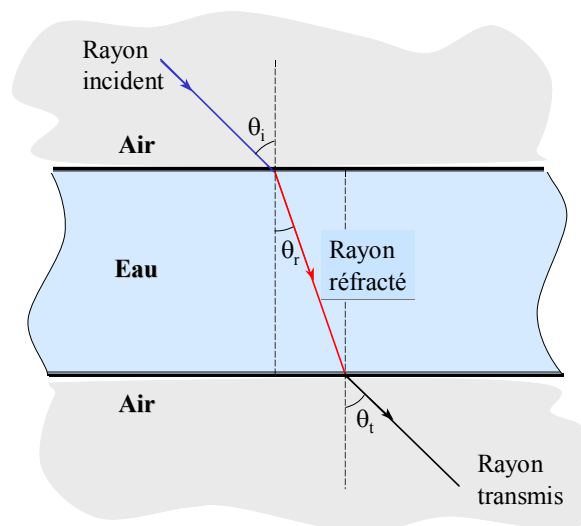


Figure 1.9. Réfraction de la lumière en passant de l'air à l'eau.

Adapté d'après Hecht (2002).

Le degré de réfraction dépend de la longueur d'onde de la lumière utilisée, de la polarisabilité du matériel (degré de distorsion dans la distribution de ses électrons causé par le composant électrique du rayon lumineux), de la densité du milieu (plus le matériel est dense, plus la lumière sera déviée et donc ralentie), et de l'angle d'incidence de la lumière. Une partie de la lumière est aussi réfléchiée et une autre partie est transmise (Figure 1.9).

L'indice de réfraction (n) d'un matériel représente donc le facteur par lequel une radiation électromagnétique est ralentie quand elle traverse la frontière entre deux milieux, et peut être exprimé comme suit (Hecht, 2002):

$$n = \frac{\text{vitesse dans le premier milieu}}{\text{vitesse dans le deuxième milieu}} = \frac{\sin \theta_i}{\sin \theta_r} \quad (1.1)$$

Par norme, les indices de réfraction des matériaux sont mesurés par rapport à celui de l'air, ainsi le numérateur dans l'équation [1] devient la vitesse de la lumière dans l'air, qui est approximativement égale à celle de la vitesse de la lumière dans le vide, et puisque la lumière est ralentie par tous les milieux, sauf le vide, l'indice de réfraction est toujours supérieur à 1.

L'indice de réfraction d'un matériel est généralement décrit comme une valeur scalaire fixe. Cependant, pour la mesure de la biréfringence, il faut considérer deux propriétés de l'indice de réfraction (Rheometric Scientific, 1998). Premièrement l'indice de réfraction est un nombre complexe et contient une partie réelle (n') et une partie imaginaire (n''), donc:

$$n = n' + in'' \quad \text{où } i = \sqrt{-1}. \quad (1.2)$$

Si on considère l'indice de réfraction d'un point de vue de rayonnement lumineux, le vecteur électrique (E) d'une lumière polarisée qui se propage dans le plan z (Figure 1.8) est donné par :

$$\mathbf{E} = \underbrace{\mathbf{E}_0 \cos\left(\frac{2\pi n'}{\lambda} - \omega t\right)}_{\text{change de phase}} \underbrace{e^{-\frac{2\pi n''}{\lambda} z}}_{\text{atténuation}} \quad (1.3)$$

Où E_0 est le vecteur amplitude de la lumière incidente, λ est la longueur d'onde du rayonnement, ω est la fréquence de la lumière et n' et n'' sont les parties réelle et imaginaire de l'indice de réfraction. La partie réelle se trouve entre les parenthèses et détermine le changement de phase du vecteur électrique du rayon incident, c'est-à-dire le changement de sa direction et de sa polarisation. La partie imaginaire se trouve dans l'exponentiel décroissant et détermine l'atténuation de la lumière (i.e., la diminution de son intensité) soit par absorption ou par diffusion (Rheometric Scientific, 1998). L'absorption a lieu à des longueurs d'ondes spécifiques correspondant aux différents états d'excitation des atomes et est à la base des méthodes spectroscopiques telle la spectroscopie infrarouge. La diffusion a lieu uniquement lorsque des particules sont en suspension, ce dernier phénomène sera traité plus en détail dans la section suivante.

La deuxième propriété de l'indice de réfraction à considérer est que, dans certain cas, il peut prendre des valeurs différentes selon la direction de propagation de la lumière dans un matériel. Cette anisotropie est la source de la biréfringence et du dichroïsme mesuré par rhéologie optique.

1.6.2. Concepts d'isotropie, anisotropie et biréfringence

Selon leurs propriétés optiques, les molécules, particules ou matériaux peuvent être classés comme étant isotropes ou anisotropes. Une particule ou un matériel dit isotrope est celui qui a un seul indice de réfraction à une température et longueur d'onde donnée, sans importance pour l'angle d'incidence avec lequel la lumière le pénètre. La lumière sera réfractée à un angle constant et traversera le milieu à une seule vitesse, sans être polarisée par son interaction avec les composants électriques de ces atomes. Des exemples de ces matériaux sont le verre, les polymères non-orientés et les cristaux de structure cubique.

Une particule ou un matériel est dit anisotrope quand ses propriétés varient selon la direction de la mesure. Ainsi, un matériel anisotrope peut présenter plus d'un indice de réfraction selon la direction de propagation de la lumière par rapport à l'axe optique des molécules qui le composent. Ce phénomène est aussi connu sous le nom de biréfringence. La plupart des cristaux, excepté ceux possédant un assemblage cubique, possèdent un certain degré d'anisotropie dans leurs propriétés physiques du fait qu'ils possèdent différents axes cristallographiques. Un exemple typique sont les cristaux de carbonate de calcium ou calcite qui présentent un pouvoir biréfringent exceptionnellement grand.

D'autre part, certaines molécules, de nature rigide et allongée, ont tendance à s'orienter préférentiellement dans une direction (le directeur) et forment des phases anisotropes, tel est le cas des cristaux liquides lyotropes. La Figure 1.10 présente les organisations les plus couramment retrouvées chez les cristaux liquides. En fait, ce type de comportement est typique des polymères rigides ou semi-rigides en solution, qui forment spontanément des phases ordonnées au-dessus d'une certaine concentration critique, pour réduire au minimum leur volume exclu. Étant donné la rigidité de plusieurs polysaccharides, il n'est pas surprenant qu'eux aussi présentent cette tendance (Roschinski & Kulicke, 2000; Gray, 1994). Dans le cas du xanthane, il a été trouvé qu'il subit une transition à un état cholestérique (Sato et al., 1990), semblable à celui des cristaux liquides (Figure 1.10c), à des concentrations aussi faibles que ~ 0.8 % p/p (Carnali, 1991).

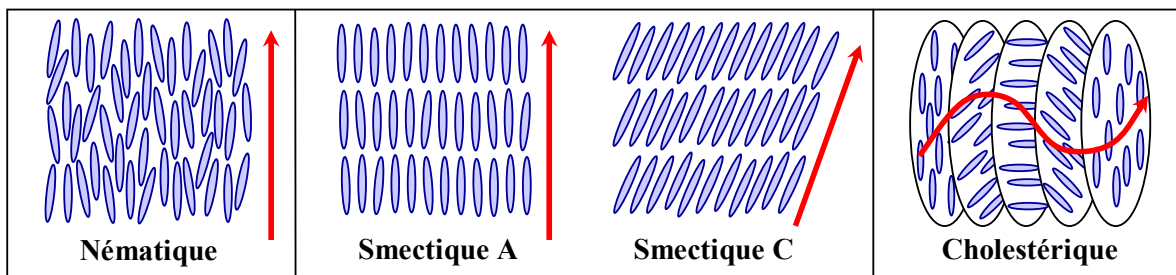


Figure 1.10. Types de phases lyotropes usuellement rencontrés dans les liquides cristallins. (a) Phase nématique avec ordre directionnel, (b) phases smectiques avec ordre directionnel et positionnel (en couches), (c) phase cholestérique. Les flèches indiquent le directeur.

Adapté de : Polymers and Liquid Crystals (<http://plc.cwru.edu/>).

D'autres matériaux, tel les polymères asymétriques en solution, peuvent devenir biréfringents après l'application des forces extérieures tels un cisaillement (Maxwell effect), un courant électrique (Kerr effect) ou un courant magnétique (Cotton-Moutton effect). Ceci est dû au fait qu'une fois les molécules orientées, leur polarisabilité devient anisotrope.

La biréfringence est donc une propriété des matériaux anisotropes et peut être considérée comme étant une anisotropie de l'indice de réfraction. Lorsqu'une lumière passe à travers un milieu anisotrope, elle interagit de différentes façons selon sa polarisation et son angle d'incidence par rapport à l'axe optique du milieu. En général, la lumière sera réfractée en deux rayons, chacun suivant un des deux indices de réfraction (Figure 1.11).

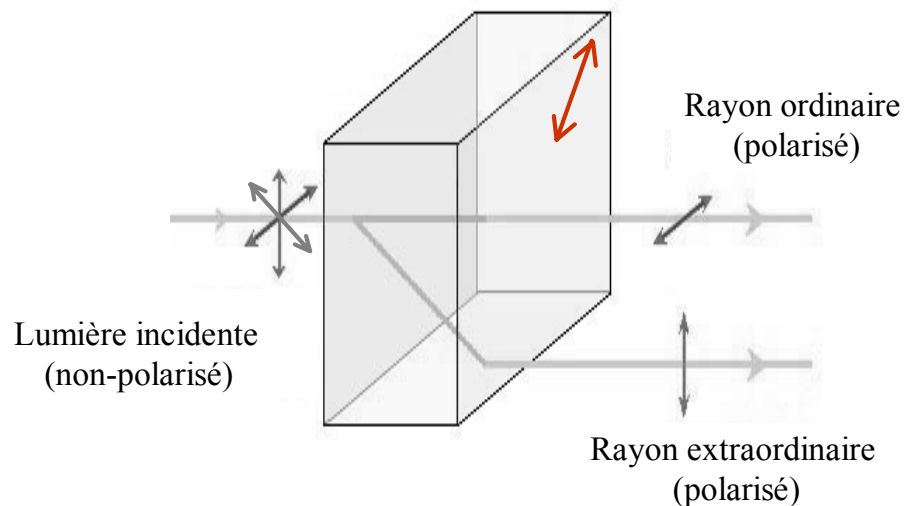


Figure 1.11. Biréfringence ou double réfraction induite par un cristal de calcite. La flèche sur le bord du cristal indique la direction de l'axe optique. Adapté de : Polymers and Liquid Crystals (<http://plc.cwru.edu/>).

Ces deux rayons sont polarisés linéairement et les vecteurs de leurs champs électriques vibrent sur des plans perpendiculaires l'un par rapport à l'autre. Le rayon, avec une polarisation perpendiculaire à l'axe optique, suit les lois de réfraction normales, il est donc appelé rayon ordinaire et exhibe un indice de réfraction n_o . L'autre rayon, avec une polarisation parallèle à l'axe optique, voyage à une vitesse qui dépend de la direction de

propagation, il est alors nommé rayon extraordinaire et exhibe un indice de réfraction n_e . Puisque les indices de réfraction sont différents, les faisceaux traversent le matériel à différentes vitesses et émergent à des temps différents i.e., présentent un déphasage ou retard.

Le comportement est différent lorsque la lumière pénètre de façon parallèle ou perpendiculaire par rapport à l'axe optique. Lorsqu'un rayon de lumière entre de façon perpendiculaire par rapport à l'axe optique, il est séparé en rayons ordinaire et extraordinaire, comme décrit précédemment, mais au lieu d'être séparées, leurs trajectoires coïncident. Même si les rayons émergent à un même endroit, ils continuent de présenter un déphasage ou retard. D'un autre côté, si la direction de la propagation du rayon lumineux coïncide avec l'axe optique, il se comporte comme s'il s'agissait d'un matériel isotrope et obéit aux lois des réfractions normales : il est réfracté à un seul angle et voyage à la même vitesse.

La biréfringence (Δn) ou anisotropie optique est définie comme étant la différence ou « retardation » entre les deux indices de réfraction :

$$\Delta n = n_e - n_o \quad (1.4)$$

Où n_o , est l'indice de réfraction expérimenté par le rayon ordinaire (composants de E perpendiculaires à l'axe optique); et n_e , est l'indice de réfraction expérimenté par le rayon extraordinaire (composants de E parallèles à l'axe optique).

1.6.3. La rhéologie optique : biréfringence induite par le cisaillement

Dans le cas particulier de la biréfringence induite par le cisaillement, l'anisotropie est générée par une orientation et parfois un allongement des molécules dans le sens de l'écoulement. Dans ce cas, la lumière subit un retard anisotrope quand elle traverse l'échantillon. Ceci est aussi connu sous le nom d'effet dynamo-optique de Maxwell ou « Maxwell effect ». Considérons un échantillon au repos (Figure 1.12) où les molécules se trouvent avec des configurations randomisées (point A). Le tenseur de l'indice de réfraction

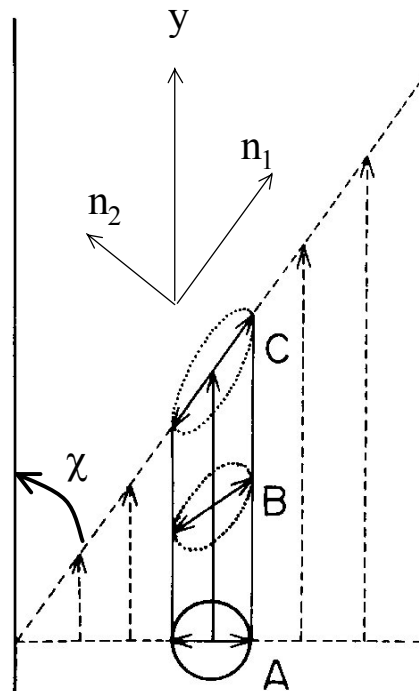
sera alors isotrope et prendra une seule valeur. Lorsqu'un cisaillement est appliqué, les molécules seront étirées (points B et C) et l'orientation de ses segments résultera en l'anisotropie de l'indice de réfraction.

L'anisotropie dans le tenseur de l'indice de réfraction définit les valeurs mesurées en rhéologie optique. Si nous considérons l'indice de réfraction avec ses composants réel et imaginaire, la biréfringence induite par le cisaillement (Δn) est le déphasage entre les parties réelles de l'indice de réfraction du rayon ordinaire et extraordinaire qui traversent la solution et le dichroïsme représente le déphasage dans les parties imaginaires :

$$\Delta n' = n_1' - n_2' \quad \text{biréfringence}$$

$$\Delta n'' = n_1'' - n_2'' \quad \text{dichroïsme}$$

Figure 1.12. Biréfringence induite par le cisaillement. Dans la position A, la molécule est relaxée et l'indice de réfraction est le même dans toutes les directions. À mesure que le taux de cisaillement augmente, les molécules s'orientent et même se déforment. Alors une anisotropie optique se développe et les molécules exhibent deux indices de réfraction n_1 et n_2 montrés pour la position C. La direction du cisaillement est y .



Selon Meyer et al. (1993) ces deux techniques mesurent des effets sur deux dimensions différentes, la biréfringence étant utilisée pour les plus petites tailles, voir au niveau des segments des macromolécules, alors que le dichroïsme serait plus utile pour l'étude à de plus grandes tailles, voir d'agrégats de molécules. Pour un échantillon homogène, la biréfringence est liée à la phase de déphasage δ par :

$$\delta = (2\pi d/\lambda) * \Delta n \quad (1.5)$$

Où δ est la largeur du parcours de la lumière (épaisseur de l'échantillon), et λ est la longueur d'onde de la lumière.

À mesure que le gradient de cisaillement augmente, les axes longs des polymères s'orientent préférentiellement de plus en plus dans la direction de l'écoulement. Ceci est indiqué par l'angle d'extinction (χ), aussi nommé angle d'orientation, car il indique l'angle d'orientation des molécules par rapport à la direction de l'écoulement (Yevlampieva et al., 1999). À de faibles taux de cisaillement, la biréfringence est presque nulle et l'angle d'extinction approche 45° indiquant que le système est anisotrope et les molécules se trouvent disposées au hasard. Un angle de 0° indique, d'un autre côté, que les molécules sont alignées dans le sens de l'écoulement.

1.6.3.1. Règle tensio-optique

La biréfringence et la contrainte de cisaillement sont corrélés car ces deux effets ont la même origine : l'orientation des molécules. En effet, la contrainte de cisaillement est le résultat des forces nécessaires pour orienter les molécules et ainsi induire l'écoulement; et la biréfringence est directement reliée à l'orientation des segments. D'où l'origine de la règle tensio-optique (stress-optical rule) qui corrélait les composants de la contrainte de cisaillement et les tenseurs de l'indice de réfraction. (Tsvetkov, 1989).

Alors, la biréfringence et angle d'orientation peuvent être utilisés pour trouver la contrainte de cisaillement σ_{xy} et la différence du premier stress normal N_1 .

$$\sigma_{xy} = (\Delta n/2C) \sin 2\chi ; \Delta n = C\tau_{xy} \quad (1.6)$$

$$N_1 = (\Delta n/C) \cos 2\chi \quad (1.7)$$

Où C est le coefficient tensio-optique, τ_{xy} le tenseur de contrainte dans le plan x-y et N_1 , est la différence du premier stress normal ($\tau_{xx} - \tau_{yy}$). Cette condition est essentielle pour

pouvoir appliquer les modèles mathématiques qui permettront de caractériser le polymère au niveau moléculaire (Chassapis et al., 2002). Cette règle a été trouvée valide pour une grande variété des polymères flexibles (Fuller, 1995). Cependant, plusieurs études sont aussi effectuées dans des systèmes semi-dilués, du fait que ceux-ci se rapprochent plus des applications réelles. Dans ce cas, il s'agit plutôt de mesurer l'orientation et la relaxation des polymères lors de la mise en place ou arrêt de la contrainte (Clasen & Kulicke, 2001; Roschinski & Kulicke, 2000; Meyer et al., 1993).

Le coefficient tensio-optique est par définition une fonction des conditions locales comme la température, la nature et taille des unités chimiques des polymères, mais il est indépendant du poids moléculaire, de la distribution de taille moléculaire, du degré de ramification ou de niveau de crosslinking (dell'Erba, 2001; Chen & Archer, 1999). La constante optique est dérivée de la théorie de Kuhn & Grun, dans laquelle il est assumé que des molécules flexibles sont formées par des segments statistiques attachés les uns aux autres à travers des liens qui peuvent tourner librement. Cette condition est trouvée facilement pour les molécules flexibles. Cependant, pour ce qui est des molécules plus rigides, cette condition est seulement retrouvée à de faibles taux de cisaillement et à des poids moléculaires suffisamment élevés. Dans ce cas, les molécules suivent une dynamique Gaussienne et C peut être corrélé à l'anisotropie des segments par :

$$C = 2\pi/45nkT(n^2+2)2\Delta\alpha \quad (1.8)$$

Où n est l'indice de réfraction et $\Delta\alpha$ est l'anisotropie d'un élément Kuhn de la chaîne. Plusieurs études portent sur la mesure de $\Delta\alpha$ pour ensuite la comparer avec l'anisotropie de la polarisabilité optique théorique que devrait avoir une molécule, en tenant compte de sa composition chimique et des liens qui composent un segment Kuhn. Ainsi, dans la mesure où les valeurs expérimentales et les valeurs calculées diffèrent, cela donne des informations sur la flexibilité réelle des chaînes.

Donc, le tensio-optique donne une indication du niveau d'ordre de la structure des polymères. Par exemple, des études faites sur le xanthane démontrent que, même si le xanthane en milieu aqueux et hautes forces ioniques se trouve sous une conformation plus

compacte, car ses chaînes latérales sont repliées sur la chaîne principale (Young et al., 1994; Morris, 1990; Liu & Norisuye, 1988; Norton et al., 1984), sa structure interne reste intacte car le coefficient optique est du même ordre dans l'eau déionisée que dans l'eau salée (Yevlampieva et al., 1999). Or, lorsque le xanthane se retrouve dans le cadoxen, où il est connu qu'il est sous une forme complètement dénaturée (Sato et al., 1984a), le coefficient optique est deux ordres de magnitude plus faible. De la même façon, lorsque le coefficient optique diminue lors d'un chauffage, c'est une indication que la chaîne devient plus flexible dû, par exemple, au relâchement des liens des chaînes latérales (Yevlampieva et al., 1999).

La règle de contrainte – optique est généralement respectée pour des taux de cisaillement $\gamma < 1/\tau^4$ (Gatzonis et al., 1997). Cependant elle peut ne pas être respectée à des concentrations suffisamment élevées et dans les deux situations suivantes: (1) lorsque des contraintes de cisaillement trop élevées sont appliquées, dans ce cas les molécules deviennent trop allongées et leur conformation ne suit plus les statistiques Gaussiennes; (2) lorsque l'échantillon contient des impuretés tels des agrégats ou d'autres structurations secondaires anisotropes, dans ce cas la contribution de la biréfringence de forme ne peut pas être exclue et la relation avec le tenseur de contrainte n'est plus directe (Li et al., 2000).

La biréfringence peut présenter des pics lors de l'application d'un cisaillement. Ces pics, appelés « overshoots », précèdent l'état d'équilibre qui serait atteint, par la suite, due à l'orientation des chaînes dans le sens de l'écoulement. Les overshoots en biréfringence sont très répandus dans les solutions polymériques et se manifestent dans deux circonstances (1) à une contrainte constante, dans ce cas ils reflètent l'orientation des chaînes causées par les enchevêtrements qui ont lieu dans des temps plus courts que les relâchements et (2) à un temps constant après avoir imposé le cisaillement. Dans ce cas, le pic est plus large et a lieu à des taux de cisaillement plus élevés que dans le premier cas; ce pic est associé avec l'étirement des segments du polymère (Chai et al., 1999; Immaneni et al., 1997; Chow et al., 1985). Ce dernier phénomène a lieu quand le taux de cisaillement multiplié par le taux de relaxation dépasse 1 ($\gamma^* \tau > 1$) (Pearson et al., 1991) et est un phénomène transitoire,

c'est-à-dire qu'une fois l'état de équilibre atteint, les molécules ne seront plus distendues (Pearson et al., 1991).

1.6.3.2. Origine de la biréfringence dans les polymères

Deux sources contribuent à la biréfringence mesurée : l'anisotropie intrinsèque et l'anisotropie de forme ou de diffusion. L'anisotropie intrinsèque fait référence à des anisotropies dans la polarisabilité des segments d'un polymère i.e., si la conformation de la chaîne est altérée par une orientation, alors que l'anisotropie locale produit une anisotropie macroscopique. Dans ce cas, la biréfringence mesurée, donne de l'information sur l'orientation locale des segments du polymère.

L'anisotropie de forme a lieu quand il y a une anisotropie dans les fonctions de corrélation des segments ou de la densité. Ceci a lieu par exemple à de trop faibles concentrations où une différence dans les indices de réfraction entre les molécules et le solvant peut être détectée. Dans ce cas, la biréfringence n'est plus reliée à la contrainte de cisaillement de façon directe et donc, lorsque l'anisotropie de forme est présente, elle empêche l'analyse des résultats par les théories mathématiques normalement utilisées dans ce domaine (Clasen & Kulicke, 2001; Chen & Archer, 1999; Bossart & Ottinger, 1997; Fuller, 1995). L'anisotropie de forme est aussi le résultat de l'orientation d'agrégats et est indépendante de l'anisotropie intrinsèque des constituants de la molécule. À différence de la biréfringence intrinsèque, la biréfringence de forme varie avec l'indice de réfraction du solvant.

Les forces de cisaillement peuvent induire de l'anisotropie optique dans les suspensions macromoléculaires ou colloïdales résultant en la biréfringence ou le dichroïsme.

Plusieurs études sur des systèmes de biopolymères (Pavlov et al., 2001; Shtenninkova et al., 1990), ainsi que sur des polymères synthétiques (Chassapis et al., 2002; dell'Erba, 2001), montrent que la biréfringence dépend du poids moléculaire et de la concentration des polymères en solution. Ainsi, à de hauts poids moléculaires et à des concentrations élevées, la biréfringence se trouve augmentée et, du fait même, le degré d'orientation des molécules

est plus grand. De telles tendances sont prévues pour des raisons physiques : à de faibles concentrations, les forces Browniennes dominent sur les forces de cisaillement alors qu'à des concentrations élevées, les interactions entre segments de polymères restreignent leur mouvement, ce qui a pour résultat de favoriser l'orientation des segments dans le sens de l'écoulement et donc d'augmenter la biréfringence (Li et al., 2000; Meyer et al., 1993). Il est aussi à noter que plus la concentration en polymères en solution est faible, plus le comportement linéaire, où la règle tensio-optique s'applique, se poursuivra jusqu'à des taux de cisaillement plus élevés.

L'étude de la biréfringence induite par le cisaillement a été développée car elle soulève de grands intérêts dans plusieurs secteurs de l'industrie. Ceci est dû au fait que la relation entre la structure des polymères en solution et la façon dont celle-ci affecte la dynamique de l'écoulement permet d'acquérir un meilleur contrôle et aussi de prédire le comportement des fluides sous écoulement, dans de nombreuses applications (Meyer et al., 1993).

La mesure de la biréfringence par rhéologie optique est la méthode de choix pour étudier la dynamique, l'orientation et l'extension (déformation) des chaînes des polymères sous cisaillement. Lorsqu'un ordre est induit par une force extérieure, la biréfringence est une fonction des propriétés géométriques, mécaniques et optiques des macromolécules en solution (Fuller, 1995; Tsvetkov, 1989). Ainsi, la biréfringence induite par le cisaillement donne de l'information sur l'anisotropie de la polarisabilité optique des molécules. Ce paramètre, en étant directement relié à la structure chimique, est très sensible aux variations dans la structure ou dans l'ordre moléculaire (Tsvetkov, 1989). Cette méthode peut par exemple être utilisée pour explorer la structure moléculaire dans les liquides, pour suivre les changements de conformation moléculaire (e.g. à différentes températures ou forces ioniques) (Immaneni et al., 1997) et pour caractériser les molécules, puisqu'elle donne accès aux informations sur les dimensions et la structure des macromolécules (Fuller, 1995; Tsvetkov, 1989). Finalement, un des principaux avantages des études rhéo-optiques par rapport aux études rhéologiques, réside dans sa grande sensibilité à de faibles concentrations (Meyer et al., 1993).

1.6.4. La diffusion de la lumière aux petits angles

Quand la lumière traverse une dispersion colloïdale ou polymérique, une partie est transmise et une partie est diffusée. La diffusion résulte de l'interaction du champ électrique du rayon incident avec les nuages d'électrons des atomes dans les particules en suspension. Lorsque le vecteur électrique (E) d'un rayon de lumière frappe une particule, les fluctuations dans le champ électrique induisent un dipôle électrique dans le même plan que le vecteur électrique incident. Le mouvement d'électrons produit à son tour un courant qui oscille et produit un champ électromagnétique qui rayonne (la lumière diffusée) dans toutes les directions et à la même longueur d'onde que la radiation incidente. Une diffusion intense résulte en une forte turbidité de la dispersion.

Il existe deux types de techniques de diffusion de la lumière : la diffusion statique de la lumière (SLS), aussi connu comme diffusion de Rayleigh ou diffusion de la lumière classique; et la diffusion dynamique de la lumière (DLS) ou spectroscopie de corrélation de photons. La principale différence, entre ces deux techniques, est la durée du temps de mesure pendant une expérience de diffusion. Lorsqu'on mesure les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée d'un échantillon dans un temps de l'ordre de la microseconde, elles sont directement reliées au mouvement Brownien des molécules en suspension. Or, si l'intégration est faite pour des mesures de l'ordre de la seconde, la valeur moyenne qui en résulte ne contient plus d'informations sur les propriétés dynamiques du système, d'où les appellations de diffusion statique ou dynamique (Santos & Castaño, 1996). Dans la présente revue, on s'intéresse à la diffusion statique de la lumière.

1.6.5. La diffusion statique de la lumière (SLS)

Cette méthode se base sur le fait que les particules diffusent la lumière d'un laser à des angles qui sont inversement proportionnels à leur taille. Les petites particules diffusent la lumière à de grands angles, alors que les grandes particules diffusent la lumière à de petits angles. Donc, il y a une relation directe entre la distribution de l'énergie de la lumière diffusée dans les détecteurs et la taille des particules à l'origine de cette diffusion (Mastersizer Co., 2002). En mesurant les interactions entre les particules en suspension

avec le rayonnement lumineux par SLS, des propriétés physiques, telles la taille des particules, la forme et la structure interne peuvent être déterminées. Deux cas sont à considérer pour cette technique selon la taille des particules en suspension par rapport à la longueur d'onde de la radiation utilisée (Chu, 1991; Kratochvíl, 1987).

1.6.5.1. Diffusion par petites particules

Lorsque les particules sont plus petites que la longueur d'onde du rayon lumineux utilisé, les molécules se comportent comme des points de diffusion (Figure 1.13a), l'intensité de la lumière diffusée dépend de la concentration massique des particules en suspension mais est indépendante de l'angle de détection. Tel est le cas des protéines natives, par exemple.

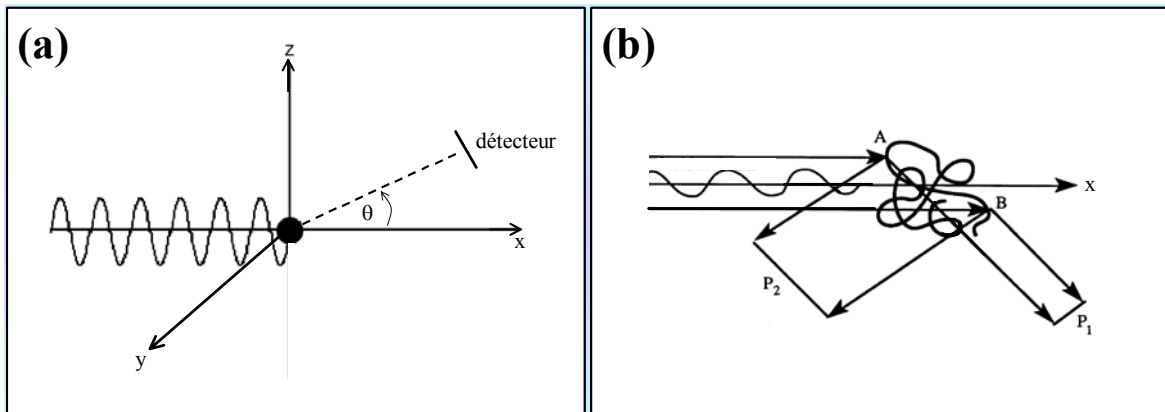


Figure 1.13. Diagramme schématisant la diffusion d'une lumière polarisée dans le plan xz par (a) une particule ponctuelle (avec un rayon $< \lambda$) et (b) deux parties différentes d'une macromolécule (avec un rayon $\geq \lambda$). Adapté de Painter & Coleman (1997).

En solution diluée, l'intensité de la lumière diffusée pour des petites particules non-uniformes est normalement écrite comme :

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{I}{M_w} + 2 A_2 c + (3 A_3 c^2 + \dots) \quad (1.9)$$

où la constante optique pour une lumière polarisée verticalement est $K = 4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 / N_A \lambda^4$; n_0 est l'indice de réfraction du solvant; dn/dc est l'incrément d'indice de réfraction mesuré pour le mélange; λ est la longueur d'onde de la lumière; N_A est la constante d'Avogadro; c est la concentration massique; A_2 est le deuxième coefficient viriel qui est relié à l'interaction inter-particule; $R_\theta = I_s/I_0 (d^2/\sin^2\theta_z)$ est le ratio de Rayleigh pour la solution; I_0 est l'intensité de la lumière incidente (polarisé verticalement); I_s est l'intensité de la lumière diffusée; d est la distance de l'échantillon au détecteur, l'épaisseur de l'échantillon, et θ dénote l'angle de diffusion. Dans ce cas, il est possible de trouver le poids moléculaire du soluté à l'aide d'un graphique de Zimm en traçant Kc/R_θ versus $\sin^2(\theta/2) + kc$ (à un angle donné, généralement 90°), dont l'ordonnée à l'origine = $1/P_M$ et la pente = $A_2/2$.

1.6.5.2. Diffusion par grandes particules

Lorsque la taille de la particule est similaire ou plus grande que la longueur d'onde utilisée, la lumière peut être diffusée par différentes parties de la même molécule et il peut y avoir des interférences constructives ou destructives dans l'intensité de la lumière diffusée (Figure 1.13b). Pour une solution de macromolécules dans le régime dilué, l'intensité de la lumière diffusée dépend donc de l'angle de mesure et de la concentration massique. Dans ce cas le facteur de forme P_θ , doit être pris en compte et on écrit :

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{I}{M_w P_\theta} + 2 A_2 c + (3 A_3 c^2 + \dots) \quad (1.10)$$

$$\text{où } P_\theta = 1 - \frac{16 \pi^2 n^2 R_g^2}{3 \lambda^2} \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (1.11)$$

En définissant le vecteur d'onde $q = 4\pi n \sin(\theta/2)/\lambda$, où θ est l'angle de diffusion, et en réarrangeant l'équation (1.10), on obtient l'équation de Rayleigh-Gans-Debye :

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{I}{M_w} + (1 + 2 A_2 M_w c) \left(1 + q^2 R_g^2 / 3 \right) \quad (1.12)$$

Où P_M est le poids moléculaire de la macromolécule, R_g est son rayon de giration. Les paramètres restants prennent la même signification que pour l'équation [1]. Les paramètres M_w , R_g et A_2 , pour des grandes particules, autour de 1/10 de la longueur d'onde, peuvent être déterminés à l'aide de cette équation et du graphique de Zimm, si des mesures à plusieurs concentrations sont faites (Liu & Chu, 2002). On met en graphe deux courbes, Kc/R_θ vs. $\sin \theta/2+kc$, et Kc/R_θ vs. $\sin \theta/2+kc$, et on fait des extrapolations à $\theta = 0$ et $c = 0$. L'ordonnée à l'origine commune donne $1/P_M$ (mass-averaged). La pente de l'extrapolation à $c = 0$ est reliée à R_g et la pente de l'extrapolation à $\theta = 0$ est reliée à A_2 (Kratochvíl, 1987).

La technique de SLS est aussi très utile pour déterminer les cinétiques de séparation de phases (Girard et al., 2004; Tuinier et al., 2000), d'agrégation (Ramírez-Santiago & González, 1997) où de polymérisation (Eliçabe et al., 1998 et 1997) du fait qu'elle est très sensible aux fluctuations de concentration. Il s'agit alors de faire le suivi de l'évolution du profil d'intensité de lumière diffusée dans le temps.

1.6.6. Les mécanismes de séparation de phases

Lors d'une séparation de phases dans un système polymérique, deux mécanismes peuvent être mis en jeu. La décomposition spinodale (SD) ou la nucléation et croissance (NC) (Figure 1.14). La NC a lieu lorsque l'échantillon s'éloigne de la région thermodynamiquement stable et rentre lentement dans la région métastable du diagramme de phases, entre les courbes binodale et spinodale. Dans cette région, les petites fluctuations de concentration ne causent pas une diminution de l'énergie libre du système, à moins que les fluctuations aient formé un nucleus d'une taille critique. En bas de cette taille, les gouttelettes émergentes se re-dissolvent aussitôt car le gain en énergie libre, obtenu lors de la formation d'une phase plus concentrée, est surpassé par la perte d'énergie libre causée par la formation de l'interface.

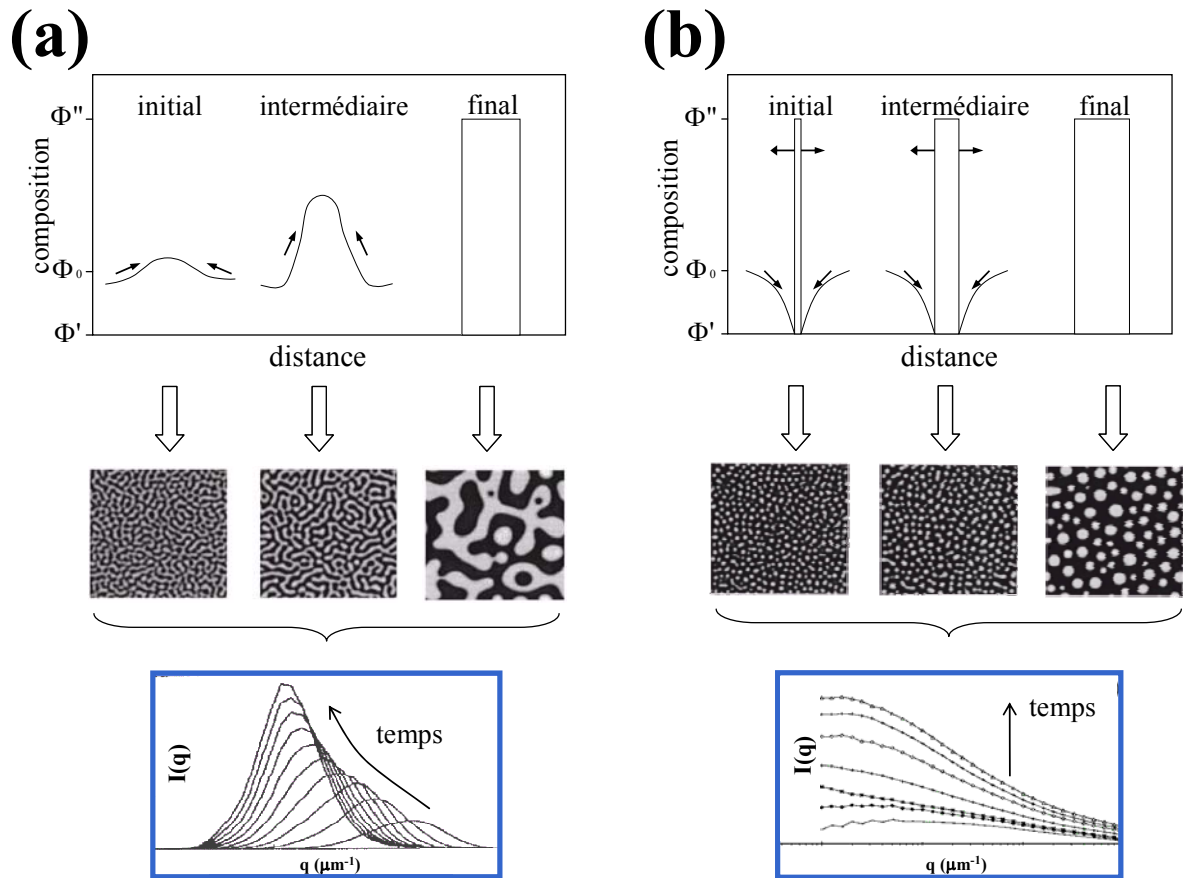


Figure 1.14. Représentation schématique des fluctuations de concentration qui mènent à une séparation de phases, structures formées et courbes typiques obtenues par SLS pour un mécanisme de (a) décomposition spinodale et (b) nucléation et croissance. Adaptée d'après Syrbe (1998) et Chen & Chakrabarti (1998) (simulations par ordinateur).

Toutefois, si les fluctuations donnent origine à des noyaux d'une taille supérieure à la taille critique, ils croîtront suivant le mécanisme de nucléation et croissance (Butler & Heppenstall-Butler, 2003b; Wagner & Kampmann, 1991). La NC est un processus lent. Du fait que les noyaux formés possèdent une multitude de tailles, la réponse en diffusion de la lumière est une augmentation de l'intensité de la lumière diffusée dans tous les angles de mesure (Donald et al., 1995). La Figure 1.14 présente un schéma de l'évolution des fluctuations de concentration, des structures formées et de la réponse mesurée par SLS pour un mélange de composition initial Φ_0 qui se sépare par SD ou NC.

La décomposition spinodale a lieu lors d'un passage abrupt et rapide de la zone stable à une région suffisamment profonde de la zone instable, à l'intérieur de la courbe spinodale. Ou bien, en traversant lentement la région métastable mais proche du point critique. Dans la région instable, le changement de l'énergie libre, lors de petites fluctuations de concentration, est toujours négatif, et donc la séparation de phases du système est favorisée et survient spontanément. Dans ce cas, les fluctuations de concentration grandissent dans le temps, donnant origine à une phase bi-continue, possédant une taille périodique caractéristique. Cette taille périodique est à l'origine du pic détecté par diffusion de la lumière (Gunton et al., 1983).

Pour minimiser l'énergie interfaciale, le système doit croître soit par coalescence de gouttelettes ou par la maturation de Ostwald, ce dernier mécanisme consiste en la croissance de grandes gouttelettes à partir des plus petites qui sont re-dissolues. Même, si initialement la SD et la NC présentent des morphologies différentes (Figure 1.14), dans les étapes tardives les deux mécanismes peuvent présenter la même structure de gouttelettes ou particules séparées. Toutefois, si une gélification survient, la structure peut rester figée sans être complètement séparée. D'ailleurs plusieurs études visent à contrôler les processus de séparation de phases et gélification pour ainsi produire une variété de textures (Butler & Heppenstall-Butler, 2003a, b; Turgeon & Beaulieu, 2001; Bansil & Liao, 1997; Tromp & Jones, 1996). Pour l'étude des cinétiques de séparation de phases, dans le contexte des théories contemporaines de la séparation de phases, l'évolution de $I(q)$ au cours du temps doit être suivie à plusieurs angles. Les dynamiques de la décomposition spinodale ou de la nucléation et croissance peuvent être étudiées en analysant l'échantillon dans les régions métastables ou instables du diagramme de phases et en mesurant l'évolution de l'intensité de la lumière diffusée $I(q)$. Pour des systèmes qui suivent une décomposition spinodale, $I(q)$ augmente dans le temps et présente un pic de diffusion à un angle caractéristique. Dans les étapes intermédiaires ou tardives de la séparation, ce pic se déplace dans le temps vers les plus petits angles, indiquant une croissance des structures. Pour des systèmes qui suivent une nucléation en croissance, classiquement $I(q)$ devrait aussi augmenter dans le temps, mais sans présenter un pic. Cependant, dans les dernières années plusieurs études, portant sur la séparation de phases induite par une polymérisation, ont trouvé qu'un

mécanisme de nucléation et croissance peut présenter un pic dans son profil de diffusion. Cela est dû à la formation d'une couche appauvrie en soluté autour des noyaux formés, donnant ainsi origine à une longueur de corrélation, qui serait responsable de la présence du pic (Maugey et al., 2001; Chen et al., 1998; Eliçabe et al., 1998 et 1997; Carpineti & Giglio, 1992). Cependant le comportement de ce pic est différent de celui dû à une décomposition spinodale (Butler & Heppenstall-Butler, 2003a, b; Maugey et al., 2001; Eliçabe et al., 1997). Par exemple, dans des systèmes de gélatine/dextrane qui subissent une séparation de phases par NC, au début de la séparation le pic se déplace vers les grands angles, dû à la formation continue de gouttelettes. Une fois que la nucléation est terminée, les gouttelettes croissent et le pic se déplace alors vers les grands angles (Butler & Heppenstall-Butler, 2003a). Dans des systèmes qui subissent une séparation de phases induite par une polymérisation, il a été trouvé que lors des étapes intermédiaires ou tardives de la séparation de phases, le pic issu d'une NC peut se déplacer vers les grands angles dû à la production continue de petits noyaux (Eliçabe et al., 1997). Dans d'autres cas, toujours pour des systèmes qui subissent une polymérisation, le pic est présent dès le début de la séparation et diminue en intensité dans le temps pour donner lieu à un deuxième pic relié aux structures formées (Maugey et al., 2001).

1.6.7. Agrégation fractale

Le terme générique d'agrégation décrit le processus par lequel deux ou plusieurs particules colloïdales se lient sous l'influence d'une quelconque interaction attractive inter-particulaire. Il est connu que, lorsqu'il n'y a pas de coalescence, les agrégats formés sont structurellement similaires à différentes échelles, c'est à dire, ils sont de nature fractale et peuvent être décrits par la dimension fractale d_f (Bushell & Amal, 2000).

Deux régimes d'agrégation fractale bien connus existent, l'agrégation contrôlée par la diffusion (DLCA) et l'agrégation contrôlée par la réaction (RLCA). Ces deux régimes sont contrôlés par le mécanisme de collision i.e., la probabilité P de collision entre monomères. Une $P = 1$ conduit à un mécanisme DLCA, alors que des valeurs de P plus petits résultent en RLCA.

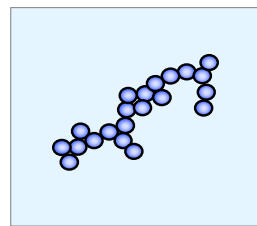
Le modèle de Derjaguin-Landau-Verwey-Overweek (DLVO), sur les colloïdes stabilisés par les charges, est utile pour expliquer l'agrégation entre deux particules. Un des facteurs déterminants, lors d'une agrégation, est le comportement de l'énergie d'interaction, donnée par la barrière énergétique répulsive, entre deux particules colloïdales qui se rapprochent. Si la hauteur de la barrière énergétique E_b , est suffisamment grande comparativement à $k_B T$, les particules n'auront pas propension à se lier. De la même façon, lorsque leur mouvement de diffusion les fait entrer en contact, le colloïde sera stable contre l'agrégation. Donc, l'agrégation peut avoir lieu uniquement quand la hauteur de la barrière est réduite. Si E_b est réduite de beaucoup par rapport à $k_B T$, chaque collision résultera en une liaison, produisant une agrégation rapide, limitée seulement par la vitesse avec laquelle la diffusion induit des collisions entre particules. Ce régime est nommé agrégation colloïdale limitée par la diffusion (DLCA). En contraste, si E_b reste comparable ou plus grande que $k_B T$, plusieurs collisions doivent avoir lieu avant que deux particules forment un lien et restent collées, résultant en une agrégation beaucoup plus lente. Ce régime est ainsi nommée agrégation colloïdale limitée par la réaction (RLCA) (Lin et al., 1990).

Étant donnée que la probabilité P que deux amas restent collés est proportionnelle au nombre de sites de liaison, les agrégats plus grands ont potentiellement plus de sites de liaison et donc croissent plus rapidement. Ainsi, au début, la vitesse d'agrégation est très lente, car tous les amas sont petits, mais cette vitesse augmente en même temps que la taille des amas augmente au cours de l'agrégation. En fait, une caractéristique de l'agrégation fractale est l'augmentation exponentielle de la taille moyenne des amas dans le temps (Bushell et al., 2002; Lin et al., 1990). La cinétique de croissance ainsi que la distribution de masse des agrégats auront, à leur tour, une influence sur la structure des agrégats formés. Ainsi, à de hautes vitesses d'agrégation, les amas formés seront diffus, et lorsque les agrégats se forment lentement ils seront plus denses, du fait que les particules peuvent s'arranger et s'interpénétrer davantage à cause de la basse vitesse de réaction. Ainsi les deux régimes donnent des structures internes différentes (Figure 1.15).

Il est de nos jours reconnu que les régimes DLCA et RLCA donnent des agrégats avec une structure interne différente caractérisée par une dimension fractale de 1.75 et 2.1,

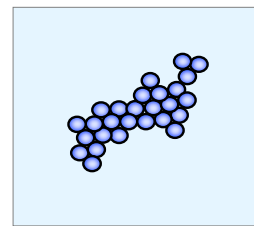
respectivement (Bushell et al., 2002; Bushell & Amal, 2000; Tang et al., 2000; Lin et al., 1990; Martin et al., 1990). Les techniques de diffusion de la lumière peuvent être utilisées pour étudier les propriétés fractales des agrégats dans des systèmes colloïdaux très divers : par exemple sur l'agrégation de protéines (Georgalis et al., 1999; Ikeda et al., 1999; Hagiwara et al., 1998), sur la formation de gels (Chou & Hong, 2004; Lattuada et al., 2003; Krall & Weitz, 1998), ou pour des études théoriques ou de simulation par ordinateur (Lattuada et al., 2003; Bushell et al., 2002; Lambert et al., 2000). Notamment, la cinétique d'agrégation et le degré fractal qui caractérisent la structure interne des agrégats peuvent être mesurés. Plusieurs études ont trouvé que l'agrégation fractale et la décomposition spinodale présentent une évolution de leur intensité diffuse très similaire (Poon et al., 1997; Ramírez-Santiago & González, 1997).

Agrégation fractale



DLCA

Agrégation limitée par
la ***diffusion***
 $d_f = 1.8$
Structures lâches



RLCA

Agrégation limitée par
la ***réaction***
 $d_f = 2.1$
Structures plus compactes

Figure 1.15. Schéma présentant les agrégats fractals de type DLCA ou RLCA.

Adapté d'après Tang et al. (2000).

L'évaluation du degré fractal d_f , à partir de la mise à l'échelle de $I(q)$, requiert que le rang de q testé, sonde des échelles de grandeur beaucoup plus larges que les particules primaires et beaucoup plus petites que l'agrégat. Il doit alors satisfaire $1/R_g > q > 1/r_0$, où R_g est le rayon de giration moyen des agrégats et r_0 est le rayon de giration des particules primaires. Idéalement, $q_{\min} \geq 10/R_g$ et $q_{\max} \leq 1/10r_0$. En d'autres mots, q doit examiner des grandeurs

entre R_g et r_o , pour être en mesure de négliger la diffusion provenant de la surface de l'agrégat ou de la surface des particules primaires respectivement. Un troisième réquisit est que la loi de puissance soit appliquée sur au moins 1 décade de tailles pour que l'objet puisse être appelé un fractal (Kim & Berg, 2000). Lorsque toutes ces exigences ont été rencontrées, on se retrouve dans le régime fractal et, dans ces circonstances, le d_f reflète la structure interne d'un amas. À de faibles q , l'intensité de la lumière diffusée est libre des effets de la structure des agrégats et est uniquement une fonction de la taille linéaire des agrégats, par le biais de son rayon de giration (Selomulya et al., 2001; Kim & Berg, 2000).

La Figure 1.16 présente un profil d'intensité de lumière diffusée typique pour un système qui suit une agrégation fractale. Dans cette figure on peut vérifier les lois de mise à l'échelle de l'agrégation colloïdale, avec un plateau (régime de Guinier) où $q \approx 1/R_g$, une région de transition vers un comportement asymptotique aux grandes valeurs de q où se trouve le régime fractal (Bushell et al., 2002).

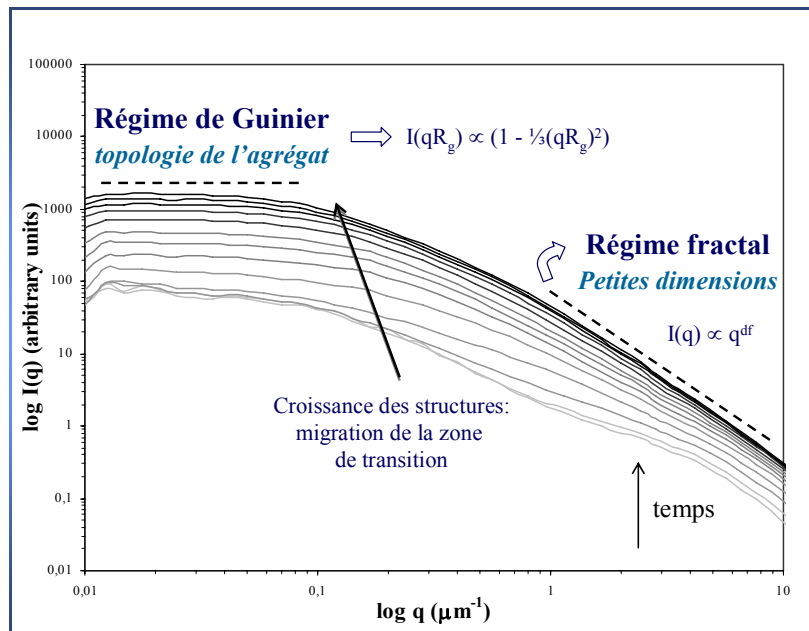


Figure 1.16. Diagramme d'intensité de la lumière diffusée pour des complexes de protéines sériques - xanthane exhibant les régions typiquement trouvées lors d'une agrégation fractale. La zone de Guinier à de faibles angles de diffusion (q) et le régime fractal à de hautes valeurs de q .

1.7. Hypothèse, but et objectifs du travail

1.7.1. Hypothèse

L'étude approfondie des connaissances actuelles sur les interactions entre les protéines et les polysaccharides anioniques ainsi que les facteurs qui les affectent nous permet de conclure que (i) le mécanisme de séparation de phases associative dans des systèmes de biopolymères a été très peu étudié; (ii) le processus par lequel les différents paramètres étudiés façonnent la structure finale des complexes est encore mal connu; et (iii) l'effet de la taille moléculaire du polysaccharide sur les propriétés des complexes n'a pas été étudié à fond dans des systèmes composés exclusivement par des biomacromolécules. Suite à cette revue de littérature, l'hypothèse suivante a été formulée :

L'étude à un niveau fondamental de l'interaction entre la β lg et le xanthane (natif ou microfluidisé), sous des conditions de compatibilité thermodynamique, permettra de déterminer quels sont les processus moléculaires encourus pour arriver aux différentes structures complexes formées, quand des facteurs tel le pH, le ratio protéine - polysaccharide, le poids moléculaire du polysaccharide et le cisaillement sont modifiés.

1.7.2. But

Le but de ce projet de recherche était de mieux comprendre l'interaction associative entre les protéines et les polysaccharides anioniques. La maîtrise des nouvelles connaissances acquises permettra d'avoir les outils nécessaires pour le développement de structures complexes possédant des propriétés fonctionnelles façonnées en ajustant les paramètres de départ.

Pour atteindre l'objectif principal et vérifier l'hypothèse de recherche, les objectifs spécifiques suivants ont été fixés :

1.7.3. Objectifs spécifiques

1. Déterminer l'effet de la microfluidisation sur le xanthane, d'une part, au niveau chimique, pour déterminer l'étendue de la dégradation, si celle-ci est aléatoire ou s'il y a des régions attaquées de façon préférentielle; et d'autre part, au niveau physique, notamment pour mesurer l'effet de la microfluidisation sur l'état d'agrégation et possibles changements conformationnels subis par le polysaccharide (Chapitre 2). Ces résultats permettront de mieux expliquer l'impact de la conformation du xanthane sur les différentes structures formées avec la protéine dans les Chapitres 3, 4 et 5.
2. Déterminer l'influence des différents paramètres étudiés, tel le ratio protéine – polysaccharide, le pH, le cisaillement, et le poids moléculaire du polysaccharide, sur les caractéristiques (taille, structure, viscosité en solution, viscoélasticité) des complexes électrostatiques ou des systèmes gélifiés obtenus (Chapitres 3 à 5).
3. Déterminer le mécanisme et la cinétique de séparation de phases associative du système β -lactoglobuline – xanthane sous cisaillement ou en repos, incluant les pH critiques de début d'interaction et de séparation de phases macromoléculaires, la cinétique de croissance et l'évolution de la structure interne (compacité) des structures formées (Chapitres 4 et 5).
4. Évaluer la fonctionnalité des complexes obtenus dans un système alimentaire modèle (Chapitre 6).

“The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.”

Sir William Bragg (1862 - 1942)
Physicien britannique

Chapitre 2

Effect of a Dynamic High-pressure Treatment on the Physical Properties of Xanthan Gum

Laneuville S.I., Turgeon S.L.* and Paquin P.

Dairy Research Center STELA. Faculty of Agriculture and Food Science.
Université Laval, Pavillon Paul – Comtois, Québec, Canada, G1K-7P4.

* Telephone: (418) 656-2131 ext. 4970. Fax: (418) 656-3353.

E-mail: Sylvie.Turgeon@aln.ulaval.ca

Sera soumis au journal « *Macromolecules* »

2.1. Résumé

L'effet d'un traitement par hautes pressions dynamiques (microfluidisation à 75 MPa) sur du xanthane, dans des solutions 10^{-4} M ou 0.1 M NaCl, a été étudié, avec l'objectif d'élargir son potentiel d'application. Les échantillons témoins et les échantillons traités ont été caractérisés chimiquement (sucres réducteurs, contenu en acétate et pyruvate) et physiquement (poids moléculaire (P_M), viscosité intrinsèque $[\eta]$, transition thermique, courbes d'écoulement et biréfringence induite par le cisaillement). Un intérêt particulier a été porté sur le comportement sous cisaillement et à la tendance du xanthane à s'agréger en solution.

Le xanthane natif avait un $P_M = 5.0 \times 10^6$ Da et une $[\eta] = 25.5$ dl/g. Une augmentation du nombre de passes à travers le microfluidisateur résultait en une diminution du P_M et du $[\eta]$, ce qui a été aussi détecté par une diminution de la viscosité, du caractère pseudoplastique et de la biréfringence des échantillons traités ($P_M = 4.5 \times 10^6$ à 2.8×10^6 Da avec une $[\eta] = 18$ à 8 dl/g). Même si une réduction très importante des paramètres physiques mesurés a été trouvée (e.g. une diminution de presque 100 fois dans les valeurs de η_o pour les échantillons les plus dégradés), les chaînes latérales n'ont pas été touchées, comme déterminé par l'invariabilité de l'enthalpie de transition et des contenus en acétate et pyruvate tout au long du traitement. Toutefois, pour des traitements plus sévères, une dégradation de la chaîne principale a été détectée par une augmentation des sucres réducteurs.

Un mécanisme pour le mode d'action par lequel la microfluidisation induit une dégradation du xanthane a été proposé. Selon la sévérité du traitement, différents niveaux de dégradation étaient obtenus. Ainsi, initialement, la microfluidisation réduisait l'état d'agréation des échantillons sans toucher la composition chimique de la molécule. Pour des traitements plus sévères, une transition d'ordre - désordre était induite dans les molécules résultant en l'exposition de la chaîne principale, la rendant plus susceptible à la dégradation. Bien que la microfluidisation induise des grands changements dans les propriétés physiques du xanthane, et même une dégradation partielle de la chaîne

principale, les niveaux de dégradation sont moindres que ceux trouvés lors d'une dégradation induite chimiquement ou par l'oxydation. De ce fait, la microfluidisation semble être un nouveau moyen pour obtenir une dégradation contrôlée du xanthane.

2.2. Abstract

The effect of a dynamic high-pressure treatment (microfluidization at 75 MPa) on xanthan gum in 10^{-4} M or 0.1 M NaCl aqueous solutions was investigated in views of enlarging its potential uses. Untreated and treated xanthan gum samples were characterized chemically (reducing sugars, acetate and pyruvate content) and physically (molecular weight (M_w), intrinsic viscosity $[\eta]$, thermal transition, flow behavior and flow induced birefringence). Particular interest was given to the flow behavior, flow birefringence and aggregation tendency of the samples in solution and after treatment.

Native xanthan had a $M_w = 5.0 \times 10^6$ and $[\eta] = 25.5$ dl/g. An increase in the number of xanthan passes through the microfluidizer resulted in a decrease of M_w and $[\eta]$; which was also detected by the lower viscosity, pseudoplastic character, and flow induced birefringence of treated samples ($M_w = 4.5 \times 10^6$ to 2.8×10^6 with $[\eta] = 18$ to 8 dl/g). Although an important reduction in M_w and viscosity of solutions was found (almost a 100-fold loss of η_0 for the more degraded samples), no apparent degradation of lateral chains was observed, as shown by the transition enthalpy and pyruvate / acetate content that remained constant. On the other hand, for the more severe treatments some degradation of the main chain was detected by an increase in reducing ends.

A mechanism for the microfluidization-induced degradation of xanthan was proposed. Depending on the severity of the microfluidization treatment, different extents of degradation of the molecule could be obtained. Initially, microfluidization significantly reduced the aggregated state of xanthan without importantly touching its chemical composition. For more severe treatments an order-disorder conformational transition was induced that exposed the backbone to degradation. Although microfluidization causes great changes in the physical properties of xanthan and even some degradation of the main chain, the degradation did not reached the levels commonly found during chemical or oxidation-

induced degradation. Thus, microfluidization appears as a new means to achieve controlled and relatively mild degradation of xanthan gum.

Keywords: Xanthan, microfluidization, high-pressures, flow birefringence, flow behavior, mechanical degradation.

2.3. Introduction

Xanthan gum is an extracellular polysaccharide produced by aerobic fermentation of the bacterium *Xanthomonas campestris*. The primary structure of xanthan is well established (Jansson et al., 1975) and consists of a cellulosic 1→4-linked β-D-glucose backbone substituted at C3 of alternate glucose residues with a trisaccharidic side-chain composed of a glucuronic acid between two mannose units. In general, all of the inner mannose residues carry an *O*-acetyl at C6, and around 30 to 50% of the terminal mannose has a pyruvic acid diketal at the 4,6-position.

In aqueous solution, xanthan adopts an ordered helical conformation (single or double stranded, depending principally on ionic force, temperature, solvent, and thermal treatment history of the sample (Morris, 1990; Sato et al., 1984a, b). At high ionic strengths, the side chains align along the backbone to form a stiff structure (persistence length $q = 120 \pm 20$ nm) (Lecourtier et al., 1986; Sato et al., 1984b, c; Paradossi & Brant, 1982), with some degree of flexibility (Rocherfort & Middleman, 1987; Pettitt, 1979). This conformation is stabilized principally by side chain/main chain interactions involving hydrogen bonding between the carboxylic and hydroxyl groups in the chains, and nonionic interactions outweighing the repulsion between adjacent COO⁻ groups (Young et al., 1994; Holzwarth, 1976).

The ordered conformation can undergo an order-disorder transition, to yield a disordered flexible coil by decreasing salinity, i.e., by maximizing electrostatic repulsive forces between ionized carboxylate groups (Young et al., 1994; Liu et al., 1987; Norton et al., 1984), or by increasing the temperature above a characteristic melting temperature T_m (Morris, 1990; Sutherland, 1990; Rahway, 1988; Pettitt, 1980). This transition has been

detected by a variety of physical techniques such as optical rotatory dispersion ORD (Christensen et al., 1993c; Milas & Rinaudo, 1986; Frangou et al., 1982; Southwick et al., 1982; Holzwarth, 1976), DSC (Christensen et al., 1993c; Kitamura et al., 1991; Norton, 1984; Paoletti et al., 1983), circular dichroism (Capron et al., 1997; Dentini et al., 1984; Norton et al., 1984; Milas & Rinaudo, 1979; Morris et al., 1977), NMR (Gamini et al., 1991), light scattering (Capron et al., 1997; Coviello et al., 1986; Milas & Rinaudo, 1986; Norton et al., 1984; Sato et al., 1984a; Paradossi & Brant, 1982), electron microscopy (Christensen et al., 1993b; Morris et al., 1977; Holzwarth, 1976), viscosity (Capron et al., 1997; Milas & Rinaudo, 1986; Sato et al., 1984b), and conductance measurements (Milas & Rinaudo, 1986).

Several authors have suggested that the denaturation process of the double helical conformation is a two-step process and follows an extension-dissociation path (Stokke et al., 1989; Liu & Norisuye, 1988; Lecourtier et al., 1986). In the first stage, when xanthan in the compact double stranded structure is exposed to disordering conditions (e.g. heating to T_m or upon exposure to low salinities 10^{-3} to 10^{-4} M NaCl), lateral chains unfold, resulting in an extended less compact and much more flexible double-helical structure (Stokke et al., 1989; Muller & Lecourtier, 1988; Lecourtier et al., 1986), where ordered and disordered regions can coexist within the same expanded molecule (Muller & Lecourtier, 1988; Norton et al., 1984). It has also been proposed that the double helix conformation melts down from both ends, to produce a dimerized expanded coil (Liu & Norisuye, 1988). At this stage, the M_w does not change but has a smaller persistence length and lower viscosity. Upon cooling, the dimeric structure is reformed (Muller & Lecourtier, 1988) and this stage is considered an intramolecular process. The second step is an intermolecular process and occurs under more severe conditions, i.e., salinities $\leq 10^{-5}$ M or exposure to a $T^\circ > T_m$ for large periods. Under such conditions the M_w is roughly halved, indicating a complete dissociation of aggregates, double helices or hairpin structures into single-stranded chains (Bezemer et al., 1993; Stokke et al., 1989; Muller & Lecourtier, 1988; Lecourtier et al., 1986). Likewise, the ordering of xanthan gum proceeds in two stages, in the first one, single chains are stiffened by intramolecular hydrogen bonds, followed by intermolecular aggregation (Sato et al., 1985; Norton et al., 1984). The ordering process is slower at low

ionic strengths since the charged side chains make re-association more difficult (Rocherfort & Middleman, 1987).

The unusually high viscosity and important pseudoplastic behavior of xanthan dispersions even at low polymer concentrations (Morris, 1995), are at the base of its attractive properties and efficacy in stabilizing emulsions, supporting solid particles, liquid droplets or air bubbles over long periods of time (Lapasin & Prici, 1995; Kang & Pettitt, 1992; Morris, 1977). The molecular origin of this behavior appears to be related to the molecule's structure and its tendency to entangle and form intermolecular associations by the linkage at ends of chains via the formation of double helices or by lateral associations (Morris, 1995; Norton et al., 1984). This results in the formation of a loosely bound network stabilized by hydrogen bonding and other non-covalent interactions (Capron et al., 1997; Morris, 1990; Norton et al., 1984).

When polymer degradation is studied, it often refers to the negative impact on its functional properties. However, several studies have been done where controlled degradation (partial depolymerization) of hydrocolloids results in the enlargement of their potential applications and thus, the improvement of their functional properties (Evans & Marr, 1997). Tuinier et al. (2000) reports that higher viscosities could be achieved by reducing the M_w of guar gum in mixtures with milk, without generating phase separation due to incompatibility. Evans & Marr (1997) provide numerous examples where a partial depolymerization of polysaccharides has a positive impact on the properties of the final product, for example, the production of xanthan/locust bean gum mixed gels with softer textural characteristics and desirable melt-in-mouth properties. Other studies of polymer controlled degradation aiming to improve and/or produce tailored functionalities for specific processes are reported in food science (Floury et al., 2002; Corredig & Wicker, 2001) as well as in pharmaceuticals (Lii et al., 1999; Silvestri & Gabrielson, 1991; Kojima et al., 1984).

The interest on characterizing the effect of microfluidization (a dynamic high-pressure treatment) on xanthan gum chemical and physical properties was propelled by previous results on protein – xanthan gum associative interaction studies, where it was found that the application of a microfluidization pre-treatment on xanthan gum resulted in the

modification of the functional properties of the resulting ingredient, i.e., particulated aggregates formed instead of fibrous ones (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3). This indicated that microfluidization could be used to change xanthan gum properties and enlarge its potential applications, e.g. for the development of novel food ingredients. Previous works have found that microfluidization decreases the M_w of xanthan gum (Lagoueyte & Paquin, 1998); however, questions on the integrity of the molecule and aggregation state remained unanswered.

2.4. Materials and Methods

Xanthan gum, Keltrol F (lot no. 9D2192K), was obtained from KELCO Co. San Diego, CA. Xanthan dispersions (1 wt%) were prepared at ionic strengths of 10^{-4} M or 0.1 M NaCl using a high shear Stephan mixer operating at 300 rpm for 25 min, and equipped with a vacuum pump. Samples were then kept at 4 °C overnight for adequate hydration. Subsequently, xanthan gum dispersions were circulated 1, 4, or 12 times through the microfluidizer (110Y Microfluidics Corporation, Newton, MA) at 75 MPa. During microfluidization, the temperature was controlled by covering the reaction chamber with ice, which allowed to obtain an outlet temperature of 20-25 °C. Microfluidized samples were divided in two sets; one set was dialyzed using Spectrapor*4 membranes (Spectrum, MWCO = 12.000 - 14.000) against Milli-Q water at 4 °C, for 4 days with 3 water changes per day. At the end of this time, the presence of chloride ions was not detected by the AgNO_3 assay (Harris & Kratochvíl, 1974). Dialyzed samples were freeze-dried, grinded to powder and kept at room temperature until further analysis. The second set was kept in solution and cold storage at 4 °C with 0.05% N_3Na added as a preservative, this second set was used only for rheological measurements. Blank samples, which will be designated as samples treated 0 passes (0P), were also prepared following all the described steps except for microfluidization treatment. Some tests were made on dispersions of xanthan gum “as received”; these samples are designated as Keltrol. Generally, commercial samples are found in the double helical structure due to the pasteurization treatment during its processing (Muller et al., 1986).

2.4.1. Chemical Analyses

Keltrol, 0P, and microfluidized xanthan samples were characterized chemically. Protein content was determined by measuring total nitrogen by combustion according to the Dumas principle (IDF standards 185:2002) using a LECO equipment (FP-528, Leco Corporation, St. Joseph, MI) with a conversion factor of 6.25. Total carbohydrate content was determined by the phenol - sulphuric acid method using D-glucose as standard (Chaplin, 1986). Reducing ends were assayed by the Nelson reagent method (Hodge & Hofreiter, 1962). All chemicals used were of reagent grade quality. The degrees of pyruvilation and acetylation were determined by ^1H -RMN using a 200 MHz Varian XL spectrometer (Varian Associates, Palo Alto, CA). The substituents content was estimated by measuring the peak areas of the acetate ($\delta = 2.14$ ppm) and pyruvate ($\delta = 1.44$ ppm) using 5 mM of sodium acetate ($\delta = 1.89$ ppm) as internal standard.

2.4.2. Physical Analysis

For all tests, xanthan gum dispersions were prepared 24 h prior to the analysis, left overnight at 4 °C to allow adequate hydration and then left to stand at room temperature for 1 h before measurements. Concentration and solvents used are specified in each section.

2.4.2.1. Size exclusion chromatography (HP-SEC)

The M_w was measured by HP-SEC on a Waters system (Waters & Associates, Milford, MA, equipped with a 501 pump and 410 differential refractometer detector) with TOYO SODA TSK-G6000PW and TSK-G4000PW columns connected in series. Xanthan samples were dispersed (1 mg/ml) in the mobile phase (0.1 M NaNO_3 - 0.05% N_3Na), and filtered through 1.2 μm Millipore filters (Anotop 10 Plus, 25 mm, Whatman) prior injection. The elution was performed at 1 ml/min (30 °C). M_w were calculated using a calibration curve obtained with Pullulan standards (Shodex P-82 pullulan standard kit, lot 60301, peak M_w ranging from 0.59×10^5 to 78.8×10^5 and Shodex 1600 Individual standard, with peak at 166×10^5). The presented M_w values are given as equivalent pullulan M_w . Since xanthan samples aggregate easily, it has been suggested that SEC measurements without coupling

with other techniques may give an overestimate of the M_w . However, the M_w for the Keltrol and OP samples are in the same order of that found by Rodd et al. (2000).

2.4.2.2. Intrinsic viscosity

The intrinsic viscosity was measured in the dilute regime in 0.01 M NaCl. Five different concentrations were tested: 0.01 to 0.25 g/L at intervals of 0.05 g/L. Eight measurements were taken for each sample using a rolling ball viscosimeter AMV200 (Paar Physica, Glen Allen, VA) with a capillary of 1.6 mm diameter and a ball 1.5 mm diameter (density: 7.85 g/cm³). Measurements were taken at 25 °C at an inclination angle $[\theta] = 20$. Intrinsic viscosities $[\eta]$ were calculated by extrapolation of the reduced and inherent viscosities to infinite dilution using the Huggins' and Kraemers' equations (Kravtchenko & Pilnik, 1990). The mean difference between these two values was of the order of 0.8%, and considered very low, thus the mean values are presented. The use of mean values of $[\eta]$ has been discussed elsewhere (Bohdanecky & Kovař, 1982). The Huggins constant k_H was also estimated.

2.4.2.3. DSC

Differential scanning calorimetry (DSC) experiments were performed using a Setaram Microcalorimeter (MicroDSC III) equipped with 1 cc batch cells, dispersions were prepared at 1 wt% in 0.05 M NaCl and a solution volume of ~800 μ l was used. Samples were heated, cooled down and heated again from 30 to 120 °C at a scanning rate of 0.2 K/min. The transition temperature (T_m) was determined as the temperature at the peak of the enthalpy curve.

2.4.2.4. Rheometry

Flow curves were taken on xanthan samples re-dispersed in distilled water (0.5 wt%). Test were also conducted on samples that were kept in cold storage (1 wt%) 48h or 2 months after microfluidization. Measurements were performed at 25 °C with a shear-rate controlled rheometer (ARES-100FRT, Rheometric Scientific, Piscataway, NJ) equipped with a couette-

type sensor. The inner and outer cylinder radii were 33 and 34 mm respectively; the length of the inner cylinder was 33 mm. The shear-rate range explored was from 0.02 s^{-1} up to 2520 s^{-1} . The Newtonian viscosity at a shear rate approaching zero (η_0) was calculated by fitting the flow curves with the Carreau model A, Eq. (2.1), (Carreau, 1972) or the modified Carreau Model, Eq. (2.2), with the inclusion of the infinite shear rate Newtonian viscosity term η_∞ , when applicable (Carreau et al., 1997; Raju et al., 1993).

$$\eta = \frac{\eta_0}{[1 + (\tau\gamma)^2]^m} \quad (2.1)$$

$$\frac{(\eta - \eta_\infty)}{(\eta_0 - \eta_\infty)} = \frac{1}{[1 + (\tau\gamma)^2]^m} \quad (2.2)$$

Where η is the viscosity at a given shear rate γ ; η_0 and η_∞ (Pa·s) are the zero and infinite shear rate Newtonian plateaux respectively; τ is a relaxation time so that $\gamma_c = 1/\tau$ (s^{-1}) is a characteristic shear rate for the onset of the shear thinning regime; and $-2m$ is the slope of the power law region.

2.4.2.5. Flow Birefringence

Flow birefringence was measured on xanthan gum samples re-dispersed at 0.25 wt% in 10^{-4} M or 0.1 M NaCl. Samples at 1 wt% after microfluidization were also tested. Measurements were performed at 23 °C with a shear stress controlled rheometer (SR-5000, Rheometric Scientific, Piscataway, NJ) equipped with an Optical Analysis Module (OAM) and a quartz parallel plate geometry (32 mm diameter). The laser emitting at a wavelength λ of 632.8 nm passed through the sample (1 mm gap) at normal incidence. Two types of tests were carried out. A step rate test, where sequential steady shear rates were applied as follows: 0/1/10/100/500 and 0 s^{-1} , each step lasted 100 s. The second test was a rate ramp test where shear rate was increased from 0 to 500 s^{-1} in 500 s. Flow induced birefringence (Δn) and extinction angle (χ), characterizing the average orientation of the molecules in the

flow direction, were measured and used to evaluate the start-up, steady state and relaxation birefringence. Triplicate assays showed a repeatability of $\pm 0.3\%$.

It is well known that there are three concentration regimes in polymer dispersions, the dilute, semi-dilute and concentrated regime (Lapasin & Priel, 1995). The semi dilute regime starts at the critical concentration c^* at which individual molecules begin to physically interact and overlap. With further increase in concentration, polymer-polymer interaction becomes dominant, and polymer chains begin to interpenetrate, this regime constitutes the concentrated regime and is delimited by c^{**} (Richardson & Kasapis, 1998; Milas et al., 1990). For xanthan gum, c^{**} also defines the beginning of the concentrated regime where molecular aggregation can take place (Rodd et al., 2000). The overlap concentration c^* is usually in the order $[\eta]^{-1}$ and c^{**} approximates $8[\eta] - 1$ (Milas et al., 1990). Previous studies have found that for xanthan gum c^* is in the range 0.02 - 0.1 wt% and $c^{**} \sim 0.65$ wt% (Rodd et al., 2000; Meyer et al., 1993). The rheoptical measurements in the semi-dilute and concentrated regime will allow assessing the molecular organization and the behavior of molecules and aggregates during flow.

2.5. Results and discussion

2.5.1. Chemical characterization

Xanthan gum samples contained 96.36% total sugars and 3.6% protein (non dialyzable, thus accounted as cellular debris). The pyruvate content was 3.76 ± 0.08 mg/100g which corresponds to $\sim 43.2\%$ pyruvilation. This value approaches the typical value of 50% pyruvilation reported for Keltrol samples, which corresponds to a xanthan bearing one pyruvic acid ketal on every other terminal D-mannose unit (Holzwarth, 1978; Sandford et al., 1977). The level of acetylation was 85 ± 3 mg/100g. The acetate and pyruvate content remained constant throughout the microfluidization process, indicating that lateral chains were not affected by microfluidization.

On the other hand, the relative amount of reducing ends (Table 2.1) showed a slight but significant increase from ~ 11 mg/g for OP samples to ~ 16 mg/g for xanthan treated 12

passes. No increase in reducing ends was found in samples treated 1 pass in 0.1 M NaCl, showing that at least in the first stages of the treatment, the ordered conformation renders the molecule less susceptible to degradation. A tendency towards higher degradation was noted for samples treated 4 or 12 passes in 0.1 M compared to those in 10^{-4} M; however this difference was not statistically significant.

2.5.2. Molecular weight and Intrinsic Viscosity

Figure 2.1 and Table 2.1 presents the M_w , as measured by HP-SEC, for xanthan samples microfluidized in 10^{-4} M or in 0.1 M NaCl versus the number of passes (at 75 MPa). There is a substantial M_w reduction, from 5.1×10^6 to 2.8×10^6 Da, as the number of passes increases, although a high molecular mass ($> 10^6$) is retained for all samples.

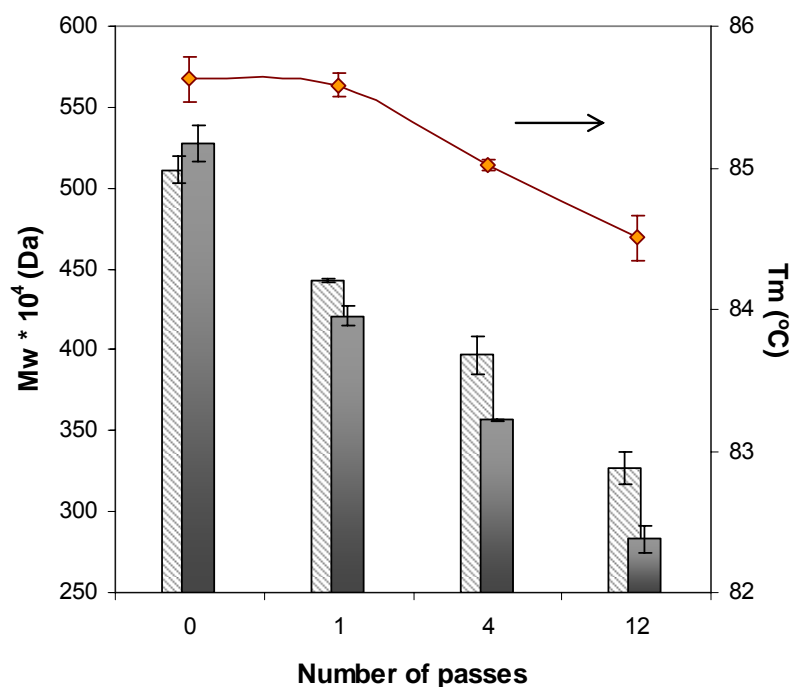


Figure 2.1. M_w measured by HP-SEC for xanthan gum microfluidized in 10^{-4} M (\square) or in 0.1 M NaCl (\blacksquare). The transition temperature T_m is also presented ($\text{---}\blacklozenge\text{---}$).

Surprisingly, the results reveal that the M_w reduction achieved through microfluidization is more pronounced for samples treated in 0.1 M NaCl, where xanthan is in the ordered double helical conformation (Young et al., 1994; Foss et al., 1987; Holzwarth, 1976). Previous studies on acid or enzymatic degradation of xanthan gum (Hjerde et al., 1994) have shown that xanthan is more stable in the ordered conformation (high ionic strength) since the lateral chains protect the main chain against degradation (Kang & Pettitt, 1992). Clearly, the mode of action is different in the case of physical induced degradation.

Since the measured M_w for the 0P and Keltrol samples are similar to that of a double stranded xanthan (Muller et al., 1986), it is assumed that this is the adopted conformation of the initial samples. The M_w of samples treated 4 passes (3.97 and 3.48×10^6 Da) are similar to the reported M_w value of 3.56×10^6 Da obtained for xanthan under strong dissociating conditions (solvent containing $\geq 85\%$ cadoxen), where the molecule is found as a single flexible random coil (Sato et al., 1984a, b). After 12 passes, degradation in the main chain is noticeable by an important decrease in M_w and some increase in reducing ends Table 2.1.

Table 2.1. Summary of the results of M_w , the ratio M_w / M_{w0} , intrinsic viscosity $[\eta]$, Huggins constants k_H , transition temperature T_m , estimated rod length ML, and other physical parameters determined for all studied samples.

	M_w ($\times 10^5$ Da)	M_w / M_{w0}	Reducing ends (mg/g)	$[\eta]$ (ml/g)	K_H	c^* (g/L)	L (μ m)	T_m ($^{\circ}$ C)	Δh (J/g)
Keltrol	50.8	1.00	nd	2500.0	0.66	0.40	0.94	nd	nd
10^{-4} M									
0	50.9	1.00	11.4	2657.4	0.80	0.37	0.96	86.1	6.8
1	44.8	0.88	12.4	1856.4	0.59	0.54	0.80	85.7	6.9
4	39.2	0.77	14.1	1436.7	0.56	0.72	0.70	85.1	5.8
12	32.5	0.64	15.3	1049.6	0.48	0.96	0.59	84.6	6.1
0.1 M									
0	52.0	1.00	11.7	2636.7	0.74	0.39	0.97	85.5	5.8
1	41.6	0.80	11.8	1768.6	0.59	0.57	0.77	85.2	6.0
4	34.8	0.67	14.3	1269.8	0.49	0.82	0.64	85.0	6.0
12	28.6	0.55	15.6	895.9	0.44	1.12	0.53	84.4	6.1

Intrinsic viscosity measurements reveal a similar trend (Table 2.1) with $[\eta]$ decreasing by increasing the number of microfluidization passes, and samples treated in 0.1 M being more affected by microfluidization. However, this effect was significant only for 4 and 12 passes. The obtained $[\eta]$ values for the Keltrol and 0P samples are in agreement with those reported in literature for xanthan in a double stranded conformation (Smith et al., 1981). Furthermore, Milas et al. (1996) report a $[\eta] = 1230$ ml/g for sonicated single stranded xanthan samples, this value approximates the $[\eta]$ obtained for samples treated 4P either in 10^{-4} M or 0.1 M NaCl (Table 2.1). On the other hand, values as high as $[\eta] = 2000$ ml/g and $M_w = 2.16 \times 10^6$ Da have been reported for xanthan in 4M urea, where the molecules are found in the disordered conformation (Southwick et al., 1982).

The Huggins constant k_H is considered to be an index of polymer-polymer interaction. It can take values between 0.3 (in good solvents) and 0.5 (Sato et al., 1985), although values as high as 0.8 are considered to be normal (Doublrier & Cuvelier, 1996). Values higher than unity indicate that aggregation is likely to occur (association between the macromolecules) (BeMiller, 1996; Da Silva & Rao, 1992). Other authors propose that in cases of association the Huggins coefficient $k_H \gg 0.5$ (Bohdanecky & Kovař, 1982).

Keltrol and 0P samples presented k_H values between 0.7 and 0.8 (Table 2.1), indicating some aggregation, possibly due to a renatured conformation containing mismatched helical conformations and/or aggregates with more than two molecule strands. These values approach those reported in literature for untreated xanthan gum, $k_H = 0.6 - 0.63$ in 0.1 or 0.01M (Capron et al., 1997; Rinaudo & Milas, 1978). Rinaudo & Milas (1978) attributed these high values to the rigidity of the main chain and to the particular hydrodynamic behavior attributed to the arrangement of the lateral chains. Other authors have found values as high as $k_H = 1.1$ in 0.01 M NaCl (Torres et al., 1993), they suggested that the high k_H values were representative of the aggregation tendency of xanthan molecules and that under such case, the usual meaning of the Huggins coefficient is not valid.

The k_H obtained for microfluidized xanthan samples approached that for xanthan gum in an extended conformation, $k_H = 0.40 - 0.45$, measured above 50 °C (Capron et al., 1997;

Muller & Lecourtier, 1988), indicating the absence of associations and typical of non-interacting molecules. Thus, microfluidization is an effective means of producing aggregate-free xanthan dispersions.

A slightly higher $[\eta]$ value was obtained for the OP compared to the Keltrol sample. It has been found that the exposure to a low NaCl environment (disordering conditions e.g. during dialysis) results, upon re-addition of salt, in the formation of a more stiff wormlike conformation (Milas et al., 1996; Lecourtier et al., 1986). Furthermore, several authors have also found, by viscosity and light scattering measurements that addition of NaCl after exposure to low salinities does not cause single xanthan molecules to reform a perfectly paired double helix, instead single chain portions tend to randomly aggregate and may form multi-stranded structures and dimeric helices with a certain degree of mismatch. These aggregates have a more extended conformation, larger hydrodynamic volume (more excluded-volume effect) and thus yield higher viscosities (Liu & Norisuye, 1988; Milas & Rinaudo, 1986; Sato et al., 1985). These multi-stranded aggregates have been observed by electron microscopy (Stokke et al., 1986; Holzwarth & Prestidge, 1977) and atomic force microscopy studies (Capron et al., 1998).

It is accepted that Keltrol samples are found in the renatured state, due to the pasteurization process (Holzwarth, 1978), and dissolve as a double helix when not heated (Milas et al., 1996; Gamini & Mandel, 1994; Paradossi & Brant, 1982). It has been suggested that intermolecular association is enhanced (created) during drying processes such as lyophilisation (Morris, 1995; Chauveteau & Kohler, 1984) or atomization (Muller et al., 1986).

Lecourtier et al. (1986) report irreversible changes in optical rotation measurements after exposure to low salinities, showing that renatured xanthan gum has a stiffer conformation than the native sample, possibly by a reorganization of H-bonds between the side chains and the backbone. However, H-bonds are strongly dependent on the pyruvate content, which increase the number of charged groups and therefore the electrostatic repulsion and the steric hindrances resulting in the formation of a more extended double helix (as detected by the increase in $[\eta]$) with a persistence length of 150 nm, a value slightly higher than the

120 nm measured for the double conformation (Morris, 1990; Muller et al., 1986; Sato et al., 1984c; Holzwarth & Prestidge, 1977). This irreversible change did not happen for samples with lower pyruvate content. Since intrinsic viscosity is determined from measurements of reduced viscosity at low concentrations, it is assumed that the extent of interchain association is negligible. Therefore, the measured $[\eta]$ is dependent upon the size and shape characteristics of single molecules at infinite dilution.

The $[\eta]$ can be further explored to estimate the macromolecular dimensions of xanthan gum, as done by Whitcomb et al. (1977). Assuming that the molecule can be approximated by a cylindrical rod, the rod length (L) can be calculated with equation (2.3):

$$L^3 = \frac{[\eta] * 45 * M_w * (\ln L / d)}{2\pi * N_A} \quad (2.3)$$

Where N_A is Avogadro's number and d is the diameter of the molecules. Whitcomb et al. (1977) report that the diameter of the xanthan molecule, which has been estimated to vary between 16 and 40 Å, has little impact on the calcul of L when using equation (2.3). Based on results of Christensen et al. (1993a, b), who report that degraded xanthan molecules can exist in a double stranded conformation when environmental conditions are favorable, it was assumed that the xanthan samples under the present conditions (0.01M NaCl) were in a renatured state (after dialysis, lyophilisation and redispersion), and the diameter was set to 40 Å. Therefore, equation (2.3) can be solved by iteration if the only unknown is L, and the resulting L values are presented in Table 2.1. The calculated rod lengths for 0P samples in 10^{-4} M and 0.1 M NaCl were of 961 or 975 nm respectively, these values are in agreement with the values reported by Whitcomb et al. (1977) for a xanthan sample of 3.6×10^6 Da and rod length of 960 nm. The decrease in rod length upon increasing the number of passes through the microfluidizer is in accordance with the reduction in M_w .

2.5.3. Thermal transition

The transition temperature (T_m) and enthalpy Δh (J/g) of the conformational transition for xanthan samples in 50 mM are presented in Table 2.1. All samples displayed a single

transition peak similar to that observed for the OP samples, with the same transition enthalpy $\Delta h_{\text{cal}} = 6.2 \pm 0.4$. The measured Δh values were in the same range as those measured by Kitamura et al. (1991) in 50 mM with $T_m = 80.7$ °C and $\Delta H_{\text{cal}} = 7.95$ J/g.

The endothermic peak for the OP samples peaked around 85.5 °C, whereas the T_m decreased with M_w for samples microfluidized 4 or 12 passes. This is in agreement with result obtained for xanthan that suffered partial enzymic hydrolysis, where it was found that the conformation transition temperature decreased with decreasing polymer M_w (Milas et al., 1986a; Paradossi & Brant, 1982; Milas & Rinaudo, 1981). As suggested by Holzwarth & Ogletree (1979), the dependence of T_m on M_w is probably due to a cooperative conformational transition and that the degree of cooperativeness decreases with a decrease in M_w . These results are different from those obtained for sonicated xanthan samples which presented the same T_m . Sonication induces a random depolymerization process that results in the reduction of M_w (and low polydispersity) without affecting the chemical structure of xanthan gum (Milas et al., 1986a).

Higher T_m indicates a stiffer conformation and lower T_m indicates a chain that is more flexible (Shatwell et al., 1990). Therefore, if indeed microfluidization causes an order-disorder transition in the xanthan molecules, following aggregate disruption (if present); it is possible that the reduction in T_m is the result of a more extended conformation of the renatured state.

Christensen et al. (1993c) reported that in native xanthan gum a significant part (up to 80%) of the transition enthalpy Δh_{cal} is linked to conformational changes in the side chains, particularly around the glycosidic oxygen, in the linkage between the β -mannose (terminal mannose) and the glucuronic acid. They report that the area under the peak, representing Δh_{cal} , decreases markedly with an increasing degree of hydrolysis in the side chains (Christensen et al., 1993c). However, the T_m was essentially independent of side chain composition. The remaining contribution to the enthalpy is partly linked to the conformational change in the glucan backbone of the molecule and the inner part of the side chains (Christensen et al., 1993c). Since the measured Δh_{cal} for microfluidized xanthan

was essentially the same as that for the 0P samples, it was concluded that lateral chains were not affected by microfluidization; which is also supported by the chemical results that showed that lateral chains remained intact even after 12 passes (section 2.5.1). The reduction of T_m for microfluidized samples would therefore be straightforwardly related to lower M_w and a more extended conformation of the chains (Stokke et al., 1989), which is induced by shear, cavitation and turbulence forces inside the microfluidizer chamber.

2.5.4. Flow behavior

Figure 2.2 shows the apparent viscosity (η) with respect to the shear rate ($\dot{\gamma}$) for all samples. The solutions were highly pseudoplastic and presented a measurable low shear Newtonian plateau, giving access to the zero-shear viscosity (η_0), followed by a transition zone to a shear-thinning power law region, where viscosity decreased as a negative power of shear rate, the power law exponent being $-2m$ (Smith et al., 1981). The initial increase in viscosity, at very low shear rates, for the 0P and 1P samples may be related to molecular entanglement and the presence of a tenuous network. In these cases, the first points were not taken into consideration for the fitting of the Carreau equations. The flow curves for the 0P samples were best described by the Carreau model that included the η_∞ term, Eq. (2.2). Microfluidized samples were fitted with the Carreau model A, Eq. (2.1) (Carreau, 1972). The calculated parameters: zero shear viscosity (η_0), infinite viscosity (η_∞), relaxation time (τ), and the coefficient m , are summarized in Table 2.2. The r^2 values of the Carreau fitting were ≥ 0.97 in all cases.

Samples treated 0P presented a higher viscosity over the whole range of shear rates, whereas, samples microfluidized 1 or 4 passes appeared to converge to a common high-shear limit. The more degraded samples (12 passes) had overall lower viscosities (Figure 2.2). In general, the number of xanthan passes through the microfluidizer had an influence on η_0 , τ , and m (Figure 2.2 and Table 2.2). Data in Table 2.2 indicate a progressive decrease in η_0 and the pseudoplastic behavior of the solutions with increasing the number of passes in both solvents. The higher degradation and loss of viscosity occurred when samples were treated in 0.1 M NaCl. The high-pressure treatment enlarged the zone of η_0 and lowered its

value to $\sim 0.2 - 0.35\%$ of its initial value, depending on the solvent in which the sample was treated (Table 2.2). The reduction in η_0 is related the reduction of M_w . For samples treated 12 passes in 0.1 M NaCl, a minimal η_0 , and m (related to the greatest broadening of the curves) and a minimal τ (onset of shear thinning at higher rates of shear) were obtained (Figure 2.2, Table 2.2). These flow profiles are similar to those obtained for xanthan degraded by ultrasounds (Milas et al., 1985). Kojima et al. (1984) also found that the degradation of polysaccharides induced by hydrodynamic shear had similarities with that obtained by ultrasonic degradation.

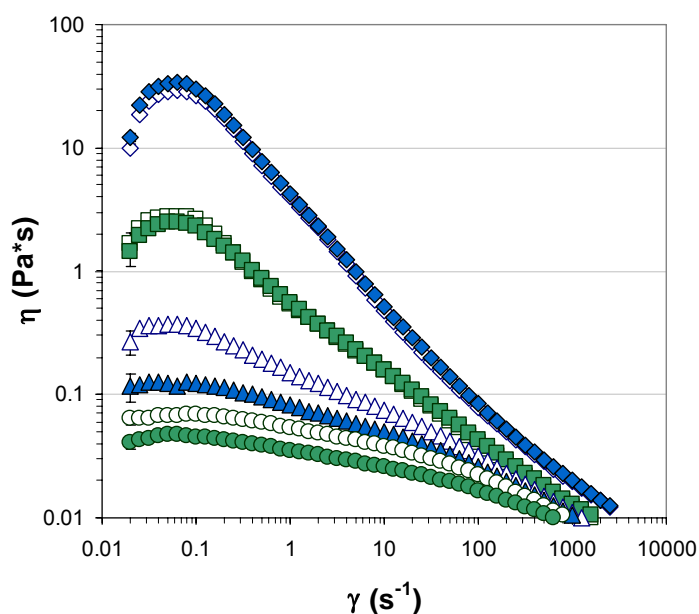


Figure 2.2. Flow curves for xanthan microfluidized in 10^{-4} M NaCl (open symbols) or 0.1 M NaCl (filled symbols). All samples were dialyzed, lyophilized and re-dispersed in 0.05 M NaCl before measurement. Native (\diamond), 1 pass (\square), 4 passes (\triangle), and 12 passes (\circ).

Average error bars are presented only in the first point of each curve for clarity.

Samples treated 0P or 1P, presented a high shear-thinning behavior, a small Newtonian region at low shear rates and a much more extended power law region. Xanthan gum is known to have a very strong shear-thinning behavior, which is enhanced by the weak network structure of the solution (Morris et al., 1977). As explained by Richardson &

Kasapis (1998), the Newtonian plateau observed for semi-dilute solutions at low shear rate corresponds to a dynamic equilibrium between forced disentanglement (to allow solutions to flow), and re-entanglement with new molecules. At higher rates of shear, the rate of disentanglement exceeds the rate at which new entanglements are formed and the overall cross-linking density of the solution is reduced, with a concomitant shear thinning.

Table 2.2. Carreau viscosimetric parameters measured for xanthan samples re-dissolved in 10^{-4} M or 0.1 M NaCl aqueous dispersions.

<i>Number of passes</i>				
10^{-4} M NaCl	0	1	4	12
η_0	30.1 ± 0.7	2.7 ± 0.5	0.37	0.11
τ	11.8	12.1 ± 0.6	7.9 ± 0.5	2.09 ± 0.4
m	0.81	0.58	0.37	0.25
η_∞	0.0076	---	---	---
0.1 M NaCl	0	1	4	12
η_0	34.6 ± 0.4	2.47	0.13	0.05
τ	12.59	11.5 ± 0.5	4.78 ± 0.7	2.8 ± 0.8
m	0.81	0.57	0.28	0.20
η_∞	0.0075	---	---	---

std. dev. ≤ 0.03 , unless otherwise stated.

Since the η_0 is a function of the volumic mass of the molecule, it can be related to the degradation of xanthan since lower molecular weights result in lower viscosity (Doublier & Launay, 1981). The reduction in η_0 and in the shear-thinning behavior (decrease in m) is correlated with a lower M_w of xanthan. The coefficient m is related to the polydispersity of the system. Low polydispersity generates a large slope for the flow curve (Cross, 1969). From data in Table 2.2, it is possible to see that microfluidization increases the polydispersity of the system, probably by disrupting the xanthan aggregates in a random manner and by yielding aggregates with several intermediate sizes that broaden the molecular weight distribution of the sample, a similar effect was observed on pectins after valve homogenization (Corredig & Wicker, 2001).

The transition from Newtonian to pseudoplastic behavior (power law region) occurs at the critical shear rate $\dot{\gamma}_c = 1/\tau$ (Table 2.2), which is known to increase with decreasing the M_w (Milas et al., 1986b). Considering the curves given in

Figure 2.2 and Figure 2.3, it is shown that the onset of non-Newtonian behavior shifts to higher shear rates with increasing number of passes. For OP samples, the linear power law portion had a slope approaching ~ 0.85 (Table 2.2), a value considerably larger than that observed for most other polysaccharides, but which is in accordance with other results found for xanthan solutions in the semi-dilute regime (Oviatt & Brant, 1994; Richardson & Ross-Murphy, 1987; Doublier & Launay, 1981). Shear thinning behavior is characteristic of macromolecules whose rheological properties in solution are essentially governed by molecular entanglements (Doublier & Launay, 1981), and possibly also to modification of interchain interaction (Milas et al., 1986b). This effect is related to the orientation of the molecules, as evidenced by flow birefringence studies (Morris, 1990).

Infinite shear viscosity, η_∞ , is of importance in terms of the shear thinning of a polymer solution and it indicates when the viscosity becomes independent of shear rates. The solution becomes free of entanglement and the molecules become oriented. Larger molecules will show a higher degree of orientation. As found in this study, samples treated 4 or 12 passes had not achieved the zone of η_∞ at the highest tested shear rates ($\sim 1050 \text{ s}^{-1}$).

Xanthan solutions are often reported to display a yield stress, which is a critical stress above which flow is observed and below which the system can be regarded as solid-like. However, in this study, a Newtonian plateau was evidenced at low rates of shear ($\dot{\gamma} < 0.2 \text{ s}^{-1}$), giving access to the zero-shear rate viscosity ($\eta_0 \approx 70 - 100 \text{ Pa}\cdot\text{s}$). The overall shape of these flow curves did not differ from that of other polysaccharides. The main difference lies in the very high apparent viscosity due to the rigidity of the macromolecule. Although xanthan gum in solution cannot be considered to form a weak gel, in the strict sense (Doublier & Cuvelier, 1996; Rocherfort & Middleman, 1987), the aggregation and structuration pattern of this molecule is at the base of its functional properties (i.e., suspending and stabilizing effect). As previously suggested (Morris, 1995), the interesting properties of xanthan gum may result from an incomplete solubilization of the

polysaccharide. Morris (1995) found that a heat treatment of xanthan in 4 M urea resulted in a reduction of the low shear rate viscosity due to the disruption of aggregates, and pointed to the need of distinguish between xanthan solutions and xanthan dispersions. In this sense, when a good solubilization is needed, 1 pass through the microfluidizer may be applied to form a true xanthan solution, this may constitute an alternative to the numerous filtration steps that are currently required before several analytical techniques.

Lagoueyte & Paquin (1998), found that beyond 12 passes, microfluidization had no more significant effect and it was proposed that microfluidization disrupted the aggregated xanthan molecules with the effect being more pronounced for the first passes, additional passes having less and less impact on M_w . These results are somewhat different from our findings, since in our case at 12 passes the M_w , $[\eta]$ and other factors seemed far from approaching a limiting value (see Figure 2.1), even though it is expected that a limiting value would be approached at some point. This may be due to the highly aggregated initial sample ($M_w = 26 \times 10^6$) used by Lagoueyte & Paquin (1998) that may have presented a greater initial impact due to the disruption of large aggregates compared to the less steep decrease found when the backbone is being attacked, which we estimate in their sample started after 12 passes. We concur however with their postulate that the turbulence, cavitation and high shear stress of microfluidization may induce an order-disorder transition that renders the molecule more susceptible to degradation.

2.5.4.1. Viscosity recovery

In this section, the flow curves for samples that were not lyophilized and were kept at 4 °C after microfluidization are presented. In Figure 2.3 the viscosity profiles of xanthan samples measured 2 days (open symbols) or 2 months (filled symbols) after microfluidization and cold storage are presented. It can be seen that after 2 months of storage, the viscosity of microfluidized samples increased showing a recuperation of viscosity and aggregation phenomenon, particularly for samples treated in 10^{-4} M NaCl.

A slight increase in the viscosity for OP samples was also observed, only in 10^{-4} M NaCl. This phenomenon has been previously reported in literature by several authors (Bezemer et

al., 1993; Carnali, 1991; Hacche et al., 1987; Southwick et al., 1980; Holzwarth, 1976) who observed a time-dependent aggregation (long term equilibration process) of xanthan in deionized water, which might be related to the aggregation tendency of xanthan molecules.

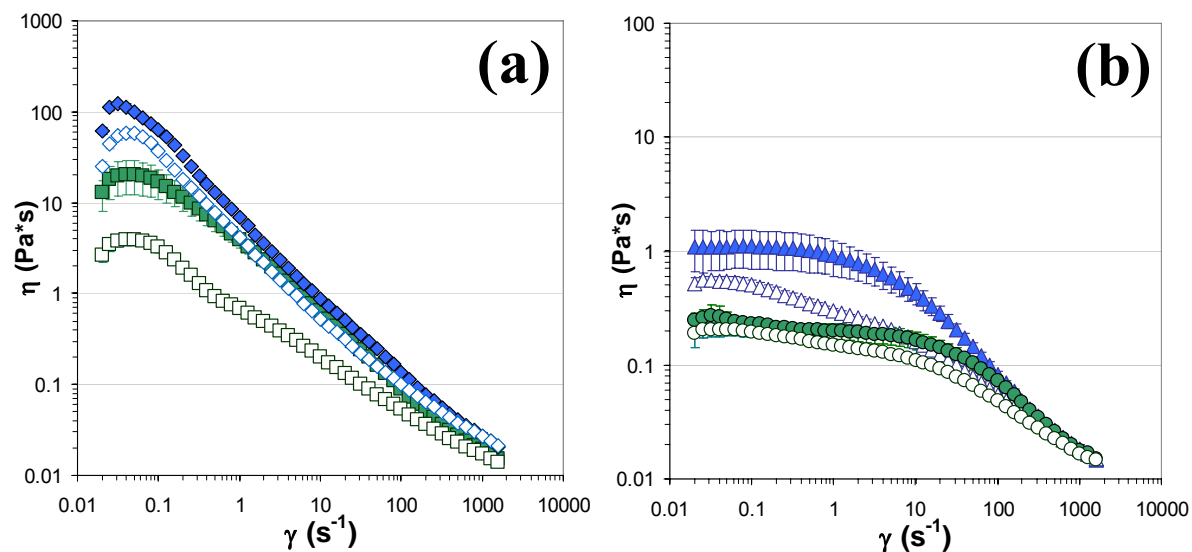


Figure 2.3. Flow curves for samples microfluidized in 10^{-4} M NaCl, measurements were made 2 days after treatment (open symbols) or two months after treatment (filled symbols).

(a) 0 passes (\diamond, \blacklozenge) and 1 pass (\square, \blacksquare); (b) 4 passes ($\triangle, \blacktriangle$) and 12 passes (\circ, \bullet).

Interchain association is a process that includes more than just molecular entanglements; there are specific interactions, principally hydrogen bonding and other forms of non covalent interaction such as ionic interactions controlled, in part, by environmental ionic strength and the levels of acetylation and pyruvilation of the lateral chains (Frangou et al., 1982; Southwick et al., 1980). Southwick et al. (1980) found that hydrogen bonding played a major role in stabilizing these aggregates since aggregates did not form in the presence of urea, a known hydrogen-bond breaker. In our samples, hydrogen bonding may have been further favored by the low temperatures ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) during storage. Several authors have found that association is enhanced by intermolecular apolar interactions between pyruvate methyl groups, therefore samples with higher pyruvate content are more likely to aggregate and

present higher viscosities (Kitamura et al., 1991; Dentini et al., 1984; Tako & Nakamura, 1984; Smith et al., 1981).

For samples treated 1 pass in 10^{-4} M NaCl, the recuperation was remarkable (Figure 2.3) and the final viscosity profile was very close to that of the 0P sample, except in the low shear region ($< 0.2 \text{ s}^{-1}$), showing that for 1 pass, only aggregates were broken and the induced order-disorder transition was reversible. For samples treated 4 passes, the recuperation was smaller, and for 12 passes it was almost negligible showing that for these samples the degradation was much more important and permanent. Lagoueyte & Paquin (1998) had hypothesized that the reversibility of the process depended on the intensity of the process, which our results clearly support.

In 0.1 M NaCl no changes were observed after cold storage (results not shown). It is possible thought that there was some recuperation but it occurred in a small window of time ($< 48 \text{ h}$) after microfluidization, such rapid re-aggregation would be favored by the high ionic strength in the system. As found by Rocherfort and Middleman (1987), in deionized water the regain of structure is extremely slow and incomplete, this can be explained by the strong electrostatic repulsion from the charged lateral chains, which are exposed in the disordered configuration, and therefore renders re-association difficult. Likewise, the fast and complete recovery of properties with the addition of salt can be explained by the screening of these charges, which induces the ordered conformation and subsequent re-association of the ordered species.

The flow curves presented in Figure 2.3 for xanthan samples microfluidized 1 pass resembles the flow profiles of xanthan dissolved at different molar concentration of urea (Frangou et al., 1982). In the presence of urea, the flow curves had a clear zero-shear Newtonian plateau that decreased when the urea content increased, however the flow curves converged to a common high shear limit. Frangou et al. (1982) proposed that this was due to the disruption of intermolecular entanglements that are maintained by hydrogen bonding and ionic interactions, but that the molecules per se were intact. Another related result concerns that found by Chauveteau and Kohler (1984) who report that a sample free of microgels (obtained by filtration) presents a lower η_0 region and a common high shear

limit compared to a non-filtered sample. This result supports the chemical analysis and the measured Huggins constants (k_H), confirming that xanthan samples treated only 1 pass are free of aggregated structures and composed mainly of intact xanthan molecules. On the other hand, samples treated 4 or 12 passes, presented a lower viscosity over the whole range of studied shear rates, indicating that these samples were permanently degraded.

2.5.5. Degradation rate

Previous studies on acidic and oxidative degradation of xanthan gum (Christensen et al., 1996; Christensen & Smidsrød, 1991; Foss et al., 1987; Lambert & Rinaudo, 1985) have shown that degradation rates decreased at high ionic strengths since the molecules are found in an ordered, more stable, double stranded conformation. Moreover, it has been reported that xanthan is more stable against degradation compared to other polymers only when in the ordered state (Hjerde et al., 1994). This might be caused by the alignment of the side chains along the backbone resulting in a shielding of the glycosidic linkages on the backbone. The effect is to provide extraordinary stability of xanthan to strong acidic and alkaline conditions. In those types of treatments, preferential degradation occurs in the lateral chains, with the β -mannose being the most susceptible unit (Christensen et al., 1996 and 1993b; Stokke & Christensen, 1996; Christensen & Smidsrød, 1991; Stokke et al., 1989). The side chains also protect the main chain from enzymic degradation by preventing the formation of enzyme-substrate complexes (Hjerde et al., 1994; Kang & Pettitt, 1992; Foss et al., 1987).

Accordingly, simulations of acid hydrolysis assuming a double stranded structure show an initial time where depolymerization is slow followed by a transition where a more rapid degradation occurs, this would be related to the double stranded structure of xanthan gum (Hjerde et al., 1994). Such behavior was explained by interchain stabilization, which mask the breaks in the glucan backbone, the latter would then tolerate several fractures in the polysaccharide chain and still keep its double structure and hydrodynamic volume. As a result, at the beginning the process has an apparent slower rate of depolymerization, until

several breaks are introduced in the chain (Stokke & Christensen, 1996; Christensen & Smidsrød, 1991; Foss et al., 1987).

On the other hand, an increase in the degradation rate has been observed when approaching T_m (Foss et al., 1987; Lambert & Rinaudo, 1985). Muller & Lecourtier (1988) found that heating xanthan in low salt levels (10^{-4} M) leads to chain degradation and an important decrease in M_w compared to samples in 0.1 M, confirming the much lower chemical stability of the disordered conformation.

In the microfluidization case, the contrary is found: samples treated in 0.1 M were more affected than their counterparts treated at low ionic strengths. It has been proposed that microfluidization obeys random scission kinetics (Cencia-Rohan & Silvestri, 1993) and that the apparent mechanical degradation rate constant (k_d) may be approximated from the slope of a plot of $1/M_w$ vs. the number of passes. Such plot is presented in Figure 2.4, which shows the determination of k_d for xanthan treated in 10^{-4} M and 0.1 M NaCl. The data for microfluidized samples could be well described by a single constant decay (Figure 2.4) where it is confirmed that degradation rate in 10^{-4} M is lower than in 0.1 M NaCl. Clearly, high-pressure treatments have a completely different way of inducing polymer degradation than other techniques. For the application and description of the theory of random scission kinetics adapted to mechanical degradation of polymers see (Cencia-Rohan & Silvestri, 1993) or (Silvestri & Gabrielson, 1991) and references therein.

The degree of degradation induced by high-pressure treatments has been found to depend on the applied pressure (Floury et al., 2002; Silvestri & Gabrielson, 1991), exposure time (number of passes) (Lagoueyte & Paquin, 1998; Silvestri & Gabrielson, 1991), solvent type (Cencia-Rohan & Silvestri, 1993) and nature of the polymer. It has been suggested that mechanical degradation occurs when covalent bonds are exposed to mechanical stresses during intense shear, turbulent forces (Harrington & Zimm, 1965) and strong elongational flow resulting in elevated frictional forces (Floury et al., 2002). Moreover, Cencia-Rohan and Silvestri (1993) reported that, during microfluidization, the covalent bonds of large molecules, such as polysaccharides, could be broken if a critical shear force, specific for each polymer-solvent system, was exceeded.

Accordingly, studies on tragacanth (Silvestri & Gabrielson, 1991) and schizophyllan (Kojima et al., 1984) report the breakdown of covalent bonds inside the polymer chain by mechanical stresses, related to a mechanical degradation on exposure to high shear and turbulence forces (Silvestri & Gabrielson, 1991). Disruption of aggregates were reported for methylcellulose (Floury et al., 2002), pectin (Corredig & Wicker, 2001) and xanthan (Lagoueyte & Paquin, 1998) all of which resulted in a decrease in the measured M_w and/or $[\eta]$. In all of the mechanical-induced degradation studies cited herein, the decrease in M_w was not linear with pressure or permanence time, the decrease being more important for the first treatments and then tending to approach a constant value.

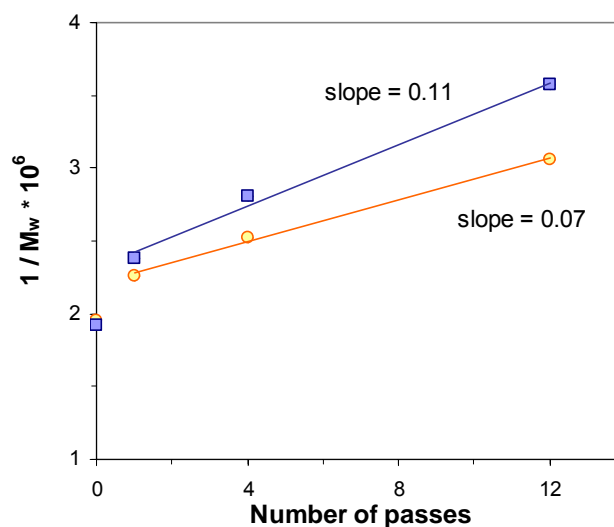


Figure 2.4. Determination of the apparent degradation rate constants for xanthan treated in 10^{-4} M (○) or in 0.1 M NaCl (■) by microfluidization at 75 MPa.

Furthermore, it has been found that the rate of degradation increases by increasing the viscosity of the solution (Cencia-Rohan & Silvestri, 1993; Kojima et al., 1984) and the radius of gyration of the polymer (Cencia-Rohan & Silvestri, 1993). Accordingly, the effect is always stronger at the beginning of the treatment, when polymers are larger and viscosities are high, with additional severity of the treatment having less and less impact. Consequently, for each type of homogenizer and polymer-solvent system, the treatment will no longer have an effect after a critical lower M_w has been reached. Since higher

viscosities in the system cause a lower Reynolds number, these results points to the important effect of shear forces during mechanical degradation. Additionally, viscosity studies suggests that, initially, the degradation occurs preferentially at entanglement points (Kojima et al., 1984), which are randomly distributed, and thus results, after the first treatment, in the broadening of the M_w distribution as was found in this study and in studies with pectin (Corredig & Wicker, 2001).

Accordingly, it was found that for the first pass the rate of degradation is higher, indicating the disruption of intermolecular aggregates. Then, covalent linkages in the main chain can be attacked, this occurs at a lower rate as shown by the less steep reduction in the measured physical parameters (Figure 2.4). The slower rate of degradation is also caused by the smaller size of the molecules, as previously discussed. This would explain the higher susceptibility to mechanical degradation of xanthan in 0.1M NaCl. At such ionic strengths, xanthan adopts the ordered conformation, which yields higher viscosities and where the molecules have larger hydrodynamic size. Moreover, the ordered conformation has a persistence length of 120-150 nm (Stokke et al., 1986; Sato et al., 1984c), indicating a much more stiffer conformation when compared to the persistence length of 50 - 70 nm for the disordered conformation (Stokke et al., 1986). Therefore, ordered larger molecules have more exposed surface and their stiff conformation may experience stronger effective stresses when subjected to the high shear and cavitation forces present while traversing the microfluidization chamber.

2.6. Flow birefringence

The birefringence (Δn) and extinction angle (χ) versus shear rate for samples re-dissolved in 0.1 M NaCl at 0.25 wt% are presented in Figure 2.5. The Δn is positive and increases with increasing shear rate (Figure 2.5a). From Figure 2.5b, it can be seen that at rest, samples present a $\chi \sim 45^\circ$, indicating the randomness of the molecular orientation. As the shear rate increased, χ decreased due to the progressive orientation of the molecules in the flow direction (0°). For a same rate of shear ($\dot{\gamma}$), the induced Δn was lower for more degraded samples. Accordingly, molecular orientation occurred promptly for 0P and 1P

samples, whereas it occurred gradually for more degraded samples (Figure 2.5b), indicating that the molecules required more force to become aligned, such results are related to lower M_w . Similar effects of M_w have been reported in literature for a variety of biomacromolecules (Pavlov et al., 2001; Chow et al., 1985; Milas & Rinaudo, 1981) and synthetic polymers (Chassapis et al., 2002; dell'Erba, 2001).

Theory predicts the saturation of Δn and χ at high enough rates of shear (Chassapis et al., 2002). Accordingly, Figure 2.5a and 2–5b show that Δn approached a saturation value while χ completely leveled-off at lower rates of shears than Δn . Higher shear rates were required to attain saturation as molecular weight decreased (Figure 2.5b). For samples 0P and 1P, χ leveled-off at $\gamma \approx 240 \text{ s}^{-1}$, whereas for samples 4P and 12P, χ saturation occurred at $\gamma \approx 350 \text{ s}^{-1}$ and $\gamma \approx 450 \text{ s}^{-1}$ respectively. The attainment of saturation indicates that molecules are fully aligned; the resulting smooth curves of Δn and orientation angle are a typical response of long rigid molecules (Decruppe & Ponton, 2003).

Figure 2.5a also shows that at high ionic strengths and sufficiently high shear rates ($\gamma = 400 \text{ s}^{-1}$), xanthan microfluidized 1 pass became more birefringence than 0P samples. This effect was more pronounced at higher concentrations (1 wt%), where 1P samples presented the highest birefringence after $\gamma \sim 6 \text{ s}^{-1}$, regardless of ionic strength (results not shown). This may be related to the presence of aggregates in 0P samples. As shown in previous sections, xanthan microfluidized 1 pass is a sample free of aggregates and microgels composed of relatively intact xanthan molecules. It has been proposed that aggregates hinder molecular orientation in the flow direction (Meyer et al., 1993). Therefore, in 1P samples, molecules can orient more easily, without physical obstruction of aggregates, resulting in higher birefringence. This effect would be more apparent at higher concentrations where molecular orientation is further favored due to segment-segment interaction, which hinders Brownian motion, the latter tending to randomize molecular orientation (Meyer et al., 1993).

Interestingly enough, the higher birefringence of the 1P samples is maintained after the dialysis, lyophilisation and re-dissolution at high ionic strengths processes, as shown in

Figure 2.5a, demonstrating that the disruption of aggregates achieved by microfluidization is maintained, to a great extent, after all these processes which are known to induce xanthan aggregation (Morris, 1995; Muller et al., 1986; Chauveteau & Kohler, 1984).

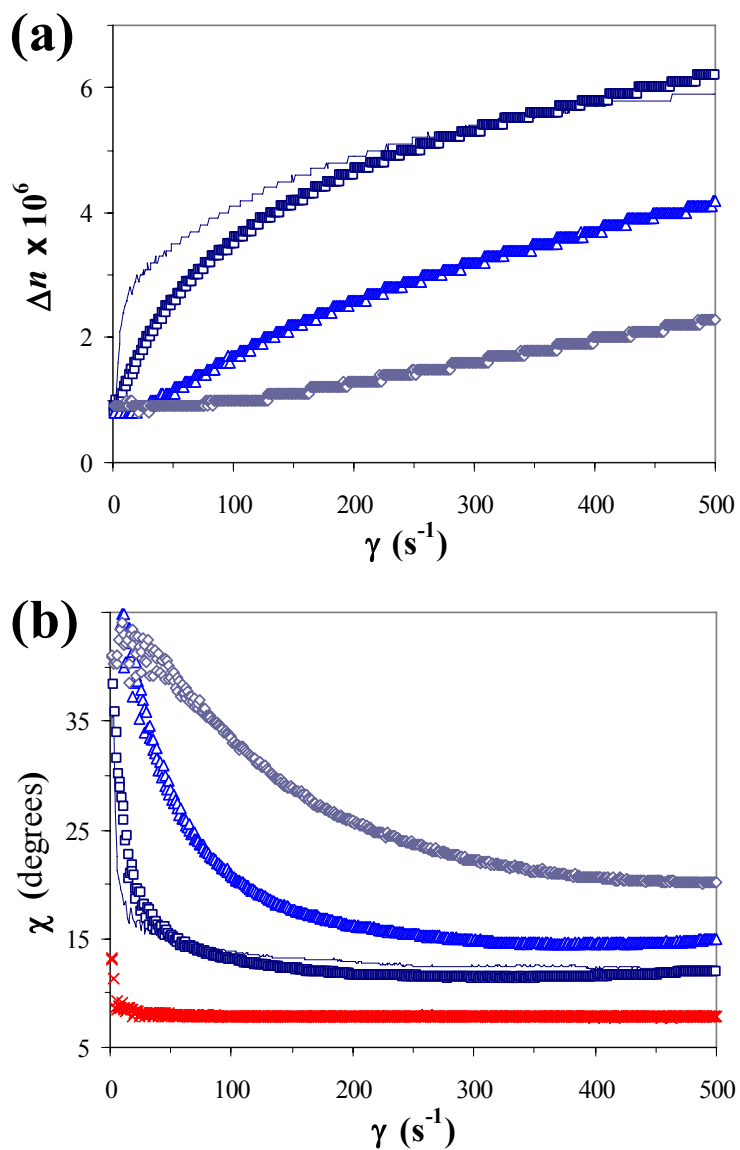


Figure 2.5. Rate ramp test (a) flow birefringence and (b) orientation angle measured in 0.1 M and 0.25 wt%. Xanthan samples are: non-treated (—) and microfluidized 1 (\square), 4 (\triangle) or 12 (\diamond) passes. The orientation for non-treated sample in 10^{-4} M NaCl (\times) is also presented for comparison.

Similar trends were observed for samples re-dispersed in 10^{-4} M NaCl. However, the measured Δn were twice as high compared to those produced by the same samples when re-dispersed in 0.1 M NaCl. This effect has been found in previous xanthan gum studies (Schorsch et al., 1996), where it was proposed that at low ionic strengths, a liquid crystalline organization of xanthan is favored resulting in higher birefringences due to the mesomorphic organization of the molecules. In this context, salt hinders such organization, resulting in lower anisotropy. Several studies have shown that xanthan tends to undergo a transition to cholesteric liquid crystalline states, in semi-dilute and concentrated solutions. Formation of anisotropic phases is caused by the stiff nature of xanthan gum and is typical of rigid polymers. The onset of liquid crystalline phase formation varies according to the type of xanthan sample and solvent used. In pure water, it is estimated to take place around 5 g/L (Bezemer et al., 1993). Other authors have found concentrations as low as 3 g/L (Sato et al., 1990; Hacche et al., 1987; Rinaudo & Milas, 1982). Milas & Rinaudo (1982) found that the cholesteric phase of xanthan gum appears at lower polyelectrolyte concentrations in water (~ 2.5 g/L) compared to that in 0.1M (~ 7.5 g/L). Thus, at low ionic strengths, the electrostatic repulsions in the lateral chains favor the organization of a cholesteric phase.

This effect coupled with the recuperation of viscosity found by rheometry for samples treated 1 pass, as well as previous results that show that xanthan molecules self associate in low ionic strengths aqueous solutions (Southwick et al., 1980) may point to the association pattern responsible for the formation of liquid crystalline phases in semi dilute and concentrated xanthan dispersions. Additionally, the higher Δn found in 0P samples and 10^{-4} M; compared to the 1Pa samples, further suggest that the mesomorphic organization of xanthan gum seems to be promoted by the presence of aggregates.

Figure 2.6 presents the birefringence and orientation angle obtained in the step rate tests for samples re-dispersed in 10^{-4} M NaCl. The birefringence reaches a steady state value almost immediately after flow inception, at $t = 50$ s, or at flow rate increments and rapidly relaxes to the initial value when flow is stopped at $t = 550$ s. This type of behavior is typical of semidilute solutions of rigid rods (Gatzonis et al., 1997). The transient response of Δn and χ also depended on the degree of degradation. The shear rates needed to induce a detectable

Δn or molecular orientation increased as M_w decreased. For 0P samples, Δn appeared from the lowest tested shear rate $\gamma = 1 \text{ s}^{-1}$ (Figure 2.6a) and χ showed that the molecules were almost fully oriented (Figure 2.6b). For samples treated 12 passes, a slight molecular orientation occurred at $\gamma = 50 \text{ s}^{-1}$ (Figure 2.6b), however, this was not high enough to produce birefringence (Figure 2.6a). For these samples, Δn faintly appeared at $\gamma = 100 \text{ s}^{-1}$ with an orientation angle of only $\sim 33^\circ$. The maximum Δn measured for samples treated 12P at 500 s^{-1} , was 70% lower than that for 0P samples.

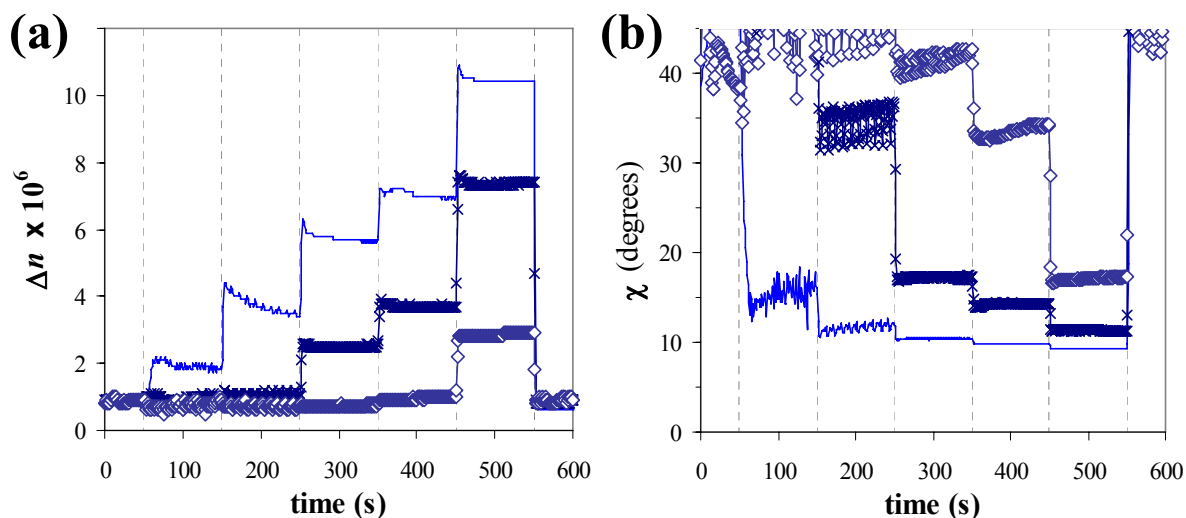


Figure 2.6. Transient birefringence. Step rate tests, flow inception begins at $t = 50 \text{ s}$, shear rate steps were of 0, 1, 10, 50, 100, 500 and 0 s^{-1} (a) flow birefringence and (b) orientation angle, measured in 10^{-4} M and 0.25 wt% for non treated xanthan (—) and xanthan microfluidized 1 (\times) or 12 passes (\diamond).

Birefringence overshoots can be seen in Figure 2.6a for the 0P sample. The percentage of overshoot was measured as $(\Delta n_{\text{max}} - \Delta n_{\text{steady}})/\Delta n_{\text{steady}} \times 100\%$ (Chai et al., 1999). The 0P sample had a $\sim 26\%$ overshoot at $\gamma = 10 \text{ s}^{-1}$, and a smaller one ($\sim 10\%$) at $\gamma = 50 \text{ s}^{-1}$. The same tendency was found at higher ionic strengths, although smaller overshoots ($\sim 13\%$ at $\gamma = 10 \text{ s}^{-1}$) were measured. The overshoots were greatly diminished at 1 pass and occurred at much higher rates ($\sim 3 - 4\%$ at $\gamma = 500 \text{ s}^{-1}$). For more degraded samples, no overshoots were

detected. At higher concentrations, overshoots of 34% and 28% were present at $\dot{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$ for 0P and 1P respectively.

The occurrence of birefringence overshoots is widely reported in literature for synthetic polymers (Gatzonis et al., 1997; Chai et al., 1999), biopolymers such as collagen (Chow et al., 1985), xanthan (Schorsch et al., 1996; Meyer et al., 1993) and poly-L-lysine (Lee & Mc Hugh, 1999) amongst others. Several explanations have been proposed for the presence of overshoots and depend essentially on the concentration regime. At low concentrations, overshoots have been considered to be caused by molecular stretching (Chai et al., 1999; Gatzonis et al., 1997). Other authors suggest that overshoots are an indication of an increased degree of flexibility in the system due for example to the presence of unordered fractions in the molecules (Lee & Mc Hugh, 1999). At higher concentrations, rheological studies on xanthan gum have shown that overshoots indicate a rapid breakdown of larger structures present prior to flow inception (Lim et al., 1984). Finally, the overshoots may also reflect a rapid increase and decrease in the orientation of large aggregates (Meyer et al., 1993).

It is known that overshoots are more susceptible to occur at higher molecular weights, since large molecules are more easily stretched (Gatzonis et al., 1997). This would explain the loss of overshoots for the most degraded samples. However, for samples treated one pass the overshoots were also greatly diminished, suggesting that overshoots are also dependent on aggregate content. Gatzonis et al. (1997) suggested that overshoots may be caused by the stretching of wormlike multi-chain aggregates. A similar picture would be consistent with the known tendency of xanthan gum to form aggregates. The larger overshoots in 10^{-4} M NaCl also suggest that aggregates are more loosely bound at low ionic strengths and stretch easier in the flow direction than aggregates at higher ionic strengths. This is in agreement with previous rheological studies where it was found that xanthan aggregates in lower ionic strengths were disrupted more easily than their counterparts in salt solution (Lim et al., 1984).

2.6.1. Birefringence relaxation

Figure 2.7 presents the normalized birefringence relaxation upon flow cessation for 0P and 1P samples in the concentrated and semi dilute regimes (1 and 0.25 wt%). Data are normalized by the corresponding steady state birefringence. Relaxation times (τ) were calculated using the relation $\chi = \pi/4 - 1/2 \arctan(\gamma\tau)$ (Decruppe & Ponton, 2003; Lee & Mc Hugh, 1999; Meyer et al., 1993). For samples at 1 wt%, the relaxation process took longer (Figure 2.7), which is expected due to the molecular hindering present at higher concentrations, and displayed a fast (τ_f) and a slow (τ_s) mode of relaxation (Figure 2.7a). The fast relaxation mode has been related to single-chain relaxation (Gatzonis et al., 1997). For samples at 1 wt%, the fast relaxation mode ($\tau_f = 4.0 \pm 0.5$ sec) was of the same order of magnitude than the single relaxation found in all other samples ($\tau_f = 2.1 \pm 0.2$ sec) irrespectively of ionic strength and concentration. These results are in agreement with the relaxation times previously measured for xanthan gum at lower concentrations (Meyer et al., 1993). The slow relaxation mode (τ_s) at 1 wt%, depended on ionic strength and was remarkably long, particularly for non-treated samples (0P) with a $\tau_s = 345$ or 480 sec compared to 78 or 86 sec for 1P samples in 0.1 M or 10^{-4} M NaCl respectively. The presence of a slow relaxation mode for samples in the concentrated regime is probably a consequence of molecular entanglements and aggregate relaxation. Dichroism experiments carried out at lower concentrations (Meyer et al., 1993) showed that aggregates have a much slower relaxation mode than single molecules. The slightly faster relaxation at high ionic strengths may be related to the more stiff conformation of the xanthan.

Samples treated 4 and 12 passes presented immediate relaxation upon flow cessation ($\tau_f = 2.2 \pm 0.1$ sec) either in 10^{-4} M or 0.1 M NaCl. For these samples, the relaxation curves for concentrations 0.25 and 1% superimposed (data not shown), indicating that the critical overlap concentration c^* was not achieved even at 1 wt%. Similar results were obtained for native xanthan samples below c^* (Meyer et al., 1993). In this study, these results are related to the lower molecular weights of the samples, which as expected, have lower c^* . It can be noted that the c^* values calculated from intrinsic viscosity measurements (Table 2.1), seem to be somewhat underestimated, principally for the more degraded samples. The

superimposition of birefringence relaxation for the most degraded samples also indicates that the dispersions were molecular, i.e., no aggregates or entanglements were present, which is in agreement with the measured Huggins constants (k_H) for these samples (Table 2.1).

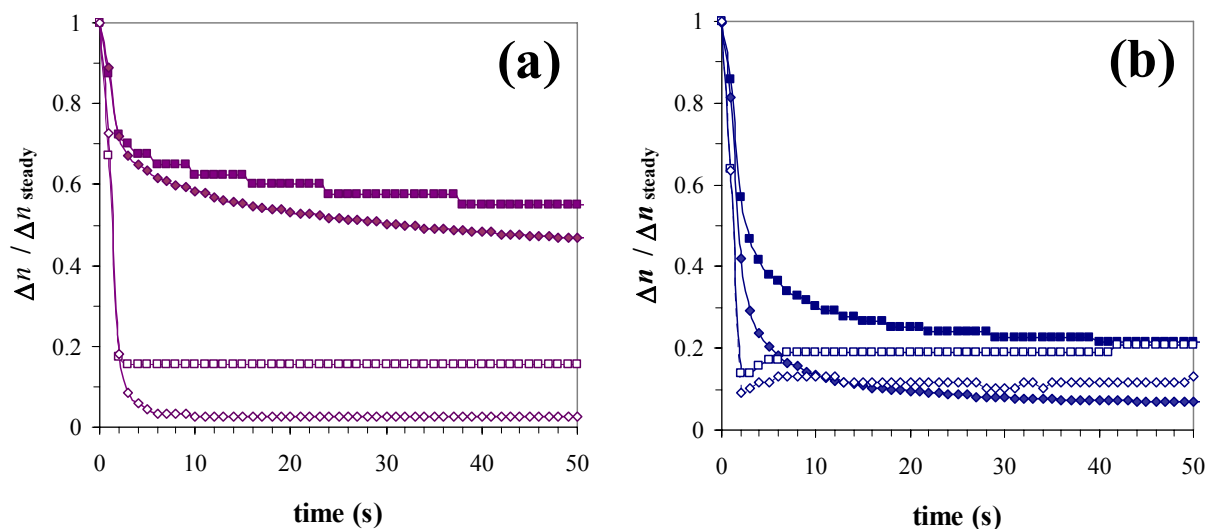


Figure 2.7. Normalized birefringence relaxation upon flow cessation at time = 0 s from $\dot{\gamma} = 500 \text{ s}^{-1}$ for (a) 0Pa and (b) 1Pa xanthan samples. Two concentrations were tested 1 wt% (filled symbols) and 0.25 wt% (open symbols) in 0.1 M (■□) or 10^{-4} M (◆◇) NaCl.

Data are normalized by the corresponding steady state birefringence (Δn_{steady}).

It has been previously argued that birefringence tested principally molecular motion (Meyer et al., 1993). However, from these results, we found that aggregates or microgels present in xanthan samples can influence the birefringence measurements particularly in the semi dilute regime. It is possible that the lower birefringence detected at high ionic strengths may be induced by the tendency of xanthan gum to aggregate as previously suggested (Meyer et al., 1993). However, the measured birefringence for the same sample is always smaller when re-dispersed at high ionic strengths, including for the most degraded samples. Therefore, this effect may be also related to the increased rigidity of the chains at high salt contents. In 10^{-4} M NaCl, xanthan molecules are found in an extended conformation, since repulsions in the charged lateral chains favors this conformation. As a consequence, chains

have more excluded volume, segmental movements occurs with ease and molecules can align and be stretched more easily by flow forces, resulting in a net increase of orientation (Figure 2.5b) and higher birefringence. The stretching of chains is also supported by the higher overshoots found in 10^{-4} M compared to those in 0.1 M NaCl.

2.7. Proposed mechanism of xanthan degradation by microfluidization

Based on the analysis of the presented results, and starting from the premise that xanthan gum dispersions contain microgels (Chauveteau & Kohler, 1984; Chauveteau, 1982) or aggregates of dimers (Capron et al., 1998; Muller et al., 1986) and that the molecules under the studied conditions are found in a extended or rigid double helical conformation, depending on ionic strength, we propose the following mechanism for degradation of xanthan by microfluidization:

In the first pass through the microfluidizer, the high shear forces disrupt the microgels and aggregates and even induce the first stage of an order-disorder transition in some of the molecules. The first stage of the transition includes the opening of the double structure by the extremities, since the ends are inherently less stable than the center of the dimer as the loss of entropy has fewer opportunities for compensation by non-covalent interactions (Norton et al., 1984). In addition, a separation of the side chains from the backbone may occur, resulting in the formation of a more extended conformation, as described in the introduction section. This first stage is supported by rheometry results that show viscosity recuperation, except at very low shear rates where microgels are believed to show their presence (Chauveteau & Kohler, 1984), and by chemical analysis that shows that chemical composition remains constant.

An analogous effect was proposed by Silvestri & Gabrielson (1991) on the effect of microfluidization on tragacanth, where the first passes provided the initial energy to tear open the long chains after which a greater number of bonds were accessible for mechanical stress and chains became more susceptible to degradation.

If the treatment is stopped after the first pass, the double helical structure can be restored, whereas large aggregates or microgels do not reform upon bringing the system into quiescent conditions. However, if more passes are applied, the expanded molecule is not able to restructure fast enough and the mechanical forces rip the separate chains apart before zip-up can take place, leaving the backbone exposed. Thus, a dissociation of the double helical structure may occur, as evidenced by the M_w obtained for samples treated 4 passes ($M_w = 2.8$ to 3.2×10^6 Da, depending of ionic strength), which approaches the M_w cited for single stranded xanthan gum (Southwick et al., 1982). After 12 passes, the degradation of the backbone is evident as determined by the increase in reducing ends and the continual loss in M_w . Therefore, with each new circulation through the high-pressure chamber, degradation increases. However, as explained earlier, mechanical-induced degradation can not continue indefinitely since there is a critical M_w , particular to each polymer - solvent system, after which the device will no longer have an effect.

2.8. Conclusions

The objective of this study was to evaluate the effect of microfluidization (1, 4 or 12 passes at 75 MPa), on the chemical and physical properties of xanthan gum (M_w , aggregated state, flow behavior).

Microfluidization reduced the M_w , intrinsic viscosity, pseudoplastic properties and flow birefringence of xanthan samples. Some degradation of the main chain was found for the more severe treatments; however the lateral chains remained unaffected. The rate of degradation was higher for the first passes through the microfluidizer and the effect was more important in 0.1 M than in 10^{-4} M NaCl. This was related to a higher sensitivity of the larger and stiffer xanthan molecules in the ordered conformation to the stresses caused by the high shear, turbulence, and cavitation forces encountered during microfluidization.

A mechanism for the microfluidization-induced degradation of xanthan was proposed which includes, initially, the disruptions of aggregates, followed by the formation of an extended conformation (which is reversible). For more severe treatments, an order-disorder transition occurs that exposes the backbone, rendering it susceptible for degradation upon

further circulations through the device. Although microfluidization did cause some degradation of the main chain, it did not reach the levels of degradation commonly found during chemical or oxidation-induced degradation. Thus, microfluidization appears as a new means to achieve controlled and relatively mild degradation of xanthan gum.

2.9. Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from NSERC industrial chair and industrial partners Novalait Inc., Agropur and Parmalat, and Mrs. Anne-Françoise Allain for professional technical support.

“The true worth of an experimenter consists in his pursuing not only what he seeks in his experiment, but also what he did not seek.”

Claude Bernard (1813-1878)
Médecin et physiologiste français

Chapitre 3

**Effect of Preparation Conditions on the
Characteristics of Whey Protein – Xanthan Gum
Complexes**

Laneuville S.I., Paquin P. and Turgeon S.L.*

Dairy Research Center STELA. Faculty of Agriculture and Food Science.
Université Laval, Pavillon Paul – Comtois, Québec, Canada, G1K-7P4.

* Telephone: (418) 656-2131 ext. 4970. Fax: (418) 656-3353.

E-mail: Sylvie.Turgeon@aln.ulaval.ca

Publié dans « *Food Hydrocolloids*, **2000**, 14 (4) : 305–314 »

3.1. Résumé

L'impact de deux paramètres : le ratio protéine-polysaccharide [P:PS] (5:1, 10:1, 15:1, et 20:1), et l'intensité d'un traitement à hautes pressions dynamiques (4, 8, ou 12 passes à travers d'un microfluidisateur) sur les caractéristiques (taille, composition et profil d'écoulement) des complexes de protéines de lactosérum - xanthane, a été étudié dans le but de produire un substitut de gras. Il a été trouvé que la taille et la composition des complexes sont fortement influencées par le ratio P:PS. À de faibles ratios (5:1 et 10:1), des petits complexes étaient principalement produits (40% étaient $< 20 \mu\text{m}^2$), pendant que pour des ratios plus élevés (15:1 et 20:1), entre 40 et 44% des particules étaient $> 300 \mu\text{m}^2$. La protéine et le polysaccharide mesurés dans les fractions complexées avaient des ratios P:PS plus élevés que les ratios originaux, ce qui pourrait indiquer la présence de complexes avec une multi-couche de protéines et/ou la formation de microparticules de protéine, principalement pour le ratio 20:1. Le traitement à hautes pressions du xanthane était essentiel pour empêcher la formation de complexes fibreux, probablement en perturbant le patron d'association des molécules de xanthane. L'augmentation du ratio P:PS et du nombre de passes du xanthane à travers le microfluidisateur résultait en une diminution de la viscosité newtonienne à de faibles cisaillements ainsi que du caractère pseudoplastique des solutions contenant des WPI et du xanthane non-complexés. Après complexation, les solutions présentaient les mêmes tendances à exception du ratio 20:1, pour lequel une augmentation de la viscosité a été observée, probablement due à la présence d'agrégats de protéines. Bien que la microfluidisation du xanthane affecte la viscosité des solutions et qu'il est nécessaire pour la production des complexes particulés, aucune différences significatives n'ont été observées dans la taille ou la composition des complexes fabriqués avec du xanthane microfluidisé à différents nombres de passes.

3.2. Abstract

The effect of two parameters: the protein-to-polysaccharide (P:PS) ratio (5:1, 10:1, 15:1, and 20:1) and the intensity of a dynamic high-pressure pretreatment of xanthan (4, 8, or 12 passes through a microfluidizer) on whey protein-xanthan complexes characteristics (size, composition, and flow behavior) were studied in view of producing a fat substitute. It was found that the P:PS ratio strongly influenced the size and composition of the complexes. Low P:PS ratios (5:1 and 10:1) produced principally small complexes (40% were $< 20 \mu\text{m}^2$), whereas in higher ratios (15:1 and 20:1) 40-44% of particles were $> 300 \mu\text{m}^2$. The protein and polysaccharide measured on the complexed fractions resulted in higher P:PS ratios than in initial ratios, suggesting the presence of complexes with a protein multilayer and/or the formation of protein microparticles, particularly for the 20:1 ratio. The high-pressure pretreatment of xanthan was essential to prevent the formation of fibrous complexes, presumably by disrupting the association pattern of xanthan molecules. An increase in the P:PS ratio and in the number of xanthan passes through the microfluidizer resulted in a decrease in the zero shear viscosity and the pseudoplastic character of uncomplexed WPI-xanthan solutions. After complexation, the solutions presented the same trend except for the 20:1 ratio, which had an increased viscosity, presumably due to the presence of protein aggregates. Although microfluidization of xanthan affected the viscosity of solutions and was indispensable to produce particulated complexes, no significant differences were found on the size or composition of complexes fabricated with xanthan microfluidized different number of times.

Keywords: Xanthan, whey proteins, complexation, dynamic high pressures, particle size, flow behavior.

3.3. Introduction

Protein-polysaccharide interactions have extensively been studied since they play an essential role in the structure, stability, and rheological characteristics of many food systems (Sanchez et al., 1997; Tolstoguzov, 1996; Samant et al., 1993). From a thermodynamic point of view, protein and polysaccharides can be compatible or incompatible in an aqueous solution. Under conditions of thermodynamic incompatibility, a two-phase system is obtained in which the two different molecules are mainly in separate phases. Under conditions of thermodynamic compatibility, two types of solutions can be obtained: (1) a homogeneous and stable system in which the molecules coexist in one phase; (2) a two-phase system where both molecules interact and are essentially in the same concentrated phase. In the latter system, a complexation or complex coacervation takes place due to an electrostatic attraction between the biopolymers. Complexation between proteins and anionic polysaccharides, such as xanthan gum, occurs below the protein's isoelectrical pH (IEP), where a complete compatibility exists by virtue of the opposite net charges they carry (Tolstoguzov, 1996; Samant et al., 1993). The factors affecting protein-polysaccharide compatibility as well as the characteristics of the complexes they form are the protein-to-polysaccharide (P:PS) ratio, pH, ionic strength, total solids content, temperature, rate of acidification, rate of shear during acidification, and the nature of the polymers (molecular weight (M_w), net charge and flexibility of chains) (Shu et al., 1996; Samant et al., 1993). Their effects on the characteristics of protein-polysaccharide complexes have rarely been studied, particularly for whey protein isolate (WPI) - xanthan gum complexes.

Previous studies in our laboratory have permitted the development of a fat substitute based on WPI-xanthan gum complexes (Le Hénaff, 1996; Lefèbvre, 1995). Whey proteins and proteins in general, are used in the fabrication of fat substitutes due to their capacity to form aggregates under defined pH and temperature conditions. However, a mechanical treatment must be performed to decrease the size of the aggregates. Ideally, microparticles must have a size similar to that of fat globules (0.3 – 3.0 μm) to mimic fat characteristics in the mouth (creaminess and smooth texture). Satisfactory results can also be obtained by maintaining

the particle size under the threshold of perception, which is around 40-60 μm , depending on the particle's characteristics and the product's viscosity (Sanchez & Paquin, 1997; Cheftel & Dumay, 1993). In some products, where heat treatment is involved, a second aggregation can be favoured and lead to a gritty texture. Adding a polysaccharide can prevent an excessive protein aggregation by minimizing protein-protein interactions, either by shielding active charged groups or by decreasing the collision rate between molecules through an increase in the viscosity of the solution. Moreover, the polysaccharide confers some characteristics of fat by binding great quantities of water and thereby providing plasticity, lubricity, and a melting sensation, which will ultimately improve the overall sensation of the product in the mouth. Another advantage of using a protein-polysaccharide mixture is that protein-based fat substitutes are perceived as more "natural" and healthier than synthetic ones (Sanchez & Paquin, 1997; Giese, 1996). In general, using a polysaccharide alone cannot produce a fat substitute since its long chains prevent the formation of spherical particles, which are characteristics of fat (Lefèbvre, 1995).

During WPI-xanthan gum complexation, the globular protein bonds along the xanthan molecule backbone producing fibrous complexes (Cheftel & Dumay, 1993; Chen et al., 1989) that have been used to manufacture meat analogs and/or other textured products (Chen et al., 1989; Soucie et al., 1988; Chen & Soucie, 1985; Antonov et al., 1980). To produce a fat substitute based on these complexes, a microfragmentation step of fibers is necessary to obtain an ingredient with the desired particle size distribution (Chen et al., 1989). Work has been done to particulate fibers, generally with a high-pressure treatment (Cheftel & Dumay, 1993; Chen et al., 1989). An alternative solution was presented by Le Hénaff (1996), who reported that a microfluidization of xanthan before complexation prevents the formation of fibers and allows controlling the size of the complexes from the initial stages of fabrication.

The objective of this study was to determine the effect of two parameters: the P:PS ratio (5:1, 10:1, 15:1, and 20:1) and the intensity of a dynamic high-pressure pretreatment of xanthan gum (4, 8, and 12 passes through a microfluidizer) on WPI-xanthan gum complexes characteristics (size, composition, and flow behavior in solution).

3.4. Materials and Methods

Xanthan Gum - Keltrol F, KELCO Co. San Diego, CA (96% sugar, 4.02% protein) and WPI –BIPRO, Davisco Foods Intl. Inc., NM, US (96% protein w/w, 0.08% sugar, and 0.66% minerals) were used to fabricate the complexes.

3.4.1. Microfluidization of Xanthan Gum

Xanthan gum was solubilized (1% w/w) in distilled water and under vacuum using a high shear Stephan mixer for 15 min or until a lump-free solution was obtained. The solution was left at 4 °C for 16 h for adequate hydration. The xanthan solution was then circulated 4, 8, or 12 times through the microfluidizer (110Y Microfluidics Corporation, Newton, MA) at 750 bar. During microfluidization, the temperature was controlled by covering the reaction chamber with ice in order to obtain an outlet temperature of 20-25 °C. The microfluidized xanthan samples were spray-dried at respective inlet and outlet temperatures of 200 °C and 80-85 °C (Niro Atomizer, Copenhagen-Denmark) and kept at 4 °C until further use. The number of passes applied was chosen from a previous study (Lagoueyte & Paquin, 1998), where microfluidization was found to substantially reduce the M_w of xanthan. Lagoueyte & Paquin (1998) reported that the average M_w of xanthan decreased ~60% after 4 passes / 750 bar (10.9×10^6 Da); ~70% after 8 passes / 750 bar (7.9×10^6 Da), and after 12 passes / 750 bar, a minimal size was attained (5.4×10^6 Da). Native xanthan was 26.3×10^6 Da. These molecular weights were measured by size exclusion chromatography using pullulan standards and it was proposed that microfluidization disrupted the aggregated xanthan molecules (Lagoueyte & Paquin, 1998).

3.4.2. Manufacture of Complexes

Microfluidized xanthan (4, 8, or 12 passes) was resolubilized and mixed with solubilized WPI to obtain the P:PS ratios of 5:1, 10:1, 15:1, and 20:1. The protein content of xanthan gum (4%) and the sugar content of the WPI (0.08%) were considered negligible since they accounted for a maximum variation of only 0.07 or 0.02% respectively. The total solid content of all solutions was 3%. Acidification (HCl 1N) was carried out while applying a

shear of 500 rpm. Acidification rate was of 2 ml (added drop by drop), followed by 2-3 min of agitation until a final pH of 5.1 (ratio of 5:1), 5.3 (ratios of 10:1 and 15:1), and 5.4 (ratio of 20:1). The final pH was determined in a preliminary study to obtain the most opaque solution that kept the majority of the formed complexes in suspension. At acidic pHs, the carboxylate and amino groups of the WPI are protonated and interact spontaneously with the carboxylate groups of the polysaccharide through electrostatic attraction (Chen & Soucie, 1985). A heat treatment was then applied, at 75-80 °C / 20 min, to stabilize complexes against environmental changes. Heat induces protein denaturation, conformational adjustments, and exposition of active groups (basic groups) leading to covalent bonding, thereby maximizing protein-polysaccharide interactions and preventing dissociation (Ledward, 1994; Samant et al., 1993).

Complexation between untreated xanthan gum and WPI was only carried out at a 20:1 ratio to compare the structure of the resulting complexes. No other ratios were tested since native xanthan is known to produce fibrous complexes at various P:PS ratios (Le Hénaff, 1996; Ledward, 1994; Chen et al., 1989; Soucie et al., 1988; Chen & Soucie, 1985; Antonov et al., 1980). Fibrous complexes present no interest in the development of a fat substitute.

3.4.3. Characterization of WPI – Xanthan Gum Complexes

WPI-xanthan gum solutions (before complexation) were centrifuged at 48 246 g (20 000 rpm) for 30 min (RC-5 Sorvall, Dupont Instruments, Rotor SS34) to determine if the system separated in two phases as seen in thermodynamic incompatibility. After acidification, WPI-xanthan gum complexes were separated for analysis by centrifugation at the same speed as above. Prior to analysis, the precipitated fractions containing the protein-polysaccharide complexes were dispersed (0.4% w/v) in distilled water. The collected supernatants, containing the uncomplexed molecules, were analyzed without further treatment.

3.4.3.1. Size of WPI – Xanthan Gum Complexes

The size distribution of complexes was obtained using optical microscopy (Leitz Laborlux, Germany) and computer-aided image analysis (Matrox Inspector, Matrox Electronic Systems Ltd. 1995, Canada). A color video camera (Sony, Hyper HAD CCD-IRIS/RGB) was fixed onto the microscope and connected to the computer by a camera adapter (CMA-D2, Sony).

The diluted precipitated fractions (0.4% w/v) were colored (1:1 w/w) with previously filtered (Anotop 10 Plus 25 mm, Whatman) toluidine blue (2% w/w). A drop of the colored solution was placed on a microscope slide, covered, and then sealed with nail enamel. For each sample, ten to twelve micrographs 400X (40X objective * 10X eyepiece) were taken to examine 500-1300 complexes. Individual micrographs were saved as full color digitalized images and transformed to gray images to complete the additional steps. Each image was adjusted to improve the contrast and brightness (or sharpened) as needed. The calibration values are given by the software manufacturer (1 pixel = 0.323 μm for the 40X objective). The software measures the area, in μm^2 , of each “black” particle on the projected 2D image. The size distribution of complexes was plotted as the frequency percentage and the percentage of the area (μm^2) occupied by complexes within fixed intervals. The same size intervals were used for statistical analysis.

3.4.3.2. Composition of Complexes

The quantity of protein and xanthan in the precipitated fractions and supernatants were determined by measuring the total nitrogen content by Kjeldahl (AOAC, 1990), and the total sugar content by the phenol - sulphuric acid method (Chaplin, 1986). The resulting P:PS ratios were calculated for the precipitated fractions as well as for the supernatants:

$$\text{final P : PS ratio} = \frac{\text{total measured protein}}{\text{total measured PS}} \quad (3.1)$$

The protein remaining in the supernatant was further identified by SDS-PAGE electrophoresis, using the procedure recommended by Laemmli (1970). The stacking and

separating gels consisted of 6% and 15% acrylamide respectively. Samples were prepared to contain 1µg protein in 1 ml, and then 10 µl of each sample was mixed with 10 µl of β-mercaptoethanol and heated at boiling for 5 min. A 10-µl-sample volume was loaded into each well. A constant voltage of 200 volts was applied for 45 min. Gels were stained with a solution of 0.03% Coomassie blue G250 / 30 min and destained with a solution of 20% methanol - 10% acetic acid. The proteins were identified using a M_w marker kit (SDS-PAGE standard, Low Range 12%, BIORAD).

3.4.3.3. Flow Curves

Flow curves were taken on uncentrifuged WPI-xanthan gum solutions before acidification (pH = 7.2 ± 0.1) and on acidified solutions as obtained after the heat treatment in the complex fabrication procedure. Measurements were performed at 23 °C with a shear-rate controlled rheometer (ARES-100FRT, Rheometric Scientific, Piscataway, NJ) equipped with a couette-type sensor. The inner and outer cylinder radiuses were 16 and 17 mm, respectively, while the length of the inner cylinder was 34 mm. The shear-rate range explored was from 10 s⁻¹ up to 2551 s⁻¹. Triplicate assays showed a repeatability of ± 0.5%. The curves were fitted using the Cross model (Cross, 1969) to compare the flow curves:

$$\eta = \frac{\eta_0}{1 + (\tau D)^m} \quad (3.2)$$

Where η is the viscosity at a given shear rate D ; η_0 is the zero shear plateau; τ is a relaxation time, such that $1/\tau$ is the shear rate at which shear thinning begins; and m is the slope of the high shear-rate portion of the curve.

3.4.4. Statistical Analysis

All tests except for the flow curves were made in triplicate. The variables were analyzed as a complete factorial experience (SAS/STAT Language. SAS Institute Inc., Cary, NC.).

3.5. Results and Discussion

3.5.1. Size of WPI – Xanthan Gum Complexes

3.5.1.1. Effect of Microfluidization

The complexes fabricated with untreated xanthan were fibrous in nature, reaching lengths of 2 cm and a thickness of 2 mm (Figure 3.1). This result was expected and corroborates previous studies (Le Hénaff, 1996; Chen et al., 1989; Soucie et al., 1988; Chen & Soucie, 1985). Fibrous complexes were not characterized further since they are unsuitable for the development of a fat substitute. The microfluidization treatment of xanthan (4, 8, or 12 passes / 750 bar) effectively prevented fiber formation during protein-polysaccharide complexation.

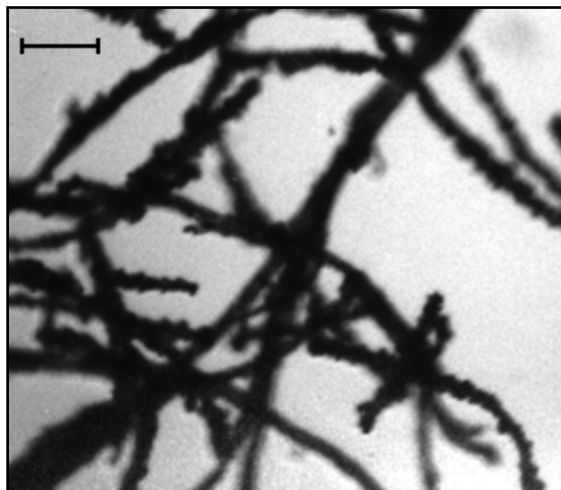


Figure 3.1. Fibrous WPI - native (not microfluidized) xanthan gum complexes fabricated with a P:PS ratio of 20:1, 1% total solids. Optical microscopy (120X). Bar = 50 μ m.

Figure 3.2 presents complexes fabricated with xanthan that was microfluidized 4 times and with different P:PS ratios. The complexes are particulated and irregular. According to Miller (1994), irregular and deformable particles produce a better rolling sensation in the mouth than rigid spherical particles. Moreover, several patents describe irregularly shaped

particles that can be used as fat substitutes (Bishay & Clark, 1996; Hoefler et al., 1994; Chen et al., 1989). The structure of complexes will be discussed in detail herein after.

Several studies (Morris, 1990; Sutherland, 1990; Rahway, 1988) have shown that the xanthan molecule has an ordered helical conformation (cellulosic backbone with negatively charged trisaccharidic side-chains aligned along it). This structure permits the association of molecules into fibrous aggregates by the linkage at ends of chains via the formation of double helices. The fibers may thicken and bifurcate leading to the formation of a weak network that is further stabilized by non-covalent interactions (Morris, 1990). Such networks produce solutions with high viscosities and important pseudoplastic behaviors even at low concentrations. Two hypotheses may explain fiber formation during protein-polysaccharide complexation. The first one, proposed by Soucie et al. (1988) and Chen et al. (1989), explains that fibre formation is based on the binding of protein along the stiff and relatively linear xanthan molecule. As a second hypothesis, we propose that when proteins and xanthan are allowed to complex in solution, the fiber formation is essentially guided by the association pattern of xanthan and not just by the linearity of the molecule. Studies on xanthan gums (Morris, 1990; Muller et al., 1986; Holzwarth and Prestidge, 1977) have shown that xanthan gum has a persistence length of 50 – 120 nm depending on the conditions and treatments that were applied to the sample, and which may form fibrous aggregates that can reach several μm in length (10 μm and more). Under complexation conditions, protein molecules, for example β -lactoglobulin, which will be in its dimeric form (3.58×6.93 nm) at the studied pH (5.1 - 5.4) (Pessen et al., 1985), will bond along the xanthan fibrous aggregates to produce fibrous complexes as in Figure 3.1

Under the experimental conditions of this work, the microfluidization dissociates the xanthan network and/or impedes the association of xanthan molecules, allowing the protein to bond around single xanthan molecules and/or smaller aggregates, producing particulated complexes of approximately 0.2 – 5.0 μm DI, as in Figure 3.2a and Figure 3.2b. For higher P:PS ratios, a protein multilayer is formed and complexes are larger ($\sim 7 - 30$ μm DI), as in Figure 3.2c and Figure 3.2d.

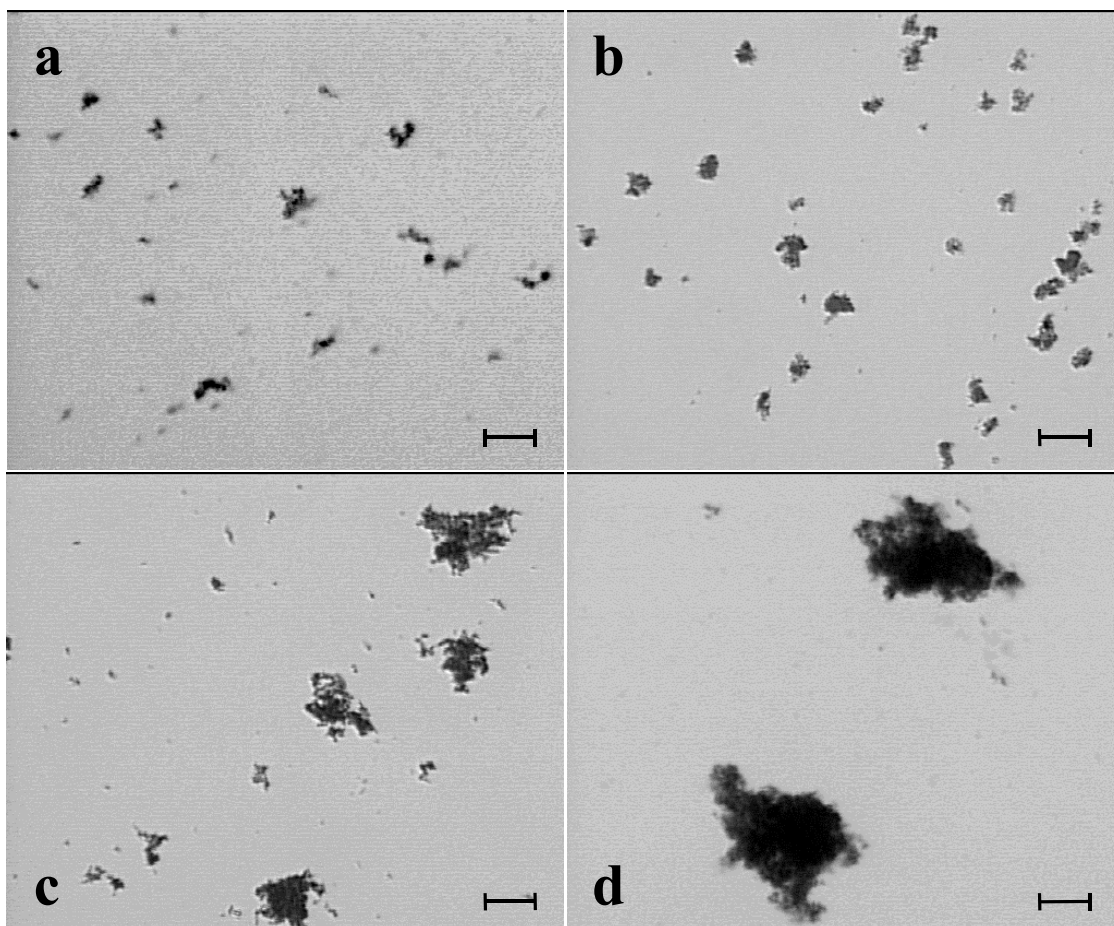


Figure 3.2. WPI - xanthan gum complexes (dark particles) fabricated with xanthan gum microfluidized 4 times and using different P:PS ratios: (a) 5:1; (b) 10:1; (c) 15:1 and (d) 20:1. Optical microscopy (400X). Bars = 15 μm .

Cencia-Rohan and Silvestri (1993) reported that, during microfluidization, the covalent bonds of large molecules, such as polysaccharide, could be broken if the critical shear force, specific for each polymer-solvent system, was exceeded. Accordingly, Silvestri and Gabrielson (1991) reported that microfluidization reduced the M_w of tragacanth (a gelling gum extracted from *Astragalus bush*, an Asian shrub). However, in the present case, the possibility of microfluidization breaking covalent bonds on xanthan was discarded since the M_w obtained after the high-pressure treatment ($\sim 5.4 \times 10^6$ Da for 12 passes / 750 bar) was close to that reported for xanthan gum under strong dissociating conditions ($\sim 2 \times 10^6$ Da) (Milas et al., 1985).

As it is already known, xanthan undergoes a thermally induced conformational transition (helix-random coil) in aqueous solutions (Morris, 1990; Sutherland, 1990; Rahway, 1988). Therefore, a heat pretreatment of xanthan, over its transition temperature (~ 55 °C for a salt-free solution containing 1% xanthan), is possibly sufficient to prevent fiber formation during complexation. This effect may be intensified if the heat treatment is carried out while mixing at high shear rates, since as reported by some authors (Chen et al., 1989; Soucie et al., 1988; Chen & Soucie, 1985), the protein-polysaccharide fibers are finer and smaller when the acidification is completed at high shear rates. The addition of certain salts may also prevent fiber formation by disrupting the association between xanthan molecules. For instance, Milani (1993) reports the production of microparticulated protein-xanthan complexes using 0.2% of sodium hexametaphosphate (HMP). However, the author could not conclude on the mechanisms by which HMP prevented fiber formation.

Although microfluidization prevented fiber formation, the number of passes tested in this study (4, 8, or 12 times through the microfluidizer) produced complexes with no statistical differences regarding their size or composition. This unexpected result may be due to the overwhelmingly high effect that the initial P:PS ratio had on the size and composition of complexes. For this reason, the following results are given as the mean values of all number of passes at each P:PS ratio.

3.5.1.2. Effect of the Protein-to-Polysaccharide Ratio

The P:PS ratio had an effect ($p < 0.01$) on complexes size. The size distribution of complexes fabricated with 5:1 and 20:1 ratios (mean values for all number of passes) are presented in Figure 3.3. Ratios of 10:1 and 15:1 showed intermediate behavior. It can be observed that the sizes of all complexes are below the perception threshold, which is around 40-60 μm DI (40 μm is $\sim 1200 \mu\text{m}^2$). However, the presence of large particles becomes important for high P:PS ratios. The statistical analysis revealed an interaction ($p < 0.001$) between P:PS ratios and area intervals. A more detailed analysis of this interaction revealed some general trends about size distributions.

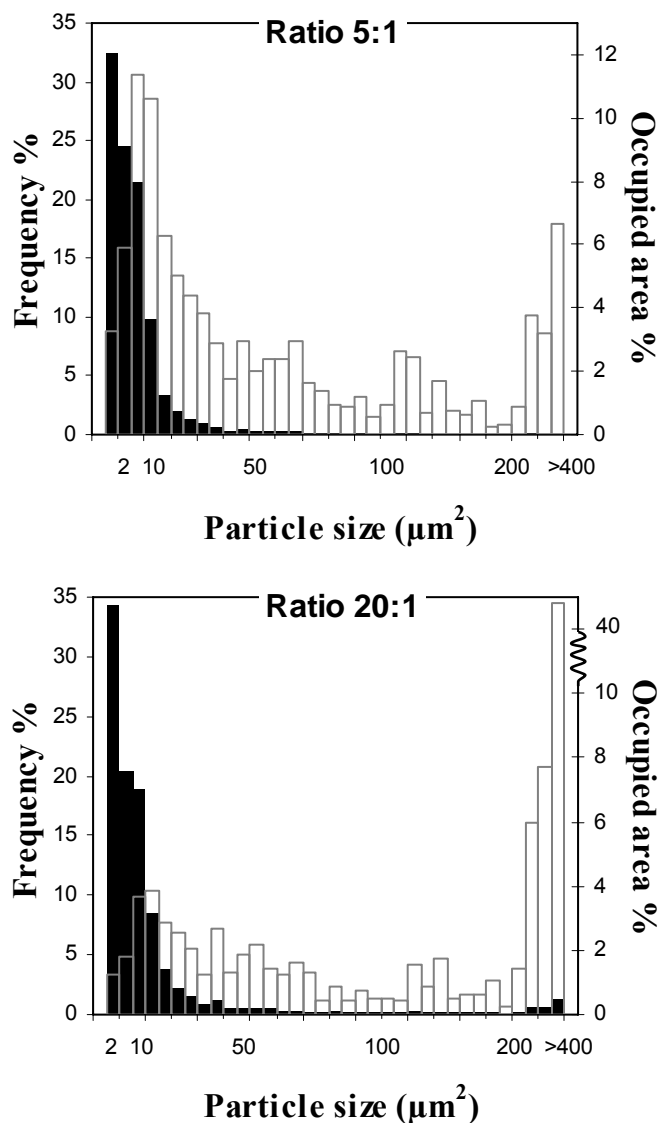


Figure 3.3. Size distribution of complexes fabricated with protein-to-polysaccharide ratios of 5:1 and 20:1 (mean values for all number of passes). Frequency given on a number-of-particles basis (■) and on an area (μm^2) basis (□) as determined from optical microscopy.

To observe the general trends, area intervals were set to $100 \mu\text{m}^2$ and the resulting plot is presented in Figure 3.4. Two families could be differentiated: the 5:1 and 10:1 ratios mainly composed of complexes within the size range of 0 to $100 \mu\text{m}^2$ (76% and 65% respectively), and the 15:1 and 20:1 ratios, which contained 47% and 36% of these particles respectively. The percentage of complexes $> 300 \mu\text{m}^2$ increased steeply with higher initial

P:PS ratios, reaching high percentages for ratios of 15:1 and 20:1 (39% and 49% respectively). Optical microscopy also revealed the presence of large particles for high P:PS ratios (Figure 3.2c and Figure 3.2d). Intermediate particles (>100 to $< 300 \mu\text{m}^2$) remained between 2 and 5% for all samples.

The large complexes at high P:PS ratios are possibly the result of protein aggregation and/or the formation of complexes covered with a protein multilayer. As explained by Sanchez & Paquin (1997), at a pH value close to the protein's IEP, the attraction between proteins is maximal and large aggregates tend to form.

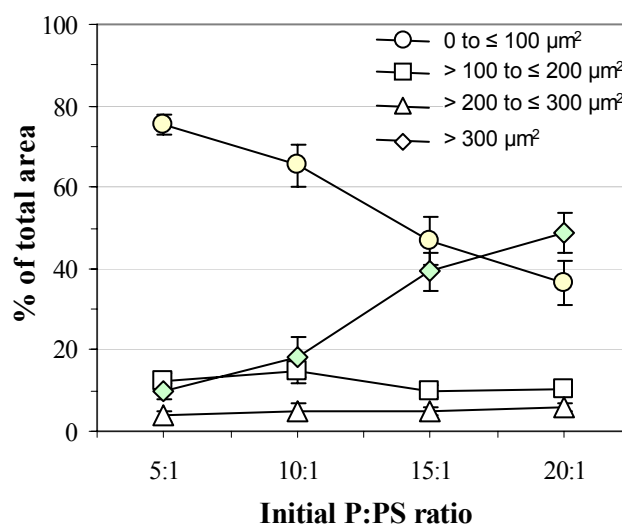


Figure 3.4. Behavior of the complexes size, on an area basis, according to the P:PS ratio.

Complexes are classified in $100\text{-}\mu\text{m}^2$ -area intervals to observe general trends.

This phenomenon is likely to be favored by the high protein concentration in these ratios. The quantity of xanthan in the solution may also have, to a certain extent, controlled the final size of complexes, since the presence of the polysaccharide would have the virtue of preventing the over aggregation of proteins (Sanchez & Paquin, 1997). Accordingly, the presence of important quantities of xanthan, as in ratios of 5:1 and 10:1 (0.5% and 0.27%, of the total solid content in the solution, respectively), was more effective in preventing the formation of complexes $> 300 \mu\text{m}^2$. In addition, the percentage of xanthan in solution affected the overall viscosity; the solutions with low P:PS ratios had higher viscosities

(Figure 3.5). An increased viscosity will likely limit the formation of large protein-protein aggregates by lowering the rate of colliding particles.

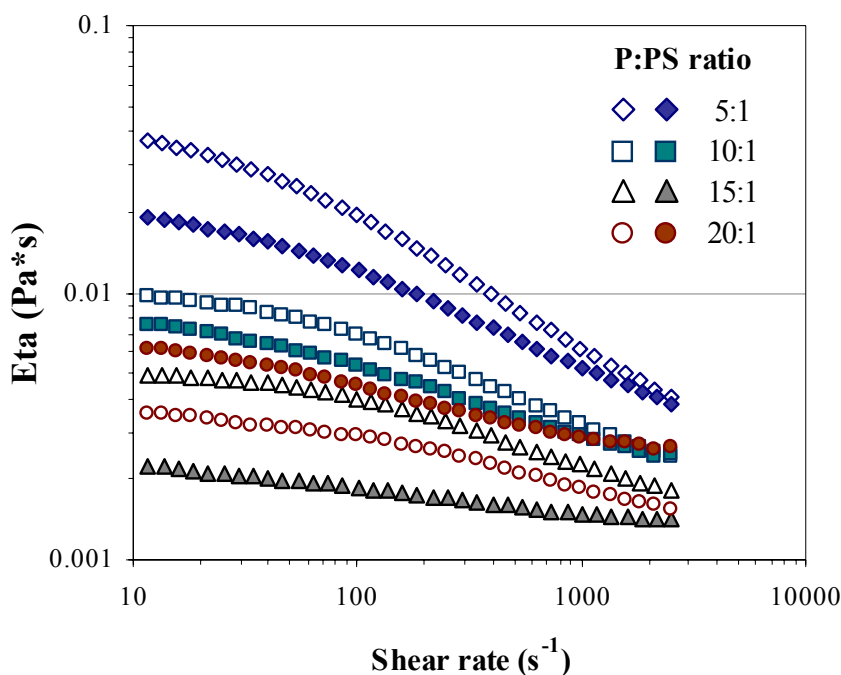


Figure 3.5. Effect of the P:PS ratio and of complexation on the viscosity of solutions. Presented samples are made with xanthan gum microfluidized 4 times. Open symbols = not complexed solutions (pH \sim 7.4); full symbols = complexed solutions (pH \sim 5.2 and heat treatment).

In this work, the ionic strengths of the solutions, calculated taking into account the WPI mineral content, the total solid content, and the initial P:PS ratio, ranged from 4.3 to 4.9 mM. These values are well below the ionic strengths needed to cause a conformational change in the xanthan molecule, which, depending on the salt that is being used and on the degree of pyruvilation and acetylation of the sample, is observed at around 0.02 - 0.035 M (Muller et al., 1986; Norton et al., 1984). Thus, the variations in the ionic strengths were considered negligible and consequently, under the conditions studied, did not affect the type of interactions between the xanthan and the WPI.

3.5.2. Protein : Polysaccharide Complexes Composition

The number of xanthan passes through the microfluidizer had no effect on the composition of complexes. Thus, mean values for each P:PS ratios were used for further analysis. Their composition was influenced by the initial P:PS ratio. The actual measured ratios in the precipitated fractions were higher than in the initial ones ($p < 0.01$) (Figure 3.6). This effect was very pronounced for the 20:1 ratio having a final P:PS ratio 3.27 times higher. The statistical analysis of the mass balance from measured protein and xanthan permitted to explain the general trends of the complexation process. Initial ratios of 10:1 and 15:1 resulted in a final P:PS ratio of around 30:1 (Figure 3.6). These ratios also had the maximum percentage of complexed protein (86-87%) and the 15:1 ratio had the maximum proportion of complexed xanthan (49%) (Table 3.1).

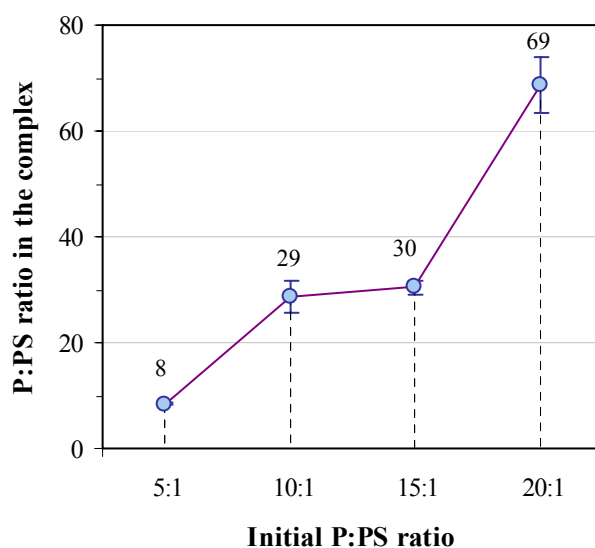


Figure 3.6. Calculated P:PS ratio in the complexed phase (precipitated) as a function of the initial P:PS ratio. Points are mean values for all number of passes. Standard deviations are presented.

These results suggested an optimal stoichiometric P:PS ratio of around 15:1. If the protein concentration in the initial mixture exceeded the stoichiometric ratio, the complexation ratio decreased. This effect was quite surprising since a high quantity of protein was expected to complex with more xanthan. Conversely, an important percentage of

uncomplexed xanthan (75%) was found for the 20:1 ratio (Table 3.1), which suggested that the polysaccharide was not participating in the complex formation and that protein aggregates were being formed. This hypothesis may be further supported by the high P:PS ratio ($\sim 69:1$) measured in the complexed fraction of these samples (Figure 3.6) and by the presence of complexes with "uncovered regions" on the polysaccharide (Figure 3.7), indicating that even if xanthan is available to react, the proteins interact preferentially with molecules of the same species. Considering that complexation takes place near the protein's IEP, where protein-protein interactions are maximal, we hypothesized that protein-protein interactions were favored over protein-polysaccharide complexation and/or that the protein was not preferentially binding to the polysaccharide. This could essentially be explained by the low concentration of xanthan at this ratio (0.143% of the total solid content in the solution), which may not effectively shield reactive groups and prevent protein over aggregation. In addition, the high protein concentration allowed them to collide and aggregate more readily due to their proximity. Although the best complexation proportion was obtained with an initial P:PS ratio of 15:1, the obtained complexes were rather large ($\sim 39\% > 300 \mu\text{m}^2$) (Figure 3.3).

For solutions under thermodynamic incompatibility conditions, the presence of xanthan would favor the formation of protein microparticles over protein-polysaccharide complexation (Tolstoguzov, 1996). However, this possibility was eliminated since no evident phase separation occurred by centrifugation in any solution before acidification. Besides, incompatibility generally takes place in mixtures that have over 4% total solids (here 3% total solids were used) and at ionic strengths above 0.3 M (Tolstoguzov, 1996; Samant et al., 1993). The ionic strength of the solutions (4.3 to 4.9 mM) are well below the ionic strength needed to cause a thermodynamic incompatibility.

Although it was not possible to determine whether the concentration of xanthan (in the 20:1 ratio) was insufficient to prevent protein collision, the resulting high P:PS ratio in the precipitated fraction, as well as the presence of large complexes in this ratio, can be explained by protein aggregation. The 15:1 ratio represents the limit where protein-polysaccharide complexes are still extensively being formed since relatively little xanthan

remains uncomplexed (Table 3.1). Accordingly, the size of complexes in this ratio is smaller ($39\% > 300 \mu\text{m}^2$) compared to the 20:1 ratio ($46\% > 300 \mu\text{m}^2$).

Table 3.1. Complexation ratio as a function of the initial P:PS ratio. Percentage of the initial protein or polysaccharide found in the complexed (precipitated) fractions or in the supernatants.

P:PS Ratio	Complexed fraction		Supernatant	
	Protein (%)*	Xanthan (%)*	Protein (%)*	Xanthan (%)*
5:1	69	37	16	54
10:1	87	36	16	67
15:1	86	49	14	56
20:1	75	28	15	75

* Data are mean values for all number of passes. Standard deviations are between 0.4 and 4.5

Finally, a proportion of protein (14-16%) and xanthan (54-67%) always remained uncomplexed, which indicates that the protein-polysaccharide complexation is not carried out at 100% (Table 3.1). As mentioned by other authors (Samant et al., 1993; Chen & Soucie, 1985), the rate of protein recovery through polysaccharide complexation is approximately 90%. As determined by SDS-PAGE, band profiles from the uncomplexed protein fraction in the supernatants were similar to uncomplexed WPI (results not shown). These results concur with those obtained by Milani (1993). However, Milani (1993) points out a difference in the amount and type of uncomplexed proteins with respect to the percentage of xanthan in solution, probably the result of different pH of complexation (pH 4.0 for Milani (1993) compared to pH 5.1-5.4 in this work). The relatively low rate of protein complexation (~ 85%) in this study may be improved by an acidification to lower pHs since it will be well below the IEP of all the proteins in the WPI and because of the higher opposite charges between both molecules.

3.5.3. Structure of Complexes

The structure of complexes was determined using optical microscopy. Figure 3.7 reveals that WPI-microfluidized xanthan gum complexes consisted of a xanthan central core (translucent portion) surrounded by proteins (dark agglomerates). This structure is in agreement with the one described by Tolstoguzov (1985). Both molecules could be differentiated because toluidine blue colours protein blue and xanthan violet. Furthermore, the structure of both molecules under the microscope was quite different: WPI appeared as individual little blue points (at neutral pH) or as blue agglomerates (acidic pH) and xanthan always appeared as translucent networks (results not shown).

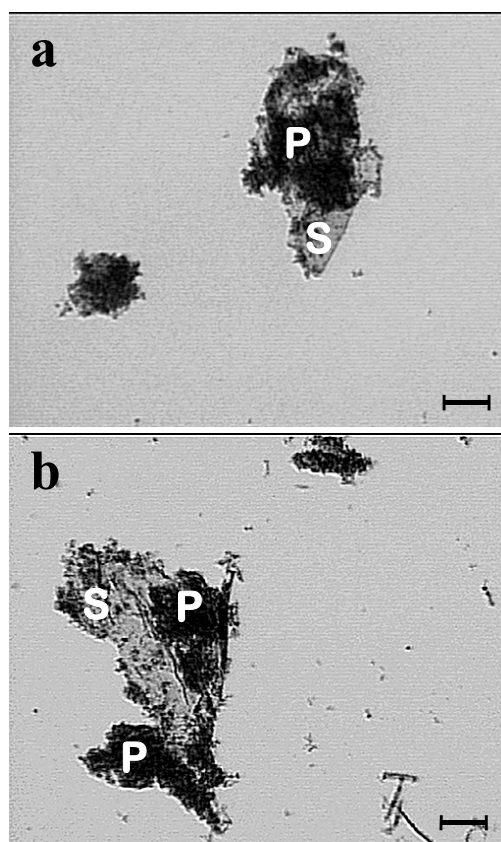


Figure 3.7. WPI - xanthan gum complexes displaying a cooperative protein-bonding (P) on the polysaccharide (S). See text for explanation. Complexes presented are fabricated with a P:PS ratio of 20:1 and xanthan microfluidized a) 8 times and b) 12 times. Optical microscopy (400X). Bars = 15 µm.

Figure 3.7 also illustrates “cooperative protein-binding” (Tolstoguzov, 1996 and 1985). This phenomenon takes place when complexation is performed by slow acidification (as done in this work) to a pH near the protein’s IEP (pH \sim 5.1 for WPI). Under such conditions, the proteins are favorably attached close to an already-bonded protein since less energy is required, preventing an even distribution of protein on the polysaccharide. This is due to an enhancement of protein-protein hydrophobic interaction near the IEP (Tolstoguzov, 1996). The complexes presenting uncovered regions on the polysaccharide were found exclusively in the 15:1 and 20:1 ratios. As explained by Tolstoguzov (1985), these complexes are formed when there is not enough protein to bond on the polysaccharide. When protein is available, it completely covers the polysaccharide to form complexes as those presented in

Figure 3.2. The fact that these complexes were only present at high P:PS ratios, where proteins should be readily available, supports the hypothesis that, at high P:PS ratios, protein-protein interactions are favored over protein-polysaccharide complexation.

3.5.4. Flow Behaviour of WPI – Xanthan Gum Solutions

Figure 3.5 shows the curves of the apparent viscosity with respect to the shear rate for samples fabricated with xanthan microfluidized 4 times at all the studied P:PS ratios, before (pH \approx 7.4) and after complexation (pH \approx 5.2 and heat treatment). The flow curves of all protein-polysaccharide solutions showed a lower Newtonian plateau followed by a shear thinning region, and were well described by the Cross model (Cross, 1969) (R ranged between 0.984 and 0.999). The calculated parameters: zero shear viscosity (η_0), relaxation time (τ), and the coefficient m , are presented in Table 3.2.

In general, the number of xanthan passes through the microfluidizer, the complexation treatment, and the initial P:PS ratio had an influence on η_0 , τ , and m .

3.5.4.1. Effect of the P:PS ratio and the number of passes

The η_0 , τ , and m decreased in complexed and uncomplexed solutions as the number of xanthan passes through the microfluidizer and the initial P:PS ratio increased (Figure 3.5, Table 3.2). For the 5:1 ratio, the decrease in η_0 and τ was much more important when the number of passes increased, whereas the differences due to the microfluidization among all the other ratios were considerably smaller (Table 3.2). Solutions made with xanthan that was microfluidized 12 times showed a less shear thinning behavior and lower viscosities (Table 3.2). These results could be related to the microfluidization of xanthan since lower molecular weights result in lower viscosity (Doublier & Launay, 1981). The reduction in η_0 and in the shear-thinning behavior (decrease in m) was also associated with lower quantities of xanthan in solution. At low xanthan concentrations, the protein molecules may interpose and prevent xanthan to form the weak network responsible for the high viscosities. These results concur with Sanchez et al. (1997) who reported that the flow behaviour of WPI-xanthan gum solutions was mainly controlled by the amount of xanthan present in the solution.

The coefficient m is related to the polydispersity of the system. Low polydispersity generates a large slope for the flow curve (Cross, 1969). From data in Table 3.2, it is possible to see that microfluidization increases the polydispersity of the system, probably by disrupting the xanthan aggregates in a random manner and by producing aggregates with several intermediates sizes that broaden the molecular weight distribution of the sample.

A steep decrease in η_0 , and τ occurs between the 5:1 and the 10:1 ratios; the decrease between the 15:1 and 20:1 ratios was comparatively very low. These results may also be related to the concentration of xanthan in the solution.

3.5.4.2. Effect of Complexation

The uncomplexed solutions have a higher but shorter zero shear plateau (Table 3.2) than the corresponding complexed solutions. The slope of the shear-thinning region for complexed solutions (0.13-0.55) was lower than those of uncomplexed solutions (0.43-

0.67) showing that the latter are more markedly pseudoplastic (Table 3.2). The η_0 , τ , and m , decreased with complexation, except for the 20:1 ratio (Figure 3.5, Table 3.2). The reduction in the viscosity is caused by the more compact conformation of protein-polysaccharide complexes compared to the initial molecules (Tolstoguzov, 1996). As explained by Tolstoguzov (1996), when proteins and polysaccharides interact to form a complex, the junction zones are less hydrophilic and the hydration capacity of the complex lowers, resulting in a decrease of the viscosity. The decrease in pseudoplasticity and apparent viscosity upon mixing a protein with a polysaccharide, at acidic pH, has also been reported by other authors (Delben & Stefancich, 1997; Sanchez et al., 1997).

Table 3.2. Cross model parameters for WPI - xanthan gum solutions before and after complexation. NC = not complexed solutions (pH \approx 7.4). C = complexed solutions (pH \approx 5.2 and heat treatment 80 °C/20 min).

<i>Nb of passes*</i>	<i>P:PS ratio</i>	<i>WPI w/w%</i>	<i>Xanthan w/w%</i>	Zero shear viscosity η_0 (Pa-s)		Relaxation time τ (s)		Coefficient m (–)	
				<i>NC</i>	<i>C</i>	<i>NC</i>	<i>C</i>	<i>NC</i>	<i>C</i>
4	5:1	2.5	0.5	0.072	0.028	0.041	0.011	0.67	0.55
	10:1	2.7	0.3	0.013	0.010	0.005	0.005	0.59	0.46
	15:1	2.8	0.2	0.006	0.003	0.002	0.001	0.53	0.28
	20:1	2.9	0.1	0.004	0.008	0.001	0.004	0.49	0.38
8	5:1	2.5	0.5	0.049	0.029	0.018	0.017	0.67	0.54
	10:1	2.7	0.3	0.015	0.008	0.008	0.004	0.59	0.44
	15:1	2.8	0.2	0.008	0.006	0.005	0.002	0.48	0.26
	20:1	2.9	0.1	0.006	0.008	0.006	0.010	0.43	0.32
12	5:1	2.5	0.5	0.022	0.010	0.005	0.002	0.67	0.52
	10:1	2.7	0.3	0.006	0.004	0.001	0.001	0.59	0.42
	15:1	2.8	0.2	0.004	0.002	0.0008	0.00001	0.43	0.13
	20:1	2.9	0.1	0.002	0.004	0.0001	0.0003	0.43	0.32

* Number of xanthan gum passes through the microfluidizer.

At high P:PS ratios, as in the 20:1 ratio, the solution's behavior is governed by protein behavior (Sanchez et al., 1997; Chen et al., 1989; Soucie et al., 1988). Therefore, the increase in η_0 may be explained by the behavior of the protein under the experimental

conditions (i.e., at acidic pH and after a heat treatment). Several authors have found that the apparent viscosity of protein solutions increases after a heat treatment due to the unfolding and/or denaturation of proteins (Alyzadehfard & Wiley, 1996; Rha & Pradipasena, 1985). Heating also causes aggregation and/or precipitation of protein, principally under acidic conditions, and this phenomenon results in an increased viscosity due to the enhanced water-holding capacity of the aggregates (Tolstoguzov, 1996; Rha & Pradipasena, 1985; Kinsella, 1984). Thus, the increase of the viscosity after complexation for the 20:1 ratio supports the hypothesis of protein-protein aggregation issued from the presence of larger particles, as seen in Figure 3.3 and Figure 3.4, and the high P:PS ratio found in the complexed phase for this ratio (Figure 3.6).

After complexation, a minimal η_0 , and m (related to the greatest broadening of the curves) and a minimal τ (onset of shear thinning at higher rates of shear) were obtained for the 15:1 ratio (Figure 3.5, Table 3.2). These results confirm that a stoichiometric concentration exists around this ratio and that it represents the threshold where complexation is the main interaction between molecules. The reduction in the pseudoplastic behavior for 15:1 after complexation (Figure 3.5) was more important compared to the other ratios (Table 3.2). This could be explained by the unavailability of complexed xanthan (for this ratio, 75% of xanthan was found in the complexed phase) to form a weak network in solution, and thus confer the pseudoplastic behavior.

3.6. Conclusions

The microfluidization of xanthan was indispensable to produce particulated WPI-xanthan complexes. Although microfluidization allowed to obtain a controlled disruption of xanthan aggregates that, in turn, affected the overall viscosities of the WPI-xanthan solutions, the chosen parameters (number of passes and pressure) does not seem high enough to have a substantial effect on the size or composition of the formed complexes, at least in the present study. Thus, it is possible that passing xanthan through the microfluidizer only once may be enough to avoid fiber formation. The P:PS ratio had a more important effect on the characteristics of the complexes. At low P:PS ratios, xanthan prevented the formation of

large complexes. On the other hand, at high P:PS ratios, there was an important protein-protein aggregation or a protein multilayer formation around the polysaccharide, which led to the formation of larger complexes. At the extreme (20:1 ratio), protein microparticles essentially formed.

The size of the complexes obtained for low P:PS ratios was similar to the size distributions of protein and protein-polysaccharide-based fat substitutes. The advantage of microfluidizing xanthan gum before complexation rests in the amount of energy saved, since less material needs to be treated at high pressures (xanthan solution compared to a protein-polysaccharide solution). Furthermore, problems such as canal obstruction that may occur during the high-pressure treatment of fibers are avoided. Finally, the high-pressure treatment may affect the interaction between the protein and the polysaccharide and/or completely disrupt the complex, thus changing its functional properties.

High viscosity and the absence of powderiness are two important factors for creaminess (Sanchez & Paquin, 1997), thus complexes made with a xanthan treatment of 4 passes, 5:1 and 15:1 ratios were chosen and their functional properties are being tested in a food system with 50 or 75% less fat.

3.7. Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from NSERC industrial chair and industrial partners Novalait Inc., CQVB, Agropur and Parmalat, and Louise Tremblay and Jocelyne Giasson for professional technical support.

“When I am working on a problem I never think about beauty. I only think about how to solve the problem. But when I have finished, if the solution is not beautiful, I know it is wrong.”

R. Buckminster Fuller (1895 - 1983)
Architecte et ingénieur américain

Chapitre 4

Small-angle static light scattering study of associative phase separation kinetics in β - lactoglobulin - xanthan gum mixtures under shear

By S.I. Laneuville¹, C. Sanchez², S.L. Turgeon^{1,*}, J. Hardy² and P. Paquin¹

¹ Dairy Research Center STELA. Faculty of agriculture and food science. Université Laval, Pavillon Paul – Comtois, Québec, Canada, G1K-7P4. * Telephone: (418) 656-2131 ext. 4970. Fax: (418) 656-3353. E-mail: Sylvie.Turgeon@aln.ulaval.ca

² Laboratoire de Physico-Chimie et Génie Alimentaires, INPL-ENSAIA, 2 Avenue de la Forêt de Hayes, BP172, 54505 Vandœuvre-lès-nancy, Cedex, France.

Sous presse « Food Colloids : Interactions, Microstructure and Processing ».

4.1. Résumé

Plusieurs études ont démontré que la β -lactoglobuline peut former des complexes électrostatiques avec la gomme xanthane (β lg-X) à pH acide. Ces complexes ont plusieurs applications comme additifs alimentaires, i.e. des substituts de matière gras, des agents texturants, et simili de viande. Cependant, la cinétique de la complexation dans ce système n'est pas encore tout à fait comprise. L'objectif de ce travail était de déterminer, par diffusion de la lumière aux petits angles, l'effet du cisaillement (2000 rpm) sur la cinétique de séparation de phases des mélanges β lg-X, acidifiés in situ (pH final \approx 4.5). Quatre ratios β lg-X ont été étudiés, 2:1, 5:1, 10:1, et 15:1. Le développement de la structure des mélanges a été suivi pendant 15h. Les résultats ont été dépouillés en relation avec l'évolution temporelle de la turbidité, et l'intensité de diffusion de la lumière $I(q)$ dans la plage 0.01-10.4 μm^{-1} . La turbidité a été utilisée pour déterminer les pHs critiques de formation des complexes solubles (pH_c) et des complexes intermoléculaires menant à une séparation de phases macroscopique (pH_φ). pH_c = 5.80 ± 0.05 était indépendant du ratio β lg-X, et étant donné que pH_c > 5.1, il a été conclu que l'interaction électrostatique s'était initiée dans des régions chargées positivement sur la surface de la protéine. Le pH_φ augmentait avec le ratio β lg-X de 5.11 à 5.43, ce qui suggère qu'à des ratios plus élevés, les complexes sont neutralisés plus tôt, puisqu'il y a plus de protéines disponibles pour l'interaction. L'évolution de $I(q)$ a montré que l'augmentation du nombre total de domaines structuraux, a été suivi d'une stabilisation de la taille des structures pour les ratios 2:1 et 5:1, ce qui est probablement dû à l'atteinte d'un équilibre électrostatique dans le mélange, qui empêcherait une agrégation subséquente. Pour le ratio 15:1, une deuxième agrégation a été observée, probablement par floculation. L'évolution de la structure interne des agrégats a été déterminée en mesurant les dimensions fractales (d_f) à partir de la pente à grandes valeurs de q en utilisant une loi de puissance de type $I(q) \sim q^{-d_f}$. Des agrégats diffus étaient initialement formés ($d_f = 1.8 \pm 0.1$), ce qui suggère un mécanisme d'agrégation limitée par la diffusion (DLCA). Les agrégats fractals se sont ensuite regroupés dans des structures plus compactes. Le processus de restructuration des complexes a été amplifié par

cisaillement. Le mécanisme de séparation de phases a été déterminé comme étant issu d'une nucléation et croissance.

4.2. Abstract

Several studies have shown that β -lactoglobulin can form electrostatic complexes with xanthan gum at acidic pH. These complexes have several uses as food additives i.e., fat replacers, texturizers, and meat analogs. However, the kinetics of β -lactoglobulin - xanthan gum (β lg-X) complexation remains poorly understood. The objective of this work was to determine, by small-angle static light scattering, the effect of shear (2000 rpm, laminar flow) on phase-separation kinetics of β lg-xanthan gum mixtures acidified in situ by glucono- δ -lactone (final pH \approx 4.5). Three β lg-X ratios were studied, namely 2:1, 5:1, 10:1 and 15:1. The structure of β lg-X mixtures was followed during 15h.

Results were analyzed in terms of the temporal evolution of the turbidity, as determined at negligible scattering angle, and of the scattered light intensity $I(q)$ in the q range 0.01 - $10.4 \mu\text{m}^{-1}$. Turbidity was used to determine the critical pH for soluble complexes formation (pH_c) and for the development of intermolecular complexes and aggregates that leads to macroscopic phase separation ($\text{pH}\phi$). $\text{pH}_c = 5.80 \pm 0.05$ was independent of β lg-X ratio, and since $\text{pH}_c > 5.1$ (the isoelectric pH of β lg), it could be inferred that the electrostatic interaction started at positively charged patches on the protein surface. $\text{pH}\phi$ increased with β lg-X ratio from 5.11 to 5.43, indicating that at higher ratios, complexes were neutralized sooner since more protein was available for interaction. The evolution of $I(q)$ showed that after an increase in the total number of structural domains, a stabilization of domain growth occurred for ratios 2:1 and 5:1. This is probably due to the attainment of an electrostatic equilibrium in the mixture, which did not allow any further aggregation of macromolecular complexes. For ratio 15:1, a second coarsening phase was observed in which large particles grew at the expenses of smaller ones, possibly by flocculation. The evolution of the internal structure of aggregates was determined by measuring the fractal dimension (d_f) from the slope at large q values using the power-law $I(q) \sim q^{-d_f}$. Diffuse aggregates formed initially ($d_f = 1.8 \pm 0.1$), indicating a diffusion limited cluster aggregation mechanism (DLCA).

Fractal aggregates then reorganized into more compact structures. The re-structuration process of the complexes was further amplified by shear. Final d_f values increased with β lg-X ratio from 2.25 to 2.37. It was determined that the β lg - xanthane system phase separated following a nucleation and growth mechanism.

4.3. Introduction

Several studies have shown that the associative or segregative interaction between proteins and polysaccharides can determine the texture, structure and viscoelastic properties of many processed foods. As a result, diverse protein - polysaccharide systems have been studied for their practical applications in food technology for the production of functional ingredients such as texturizers (Tolstoguzov, 2003) fat replacers (Chen et al., 1989) meat and caviar analogs (Tolstoguzov, 2003; Soucie et al., 1988; Chen & Soucie, 1985) edible films (Zaleska et al., 2000) microencapsulated vitamins and flavours (Tolstoguzov, 2003; Burova et al., 1999) and emulsion and foam stabilizers (Laplante, 2004; Girard et al., 2002; Dickinson, 1999). However, one of the most appealing aspects of this field is the challenge of understanding at a fundamental level the forces and mechanisms behind protein – polyelectrolyte phase separation. The potential benefits that may arise following the mastering of this process are vast, including the improvement of current processes, and the development of novel textured ingredients or products with specific particle size, structure, texture, rheology and superior shelf-life.

Abundant literature (Tolstoguzov, 2003; Ledward, 1996; Tolstoguzov, 1996; Xia & Dubin, 1994; Cheftel & Dumay, 1993; Samant et al., 1993) shows that the character of protein – polyelectrolyte interactions is affected by environmental factors, i.e., pH, ionic strength, temperature, macromolecular ratio, total solids content, etc., and by internal factors, i.e., the molecular characteristics: M_w , chain rigidity, net charge and relative charge density (Tolstoguzov, 1996; Chen et al., 1989). However, only a small number of studies (Girard et al., 2004 and 2003; Butler & Heppenstall-Butler, 2003b; Sanchez et al., 2002; Tuinier et al., 2000) have dealt with the underlying mechanism and the kinetics of associative/segregative phase separation of proteins with biomacromolecules.

According to the theory of Tainaka (1979), which is based on earlier studies by Veis & Aranyi (1960), protein – polyelectrolyte associative phase separation kinetics involves two stages delimited by two critical pH values, designed pH_c and pH_ϕ (Park et al., 1992; Dubin & Murrell, 1988). The onset of interaction occurs at pH_c . At this stage, molecules of different species interact, principally due to opposite charges they carry, to form primary (or intrapolymeric) complexes. These primary complexes are composed of a single polymer chain and multiple bound proteins, and thus they remain soluble since they still carry a net charge (Mattison et al., 1999; Xia et al., 1993). Prior to reaching pH_c , no interaction is possible due to repulsive Coulombic forces predominating, as both molecules are negatively charged. With further pH decrease below pH_c , and as charge neutralization of the primary complex is approached, the second critical pH value (pH_ϕ) is attained. At this pH, the soluble complexes interact to form interpolymeric complexes that undergo extensive higher order aggregation leading to macroscopic phase separation (Park et al., 1992; Dubin & Murrell, 1988).

Light scattering is the technique of choice for studying phase separation kinetics in colloids because it is very sensitive to concentration fluctuations and to the presence of aggregated structures appearing in the sample (Sanchez et al., 2002; Kim & Berg, 2000; Chen et al., 1998). Furthermore, a number of theoretical studies and computer simulations that predict the characteristics of the light-scattering profiles during the early and late stages of phase separation are available (Allen & Warren, 2004; Carlsson et al., 2003; Binder 1991). In a static light-scattering experiment, the time evolution of the scattered light intensity $I(q)$ measured at different scattering angles (related to q) can provide useful information about the phase separation mechanism of the system. Additionally, the size and structure of the developing aggregates can be determined.

The initial separation of a homogenous mixture into two phases can proceed through two distinct processes: spinodal decomposition or nucleation and growth. Spinodal decomposition (SD) occurs under conditions far from the binodal, i.e., deep into the two-phase region, where concentration fluctuations are unstable and readily develop into phase separation. In SD, the morphology is characterized by the presence of one particular length

scale, Λ , correlated to the prevailing domain size in the system. The characteristic Λ is associated with the presence of an intensity peak I_{\max} at a constant scattering angle q_{\max} , the wave vector of the fastest growing fluctuation; the quantities are related by the equation $\Lambda = 2\pi/q_{\max}$. The course of the process can be separated into three regimes – the early, intermediate, and late stages – giving different and well-defined patterns in light scattering measurements. In the early stage, the intensity of scattered light increases exponentially due to the rapid increase in the number of structural domains of length scale Λ . The intermediate stage is characterized by a shift in the intensity peak towards lower q values due to the coarsening of the system. In the late stage, when the system has attained equilibrium, only one length scale is important, and dynamic scaling applies (Binder, 1991).

Nucleation and growth (NG) occurs when a mixture is taken close to the binodal and the system is still stable to small concentration fluctuations. Under these conditions, phase separation will occur only if a certain amount of energy is input into the system to overcome the energy barrier necessary for the formation of a nucleus of a determined critical size. Once this critical size is attained, the development of a polydisperse array of particles will follow. Generally, the NG mechanism is characterized by the absence of a scattering peak and a monotonic decrease in the scattered light intensity with the measuring wave vector (Wagner & Kampmann, 1991). However, a peak related to NG has been reported in numerical simulations, and in systems undergoing polymerization-induced phase separation processes (Maugey et al., 2001; Chen et al., 1998; Eliçabe et al., 1998 and 1997; Carpineti & Giglio, 1992). Based on numerical simulations and practical studies of aggregating colloidal particles (Poon et al., 1997; Ramírez-Santiago & González, 1997; Carpineti & Giglio, 1992), the peak in NG has been attributed to the presence of a depletion layer surrounding the formed nuclei, or at high concentrations due to the correlations in the locations of individual scatterers (Eliçabe et al., 1998 and 1997). Mie theory studies has shown, however, that the two mechanisms (NG and SD) can be differentiated, even if both profiles present a peak in the scattering function, by the different behavior of the peak position over time (Butler & Heppenstall-Butler, 2003b; Maugey et al., 2001; Eliçabe et al., 1997).

The macromolecules selected for this study, β -lactoglobulin and xanthan gum, are well known biomacromolecules and are widely used in the food industry. β -lactoglobulin (β lg) is a globular protein with a molecular mass of about 18.3 kDa. Its tertiary structure consists of eight antiparallel β -sheets that folds to form a β -barrel with a hydrophobic core, some β -turns and one α -helix (Verheul et al., 1999; Wong et al., 1996). The quaternary structure of β lg depends on pH, ionic strength and temperature. It exists as an equilibrium between monomeric and dimeric forms in the pH range from the isoelectric point (IEP = 5.1) to pH = 6.6. Xanthan gum is an anionic polyelectrolyte which undergoes an order-disorder transition with temperature. The ordered conformation exists as a double-stranded chain with a persistence length of ca. 120 nm at high ionic strengths (Morris, 1995; Sato et al., 1984b, c). It is well known nowadays that xanthan can exist in several aggregated states – single, double or multistranded helices – depending on the primary structure of the sample (pyruvate and acetate content) (Lecourtier et al., 1986), on the solution conditions (ionic force, temperature, solvent) (Morris, 1995; Sato et al., 1984a), and on its treatment history during and after fermentation, i.e., drying, filtration, pasteurization, centrifugation, and purification (Muller et al., 1986).

Previous studies on the β lg - xanthan system have shown that the protein / polysaccharide ratio r has a major effect on the characteristics of the resulting complexes, namely the complex size, composition and viscosity in solution (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3). It was also found that a microfluidization step (a dynamic high pressure treatment) of xanthan gum prior to the complexation process allows formation of particulated complexes, instead of fibrous ones, from the beginning of production (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3; Le Hénaff, 1996). In this paper, the complexation of β lg with xanthan (native or microfluidized), in aqueous dispersion and under shear, are further characterized by determining the associative phase separation and coarsening kinetics by turbidimetry and static light scattering experiments.

4.4. Experimental section

4.4.1. Materials

Whey protein isolate (WPI) (High-Beta, lot no. JE 002-8-922 - High - Beta, 98.2 wt% protein, of which 85% is β lg, 1.8% minerals and 4% moisture) was obtained from Davisco Foods (Eden Prairie, MN). Due to the high content of β lg in this WPI powder, it was assumed that the β lg governed its behaviour (Weinbreck et al., 2003a), it is therefore referred to simply as β lg in the rest of this article.

Xanthan gum (Keltrol F, lot no. 9D2192K, 96.36% total sugar, 3.02% protein) was purchased from Kelco (San Diego, CA). Microfluidized xanthan samples (treated 1, 4 or 12 passes at 750bar) were prepared and dialyzed as described previously (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3). Microfluidization is a dynamic high-pressure treatment that decreases the molecular weight (M_w) and the aggregated state of xanthan to different extents, depending on the operating conditions (pressure, number of passes, temperature, solvent, etc.). The principal characteristics of the xanthan samples tested in this study are presented in Table 4.1.

Table 4.1. Molecular weight (M_w) and intrinsic viscosity $[\eta]$ of the xanthan gum samples used in this study.

<i>Sample</i>	<i>Code</i>	$M_w \times 10^6$ (Da)	$[\eta]$ (dL g ⁻¹)
Native xanthan gum	XG	5.08	26.9
Microfluidized 1 pass [§]	X1	4.46	20.1
Microfluidized 4 passes	X4	3.94	15.2
Microfluidized 12 passes	X12	3.22	11.3

[§] Number of passes through the microfluidizer at 750 bar.

The protein content in the β lg and xanthan gum samples was determined by measuring total nitrogen content by combustion according to the Dumas principle (IDF standards 185:2002) using LECO equipment (FP-528, LECO Corporation, St. Joseph, MI) and a conversion factor of 6.38. Total carbohydrate content was determined by the phenol - sulphuric acid method (Chaplin, 1986). All chemicals used were of reagent-grade quality.

4.4.2. Preparation of Biopolymer Dispersions

Dispersions containing 0.1 wt% total biopolymer concentration of protein and xanthan were prepared in filtered (0.2 μ m) deionized water (Milli-Q, Millipore, US) under gentle stirring for 1 h (protein) or strong stirring, and avoiding air incorporation, for 2 h (polysaccharide). Solutions were kept overnight at 4 $^{\circ}$ C to allow complete hydration. Subsequently, the dispersions were centrifuged for 30 min at 10^4g (20 $^{\circ}$ C) and filtered through a 0.2 μ m filter (protein) or a 0.8 μ m filter (polysaccharide) (Sartorius Minisart filters, Gottingen, Germany). The β lg - xanthan gum mixed dispersion (0.1 wt%) were prepared at the desired protein to polysaccharide macromolecular ratios r , namely 2:1, 5:1; 10:1 and 15:1 ($r = 2, 5, 10$ and 15 respectively), using the appropriate quantities of stock solutions (wt/wt) and mixed gently for 30 min. Tests with microfluidized xanthan gum were carried out at $r = 5$. The initial pH of the mixed dispersions was 6.58 ± 0.08 .

Associative phase separation of the mixed dispersions of β lg - xanthan (native or microfluidized) was induced by slow acidification using 0.015 wt% glucono- δ -lactone acid (GDL) (Merck, Darmstadt, Germany) to a final pH ≈ 4.5 . After the addition of GDL, dispersions were slowly stirred for an additional 15 min before starting the light scattering experiments. The pH of the dispersions was followed in parallel in order to determine the acidification curves for each system. Pure β lg and xanthan gum dispersion were also tested separately for comparison. All tests were carried out at least in duplicate. Protein blanks presented some minor aggregation starting at pH = 5.25, which is close to the β lg IEP. The maximum intensity reached was ~ 8 arbitrary units, very much less than the intensity obtained for mixed systems (3500 arbitrary units). This slight aggregation was possibly due

to the presence of some denatured protein produced during WPI manufacture. The xanthan blanks presented a low intensity profile that remained almost constant over the whole acidification course.

4.4.3. Time-Resolved Small-Angle Static Light-Scattering (SALS)

The associative phase separation, the coarsening kinetics, and the temporal evolution of turbidity of β lg - xanthan mixed dispersions were followed through acidification using a Mastersizer S long bench equipped with a 5mW He/Ne laser of wavelength (λ) of 632.8 nm (Malvern Instruments, UK). The sample was maintained under constant circulation with the stirred sample unit operating at 2000 rpm (laminar flow). The optical cell had a path length $d = 2.4$ mm and the range of scattering angles q covered was $0.01 - 10.4 \mu\text{m}^{-1}$, where $q = 4\pi n_s \sin(\theta/2)/\lambda$, with θ the scattering angle of observation and n_s the refractive index of the solvent. This q range allowed the study of particle sizes in the range between 0.05 and 900 μm .

The background intensity was recorded on filtered (0.2 μm) Milli-Q water with a recording time of 5 s, before starting the measurements on the mixed dispersions. The instrument was programmed to measure the scattered light intensity from the sample every minute over a period of 10 to 15 h (recording time 10 s). The experimental scattering intensity was then corrected with respect to the angle of the detectors. Finally, corrections were applied to take into account the turbidity development in the sample over time according to the relationship (Hashimoto et al., 1986; Stein & Keane, 1955):

$$I_c(\theta) = I_m(\theta) \left\{ \frac{\exp[\tau d / \cos \theta] \tau d [\cos(\theta - I)]^{-I}}{\exp(\tau d [\cos(\theta - I)]^{-I}) - I} \right\} \quad (4.1)$$

Where I_m and I_c are the measured and corrected scattered intensities, respectively, and d is the sample thickness. The turbidity τ of the specimen is calculated from:

$$\tau = \frac{\ln(I_0/I_t)}{d} \quad (4.2)$$

$$I_t = 1 - O(t) \quad (4.3)$$

Where I_0 is the incident intensity, I_t the transmitted intensity, and $O(t)$ the obscuration value (%) of the sample at a given time t , which is automatically measured by the Mastersizer S equipment. The corrected scattered intensity I_c will henceforth be referred to as $I(q)$.

The evolution of the internal structure of the complexes was determined by measuring the apparent fractal dimension (d_f) from the slope over 1 decade at large q values using the power-law $I(q) \sim q^{-d_f}$. The presence of a fractal structure implies that many aggregate properties will show a power-law scaling. The scattering intensity profile obeys power-law behaviour at large q values, allowing the data to collapse to master curves for the aggregation kinetics data. The d_f value indicates the degree of compactness of a structure: if the particles aggregate in linear arrays, then the value of d_f would tend to approach 1; but if they form compact spherical aggregates, d_f would approach 3 (Bushell et al., 2002).

4.4.4. Temporal Evolution of the Size of Complexes

To gain deeper insight into the evolution and coarsening of the developing complexes, we have determined the averaged scattered light intensity $I_a(q)$, according to three ranges of q , namely $0.0124 - 0.042 \mu\text{m}^{-1}$, $0.05 - 0.67 \mu\text{m}^{-1}$ and $0.8 - 10.4 \mu\text{m}^{-1}$, was determined. The three ranges were assumed to represent contributions to the scattering attributable to large ($> 130 \mu\text{m}$), medium ($10-130 \mu\text{m}$) and small particles ($\sim 1-10 \mu\text{m}$). The final values of d_{43} and $d(v,0.5)$ for the formed complexes, as calculated automatically by the Mastersizer software, were also recorded.

Results were analyzed in terms of the temporal evolution of the turbidity, the scattered light intensity $I(q)$ and the apparent fractal dimension d_f of the formed complexes.

4.5. Results and discussions

4.5.1. Temporal Evolution of Turbidity and Reaction Kinetics

Figure 4.1 presents the turbidity evolution upon acidification for $r = 5$ and 15. The plot shows that the β lg - xanthan systems follows a two-step associative phase separation process as predicted by the theory of Tainaka (1979) for complex coacervation.

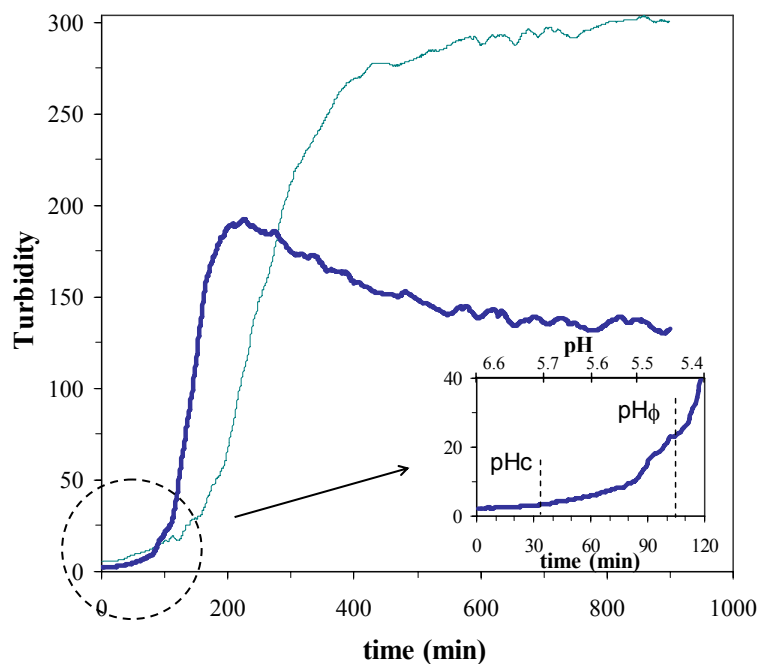


Figure 4.1. Temporal evolution of turbidity for $r = 5$ (—) and $r = 15$ (—). The inset shows an enlargement of the initial region for $r = 15$, indicating the positions of pH_c and pH_ϕ .

Average standard deviations are 5.3 and 2.9 for $r = 5$ and $r = 15$, respectively.

The measured values of pH_c and pH_ϕ are presented in Table 4.2. The pH_c value denotes the onset of the interaction that leads to the formation of soluble intrapolymeric complexes, (Park et al., 1992; Dubin & Murrell, 1988), it was taken as the point where a subtle, but distinct, increase in turbidity was detectable (inset to Figure 4.1), indicating an increase in size and/or concentration of the forming complexes. We find $pH_c = 5.76 \pm 0.03$ for all the systems studied at low ionic strength, indicating that it is independent of the

macromolecular ratio r (Table 4.2). It has been suggested that such complexation is controlled by the interaction of a single protein molecule and a single sequence of polymer segments. Consequently, the process does not follow a mass-action law, and pH_c should not be affected by r or M_w since it only depends on local charge densities and the intrinsic stiffness of the polymer chains, which are in turn controlled only by environmental conditions such as pH and ionic strength (Mattison et al., 1999 and 1995).

At pH_c , the acid has yielded its protons to enough of the carboxylate and amino groups on the protein to decrease the repulsive forces between the two molecules, so that electrostatic attraction is spontaneously supported. Since we have $\text{pH}_c \gg 5.1$, the IEP of βlg , it could be inferred that the electrostatic interaction starts with positively charged patches on the protein molecule surface providing enough binding sites for the xanthan. Similar effects have been observed in other protein-polyelectrolyte systems (Girard et al., 2004 and 2003; Weinbreck et al., 2003a; Mattison et al., 1999; Schmitt et al., 1999) and have been predicted by Monte Carlo computer simulations (Allen & Warren, 2004; Carlsson et al., 2003). Moreover, Girard et al. (2003) found that βlg possesses several charged patches, (including the 132-148 peptide, which is part of the α -helix) susceptible to taking part in complexation with polyanions above IEP. Incidentally, it was found (Schmitt et al., 2001) by dichroism measurements that, indeed, the βlg helix is at least partially lost during coacervation with the anionic acacia gum.

With further pH decrease and as charge neutralization of the primary complex is approached, $\text{pH}\phi$ is attained (inset Figure 4.1, Table 4.2). $\text{pH}\phi$ is characterized by an almost exponential increase in turbidity caused by extensive interpolymeric complexation and macroscopic phase separation (Park et al., 1992; Dubin & Murrell, 1988). At this stage, the protein charge density has increased enough for the mass action effects to be observed (Mattison et al., 1999). Accordingly, it was found that $\text{pH}\phi$ increased with r from 5.10 to 5.47 for $r = 2$ to $r = 15$ (Table 4.2). Complexes being neutralized sooner at higher r (more protein available for interaction) may explain this. Also, more protein can be bound onto the xanthan, and thus the charge per protein required to achieve complex neutralization decreases, resulting in an increase of $\text{pH}\phi$ (Mattison et al., 1999).

Table 4.2. Critical pH values determined from turbidity measurements for all the studied systems.

<i>βlg-xanthan ratio</i>	<i>pH_c</i>	<i>pHϕ</i>	<i>EEP</i>
2:1	5.78 ^a	5.10	N/A ^b
5:1	5.79	5.36	4.46
10:1	5.78	5.43	4.87 ± 0.04
15:1	5.75	5.47	4.92
5:1 X1	5.75	5.31	4.49
5:1 X4	5.74 ± 0.03	5.23	4.45
5:1 X12	5.79 ± 0.03	5.19	4.50

^a Standard Error $\leq \pm 0.02$, unless otherwise stated.

^b Not attained under the current conditions.

The sharp increase in turbidity after pH ϕ continued up to a peak for high protein systems ($r = 10$ and 15) or to a plateau for low protein systems ($r = 2$ and 5) (see Figure 4.1). This peak or plateau is attributed to the isoelectric point of the β lg - xanthan complex, also known as the stoichiometric electrical charge equivalence pH (EEP), where molecules carry similar but opposite charges, and complexation production is at its maximum (Mattison et al., 1999; Burgess, 1994). The decrease in turbidity for $r = 10$ and 15 is related to a reduced density of scattering entities, possibly as a result of flocculation due to protein over-aggregation (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3). It cannot be attributed to sedimentation since the dispersions were under continual stirring. For $r = 2$, the turbidity still seemed to be increasing at pH = 4.6, indicating that this system may have not yet fully attained its EEP. Despite the protein's IEP seeming to have no special significance for pH_c, we found that the EEP condition always took place after passing the IEP, and that it lay very close to it for high protein containing systems ($r = 10$ and 15 ; see Table 4.2). These results reveal that protein aggregation is present and forms an important part of the process, particularly for high protein content systems. The effect of a high protein content on complex characteristics was previously detected for the same system using chemical and microscopic analysis (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3).

4.5.1.1. Effect of the M_w of Xanthan Gum on Critical pH_c and pH_ϕ

Xanthan is known to form aggregates in solution by linkages at the end of the chains, and to form a tenuous network that has been compared to a weak gel (Capron et al., 1997; Morris, 1995; Kang & Pettitt, 1992); such structuring breaks up readily upon shearing (Morris, 1995). Previous studies have shown that microfluidization of xanthan dispersions results in the break-up of the aggregates and in a net reduction in the value of M_w , the thickening power, and the capacity to re-aggregate to different extents, depending on the severity of the treatment (microfluidizer pressure and number of passes) (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3). The principal characteristics of the xanthan samples tested in this study are presented in Table 4.1.

The associative phase separation process in systems containing microfluidized xanthan was found to start at the same pH_c (Table 4.2), indicating that the M_w of the polyelectrolyte had no noticeable influence on the initial step of complexation. This result is in agreement with previous studies, where it was proposed that the interaction is initiated at small patches on the protein surface involving short segments of the polyelectrolyte chain. Therefore, the value of M_w for the polyelectrolyte should have no effect on pH_c (Mattison et al., 1999 and 1995; Li et al., 1994).

On the other hand, pH_ϕ was found to decrease significantly with increasing severity of microfluidization treatment, from 5.36 ± 0.01 with native xanthan to 5.19 ± 0.02 with xanthan treated 12 times (Table 4.2). This result shows that the transition at pH_ϕ depends strongly on polyelectrolyte M_w (Li et al., 1994), which may be explained by the formation of smaller primary complexes, resulting from the lower M_w of the xanthan (Table 4.1) that serves as the backbone for the developing complexes. The formation of smaller intrapolymeric complexes would result in a weaker turbidity increase upon interpolymeric aggregation, thereby shifting the pH_ϕ to lower values. Accordingly, at the same r , final turbidity values were lower for samples containing microfluidized xanthan (e.g. $\sim 14\%$ turbidity reduction for samples containing X12). Moreover, the formation of smaller intrapolymeric complexes was observed from the beginning of the complexation process when microfluidized xanthan was used (section 4.5.2.1). It has been proposed that, when a

high M_w polyelectrolyte is used, the critical pH values are attained sooner due to a higher local concentration of protein molecules bound to a single chain (Shieh & Glatz, 1994).

4.5.2. Complex Size Evolution and Coarsening Kinetics

The evolution of the averaged scattered light intensity of small ($\sim 1\text{--}10\ \mu\text{m}$), medium ($10\text{--}130\ \mu\text{m}$) and large ($> 130\ \mu\text{m}$) particles for $r = 2, 5$ and 15 is presented in Figure 4.2a-c. This approach allows us to gain deeper insight into the evolution and coarsening of the developing complexes. For all the studied values of r , it could be observed that once pH_c was attained, the number of small and medium-sized particles, assumed to be intrapolymeric complexes, increased rapidly while the number of large particles decreased. The reduction in the scattered intensity due to large particles at the early times (Figure 4.2) may be in part ascribed to the formation of more compact primary complexes. As more protein binds to the xanthan molecule, a reduction of the net internal repulsion between the polyelectrolyte segments occurs resulting in the collapse of the polyelectrolyte chains. This loss in conformational entropy is partly compensated for by the release of counter-ions and occluded water generating compact structures (Weinbreck et al., 2003a; Tolstoguzov, 1996; Tsuboi et al., 1996; Li et al., 1994). The reduction in size of the complexes has also been noticed through viscosity measurements (Weinbreck et al., 2003a; Dautzenberg, 2000; Laneuville et al., 2000 – Chapter 3). Additionally, a decrease in number of large particles at early times was observed in the protein and xanthan control samples (results not shown); this can be attributed to dissolution of GDL crystals.

The production of primary complexes increased up to a peak occurring around pH_ϕ (indicated by a dashed line in Figure 4.2a-c). At this point large interpolymeric complexes begin to form (sharp increase in large particles for $r = 5, 10$ and 15) at the expense of the primary complexes (decrease in smaller particles). For the lowest protein content system ($r = 2$), the increase in the number of large particles was less steep, indicating a slower reaction rate. Subsequently, the number of interpolymeric complexes continue to increase slowly (Figure 4.2a) down to the lowest pH attained in this study ($\text{pH} = 4.4$), and thus the complexation process for this ratio may have not been completed. For higher protein

content systems ($r = 5$ and 15 , Figure 4.2b and Figure 4.2c, respectively) the coarsening process followed a more complex path: after $\text{pH}\phi$ the number of interpolymeric complexes increased abruptly up to a peak, soon after which the protein's IEP was attained. For $r = 5$, a plateau was attained at $\text{pH} = 4.55 \pm 0.02$ (min ~ 600) (Figure 4.2b) indicating the stabilization of domain growth. This is probably due to the saturation of reactive sites, caused by a stoichiometric composition of the neutralized complex (electrostatic equilibrium) which would not allow any further number of protein molecules to bind to the polysaccharide and so forces the complexes to reach a maximum size (Mattison et al., 1999). This stabilization always took place after the proteins IEP. The results presented in Figure 4.2a-c are in accordance with the mechanism of a two-step complexation, where interpolymeric complexes (large particles) grow at the expense of smaller ones (intrapolymeric complexes).

For $r = 15$, a second coarsening phase was observed at $\text{pH} = 4.51 \pm 0.01$ (time ~ 500 min) (Figure 4.2c) in which very large particles formed while small and medium-sized particles were almost completely depleted from the system. This time interval corresponds to the decrease in turbidity after the peak corresponding to the EEP for this system (Figure 4.1). In the $\beta\text{lg} - \text{xanthan gum}$ system, the neutralized complexes obtained at non-stoichiometric ratios are destabilized by the excess component causing a secondary aggregation. This is contrary to previous studies where it was found that the excess component stabilized the neutralized core against secondary aggregation (Dautzenberg, 2000). We argue that the major component can be incorporated in excess into the complex only up to a certain level, after which secondary aggregation is induced. This explanation is supported by the results found for $r = 10$ and 15 , where a plateau precedes the second coarsening (Figure 4.2c). This plateau may correspond to the time where excess protein is binding to the complex, before being completely destabilized due to the reduction of repulsive forces caused by protein over-aggregation onto the complex (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3). The ratio 10:1 presents intermediate behaviour between $r = 5$ and 15 , with a less dramatic second coarsening (results not shown).

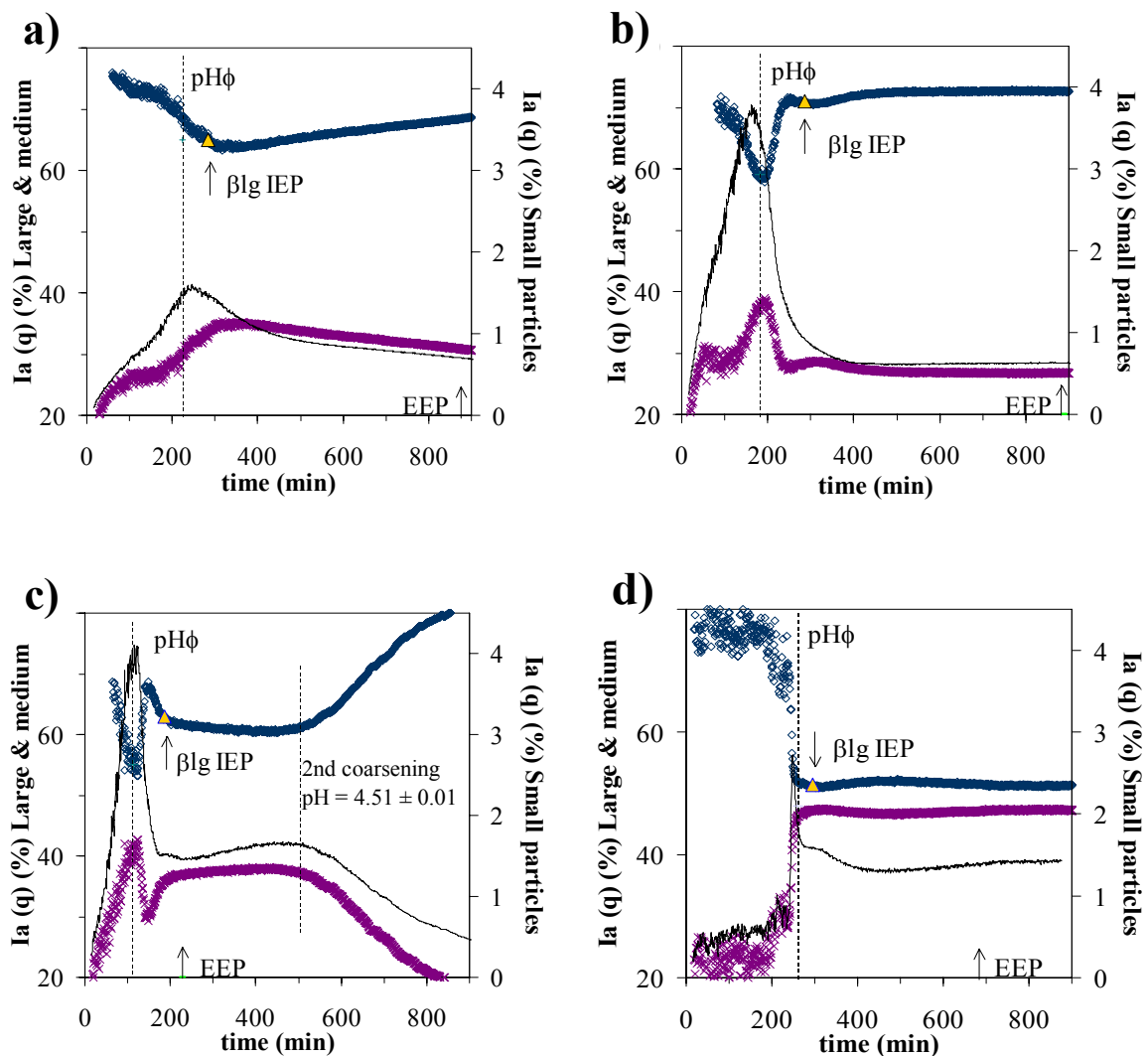


Figure 4.2. Evolution of the averaged scattered light intensity $I_a(q)$ from large ($> 130 \mu\text{m}$) (\diamond), medium-sized ($10\text{-}130 \mu\text{m}$) (\times) and small ($\sim 1\text{-}10 \mu\text{m}$) (---) particles for (a) $r = 2$, (b) $r = 5$, (c) $r = 15$, and (d) $r = 5$ with xanthan X12. Critical $\text{pH}\phi$ values are indicated by the dashed vertical lines, the isoelectric point of βIg (IEP) and of the complexes (EEP) are indicated by the arrows. Mean standard deviations are ≤ 4.0 for large and medium-sized particles, and ≤ 0.1 for small particles.

From Figure 4.2a through Figure 4.2c it can be deduced that the process of complex coarsening occurs faster at high protein content. This is caused by at least two driving forces: (1) mass action equilibrium: at high r the reaction is faster since more protein is

available to interact and saturate the xanthan gum; and (2) higher viscosity in systems at lower r (a higher proportion of xanthan gum) may have reduced the collision rate between molecules and therefore hindered faster growth (Mattison et al., 1999; Park et al., 1992). Accordingly, $pH\phi$ is reached sooner for high r (Table 4.2), indicating that the critical amount of bounded protein needed to initiate interpolymeric complexation is achieved sooner (Park et al., 1992).

4.5.2.1. Effect of the M_w of Xanthan Gum on Complexes Size

Figure 4.2d presents the complex size evolution for a system with xanthan microfluidized 12 times (sample X12). In general, when microfluidized xanthan samples were used, the increase of scattered light from small particles (intrapolymeric complexes) upon arrival to pH_c was lower, especially for X4 and X12, compared to the system where native xanthan was used, presumably as a result of smaller scattering entities. The transition to form interpolymeric complexes at $pH\phi$ also occurred after the peak in small complex production. However, large particles continued to disappear while medium-sized complexes were produced, and both factions tended towards the same final equilibrium size (Figure 4.2d). This reveals that the intrapolymeric and interpolymeric complexes were much smaller when microfluidized xanthan was used. Accordingly, the final d_{43} and $d(v,0.5)$ values (Table 4.3) were reduced with the number of passes through the microfluidizer.

Previous studies (Wang et al., 2000; Li et al., 1994; Shieh & Glatz, 1994) have also shown that an increase in the polymer M_w results in the formation of larger primary complexes that aggregate more readily into interpolymer complexes, presumably due to the higher gain in entropy (Tainaka, 1979) or to bridging effects (Shieh & Glatz, 1994).

Therefore, the final size of the complexes can be controlled by adjusting the size of the polyelectrolyte. Accordingly, the production of smaller complexes when microfluidized xanthan samples are used shows that the severity of the microfluidization treatment prior to complexation allows us to control the size of the complexes from the beginning of the production. Nevertheless, it should be noted that the acidification procedure also influences the structure and size distribution of protein – xanthan gum complexes. In this study, the

effect of M_w could be detected due to the use of GDL, which provides a slow and uniform acidification. As a result, more homogeneous complexes are formed compared to complexes obtained in previous work where HCl was used for acidification (Laneuville et al., 2000). The former results had lead us to hypothesize that the initial r value had an overwhelmingly high effect on the size of the complexes, masking the effect of M_w (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3). However, it is now evident that the acidification method used also had an impact on our results.

Table 4.3. Characteristics of the intermolecular complexes for all the studied systems.

<i>βg-xanthan ratio</i>	<i>d_{43} (μm)</i>	<i>$d(v, 0.5)$ (μm)</i>	<i>Λ (μm)</i>	<i>Final d_f</i>	<i>β</i>
2:1	18.9 \pm 0.7	13.5 \pm 0.6	360 \pm 2	2.25 ^a	2.5 \pm 0.3
5:1	24.5 \pm 0.5	19.0 \pm 0.4	233 \pm 20	2.23	10.2 \pm 0.1
10:1	17.3 \pm 2.8	10.7 \pm 0.3	467 \pm 40	2.30	12.8 \pm 0.4 [§]
15:1	70.3 \pm 20	19.8 \pm 5.7	730 \pm 42	2.37	11.8 \pm 0.8 [§]
5:1 X1	14.3 \pm 0.4	11.8 \pm 0.5	213.0 \pm 18	2.26	15.1 \pm 0.2
5:1 X4	13.4 \pm 0.7	11.5 \pm 0.6	106.5 \pm 20	2.46	14.5 \pm 0.8
5:1 X12	10.5 \pm 0.2	9.2 \pm 0.1	81.5 \pm 6	2.53	30.1 \pm 0.8

^a Standard Error $\leq \pm 0.02$, unless otherwise stated.

[§] Values before the 2nd coarsening process

Furthermore, the use here of GDL allows the formation of particulated complexes even when native xanthan was used, instead of the fibrous complexes obtained at the same concentration when HCl is used for acidification (Le Hénaff, 1996; Chen et al., 1989). Therefore, to develop further the previously presented hypothesis for the formation of fibrous complexes of protein with native xanthan (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3), we propose that in addition to the association pattern of xanthan (i.e., weak associations at the end of the chains) acting as the guide for fibre formation, a fast complexation with proteins should occur to fix in place the fibrous structure. In this context, a rapid interaction and not a gradual one is essential. Such rapid interactions may be induced by an abrupt local decrease in pH, e.g. by adding a sufficiently concentrated acid, even if it is slowly

incorporated (as shown by the results of Chen & Soucie, 1985), in the presence of an adequate protein quantity, otherwise the forming fibres would be subsequently torn apart due to insufficient fibre formation would be optimal, as previously found (Chen et al., 1989; Chen & Soucie, 1985). Evidently, a large chain length of the polyelectrolyte is essential to form fibrous complexes, and low M_w molecules will tend to form particulated complexes (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3; Tsuchida et al., 1976). Another important parameter to consider is the total solids concentration: below a certain critical macromolecular concentration (c_r), fibre formation is suppressed since xanthan molecules are too far apart for bridging to occur. In the β lg-xanthan gum system, we have $c_r < 0.1$ wt%. The effect of other factors influencing fibre formation, such as the degree of shearing, temperature and ionic strength, are consistent with this model.

4.5.3. Temporal Evolution of the Scattering Profiles: Phase separation mechanism

Time-resolved light-scattering profiles are shown for $r = 2$ and $r = 15$ in Figure 4.3 and Figure 4.4, respectively. In each plot the phase separation progress is presented over time in the following order: (a) early (before $\text{pH}\phi$), (b) intermediate and late (after $\text{pH}\phi$) stages of complexation and (c) second coarsening for $r = 15$. The scattered light intensity for all r presents a similar profile at the early and intermediate times of measurement. Conversely, in the late stages of coarsening, systems with a low protein content ($r = 2$ and 5) seem to approach or reach equilibrium, while systems with a high protein content ($r = 10$ and 15) become destabilized as the second coarsening is reached.

Initially, all samples present a correlation peak (I_{max}) located at a constant scattering q_{max} value between 0.0175 and 0.0147 μm^{-1} (Figure 4.3a and Figure 4.4a). On attaining $\text{pH}c$, as determined by turbidity measurements, the $I(q)$ was found to increase faintly, in the intermediate q region between 0.0295 and 4.159 μm^{-1} , after an induction time that increased from ~ 30 min to ~ 90 min as r decreased from 15 to 2. Then, around $\text{pH}\phi$, I_{max} increased almost exponentially as phase separation progressed, indicating an increase in the total number and size of structural domains, whereas q_{max} shifted very slightly to smaller q

values, only shortly after $pH\phi$, and remained constant at $q = 0.0124 \mu\text{m}^{-1}$, for ~ 150 min (Figure 4.3b and Figure 4.4b).

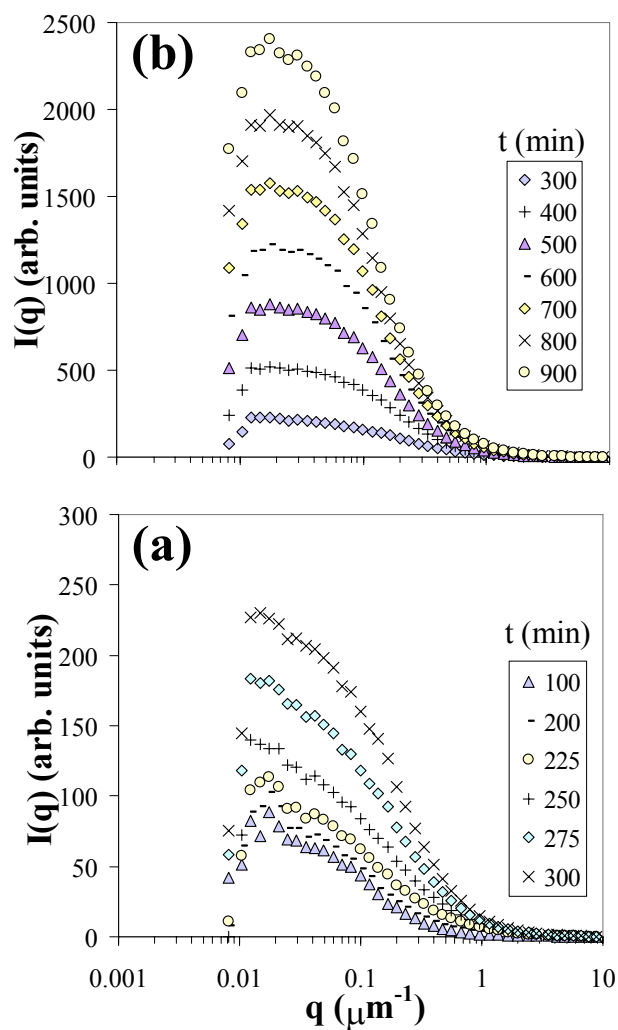


Figure 4.3. Time evolution of light scattering profiles $I(q)$ for $r = 2$ after onset of interaction ($pH_c \sim 65$ min, $pH\phi \sim 225$ min): (a) 100–300 min; (b) 300–900 min.

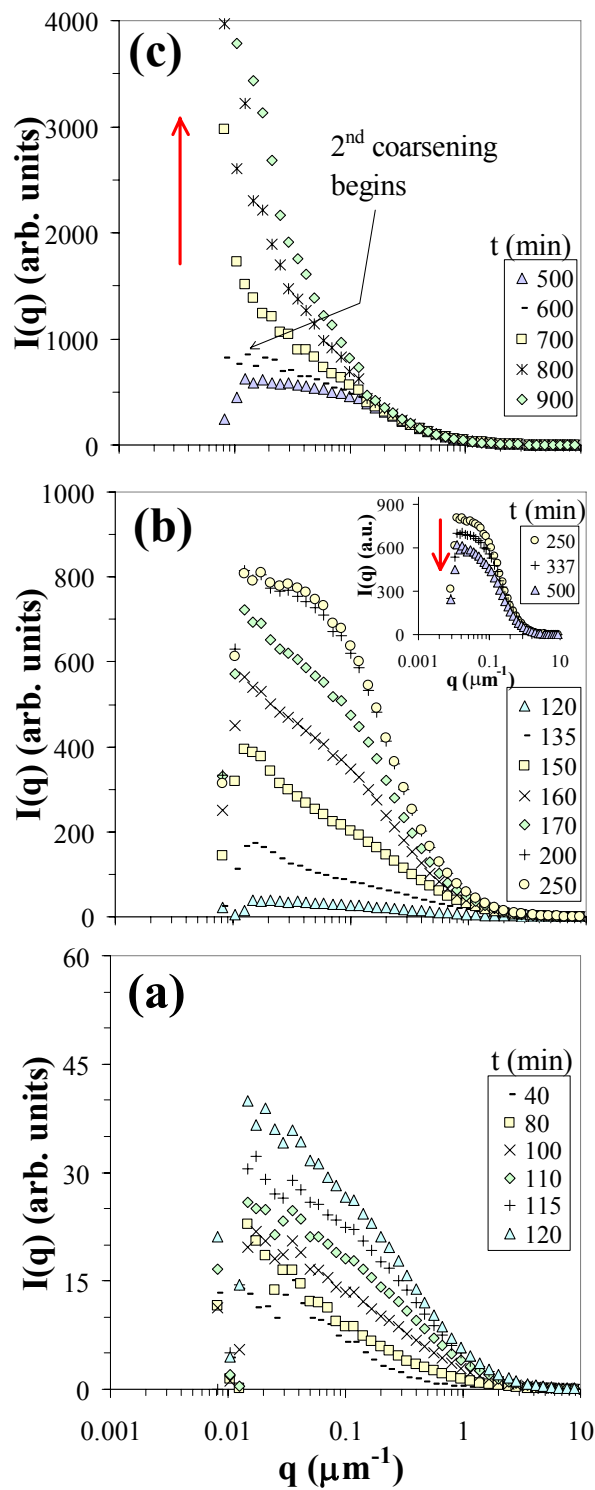


Figure 4.4. Time evolution of light scattering profile $I(q)$ for $r = 15$ after onset of interaction ($pH_c \sim 50$ min, $pH_\phi \sim 115$ min): (a) 40–120 min; (b) 120–500 min; (c) 500–900 min.

The evolution of I_{\max} as a function of time for $r = 5$ and 15 is shown in Figure 4.5. In all cases, the I_{\max} increase after $\text{pH}\phi$ can be expressed approximately by a power relation of the type $I_{\max}(t) \propto t^\beta$. The estimate values of β are presented in Table 4.3. These values are well above the 1 or 3 values predicted for classical SD or NG in the intermediate and late times of coarsening (Binder, 1991). Higher β values indicate a higher reaction rate. It was found that the complexation rate was proportional to the amount of protein in the system. In other words, coarsening appears slower in systems with high proportion of xanthan. This was also evident from the lower structuration rate of $r = 2$. High values of β have been also found in systems undergoing polymerization-induced phase separation (Chen et al., 1998).

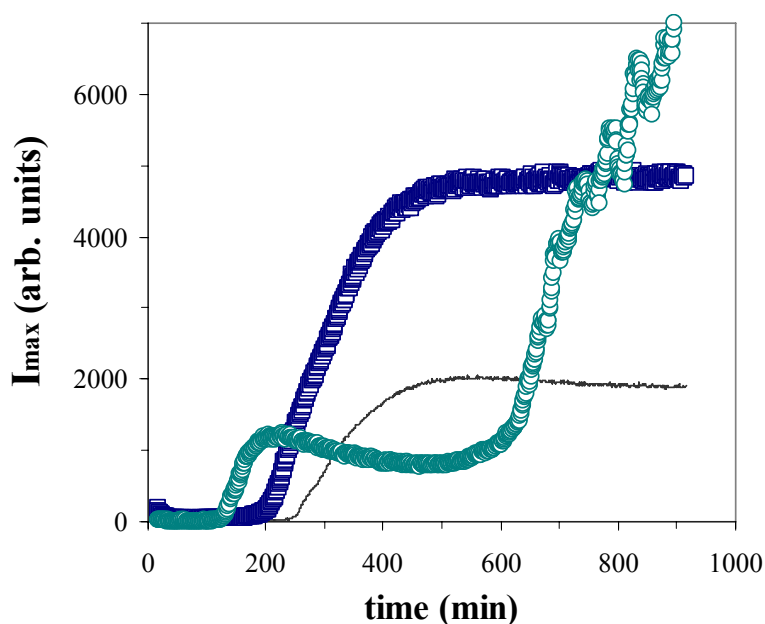


Figure 4.5. Temporal evolution of I_{\max} for $r = 5$ (\square), $r = 15$ (\circ), and $r = 5$ with X12 ($—$).

In the intermediate stages of coarsening (Figure 4.3b and Figure 4.4b), the region between $q = 0.0295$ and $0.334 \mu\text{m}^{-1}$ became stronger and formed a shoulder, while I_{\max} continued to increase. Subsequently, q_{\max} shifted to larger values starting at 500 and 250 min, for $r = 2$ and 15 respectively (Figure 4.3b and Figure 4.4b). At this stage, the systems contained a sort of bimodal cluster distribution. The presence of a shoulder is consistent with the formation of smaller primary complexes, detected at shorter wavelengths, which act as

nuclei for the formation of larger interpolymeric complexes detected at larger wavelengths. A similar pattern was found in all the studied systems. The q_{\max} is related to a characteristic length scale ($\Lambda = 2\pi/q_{\max}$), which corresponds to the main domain size (periodic structure) being formed. The final Λ values increase with protein content (Table 4.3).

A major difference was evident in the late stages of coarsening between systems with low ($r = 2$ and 5) or high ($r = 10$ and 15) protein content. For low protein content systems, the I_{\max} growth leveled off, at times > 550 min for $r = 5$ (Figure 4.5), indicating a stabilization of domain growth when approaching the EEP $\sim 4.46 \pm 0.02$. Accordingly, a plateau in the turbidity (Figure 4.1) and the complex size (Figure 4.2b) was found at the late times of interaction for this $r = 5$. The same pattern was followed at $r = 2$, but for the latter system the equilibrium plateau had not been fully attained at the end pH of this study. On the other hand, for high protein content systems, after a shorter shift of q_{\max} to higher values, I_{\max} effectively stopped its increase between 230 and 250 min (inset to Figure 4.4b). This may be due to the attainment of a transient electrostatic equilibrium in this mixture, which coincides with the short plateau attained in the complexes sizes (Figure 4.2c, 220 to 250 min, pH = 4.8 to 4.9), just before the beginning of the second coarsening. As pH decreased further, the interpolymeric complexes continued to incorporate the excess protein in solution until a certain limit after which, massive aggregation was induced. The second coarsening began with a decrease in the scattered light intensity in the small q range, between 250 and 500 min for $r = 15$ (inset Figure 4.4) suggesting a clustering of the complexes into larger structural domains. Then, I_{\max} resumed its increase at min ~ 550 min, while q_{\max} shifted towards smaller angles until it moved out of the measurement window (Figure 4.4c). This coincides with the sharp increase in turbidity (Figure 4.1) and the depletion of small particles (Figure 4.2c) at times > 500 min. A similar decrease in $I(q)$ was observed in a system of β lg and acacia gum prior to a second growth phase (Sanchez et al., 2002). Conversely, other studies have found that in complexes of protein and strong polyacids, the domain size was independent on protein concentration (Hone et al., 2000).

The profiles presented in Figure 4.3 and Figure 4.4 are different from classical NG mechanism where a monotonic decrease in $I(q)$ with q is expected. However, the presence

of a peak during NG has been reported in experimental (Eliçabe et al., 1997; Butler, 2002) and numerical simulation studies (Maughey et al., 2001), where its development at high volume fractions has been attributed to the formation of a depletion layer around the forming nuclei and/or to multiple scattering. A peak related to NG has also been reported for systems undergoing polymerization-induced phase separation (Zhang et al., 1999; Chen et al., 1998; Eliçabe et al., 1998). Moreover, the presence of a shoulder or a secondary peak, with the concomitant shift of q_{\max} toward large values is present for some of these systems. It was proposed that the formation of newer domains in the interdomain region would cause the shift of the scattering function to higher scattering angles due to a decrease of the average spacing between particles (Butler & Heppenstall-Butler, 2003b; Butler, 2002; Zhang et al., 1999; Chen et al., 1998; Eliçabe et al., 1998 and 1997). The development of a shoulder has been recently reported during β lg – pectin complexation and attributed to the formation of smaller assemblies resulting from a NG mechanism (Girard et al., 2004).

Several characteristics have led us to classify the initial phase of this interaction as being associated with the NG mechanism, i.e., the lag time between pHc and the start of $I(q)$ increase, and the stability of q_{\max} at the intermediate times followed by the later shift to larger values. The presence of a correlation length scale is related to the formation of primary complexes, possibly xanthan-rich nuclei, surrounded by a layer depleted in protein. The shoulder is assumed to result from the continual formation of smaller scattering bodies (primary complexes) as nucleation proceeds. Correspondingly, the production of intrapolymeric complexes is around its maximum when the shoulder begins to gain strength (e.g. compare Figure 4.2a - scattering due to small particles and Figure 4.3a, min 300).

Dynamical scaling of the scattering function was checked by plotting $I(q)/I_{\max}$ against q/q_{\max} . When dynamical scaling holds, all the scattering data collapses onto a single master curve. Scaling was found only for low r , and at long enough complexation times, when complexes were close to their equilibrium composition. Similar effects were found in polymerization-induced phase separation (Butler, 2002). The inset in Figure 4.7 shows the collapse of the data for $r = 5$ at times well beyond $\text{pH}\phi$. For high r , a transient scaling, with

a pattern similar to that obtained at low r , was found before the second coarsening process. Afterwards, the continuous changes in the coarseness of the system hindered dynamic scaling.

4.5.3.1. Effect of the M_w of Xanthan Gum on the Scattering Profiles

The $I(q)$ profiles for samples at $r = 5$ with microfluidized xanthan presented a similar behaviour to the system with native xanthan except that the reaction proceeded more rapidly, i.e., the β values are higher (see Table 4.3). It was found that the maximum $I(q)$ attained was lower with lower M_w (Figure 4.6, with different scale on the axis).

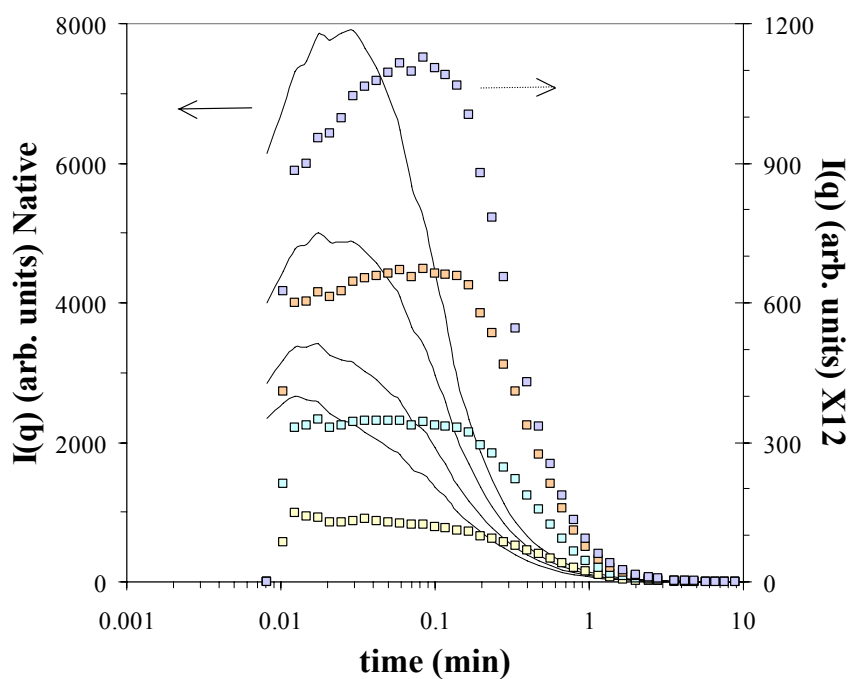


Figure 4.6. Temporal evolution of $I(q)$ for $r = 5$ with native xanthan XG (—) and for $r = 5$ with xanthan X12 (\square). Times depicted are from bottom to top: 290, 310, 360 and 800 min (pH \approx 5.1 to 4.5).

Interestingly, the region of q at which the shoulder was found to develop, appears at larger q values with decreasing xanthan M_w (see Figure 4.6). It has been proposed that during NG, the formed nuclei will have a correlation length of the order of the largest species in the

system (Eliçabe et al., 1997). Furthermore, the final Λ values decreased with decreasing xanthan M_w (Table 4.3). Therefore, the xanthan molecule acts as the support for the formation of primary complexes and determined the final size of the interpolymeric complexes, i.e., the final size is proportional to the M_w of the polyelectrolyte.

4.5.4. Apparent Fractal Dimension and Cluster Morphology

Figure 4.7 shows similar data to that presented in Figure 4.3 and Figure 4.4, but in a double logarithmic scale for $r = 5$ at times beyond $\text{pH}\phi$. The scattering curves display an increasingly linear relationship over more than a decade in the q range $> 0.65 \mu\text{m}^{-1}$, which is a signature of the scattering from a mass fractal object (Kim & Berg, 2000). As the complexes grow in size, the curved transition from the Guinier regime (plateau at small q values) to fractal scattering migrates to lower q , while the scattered light intensity in the fractal regime increases as the mass of the average aggregate increases, showing that the final structure has not yet been fully developed (Bushell et al., 2002; Kim & Berg, 2000). At sufficiently long complexation times, the $I(q)$ in the power-law region remains unchanged indicating a conservation of mass over this range of length scales. At this stage, information about the internal structure (compactness) of the aggregates, in this case βlg -xanthan complexes, can be determined by measuring the apparent fractal dimension d_f from the slope at large q values using the power-law $I(q) \sim q^{-d_f}$. At the beginning of complexation the measured values are not a real fractal dimension, as given in the strict definition of a fractal structure (Kim & Berg, 2000), since the complexes are still evolving and have not yet attained equilibrium. Nevertheless, over small periods of time (i.e., of the order of 5-10 min in this work, due to the very slow acidification), the formed structures are relatively stable, and it is possible to measure an “apparent” d_f from the slope at large q values after pHc , in order to estimate the morphology of the intrapolymeric complexes.

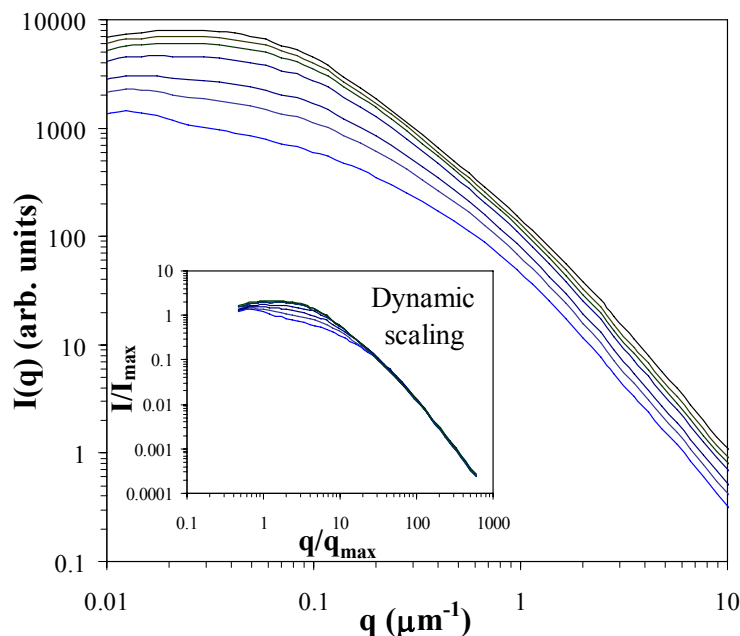


Figure 4.7. Time evolution of light scattering profile $I(q)$ for $r = 5$ after $\text{pH}\phi$ in a double logarithmic scale. Inset: dynamic scaling of the same data. The deviation at low q values reveals the breakage due to shear forces on large length scales. Times depicted are from bottom to top: 250, 275, 300, 350, 500 and 900 min.

The evolution of the apparent d_f over the course of acidification for different r is presented in Figure 4.8. The complexes underwent a restructuring process in several stages, starting with the formation of diffuse aggregates (aggregation of nucleated primary complexes) with $d_f = 1.65 \pm 0.02$ for $r = 2$ and $d_f = 1.90 \pm 0.05$ for $r = 5, 10$ and 15 , indicating a diffusion-limited cluster aggregation mechanism (DLCA). This type of mechanism occurs when repulsive forces are negligible, and the model assumes that collision always result in irreversible sticking, causing particles to stick upon contact. Loose and highly tenuous structures are formed and the aggregation proceeds very rapidly (Tang et al., 2000). At $\text{pH}\phi$ a rapid compaction of the structure occurs, showing that the interpolymeric complexes are denser than the primary complexes. Then, a slight loosening of the structure occurs around the protein's IEP (especially at high r) (Figure 4.8), followed by a gradual reorganization towards equilibrium.

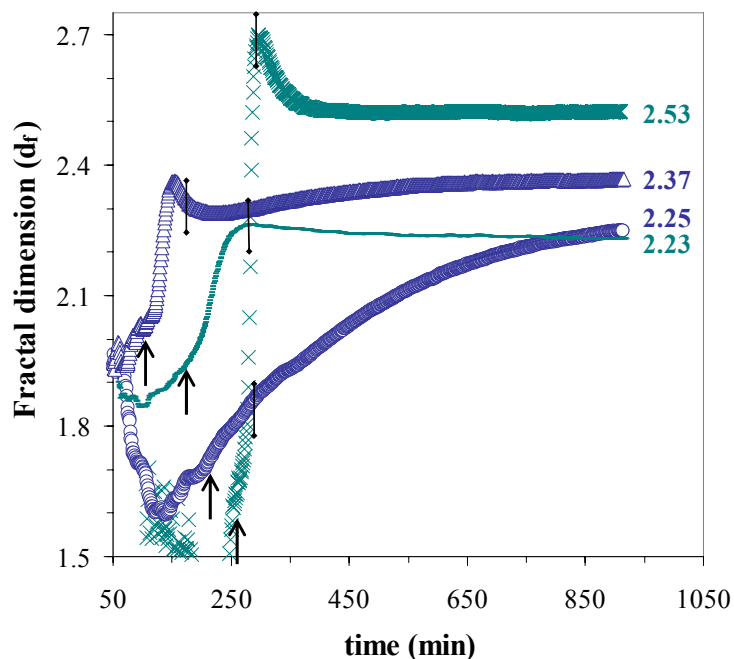


Figure 4.8. Temporal evolution of the apparent fractal dimension d_f during associative phase separation and coarsening for $r = 2$ (○), 5 (—), 15 (△) and $r = 5$ with xanthan gum X12 (×). Critical $\text{pH}\phi$ values are indicated by arrows and the protein IEP values by bars.

The error bars are smaller than data points after \sim min 100.

The final structures of the interpolymeric complexes (Table 4.3) appear more compact than the values predicted by the classical DLCA and RLCA regimes ($d_f = 1.78$ and 2.1, respectively) (Tang et al., 2000). These models assume irreversible aggregation with an infinite interparticle attraction. However, several studies of polyelectrolyte complexes with proteins (Sanchez et al., 2002; Dautzenberg, 2000) and mixed micelles (Li et al., 1994), as well as aggregation of biological molecules (Molina-Bolívar et al., 1998) produce clusters with higher d_f . It has been suggested that compact structure formation is driven by excluded volume effects and entropy loss factors, since binding induces a loss of conformational entropy on the polyelectrolyte chains. This loss is compensated for to some extent by the release of occluded water and bound counter-ions from both the protein and polyelectrolyte (Burgess, 1994; Li et al., 1994). This also compels the xanthan molecules to try to retain their original overall conformation, forcing protein molecules to occupy the space between

segments. As a result, compactness of the complex will tend to increase with increasing r , especially in pure water, due to the screening of the Coulombic interactions, leading to rearrangements into denser complexes (Dautzenberg, 2000; Li et al., 1994).

Accordingly, d_f was found to be affected by r in this way (Table 4.2). The formation of dense complexes at high r is a geometric effect. As the number of large negative particles increases ($r = 2$), the packing density and the fractal dimension decrease, because relatively few smaller positive particles are available to fill in the spaces between the negative particles. Similar trends have been found during the aggregation of biomacromolecules (Dautzenberg, 2000) and colloidal particles (Kim & Berg, 2000). For $r = 15$, the form of $I(q)$ is still a power law, but it decreases in amplitude after reaching pH 4.80 (min 250), as very large complexes are produced during the secondary aggregation. The effective d_f value remains essentially unchanged during the second coarsening process, indicating that the changes detected by turbidimetry (Figure 4.1) and scattering profiles (Figure 4.4c) occurred at large length scales, i.e., at the cluster-cluster level, with no change on the basic structure of the complexes.

The compaction of the structures during complexation may be explained by results from experimental and numerical studies from rapid aggregation processes, where aggregate structures with an initial lower d_f can restructure into more compact clusters (Kim & Berg, 2000; Molina-Bolívar et al., 1998). Initially, when the interparticle interactions are weak (e.g., the protein has a low surface charge density), as is the case at the beginning of the complexation process, for $\text{pH} \gg \text{pH}_\phi$, the salt linkages formed between protein and polyelectrolytes are very loose (Tsuboi et al., 1996; Kokufuta, 1994) and the particle clustering may be considered reversible (Molina-Bolívar et al., 1998). As a result, soluble complexes may be able to loosen and re-form repeatedly after the first collision, allowing protein rearrangements to take place and leading to denser clusters through a restructuring process. As the pH decreases, an increase of the interparticle attractive energy, due to an increase of opposite charges with acidification, may favor the progressive compaction of the structure (Molina-Bolívar et al., 1998). This effect may be supported by the fact that the value of d_f increased more rapidly for $\text{pH} < 5.2$, where both βlg and xanthan carry net

opposite charges. Accordingly, recent studies on protein – polysaccharide complexes (Weinbreck et al., 2003b), have found that spontaneous rearrangement occurs over time (without any external forces) to produce the most favorable state of protein co-operative binding (Mattison et al., 1999; Tolstoguzov, 1996).

The restructuring process may have been amplified by shear, which provides a supplementary driving force for reorganization. Studies made on diverse molecules and colloidal materials have shown that shearing strongly influences the packing geometry and the tendency for aggregates to restructure (Bushell et al., 2002; Marsh et al., 2001; Selomulya et al., 2001; Bushell & Amal, 2000; Kim & Berg, 2000). This effect has been attributed to a selective break-up that removes the weaker and more porous parts of the aggregates, followed by re-aggregation and internal rearrangement processes which leads to denser structures and lower final equilibrium sizes (Marsh et al., 2001; Selomulya et al., 2001; Bushell & Amal, 2000; Kim & Berg, 2000). The break-up due to hydrodynamic forces tends to occur at larger length scales, i.e., once the aggregates are big enough, and at sufficiently high shear-rates (Sanchez et al., 2002 and 2001; Marsh et al., 2001; Selomulya et al., 2001; Bushell & Amal, 2000). On small length scales, the differential velocity of the fluid is low and no restructuring can occur (Bushell & Amal, 2000; Kim & Berg, 2000).

A similar effect could be observed in the β lg - xanthan system under shear. As can be seen in Figure 4.2b for $r = 5$, after $\text{pH}\phi$ has been attained, large complexes begin to form up to a point where the critical size at which shear forces have an effect is reached, and selective break up of the structures occurs (decrease in large particles ~ 250 min). This effect is more noticeable at higher r . In the scattering intensity profiles this effects can be seen in the insert of Figure 4.7. The time range presented in this figure ($t = 250$ to 350 min) coincides with the decrease in the scattered light from large particles after the peak following $\text{pH}\phi$ (Figure 4.2b). A slight deviation from scaling is observed at the larger length scales, i.e., changes are occurring closer to the edge of the complexes. At large q values, the d_f remains unchanged. Several authors have reported this deviation in the scattering profiles of aggregates subjected to shear, and have attributed it to a restructuring process induced by hydrodynamic forces (Bushell et al., 2002; Marsh et al., 2001; Selomulya et al., 2001). This

shows that the size and structure of interpolymeric complexes are determined by restructuring processes driven by a competition between attractive electrostatic forces and the rupture forces caused by the flow.

4.5.4.1. Effect of the M_w of Xanthan Gum on the apparent d_f

In systems where microfluidized xanthan gum was present, the initial intrapolymeric complexes formed at pHc were more tenuous, with d_f ranging from 1.8 ± 0.02 to 1.5 ± 0.03 for xanthan treated from one to twelve times, respectively (Figure 4.8). The subsequent restructuring yielded interpolymeric complexes with a more compact structure compared to the complexes obtained with native xanthan (Table 4.3). As discussed previously, the xanthan molecules of lower M_w will tend to form more compact structures, since their entropy loss is lower.

4.6. Conclusions

Associative phase-separation kinetics and cluster morphology of β lg-xanthan complexes produced under steady shear conditions were studied by static light scattering. The complexation kinetics for this system followed a nucleation and growth mechanism resulting in the formation of fractal structures. The correlation length observed in the scattering profiles may be the result of the formation of a xanthan-rich nucleus surrounded by a layer depleted in protein. The interaction between β lg and xanthan starts at positively charged patches on the protein surface, before reaching the isoelectric pH of β lg. Primary complexes with a diffuse structure form initially, and they subsequently aggregate into more dense interpolymeric complexes. The compactation of the complexes over the course of interaction may reflect their susceptibility to restructuring due to external forces (pH and shear) and internal processes (co-operative protein binding). The β lg - xanthan ratio has an important effect on the reaction rate, and the internal structure and average size of the formed complexes, principally as the result of mass-action equilibrium. Moreover, the complexes could bind excess protein only to certain extent, after which the system was destabilized due to the decline of repulsive forces caused by protein over-aggregation onto

the complex. Finally, varying the M_w of xanthan also permits to control the characteristics of the resulting complexes. Notably, the mean size of the complexes was found to be proportional to the M_w of the polyelectrolyte.

4.7. Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from NSERC industrial chair and industrial partners Agropur, Novalait Inc., and Parmalat.

*“The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries, is not
'Eureka!' but 'That's funny ...' ”*

Isaac Asimov (1920 - 1992)
Auteur américain d'origine russe

Chapitre 5

Cold gelation of β -lactoglobulin induced by electrostatic attractive interaction with xanthan gum

S.I. Laneuville¹, S.L. Turgeon^{1,*}, C. Sanchez², and P. Paquin¹

¹ Dairy Research Center STELA. Faculty of agriculture and food science. Université Laval, Pavillon Paul - Comtois, Québec, Canada, G1K-7P4. * Telephone: (418) 656-2131 ext. 4970. Fax: (418) 656-3353. E-mail: Sylvie.Turgeon@aln.ulaval.ca

² Laboratoire de Physico-Chimie et Génie Alimentaires, INPL-ENSAIA, 2 Avenue de la Forêt de Hayes, BP172, 54505 Vandœuvre-lès-nancy, Cedex, France.

Sera soumis au journal « *Macromolecules* » ou à « *Langmuir* ».

5.1. Résumé

Le mécanisme et la cinétique de la gélification à froid des mélanges de β -lactoglobuline et xanthane en milieu aqueux est présenté. La concentration en solides totaux, par laquelle une gélification est obtenue, est très faible (0.1% p/p) comparativement aux concentrations normalement testées lors de la production de gels mixtes à base de protéines et polysaccharides (4-12% p/p). Ceci est, à notre connaissance, la première fois que des protéines et des polysaccharides possédant des charges électriques opposées sont rapportées formant une structure gélifiée, sans l'application d'un traitement thermique qui dénature la protéine, et ce à des concentrations aussi faibles. Des études par diffusion statique de la lumière et rhéologie dynamique ont permis de déterminer la cinétique de gélification. Il a été trouvé que le processus de gélification s'initiait en suivant un parcours similaire à celui obtenu lors d'une séparation de phases associative, i.e., la formation de complexes primaires suivie de la formation de complexes interpolymères. Cependant, dans ce cas-ci, les complexes interpolymères étaient capables de former des amas et des zones de jonction qui résultaient en la fixation de la structure au point de gel. La structuration de la solution par le xanthane, même à ces faibles concentrations, semble avoir joué un rôle dans le processus de gélification. Du fait que les gels formés sont de nature électrostatique, un pH et un ratio macromoléculaire optimal, pour lesquels la stabilité des gels est maximale, ont été trouvés. Ceci a été relié à l'existence d'un pH de charge stœchiométrique, où les molécules d'espèces différentes ont des charges égales mais de signes opposés et, dans ce cas, les interactions entre protéines et polysaccharides sont à leur maximum.

5.2. Abstract

The mechanism and kinetics of the cold gelation of β -lactoglobulin – xanthan gum mixtures in aqueous solution is reported. The total biopolymer concentration at which gelation was obtained was extremely low (0.1 wt%) compared to the usually tested concentrations for protein - polysaccharide mixed gels (4-12 wt%). This is, to our knowledge, the first time that oppositely charged proteins and polysaccharides are reported to form a gel without applying any heat treatment to denature the protein and at such low concentrations. Static light scattering and viscoelastic measurements allowed determining the gelation kinetics. It was found that the gelation process initiated following a similar path than that of an associative phase separation process, i.e., with the formation of primary and interpolymeric electrostatic complexes. However, interpolymeric complexes were able to form clusters and junction zones that resulted in the freeze - in of the whole structure at the point of gelation. The structuration of xanthan gum, even at these low concentrations, may have played a role in the structuration process. Due to the electrostatic nature of the gels, there was an optimum pH and macromolecular ratio at which the stability of the gels was maximal. This was related to the existence of a stoichiometric electrical charge equivalence pH, where molecules carry equal but opposite charges and protein - polysaccharide interactions are at their maximum.

5.3. Introduction

The study of proteins and polyelectrolytes associative phase separation has been a very active field of research in the last decade; although this phenomenon has been known to occur for many years, since the pioneering works by Tiebackx in the 1900's, followed by the works of Bungenberg de Jong (1936) on gelatin - acacia gum systems. The renewed interest in this area has been fueled by the potential and practical implications for numerous fields such as the biomedical (gene therapy, enzyme immobilization protein recovery and purification); pharmaceutical (encapsulation, drug delivering systems); cosmetics (microencapsulation of active ingredients); and the food industry (texturing and stabilizing ingredients, flavor/ingredient encapsulation). See for example reviews on protein-polysaccharide applications by El-Aneed, (2004); Renard et al. (2002); Dumitriu & Chornet (1998); Schmitt et al. (1998); Sanchez & Paquin (1997), and Tolstoguzov (1996).

The mixture of proteins and polysaccharides in aqueous dispersion is often accompanied by phase separation either segregative (thermodynamic incompatibility) or associative (thermodynamic compatibility) depending mainly on the electrical charges on the biopolymers and therefore on the factors affecting them such as the ionic strength and pH (Tolstoguzov, 2003; Mattison et al., 1999). Therefore, controlling environmental factors results in the diversification of their solubility, co-solubility, mechanical, texturing, and gelation properties as well as in their behavior at interfaces (Dickinson, 2003; Tolstoguzov, 1997; Samant et al., 1993).

Phase separation of biopolymeric mixtures is usually studied by light scattering techniques due to its sensitivity to concentration fluctuations and the presence of aggregates in the sample (Sanchez et al., 2002; Kim & Berg, 2000; Tuinier et al., 2000; Chen et al., 1998). In a static light scattering experiment, the time evolution of the scattered light intensity $I(q)$ profile measured at different scattering angles (q) allows the two main phase separation mechanisms, spinodal decomposition (SD) or nucleation and growth (NG), to be differentiated. SD occurs when the system is brought to the unstable region of the phase diagram; there concentration fluctuation will spontaneously grow due to the negative free energy of the system. The result is generally a bicontinuous structure characterized by a

prevailing domain size of length scale Λ , which in light scattering is linked to the presence of an intensity peak (I_{\max}) at a constant scattering angle q_{\max} , related by the equation $\Lambda = 2\pi/q_{\max}$ (Binder, 1991; Gunton et al., 1983). NG will occur if the system is slowly taken through the metastable region of the phase diagram, in this zone, concentration fluctuations decay unless a nuclei of a critical size has been formed, at which point, a variety of random sized particles develop. In light scattering experiments, this is characterized by the absence of a scattering peak and a monotonic decrease in the scattered light intensity with scattering wave vector. However, studies report a peak related to a NG mechanism (Maugey et al., 2001; Chen et al., 1998; Elicabe et al., 1998; Carpineti & Giglio, 1992), which has been attributed to the presence of a depletion layer surrounding the forming nuclei, or at high concentrations due to the correlation produced by the location of individual scatterers. Still, the peak progress over the course of separation is different from that of SD (Maugey et al., 2001; Elicabe et al., 1998).

In both cases, the newly formed phases must grow to minimize the interfacial energy, either by diffusion, coalescence or by Ostwald ripening. The latter mechanism consists in the growth of large particles at the expense of the smaller ones that readily re-dissolve. If gelation occurs, the developing structures can be trapped before the system is completely phase separated. Gelation affects the kinetics of phase separation mainly due to the reduced mobility of the molecules in the system (Butler, 2002). Many studies have been aimed to control the processes of phase separation and gelation in order to produce a varied array of textures and morphologies (Butler & Heppenstall-Butler, 2003a, b; Olsson et al., 2002; Turgeon & Beaulieu, 2001; Bansil & Liao, 1997; Tromp & Jones, 1996).

Previous studies on β lg - xanthan gum mixtures have shown that the associative phase separation under shearing for this system, takes places via a nucleation and growth mechanism (Laneuville et al., 2004 - Chapter 4). The newly formed complexes coarsen and rearrange leading to the formation of denser fractal aggregates, when present; shear forces play an important role in the structuration process of the complexes. In this paper, we present light scattering and rheometry results obtained for the same system but under quiescent conditions. The outcome is quite different when the system is let to

electrostatically interact without applying any external forces and results in the formation of a gel. This was completely unexpected since the electrostatic attraction between oppositely charged proteins and polysaccharides usually leads to a rapid interaction and the formation of particulated complexes or coacervates (Tolstoguzov, 2003; Turgeon et al., 2003; Doublier et al., 2000; Dickinson, 1998; Schmitt et al., 1998; Samant et al., 1993). Furthermore, the total biopolymer concentration at which gelation was obtained was extremely low (0.1 wt%) compared to the usually tested concentrations for protein - polysaccharide mixed gels (4 - 12 wt%) and therefore these new gels can be classified as hydrogels. This is, to our knowledge, the first time that oppositely charged proteins and polysaccharides are reported to form a gel without applying any heat treatment to denature the protein and at such low concentrations. The potential uses for this type of gel are vast, for example for the development of carrier/protective matrices for drug or micronutrient (calcium, iron, vitamins, etc.) delivery, for the protection of enzymes and other active molecules since no harsh treatments are applied during its production. In the food industry, this type of gel is also very interesting since it has immediate potential applications in all the variety of yoghurt products, where the choice of a bacterial strain that acidifies, and at the same time produces exopolysaccharides, will determine the structuration and stabilization of the final product.

There has been an extensive research in the area of protein - polysaccharide gelation under thermodynamic incompatibility conditions (Butler & Heppenstall-Butler, 2003b, Tolstoguzov, 2003; Zhang & Foegeding, 2003; Turgeon & Beaulieu, 2001; Bryant & McClements, 2000; Samant et al., 1993), where electrostatic repulsion forces between unlike species leads to a segregation of similar molecules in two different phases. This phenomenon results in an increased polymer concentration in each separated phase, causing a synergistic effect where gelation can be achieved at lower total concentrations than that usually needed for the gelation of the constituents alone. Despite the fact that the concentration needed to achieve gelation in protein - polysaccharide systems under thermodynamic incompatibility conditions can be lowered from the concentrations normally used for protein gelation alone, in the range of 10-14 wt% (Kavanagh et al., 2000; Sanchez et al., 1997), to 6.0 - 8.5 wt% (e.g. Baeza et al., 2003; Olsson et al., 2002; Bryant

& McClements, 2000), these values are still well above the concentration described here (0.1 wt%). Furthermore, protein must still need to undergo a denaturation process through thermal or partial hydrolysis treatment for gelation to occur.

5.4. Experimental Section

5.4.1. Materials

A high β lg content whey protein isolate was used as the source of β lg (High - Beta, lot # JE 002-8-922, 98.2 wt% protein, of which 85% is β lg, 1.8% minerals and 4% moisture, Davisco Foods International, Inc., MN, US). Due to the high content of β lg in this powder, it was assumed that its behavior was governed by that of β lg (Weinbreck et al., 2003a) and therefore it will be referred to as β lg hereafter. Xanthan gum (Keltrol F, lot # 9D2192K, 96.36% total sugar, 3.02% protein) was purchased from KELCO Co. San Diego, CA.

Dispersions of β lg and xanthan gum containing 0.1 wt% total biopolymer concentration were prepared in filtered deionized water (Milli-Q, Millipore, US), left overnight at 4°C, then centrifuged and filtered, as previously described (Laneuville et al., 2004 – Chapter 4), before preparing the mixtures for analysis. Different macromolecular ratios (r) were studied, namely 2:1, 5:1, 15:1 and 20:1 ($r = 2, 5, 15$ and 20 respectively). β lg and xanthan gum dispersions (0.1 wt%) were mixed at the desired r and mixed gently for 30 min. Tests with microfluidized xanthan gum, prepared and characterized as previously described (Chapter 2), were also carried out for $r = 2$ and 5 . The initial pH of the mixed dispersions was 6.60 ± 0.08 . Electrostatic interaction was induced by slow acidification using 0.015 wt% glucono- δ -lactone acid (GDL) (Merck, Darmstadt, Germany) to a final pH $\cong 4.5$. After the addition of GDL, dispersions were slowly stirred for an additional 15 min before starting rheometry or light scattering experiments that were carried out in parallel. The pH of the dispersions was also followed in order to determine the acidification rate for each system. β lg and xanthan gum dispersions were tested separately for comparison.

5.4.2. Time-Resolved Small Angle Static Light-Scattering (SALS)

The structuration of the system during acidification was followed under quiescent conditions using a Mastersizer S long bench equipped with a 5mW He/Ne laser beam emitting at a wavelength (λ) of 632.8 nm (Malvern Instruments Ltd., U.K.). The optical cell had a path length (d) of 2.4 mm and the range of scattering angle (q) covered was $0.01\text{-}10.4 \mu\text{m}^{-1}$, where $q = 4\pi n_s \sin(\theta/2)/\lambda$, with θ the scattering angle of observation and n_s the refractive index of the solvent. The background intensity was recorded on filtered ($0.2 \mu\text{m}$) Milli-Q water (recording time 5 s) before starting the measurements on mixed dispersions. The instrument was programmed to measure the scattered light intensity from the sample every minute during 10 h (recording time 10 s). The experimental scattering intensity was then corrected with respect to the angle of the detectors and turbidity as previously described (Laneuville et al., 2004 - Chapter 4; Hashimoto et al., 1986).

The evolution of the gel internal structure was determined by measuring the apparent fractal dimension (d_f) from the slope over 1 decade at large q values using a $I(q) \sim q^{-d_f}$ power-law (Bushell et al., 2002). The critical $\text{pH}\phi$ indicating the formation of interpolymeric complexes (Laneuville et al., 2004 – Chapter 4; Mattison et al., 1995; Tainaka, 1979) was determined from turbidity measurements as previously described (Laneuville et al., 2004 – Chapter 4). The critical $\text{pH}c$ indicating the beginning of interaction could not be determined due to heavy fluctuations in the turbidity signal before $\text{pH}\phi$.

5.4.3. Dynamic Oscillatory measurements

Small-deformation oscillatory measurements were performed in parallel to light scattering experiments using a stress controlled rheometer (Stresstech, Rheologica Instruments, Inc. Lund, Sweden) using a parallel plate geometry (UP30stried fixture, 20 mm diameter). βlg - xanthan gum mixtures with GDL were poured onto the bottom plate, the gap used was 1 mm. The temperature of the bottom plate was controlled with a Peltier system and maintained at 20 °C. Samples were covered with a protective jacket to reduce evaporation during measurement. Oscillation experiments were conducted at a frequency of 0.1 Hz and a constant strain of 0.1%. At the end of oscillation, a strain sweep test was recorded to

verify the linear region, which was taken as the stress at which the storage modulus was independent of strain. The formation of the gel network was followed by the development of G' and G'' with time. Since some of the samples presented very tenuous networks, a strain at the beginning of the linear region was chosen to avoid rupture of the gel.

Overall, results were analyzed in terms of the temporal evolution of viscoelasticity, the scattered light intensity $I(q)$, and the apparent fractal dimension (d_f).

5.4.4. Phase contrast optical microscopy

Phase contrast optical micrographs were taken using a BX-51 optical microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at a 40X magnification. GDL was added to the β lg – xanthan gum mixtures and mixed for 15 minutes. Then samples were placed onto microscope slides, covered, and sealed with nail enamel. Micrographs were taken ~18h after GDL addition. At that time, the structure of the gels was fully developed.

5.5. Results and discussions

5.5.1. Time evolution of viscoelasticity and critical $pH\phi$

Storage (G') and loss (G'') modulus development was followed over the course of acidification at different macromolecular ratios (r). Figure 5.1 presents the G' time-evolution for all the tested r . In general, increasing protein content resulted in softer and more opaque gels, possibly due to the disruption of the network by excess protein or β lg - xanthan complexes. Stable gels were obtained for $r = 2$ and $r = 5$. The gels with the highest G' were obtained at $r = 2$, these gels were transparent, whereas at $r = 5$, the gels were semi translucent. The gels obtained at $r = 15$ presented a lower solid-like character and were opaque. These samples broke up into flocs when vigorously shaken in a test tube, the flocs soon transformed into particulated complexes that precipitated. At sufficiently high r ($r = 20$), gelation did not occur; instead, precipitated electrostatic complexes formed from the beginning. The increase of G' detected at $r = 20$ might be related to a structuration of the

system. Similar structuration of protein dispersions, without gelation, has been previously reported (Ikeda & Nishinari, 2001).

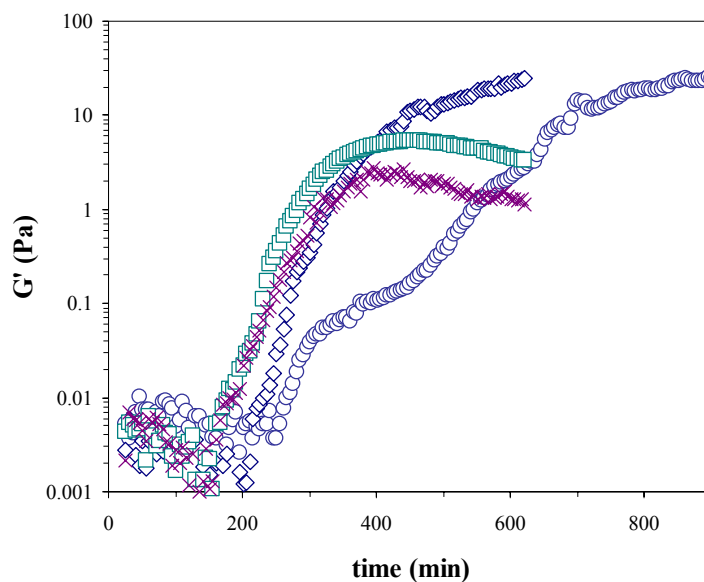


Figure 5.1. Time evolution of the storage modulus (G') for β lg - xanthan gum mixtures at $r = 2$ (\circ), 5 (\diamond), 15 (\square) and 20 ($+$).

Figure 5.2 presents the evolution of G' during gel formation for systems containing microfluidized xanthan gum. It can be seen that for the same protein to polysaccharide ratio r , softer gels (lower G') were formed when microfluidized xanthan was used. Moreover, it can clearly be seen that for $r = 5$ with native xanthan, there is an important structuration process occurring at $t \sim 180$ min, characterized by a step increase in G' .

Figure 5.3a and Figure 5.3b show the G' and G'' evolution for samples at $r = 2$ and $r = 5$. The acidification curves and the time at which the IEP of β lg is attained (pH 5.1) are also presented. Table 5.1 presents the gelation time (t_{gel}) defined as the G'/G'' crossover, its corresponding pH_{gel} , the critical $\text{pH}\phi$ determined from turbidity, and other measured physical parameters for all the studied r .

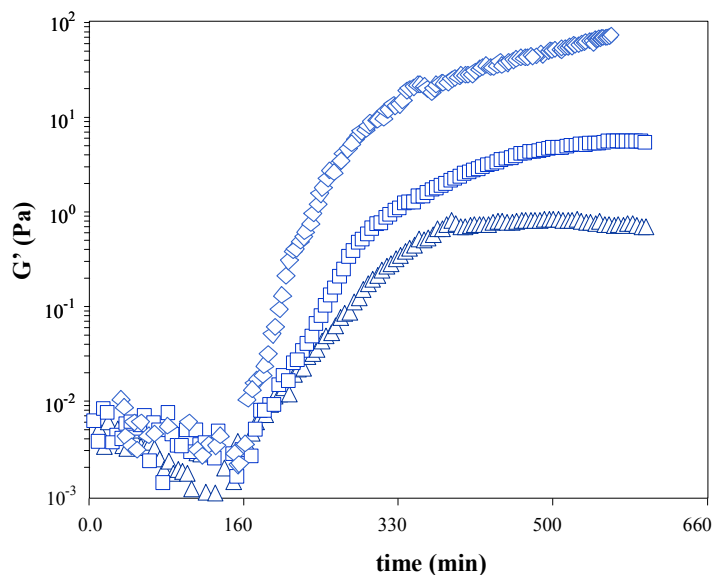


Figure 5.2. Time-evolution of the storage modulus G' for β lg - xanthan gum mixtures at $r = 5$, using native xanthan gum with $M_w = 5.1 \times 10^6$ Da (\diamond), or degraded xanthan samples with $M_w = 4.4 \times 10^6$ Da (\square) and $M_w = 3.2 \times 10^6$ Da (\triangle).

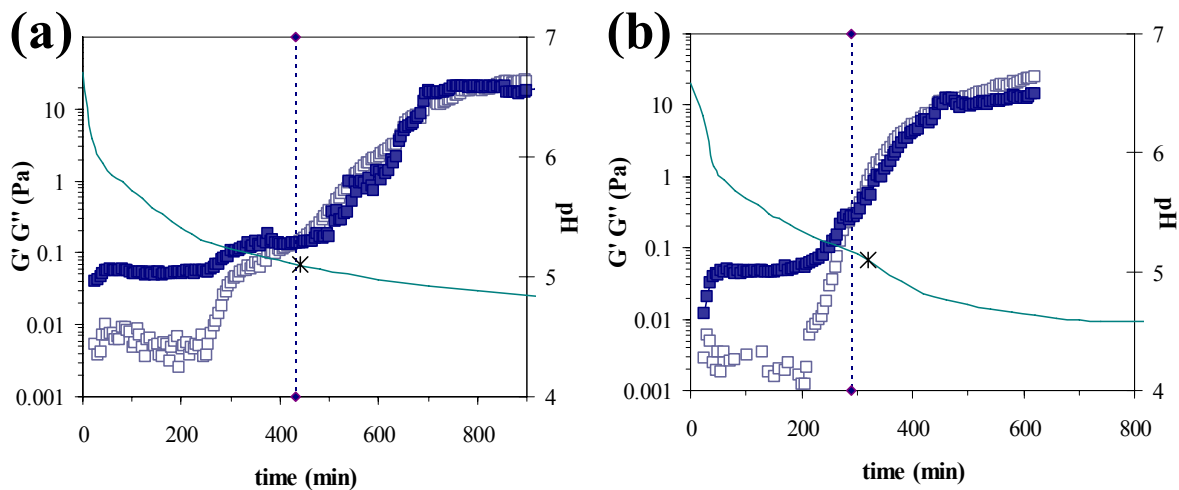


Figure 5.3. Evolution of the storage (\square) and loss (\blacksquare) modulus during gelation for β lg - xanthan gum mixtures at (a) $r = 2$ and (b) $r = 5$. The acidification curves (—) are also presented. The dotted lines indicate the gelation time (t_{gel}) defined as G'/G'' crossover. The IEP of β lg (pH = 5.1) is also indicated (*).

From Figure 5.3a and Figure 5.3b, it can be seen that the G'/G'' crossover always occurs around the IEP of β lg, with a tendency to occur slightly above the proteins' IEP, at $\text{pH} \sim 5.24$, for high protein content systems (Table 5.1). However, it is evident that the structuration process begins well above the IEP. It was found that G' initiated its increase at around $\text{pH}\phi$, the latter being determined from turbidity measurements (Table 5.1) occurred above the proteins' IEP for all the studied ratios. This is in agreement with previous results, that showed that the β lg possesses charged patches (Girard et al., 2003) susceptible to interact with xanthan gum above its IEP (Laneuville et al., 2004 – Chapter 4), and is also in agreement with several results on other protein - polysaccharide systems (Weinbreck et al., 2003a; Girard et al., 2003; Mattison et al., 1999).

Table 5.1. Time (t_{gel}) and pH (pH_{gel}) of gelation ; critical $\text{pH}\phi$; fractal dimension d_f ; correlation length (Λ_{gel}) of the prevailing structure; and parameter β for the reaction kinetics

Ratio	t_{gel} (min)	pH_{gel}	$\text{pH}\phi$	final d_f	Λ_{gel} (μm)	β
2	442.0 ± 8	5.07 ± 0.01	5.16 ± 0.01	2.07 ± 0.06	34.1 ± 5.1	2.3 ± 0.2
5	263.0 ± 12	5.21 ± 0.01	5.30 ± 0.04	2.36 ± 0.03	21.2 ± 1.7	5.2 ± 1.5
15	284.8 ± 21	5.24 ± 0.06	5.49 ± 0.01	2.38 ± 0.03	26.6 ± 0.0	20.2 ± 1.9
20	---	---	5.49 ± 0.04	2.44 ± 0.04	31.6 ± 0.0	19.3 ± 2.2

Although pH_c could not be determined; it was obvious that turbidity was increasing before $\text{pH}\phi$, indicating the formation of soluble complexes. Additionally, the measured $\text{pH}\phi$ (Table 5.1) are in remarkable good agreement with those found for the same systems under shear (Laneuville et al., 2004 – Chapter 4), showing that, at least in the beginning, the electrostatic interaction between β lg and xanthan gum follows the same path either under shear or under quiescent conditions, i.e., the formation of soluble complexes followed by interpolymeric complexation. The gelation point (G'/G'' cross-over) seems to take place after both these processes have occurred. However, for low r , the gelation kinetics is faster

than the separation kinetics, thus the structure is trapped before it can completely phase separate into electrostatic complexes as occurs for high r .

Also noticeable is that there is a pH at which G' and G'' seem to attain an equilibrium (Figure 5.3). For $r = 2$ and $r = 5$, this pH is $\sim 4.8 \pm 0.08$ and indicates that the gel structure is stabilized when both molecules carry net opposite charges.

5.5.2. Temporal Evolution of the scattered light intensity and gelation kinetics

Time resolved light scattering profiles for $r = 5$ and $r = 15$ are presented in Figure 5.4a and Figure 5.4b respectively. A scattering peak (I_{\max}) in the light scattering pattern at a nonzero scattering vector (q_{\max}) was present from the beginning of measurements for all the studied r . The scattering profile was not smooth at small wave vectors; however, smaller length scales were well discerned (Figure 5.4). The scattered light intensity increased slightly over the whole wave vector number shortly after the beginning of measurements. It is possible that pHc was attained and the initial increase in $I(q)$ reflects the formation of soluble complexes.

At $\text{pH}\phi$, the entire $I(q)$ profile increased and a secondary peak ($I_{\max 2}$) at constant q_{\max} emerged at smaller length scales (Figure 5.4), the intensity of this peak increased almost exponentially in time (Figure 5.5), taking over the first peak for high protein containing systems. The increase in $I_{\max 2}$ indicates an increase in the total number and size of structural domains, and may be related to the formation of smaller structural domains. The presence of a secondary peak has been reported in systems undergoing polymerization induced phase separation and gelation (Chen et al., 1998, Elicabe et al., 1998) and attributed to the formation of smaller primary complexes, induced by the continual decrease of pH.

From Figure 5.5, it can clearly be seen that t_{gel} occurs after a certain amount of structural domains have been formed. In all cases, the $I_{\max 2}$ increase after $\text{pH}\phi$ could be expressed by a power relation of the type $I_{\max}(t) \propto t^\beta$. The estimated values of β are presented in Table 5.1. These values are similar to those found for these systems under shear (Laneuville et al.,

2004 – Chapter 4), indicating again that the process here may indeed be the formation of interpolymeric complexes. This much higher separation/reaction rate compared to the classical values of 1 or 3 obtained during coarsening in SD or NG (Binder, 1991), may be caused by the additional energy furnished by the electrostatic attractive forces between oppositely charged molecules. Accordingly, studies on systems undergoing polymerization induced phase separation also report high β values (Chen et al., 1998). The rate of complexation and coarsening was higher at higher r , as discussed previously (Laneville et al., 2004 – Chapter 4), this is mainly due to mass action equilibrium and related to the higher viscosity of the systems with higher amounts of xanthan gum.

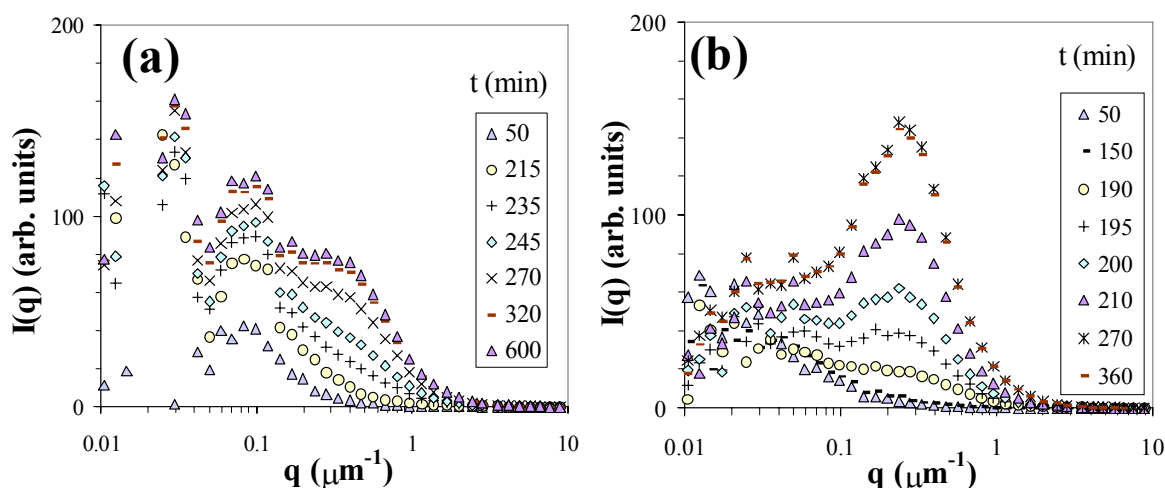


Figure 5.4. Time evolution of the light scattering profile for β Ilg - xanthan gum mixtures at (a) $r = 5$ and (b) $r = 15$. The secondary peak is attributed to the gel correlation length. $\text{pH}\phi$ occurred at ~ 210 min for $r = 5$ and at ~ 170 min for $r = 15$. t_{gel} occurred at ~ 260 and 280 min, respectively.

Once t_{gel} was reached, the increase in $I_{\text{max}2}$ slowed down until equilibrium was attained (Figure 5.4 and Figure 5.5). For $r = 2$ or 5 , a plateau in $I_{\text{max}2}$ was observed (Figure 5.5), that occurred at approximately the same time that G' and G'' stabilized (Figure 5.3). Additionally, the scattered light intensity ceased to increase (Figure 5.4), indicating the freeze-in of the structure. Figure 5.5 also shows that for $r = 2$ the structuration process is slower. Furthermore, for this ratio, $I_{\text{max}2}$ continued to evolve for longer periods after t_{gel} ,

whereas it soon achieved equilibrium for higher r . For systems with high protein content ($r = 15$), I_{\max} presented a peak (Figure 5.5), the subsequent decrease cannot be related to precipitation since the system is gelified. Instead, it may be related to a decrease in the number of structural domains, possibly due to the flocculation of existing ones. An analogous peak is observed in viscoelasticity measurements (Figure 5.1), showing that there is a critical pH for maximum solid-like behavior and structural stability.

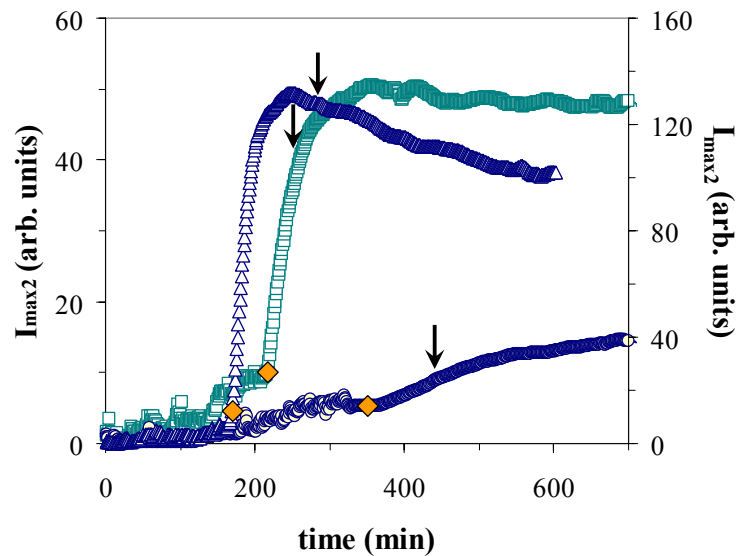


Figure 5.5. Temporal evolution of $I_{\max 2}$ for $r = 2$ (\circ), $r = 5$ (\square) and in the second axis $r = 15$ (\triangle). Also indicated are $\text{pH}\phi$ (\diamond) and t_{gel} (arrows).

We argue the pH at which a maximum in G' and $I_{\max 2}$ is obtained, corresponds to the stoichiometric electrical charge equivalence pH (EEP), where molecules carry similar but opposite charges and the interaction is at its maximum (Mattison et al., 1999; Burgess, 1994). At the EEP, there is an electrostatic equilibrium in the gel, due to the balance of attractive and repulsive forces that results in a stable gel, composed mainly of aggregated complexes of fractal nature. We argue that at higher r , the excess protein affects this equilibrium, and may hinder gel stability by favouring strong interactions between protein and polysaccharide molecules, thereby leaning the equilibrium towards the formation of particulated complexes (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3). This explanation is supported

by the lower G' values and the higher opacity obtained for gels with high protein content. Owing to the fact that the EEP is controlled by the number of opposite charges in the system; it is not surprising to find that there is an optimal r at which stability is maximal. Accordingly, gels formed at $r = 2$ and $r = 5$ were stable over a large range of pH, as seen in Figure 5.3 and Figure 5.5, and presented higher G' values (Figure 5.1).

5.5.3. Fractal dimension, internal structure development, and gel formation

The scattering curves displayed an increasing linear relationship over more than a decade in the q range $> 0.56 \mu\text{m}^{-1}$, indicating a self-similar structure from which the apparent fractal dimension (d_f) was estimated (Lattuada et al., 2003; Kim & Berg, 2000). Figure 5.6a and Figure 5.6b shows the evolution of d_f of the developing structures.

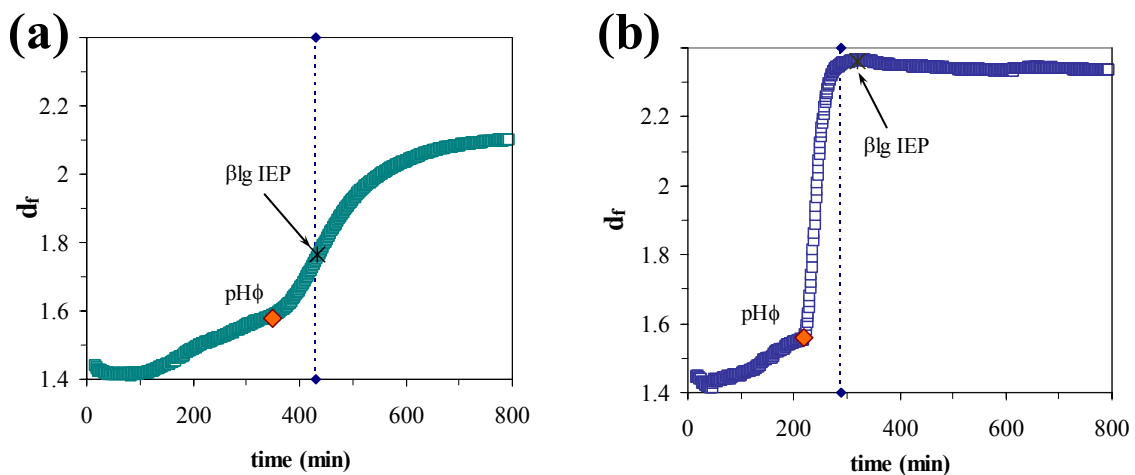


Figure 5.6. Development of the fractal dimension (d_f) during gelation for β lg - xanthan gum mixtures at (a) $r = 2$ and (b) $r = 5$. The vertical dotted lines indicate the t_{gel} , the β lg IEP is indicated by arrows, and $\text{pH}\phi$ (determined from turbidimetry) is indicated by (\blacklozenge).

It can be seen that there are two stages of structuration. The first one takes place at $\text{pH} > \text{pH}\phi$, where a slow compactation, from $d_f \sim 1.4$ to 1.6, of the newly formed complexes occurs, indicating a diffusion limited cluster aggregation mechanism (DLCA) (Tang et al.,

2000), and the tenuous character of the primary complexes. This is in accordance with the formation of β lg - xanthan complexes that interact on contact since they carry opposite charges. The second structuration stage was delimited by $\text{pH}\phi$, after which a steep compactation followed for high protein content systems, and a more gradual structuration took place for $r = 2$. Then an equilibrium is attained for $r = 2$ and $r = 5$, in agreement with the existence of an EEP. The final d_f values (Table 5.1) indicate that the density of the gel increases with increasing protein content. As previously discussed (Laneuville et al., 2004 – Chapter 4; Weinbreck et al., 2003a, b; Kim & Berg, 2000; Molina-Bolívar et al., 1998), this compactation may be caused by the tendency of molecules to reorganize due to the increasing opposite charges, as pH decreases, and to protein cooperative binding. Additionally, at high r , the compactation is further favored since more protein is available to fill in the gaps of the developing structures (Dautzenberg, 2000; Kim & Berg, 2000).

The d_f evolution is different from that found under shear, firstly, the structuration rate is higher under shear, which, may be related to the effect of hydrodynamic forces (Laneuville et al., 2004 – Chapter 4). Secondly, the initial d_f values are lower under quiescent conditions compared to the initial $d_f \sim 1.6 - 2.0$ for systems under shear, indicating that more tenuous aggregates are formed. This may be caused by the lower mobility of the molecules in dispersion. In this regard, it is important to consider the behavior of xanthan gum under the conditions of the present study: low concentrations and low ionic strengths.

In distilled water, xanthan molecules are found in an extended conformation due to electrostatic repulsions from the charged groups in the lateral chains. This extended conformation is particularly susceptible to form associations (Chapter 2), presumably by H-bonding, and induce a structuration of the solution (Rocherfort & Middleman, 1987; Morris et al., 1977). Such network formation has been observed by atomic force microscopy studies (Capron et al., 1988). The concentration at which individual polymers begin to interact is defined as c^* . Previous studies (Chapter 2) showed that $c^* \sim 0.4$ wt% for xanthan gum in 0.01M NaCl. However, it has been proposed that under quiescent conditions, lower c^* may be found since the use of viscometric techniques cause the xanthan molecules to orientate (Rodd et al., 2000). Accordingly, light scattering studies have found that $c^* \sim 0.2$

wt% (Southwick et al., 1981), and values as low as 0.02 and 0.1 wt% have been reported (Rodd et al., 2000; Meyer et al., 1993; Milas et al., 1990). Additionally, a special type of behavior is observed in xanthan at low pH, where a stabilizing effect occurs, in the pH range 4-2, and the molecule recuperates, at least partially, an ordered structure, thus favoring its structuration in solution (Oh et al., 1999; Christensen & Smidsrød, 1991; Zhang et al., 1987).

After these considerations, we propose that, at the macromolecular concentrations used in the present study, some degree of structuration was allowed in the mixture due to the extended conformation and aggregation pattern of xanthan gum. This would result in molecules with less mobility and thus explain the formation of more tenuous complexes at pHc. Additionally, the M_w of xanthan gum and the structuration that it confers to the system may also have a stabilizing and suspending effect on the newly formed complexes, which would be able to aggregate further and fix the network before precipitating. This is supported by the results of dynamic rheometry that shows that when degraded xanthan is used, the solid-like character of the gels is weaker (Figure 5.2).

Figure 5.7 presents phase contrast micrographs for $r = 2, 5$ and 15 . It can be seen that the internal structure of the gels contain larger and denser structures as the content of protein increases. This is in agreement with the measured d_f values. At $r = 2$, the microstructure presents very diffuse interfaces, the high xanthan content in this sample may have played a role in reducing the mobility of the interacting clusters, resulting in a finer and more homogeneous network. At higher r , the interfaces are better defined and large electrostatic complexes can be observed. The formation of larger electrostatic complexes at high r (Laneuville et al., 2000 and 2004 – Chapters 3 and 4) seems to disrupt the gel network, resulting in the lower G' measured by rheometry (Figure 5.1) and eventually completely hindering gel formation as found for $r = 20$.

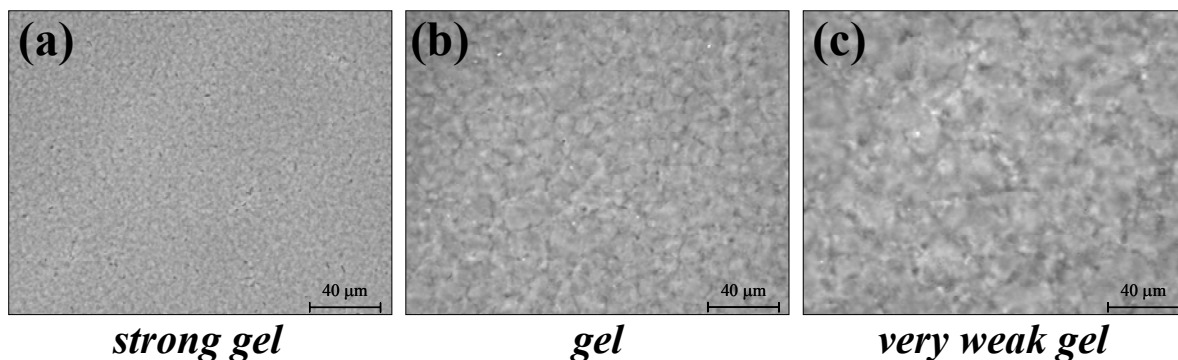


Figure 5.7. Phase contrast micrographs (40X) of the microstructure of β lg - xanthan gum gels for (a) $r = 2$; (b) $r = 5$ and (c) $r = 15$. Bars are 40 μ m.

The portraits presented in Figure 5.4 through Figure 5.6 are in agreement with a two step complexation process, initiating with the nucleation of soluble complexes, then at $\text{pH}\phi$, with the formation of fractal interpolymeric complexes. After $\text{pH}\phi$, a compactation of the structure (Figure 5.6) and an increase in structural domains (Figure 5.5 and Figure 5.7) leads to cluster-cluster aggregation. Initially, these clusters can diffuse, but as more aggregates form they become less motile. It has been proposed that such clusters may become caged (Sandkuhler et al., 2004), after which interconnection can readily occur and gelation ensues. As discussed, xanthan structuration of the solution may have a role in the process of caging the clusters of complexes. Figure 5.8 shows a schematic representation of this scenario.

We propose that the junction zones among clusters may be formed due to opposite charges of β lg and xanthan gum and also possibly by the bridging of clusters that share different portions of the same xanthan molecules. Hydrogen bonding and other non-covalent interactions may further stabilize the gel.

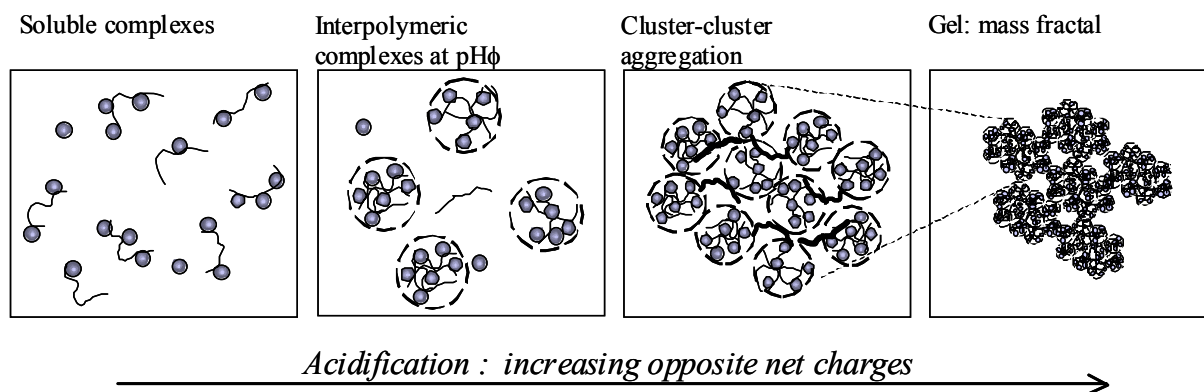


Figure 5.8. Schematic representation of the structure evolution leading to the formation of a gel from the electrostatic interactions between oppositely charged proteins (circles) and polysaccharides (coils).

The gelation process would be a competition between the phase separation process, which is set off by the increasing electrostatic interaction between protein and polysaccharide molecules as pH decreases, and the gelation that arrests coarsening and phase separation. This scenario is similar to that encountered in systems where the forces leading to phase separation are segregative (Anderson & Jones, 2001; Hong & Chou, 2000; Kita et al., 1999; Asnaghi et al., 1995). However, as can be seen in Figure 5.4, under thermodynamic compatibility the process does not follow the classical NG or SD mechanisms.

5.6. Conclusions

The kinetics of the cold gelation of β -lactoglobulin and xanthan aqueous mixtures are studied by static light scattering and rheometry. The interaction between β lg and xanthan under quiescent conditions started at positively charged patches on the protein surface, before the isoelectric pH of β lg. Primary complexes, with a diffuse structure, formed initially following a nucleation and growth mechanism. Then, they aggregated into more dense interpolymeric complexes that formed caged clusters with low mobility and gelation ensued. Subsequently, the clusters formed junction zones and the whole structure was

freeze-in at the point of gelation. The xanthan ability to structure the system may have played a role in stabilizing the developing structures against precipitation. The β lg - xanthan ratio had an important effect on the reaction rate and the stability of the gels. An optimal ratio was found for which the gels were stable over a large range of pH. This was related to the existence of a stoichiometric electrical charge equivalence pH.

5.7. Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from NSERC industrial chair and industrial partners Agropur, Novalait Inc., and Parmalat.

*“In the field of observation, chance
favors only the prepared mind.”*

Louis Pasteur (1822 - 1895)
French biologist & bacteriologist

Chapitre 6

Formulae Optimization of a Low-Fat Food System Containing Whey Protein Isolate - Xanthan Gum Complexes as Fat Replacer

Laneuville S.I., Turgeon S.L.* and Paquin P.

Dairy Research Center (STELA). Faculty of agriculture and food science. Laval University,
Pavillon Paul – Comtois, Quebec, Canada, G1K7P4.

* Telephone: (418) 656-2131 ext. 4970. Fax: (418) 656-3353. E-mail:
Sylvie.Turgeon@aln.ulaval.ca

Soumis au « Journal of Food Science »

6.1. Résumé

Les complexes protéine de lactosérum - xanthane (WPXC) ont un potentiel pour réduire significativement le contenu en matières grasses dans divers produits. Toutefois, tant leur stabilité que leur fonctionnalité n'ont pas été étudiées à fond, particulièrement en ce qui concerne leur utilisation dans des produits à pH neutre. L'objectif de cette étude était d'évaluer les complexes WPXC en tant que substituts de gras dans des glaçages à gâteaux ou des garnitures à biscuits avec un plus faible contenu en matière grasse (160 ou 80 g/kg gras). La méthode de réponse de surface a été utilisée pour étudier l'effet des complexes WPXC sur la viscosité et la texture des échantillons et pour optimiser les formulations faibles en gras. Il a été trouvé que les complexes WPXC avaient un impact positif ($p > 0.001$) conférant de bons attributs de viscosité et de texture aux échantillons faibles en gras. Une interaction significative humidité - WPXC ($p > 0.001$), a permis de dévoiler que le ratio optimal entre humidité - WPXC varie selon la texture recherchée. Ce ratio était de $\sim 8:1$ pour les glaçages à gâteau et de $\sim 5:1$ pour les garnitures à biscuits. Des formulations optimales ont été trouvées pour les produits testés et les échantillons, se conformant aux spécifications désirées, ont présenté des profils de texture et de fonte similaires à ceux des produits témoin. Cependant, pour la production de garnitures à biscuits, l'utilisation d'autres ingrédients (par exemple des humectants et des émulsifiants) doit être considérée pour maintenir un bas A_w et ainsi empêcher la migration d'humidité vers le biscuit.

6.2. Abstract

Whey protein isolate - xanthan gum complexes (WPXC) have potential to significantly reduce fat use in various products. However, their stability and functionality have not been extensively studied, particularly in neutral pH products. The objective of this study was to evaluate WPXC as a fat replacer in cake frostings and sandwich cookie fillings with reduced fat content (160 or 80 g/kg fat). Response surface methodology was used to analyze the effect of WPXC on the viscosity and textural response attributes of samples and to optimize the low fat formulations. It was found that WPXC had a positive effect ($p > 0.001$) providing acceptable viscosity and texture attributes to the low fat samples. A significant moisture - WPXC interaction ($p > 0.001$) revealed that the optimum moisture – WPXC ratio varied depending on the target texture. This ratio was ~8:1 for cake frostings and ~5:1 for sandwich cookie fillings. Optimum formulations were found for the studied products and samples meeting the desirability specifications presented textural and melting profiles similar to those of the control products. However, for the production of sandwich cookie fillings, the use of other ingredients (for example humectants and emulsifiers) must be considered in order to maintain a low A_w and prevent moisture migration to the cookie shell.

Keywords: Protein-polysaccharide complexes; Whey; Xanthan; Fat replacer; Low fat; Mixture design; Optimization.

6.3. Introduction

The consumers increasing awareness of health risks associated with high-fat and high caloric diets has resulted in an increasing demand for fat replacers and artificial sweeteners able to impart full calorie characteristics without sacrificing taste or texture (Akoh, 1998; Ward, 1997; Giese, 1996; Hollingsworth, 1996). The market for fat replacers is projected to grow by more than seven per cent annually to \$520 million in 2004, in the US only (Freedonia Group, 2003). Consequently, reduced calorie products, either low fat or low energy content, continue to be an important area for product development.

The best opportunities for new fat mimetics are projected to be for combination systems that offer improved functionality or contribute nutritional benefits, such as increased dietary fiber (Freedonia Group, 2003; Ward, 1997; Hollingsworth, 1996). Therefore, ingredients based on biological molecules have the best opportunities. Accordingly, protein - polysaccharide complexes have been largely studied to produce fat replacers (Bishay & Clark, 1996; Le Hénaff, 1996; Zolper, 1995; Bakker et al., 1994; Lawson & Lin, 1991; Chen et al., 1989; Soucie et al., 1988). For an extended review on protein - polysaccharide interactions see Turgeon et al. (2003) and Schmitt et al. (1997).

The use of protein and polysaccharide blends presents some advantages compared to other fat-replacers (Sanchez & Paquin, 1997; Ward, 1997; Giese, 1996):

- (a) Protein-based fat replacers are perceived as more “natural” and healthier than synthetic (fat-based) replacers, which is important for the acceptance of the product.
- (b) The presence of a polysaccharide confers some functions of fat by binding great quantities of water that provide lubricity and a melting sensation; thus, improving the overall sensation of the product in the mouth. In addition, polysaccharides can prevent protein over-aggregation if a thermal treatment is required during processing.

- (c) Polysaccharides have a positive impact on health since they have a high dietary fiber content which reportedly lowers cholesterol levels.

Previous studies in our laboratory have permitted the development of a fat replacer based on whey protein isolate - xanthan gum complexes (WPXC) produced under acidic conditions (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3; Le Hénaff, 1996). These complexes are fibrous in nature; consequently, a microfragmentation step is essential in order to obtain an ingredient with the desired particle size. Work has been done to particulate fibers, generally with a high-pressure treatment (Chen et al., 1989). An alternative solution is the microfluidization of xanthan gum before complexation, which effectively prevents fiber formation and permits to control the complexes size from the initial stages of fabrication (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3; Le Hénaff, 1996). Satisfactory fat mimetic characteristics (creaminess and smooth texture) can be obtained by maintaining the particle size under the threshold of perception, which is around 40-60 μm depending on the particle's characteristics and the product's viscosity (Sanchez & Paquin, 1997). The WPXC used in this study have been previously characterized, and met this requirement (Table 1). Furthermore, WPXC have been successfully used as fat replacer in low pH products such as salad dressings (Le Hénaff, 1996).

Table 6.1. Characteristics of the WPXC tested in this work[†].

Feature	
WP – Xanthan gum ratio	5 : 1
Particles > 30 μm diameter	14 %
Particles < 40 μm diameter	100 %
Complexed protein	68.8 %
Complexed xanthan	36.5 %
Viscosity (30 g/kg, 10^2 s^{-1})	$9.5 \times 10^{-2} \text{ Pa}\cdot\text{s}$
Presence of protein microparticles	presumably no

[†] Adapted from Laneuville et al. (2000) – Chapter 3

The aim of this study was to evaluate the ability of WPXC to replace fat in neutral pH products (cake frosting and sandwich cookie filling containing 160 g/kg or 80 g/kg fat). As well as to optimize the low fat formulations by determining the most suitable amounts of WPXC to use in order to obtain products with satisfactory viscosity and texture profiles.

6.4. Materials and methods

6.4.1. Whey proteins isolate – Xanthan gum complexes (WPXC)

Whey proteins isolate (WP) - BIPRO, Davisco Foods Intl. Inc., NM, US (960 g/kg protein, 0.8 g/kg sugar, and 6.6 g/kg minerals) and xanthan gum - Keltrol F, KELCO Co., New Jersey, US (960 g/kg sugar, 40.2 g/kg protein) were used to manufacture the complexes. Xanthan gum was microfluidized 4 times at 750 bar (110Y Microfluidics Corporation, Newton, MA) prior complexation in order to avoid fiber formation.

The WPXC manufacture procedure includes four steps: 1) the solubilization and mixture of WP and microfluidized xanthan gum; 2) an acidification step to favor electrostatic interactions; 3) a heat treatment to denature and stabilize the formed WPXC, and 4) microfiltration and spray drying. The procedure is described in detail elsewhere (Laneuville et al., 2000 – Chapter 3).

6.4.2. Sample preparation

Full-fat samples had a simplified basic formulation consisting of 679.4 g/kg icing sugar (Lantic sugar), 320 g/kg vegetable shortening (Crisco, all vegetable shortening), 0.5 g/kg salt, and 0.1 g/kg vanilla extract. To produce the low fat samples, a percentage of the shortening (50 or 75 wt%) was replaced, on an equal-weight basis, with different mixtures containing variable amounts of WPXC, icing sugar (in addition to the sugar used in the basic formulation), and distilled water. The proportions of the ingredients in each mixture (Table 6.2) were determined using a mixture experimental design with multiple constraints on the ingredient proportions and the D-optimal criterion (Myers & Montgomery, 1995) as explained in section 6.4.3.

Samples were prepared as follows: if used, WPXC were hydrated and mixed with a spatula. Fat was pre-molten at 37 °C in a Bain Marie and mixed with the vanilla extract (1 min). The salt and half of the icing sugar were added under continual mixing (1 min, manual mixer); if required, the hydrated WPXC were added gradually and mixed 3 minutes; the remaining sugar was added and mixing continued until an even texture was obtained (2 to 3 min). For the texture profile analysis, samples were placed in 5 cm height x 5 cm diameter containers, allowed to cool down for 1 h, covered and let stand at room temperature overnight before further analysis. Commercial samples were melted down in a Bain Marie at 40 °C (20 min) and prepared for analysis as described.

Table 6.2. Experimental design with three independent variables: moisture (X_1), icing sugar in the experimental region (X_2) and WPXC (X_3). Actual composition of the mixtures used to replace the fat (g/kg).

Reduced fat formulations						
Sample No. [§]	80 g/kg fat			160 g/kg fat		
	Moisture (X_1)	Icing sugar (X_2)	WPXC (X_3)	Moisture (X_1)	Icing sugar (X_2)	WPXC (X_3)
1	168	72	0	96	64	0
2* **	168	36	36	96	32	32
3	168	0	72	96	0	64
4	132	36	72	80	0	80
5†	96	72	72	64	0	96
6**	96	120	24	48	16	96
7	120	120	0	48	56	56
8	144	96	0	48	96	16
9**	153	66	21	64	96	0
10	153	30	57	80	80	0
11	117	66	57	84	54	22
12	123	90	27	84	22	54
13	138	60	42	60	3	70
14*	---	---	---	60	7	30
15*	---	---	---	72	44	44

§ Sample numbers as designed in Figure 6.1a and b. Actual run order randomized.

* Replicated run for the 160 g/kg fat test; ** Replicated run for the 80 g/kg fat test.

† Statistical outlier t, not taken into account in the RSM.

6.4.3. Experimental Design

A mixture experiment is a special type of response surface methodology in which the independent variables are the components (ingredients) of a mixture, and the response variables are a function of the proportions of the individual components (Myers & Montgomery, 1995). The purpose is to find an appropriate blend of ingredients to produce desirable values of the responses, in this case, maximize the resemblance to a full fat product. This approach was preferred since it permitted to test various levels (8 to 11 levels) of the fat mimetic ingredient with only a fraction of runs to prepare in contrast to classical factorial design methods.

The independent variables in this study were: moisture (X_1), icing sugar (X_2), and WPXC (X_3). The dependent variables were the objective measures of texture and apparent viscosity. The feasible experimental space for a mixture experiment with 3 ingredients is a triangle called a simplex (Figure 6.1). The composition of each mixture varies depending on its position on the simplex region; for example, the vertices of the simplex correspond to pure blends made up of 100% in weight of a single ingredient. Note that all mixtures in the simplex must have the same final weight ($X_1 + X_2 + X_3 = 100$); because of this constraint the proportions of the ingredients cannot be chosen independently (Myers & Montgomery, 1995). In many mixture experiments a minimum or maximum level of an ingredient may be required. For example, WPXC alone cannot replace the fat since the resulting product will remain in powder; on the other hand, if more moisture than necessary is used, the product will be too soggy or too liquid to be spreadable. These restrictions take the form of upper and/or lower bounds that limit the feasible space for the mixture experience to a sub-region of the simplex.

The final experimental designs (Figure 6.1 and Table 6.2) included upper and lower bounds in the ingredient proportions (determined in a preliminary study). The feasible spaces for the experiences (shaded portions on Figure 6.1), corresponds to the weight of the removed shortening; that is, 160 or 240 g/kg of the final product. The experimental points marked 1 to through 15 (Figure 6.1a) or 1 to 13 (Figure 6.1b) were determined using the D-optimal criterion and included the extreme vertices of the constrained region, the centers of edges,

the interior axial check points that lied midway between the centroid and the vertices, and the overall centroid (Myers & Montgomery, 1995). Three mixtures in each set were replicated for error estimation. The mixtures compositions were re-scaled so that the proportion of each ingredient ranged from zero to one (pseudocomponents) and were used in this form for the statistical computations. Myers and Montgomery (1995) provide a thorough treatment on the analysis of mixture experimental designs and the D-optimal criterion.

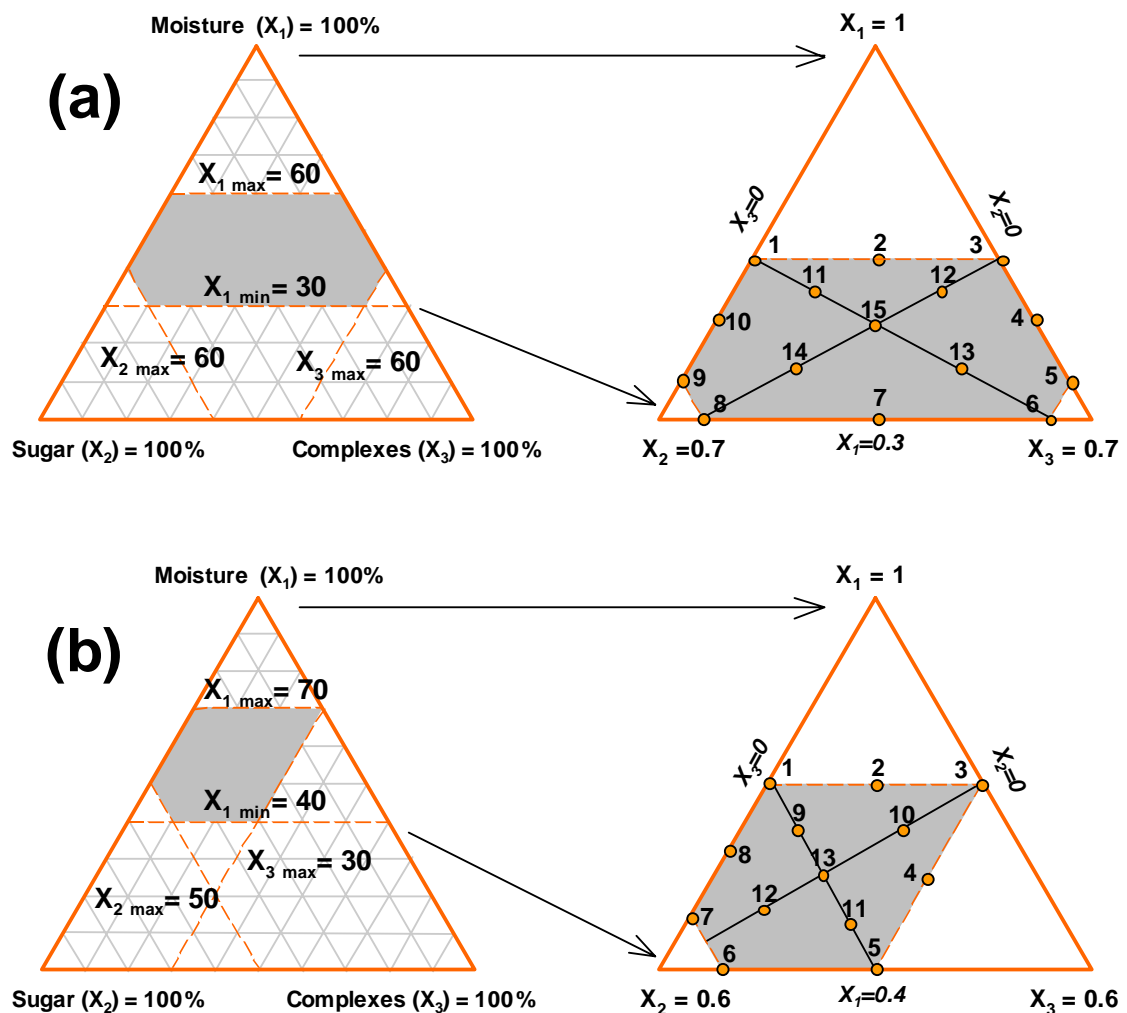


Figure 6.1. Final experimental designs with the feasible regions (shaded areas) to produce (a) a 160 g/Kg fat product and (b) a 80 g/Kg fat product. Experimental points are marked 1 through 15.

6.4.4. Instrumental analysis

6.4.4.1. Brookfield apparent viscosity

Brookfield apparent viscosity was measured on samples at the end of the manufacture process (40 °C) using a Brookfield rheometer model DV-II RV (speed 10, spindle 6). Handling of the product can be evaluated by measuring the viscosity at 40 °C since in most processes cake frostings and sandwich cookie fillings are pumped at about this temperature (Manley, 2000).

6.4.4.2. Texture profile analysis (TPA)

Texture profile analysis (TPA) (Bourne, 1978) was performed with a 40° cone fixture that was allowed to penetrate 35% into the sample (23 °C) at a rate of 1 mm/s using a TA.XT2 Texture Analyzer, Stable Microsystems.

6.4.4.3. Melting profiles

Melting profiles were obtained by applying a temperature ramp from 20 to 60 °C at a heating rate of 1 °C/min (0.05% strain, 1 Hz frequency) using 25 mm parallel plates (ARES-100FRT, Rheometric Scientific, Piscataway, NJ). Samples were forced to 1 mm thickness between the plates and covered with mineral oil to prevent evaporation. Sandpaper was adhered to the fixtures to prevent slips.

6.4.4.4. A_w

A_w was measured with a Humidat-IC II, sensor esBSK-4 (Novacina, Switzerland). Samples were placed in the sensor cubicle and allowed to stabilize for 1h (23 °C).

All tests were carried out in triplicate except for the A_w measurement that was carried out in duplicate. Averaged results are presented.

6.4.5. Statistical Analysis

6.4.5.1. Principal Component Analysis (PCA)

Principal Component Analysis (PCA) was performed on the apparent viscosity and texture attributes from low fat and control samples. Data were transformed with the logarithm, to achieve approximately homogenous variance, and mean centered prior to PCA in order to improve model performance. Full cross validation was used to identify the number of significant components. PCA was used to differentiate the attributes that described the same variation among samples, so that a reduced number of attributes could be selected for further analysis.

6.4.5.2. Response surface analysis (RSM) and formulae optimization

Response surface analysis (RSM) and formulae optimization were performed using the DESIGN-EXPERT software (Stat-Ease. Inc., 2021 E. Hennepin Ave., Suite 191, Minneapolis, MN 55413). Multiple regression equations were obtained for the most influential responses using Scheffe's canonical model for 3 components and backward step elimination (Myers & Montgomery, 1995). The best models (those with the smallest error) were chosen and contour of response surface were generated.

Optimization was carried out by establishing desirability specifications of acceptable quality for each factor, and superimposing the contours of response in order to obtain a "desirability region" (Myers & Montgomery, 1995). The desirability specifications were defined from the analysis of control samples (full fat and commercial samples). The commercial controls for cake frosting were: full fat Creamy Deluxe Vanilla (CFF) (fat content not specified) and Low Fat Creamy Deluxe Vanilla (CLF) (72 g/kg fat) (Betty Crocker, General Mills). The commercial controls for sandwich cookie fillings were taken from: full fat Oreo (~217 g/kg fat), 25% less fat Oreo (~160 g/kg fat) (Christie Brown & Co., Nabisco Ltd.), and full fat Authentic Maple Leaf Cream Cookies (~209 g/kg fat) (Leclerc Ltd.).

6.5. Results and discussion

The study of the experimental regions presented in Figure 6.1a and Figure 6.1b yielded low fat samples with characteristics similar to a cake frosting or to a sandwich cookie filling. In the following section the complete analysis for the 80g/kg fat cake frosting (75% less fat than the prepared control) is presented. The procedure is essentially the same for the 160 g/kg fat cake frosting and for the 160 or 80 g/kg fat sandwich cookie filling, which, for space reasons, will not be presented herein. However, a summary with the principal results for all these products is presented at the end of this paper. The full analysis can be found in Appendix 1.

6.5.1. Main Variation among Samples

The PCA for texture and apparent viscosity data is shown in Figure 6.2. The samples that resembled the most to the controls were samples No. 2 and No. 9 (Figure 6.2, shaded area). An optimal PCA model was achieved using 4 principal components (PC) describing 98% of the total variation in the data. However, the first and second PCs accounted for 84% of the variation among samples (Figure 6.2); therefore, this plot was used to identify the variables describing the same variation among samples. The selected variables were the hardness, cohesiveness, adhesiveness and apparent viscosity. A new PCA was performed on these four attributes to confirm that no important information about samples was lost.

PC1 described 51% of the variance in the data; this information was related to the hardness and cohesiveness of samples (Figure 6.2). The hardness, measured by TPA, represents the peak force during the first compression cycle (“first bite”) and is related to the initial impression of whether the food is hard or soft. The cohesiveness is defined as “the strength of the internal bonds making up the body of the product” and gives an idea of whether the product is tender, tough, gummy, brittle or crumbly (Guinard & Mazzucchelli, 1996; Pons & Fizman, 1996). The control samples and those with an intermediate amount of well-hydrated WPXC were soft and had relative high cohesiveness.

The variation among samples at the second PC (33%) was mainly related to differences in adhesiveness and apparent viscosity. The adhesiveness or “adhesive force” is defined as the “the work necessary to overcome the attractive forces between the surface of the food and the surface of other materials” (Guinard & Mazzucchelli, 1996; Pons & Fizman, 1996). A highly adhesive product is undesirable since it would have a sticky mouthfeel. Likewise, a highly viscous product will be difficult to handle, or an excessively fluid product will lack the desired consistency.

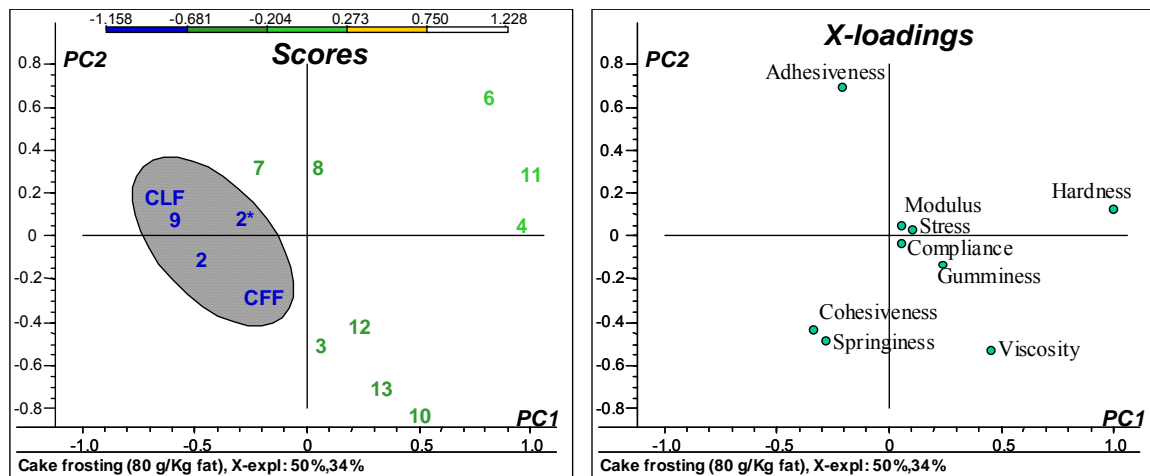


Figure 6.2. Scores and loadings for PC1 and PC2 of texture and viscosity data. Samples with preferred characteristics are shaded. CFF and CLF = full fat and low fat commercial controls.

Accordingly, samples with intermediate adhesiveness and viscosity were closer to controls; this was also associated to the amount of WPXC and moisture in the formulations. For example, samples 1, 7, and 8 do not contain WPXC and thus had very low viscosities. Whereas samples 4, 5, 10, and 11 contain high amounts of WPXC (30-50 g/kg) and/or not enough moisture, thus had very high viscosities (Figure 6.2) and, in most cases, were too stiff to be pumpable.

The preferred samples would therefore have negative PC1 scores (soft and relatively high cohesiveness), and PC2 scores around zero (intermediate adhesiveness and viscosity).

6.5.2. Response Surface

The contours of response surface for the more influential attributes hardness, cohesiveness, adhesiveness, and apparent viscosity are presented in Figure 6.3. The adequacy of the models fit was demonstrated by the significant F-values: the models explained 99.57 to 99.99% of the variation in the experimental data. General equations describing each response are presented in Table 6.3. The analysis of variance is presented in Table 6.4.

Table 6.3. Predictive regression models describing the relationship between textural and viscosity responses with mixtures composition (pseudocomponents). X_1 = moisture, X_2 = icing sugar, and X_3 = WPXC.

Hardness, N
$Y_1 = 9.0X_1 + 1.3X_2 + 11.6X_3 - 16.3X_1X_2 - 40X_1X_3 - 7.2X_2X_3$
Cohesiveness, dimensionless
$\text{Log}_{10}(Y_2) = 0.6X_1 - 0.6X_2 - 0.9X_3$
Adhesiveness, N
$Y_3 = -36.6X_1 - 0.7X_2 + 59.1X_3 + 63.3X_1X_2 - 48.9X_1X_3 - 90.9X_2X_3 +$ $26.6 X_1X_2 (X_1-X_2) + 205.2 X_1X_3 (X_1-X_3) + 33.5X_2X_3 (X_2-X_3)$
Apparent Viscosity, cp
$\text{Log}_{10}(Y_4) = -2.4X_1 + 1.3X_2 - 1.8X_3 + 5.6X_1X_2 + 16.2X_1X_3 + 6.9X_2X_3$

* The models with 2nd order terms indicate synergism in some of the binary blends.

The hardness of samples was mainly dependent on the proportion of WPXC ($p < 0.0001$) (Table 6.3). The contours of response surface for hardness (Figure 6.3a) showed a minimum region parallel to the icing sugar axis. It can be seen that once a certain level of WPXC is attained, the contour interval of response surface becomes very narrow, indicating that a small change in the WPXC content abruptly increases the hardness of the samples. It is also noticeable that a certain ratio of moisture to WPXC must be achieved

without which the resulting product was too firm. Accordingly, the significant moisture - WPXC interaction ($p < 0.002$) shows that the hydration level of WPXC plays an important role in determining the firmness of the samples.

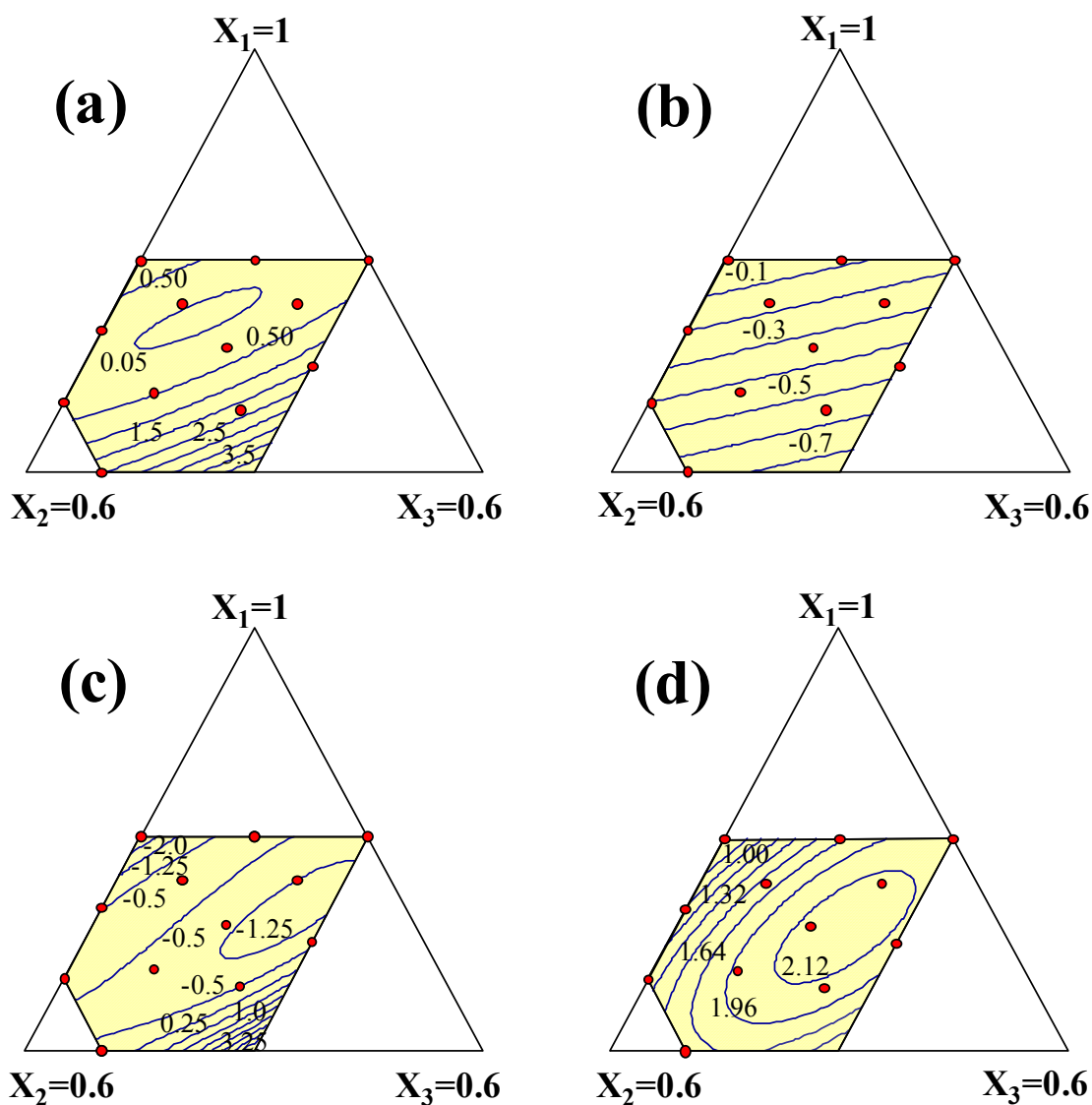


Figure 6.3. Contour plots for (a) hardness, (b) cohesiveness, (c) adhesiveness and (d) apparent viscosity for a low fat cake frosting (80 g/Kg fat).

The cohesiveness of samples was mainly influenced by the proportion of WPXC ($p < 0.004$) (Table 6.1). The contours of response surface (Figure 6.3b) are parallel and facing the moisture corner of the simplex, this indicates that moisture exhibits a linear blend: as its

proportion increases, the effect of the remaining components diminishes in proportion. This response is common when a component serves as a diluent (Myers & Montgomery, 1995).

The adhesiveness of samples was most influenced by the interaction moisture - WPXC ($p < 0.0007$). An intermediate amount of moisture and complexes was necessary to obtain adequate adhesiveness (Figure 6.3c). At too low WPXC content, adhesiveness decreased. On the other hand, at too low moisture - WPXC ratio, adhesiveness was completely lost (at this extreme samples were rather crumbly).

Table 6.4. Analysis of variance. Fitting of experimental data to surface response models.

Response	Source	df	Sum of squares	Mean square	F value	Prob > F
Hardness	Regression (quadratic)	5	7.170	1.434	32.79	<0.01
	Lack of fit	5	0.177	0.035	0.62	0.70
	Pure error	3	0.173	0.058		
Cohesiveness	Regression (linear)	2	0.525	0.263	9.34	0.004
	Lack of fit	8	0.263	0.033	2.15	0.29
	Pure error	3	0.046	0.015		
Adhesiveness	Regression (cubic)	7	0.160	0.200	20.13	<0.01
	Lack of fit	3	0.029	0.015	2.10	0.26
	Pure error	3	0.021	0.007		
Apparent	Regression (quadratic)	5	2.154	0.431	70.85	<0.0001
Viscosity	Lack of fit	6	0.032	0.005	0.72	0.66
	Pure error	3	0.022	0.007		

The apparent viscosity presented a maximum towards the moisture - WPXC edge (Figure 6.3d), and was mainly influenced by the interaction moisture - WPXC ($p < 0.001$). Samples at the right side of this maximum were extremely viscous due to the high content of WPXC and low moisture level. It was also found that for the same proportion, WPXC produced roughly a ten-fold increase in viscosity compared to icing sugar (Figure 6.3d).

The proportion of WPXC strongly affected all the studied response variables (Table 6.3). Overall, WPXC had a major role in imparting an adequate set of textural attributes and viscosity to the low fat products. The significant interaction sugar - WPXC ($p < 0.001$) present for the apparent viscosity response may be related to a competition between these two ingredients to adsorb moisture. Sugar is known to interact with water by hydrogen bonding, and is used to control A_w in a variety of products (Christen & Smith, 2000). However, it is evident (Figure 6.3a and Figure 6.3d) that WPXC are more effective in increasing the hardness and viscosity of the samples, likely due to the greater water absorption and thickening capacity of WPXC compared to icing sugar (Sanchez & Paquin, 1997).

Another parameter that greatly influenced the response attributes was the synergistic interaction moisture - WPXC ($p < 0.001$). This interaction revealed the importance of achieving a good hydration level of WPXC to fully develop the fat mimetic abilities of the ingredient. Moreover, it was determined that a certain ratio of moisture to WPXC, ranging from around 3:1 to 15:1, must be achieved without which the low fat products lacked the desired consistency. The optimal moisture to WPXC ratio varied according to the desired texture. For soft textures, as is the case of cake frostings, the optimum was around 8:1, whereas, for firmer textures, as in sandwich cookie fillings, the optimal ratio was lower and around 5:1.

6.5.3. Formulae optimization

The optimal formulae region to produce a reduced fat cake frosting (80 g/kg fat) with satisfactory viscosity and texture attributes (Figure 6.4, shaded portion) was located by superimposing contour plots of the selected responses and applying the desirability specifications of acceptable product quality presented in Table 6.5.

The resulting plot (Figure 6.4) shows that sample No. 9 lies inside the desirability region, whereas samples No. 2 is very close to it, in agreement with PCA results. One formulation meeting the desirability specifications is presented in Table 6.6. Also presented in this table are the results obtained for the production of reduced fat cake frostings and sandwich

cookie fillings (160 g/kg or 80 g/kg fat) that meet the texture and viscosity acceptability requirements.

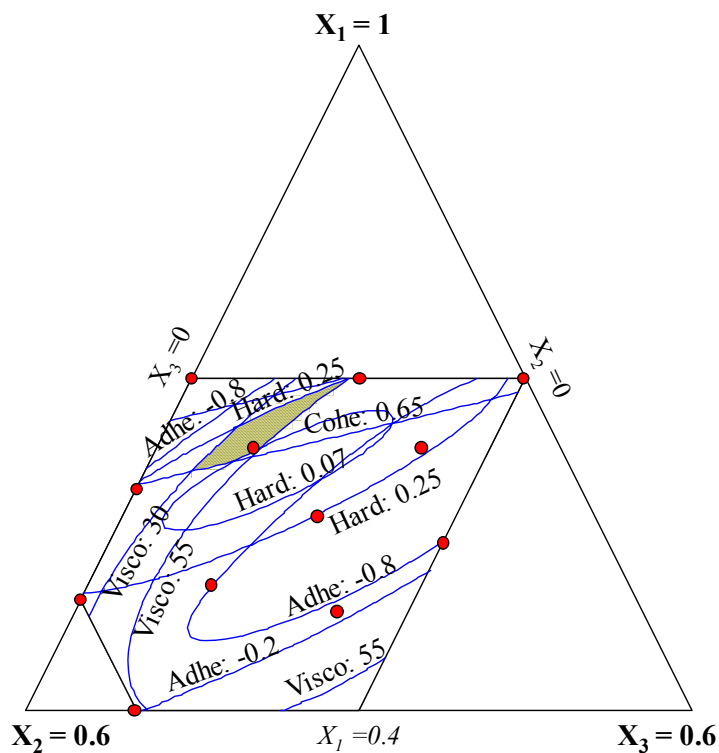


Figure 6.4. Overlay contour plot for a low fat cake frosting acceptability (80 g/Kg fat). Shaded area identifies the formulation space that meets the desirability specifications.

Table 6.5. Desirability specifications for cake frostings and cookie fillings.

<i>Response</i>	<i>Goal</i>	Cake frosting		Cookie filling	
		<i>Low threshold</i>	<i>High threshold</i>	<i>Low threshold</i>	<i>High threshold</i>
Hardness (N)	<i>In range</i>	0.07	0.30	1.00	2.85
Cohesiveness*	<i>In range</i>	0.65	0.85	0.20	0.40
Adhesiveness (N)	<i>Minimize</i>	-0.80	-0.15	-1.70	-0.60
Viscosity (cp)	<i>In range</i>	30	55	32	70

* dimensionless

Table 6.6. Most desirable formulations (actual composition g/kg) for low fat products with acceptable texture and viscosity attributes. Tested samples that lied inside or close to the optimum.

Product	<i>Optimized formulations</i> [*]			Tested samples [‡]
	WPXC	Moisture	Icing sugar	
<u>80 g/kg fat</u>				
Cake frosting	17.32	156.7	65.98	2, 9
Cookie filling [†]	18.92	101.1	120	6
<u>160 g/kg fat</u>				
Cake frosting	9.03	92.34	58.63	None
Cookie filling [†]	11.77	75.09	73.14	2, 11

* Constant ingredients are listed in section 2.2.

‡ Actual compositions are presented in Table 2.

† Low fat sandwich cookie fillings do not meet Aw requirements.

6.5.4. Melting profiles

Structural melting in dynamic oscillation during a temperature ramp can give an idea of the melting mouthfeel of the products. Melting profiles for controls and best-tested samples (No. 9 and No. 2) are presented in Figure 6.5a through Figure 6.5d.

The CFF presented a rapid decline of G' (Figure 6.5a) with the network melting completely ($G' = G''$) at 46.2 ± 0.2 °C. On the other hand, CLF presented a shallow decline in G' (Figure 6.5b), with a minimum at 50.1 ± 1.2 °C. Moreover, the network structure never lost its overall cohesion: the elastic component (G') remained as the dominant response over the whole temperature range. This behavior contrasts with the melting profile of the full fat control. Sample No. 9 (Figure 6.5c), which formulation lies inside the desirability region (Figure 6.4), presented a similar profile to that of the full fat control, although G' did not fully reach the viscous component (G'') it draw very near to it at 47.2 ± 0.5 °C, a temperature similar for the G'/G'' crossover for the CFF. The overall profile for this sample matches much better the targeted profile compared to the already commercialized

low fat product. Sample No. 2, which formulation lies very close to, but not inside, the desirability region (Figure 6.5d) presented a profile similar to that of the low fat commercial control.

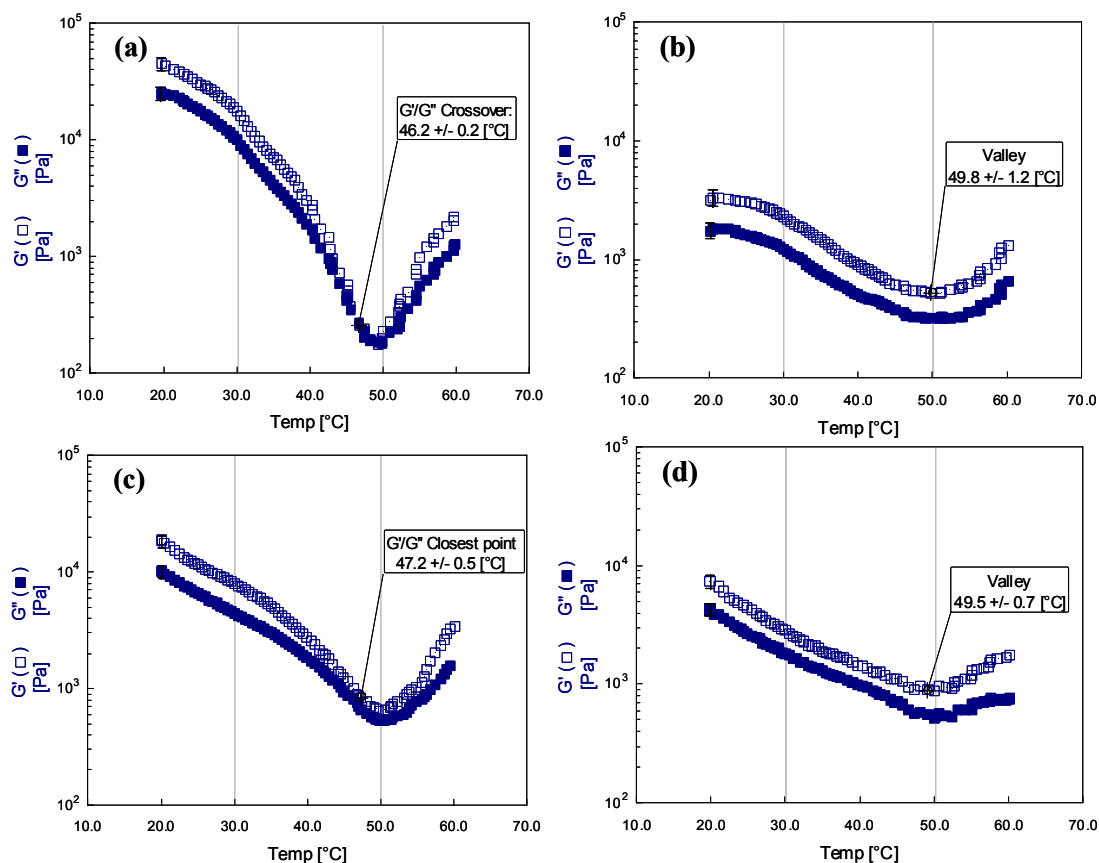


Figure 6.5. Melting profiles of commercial cake frostings controls and best low fat samples (80g/kg fat) containing WPXC as fat replacer. (a) CFF = commercial full fat control, (b) CLF = commercial low fat control; (c) No. 9 = sample inside the desirability region; (d) No. 2 = sample close to the desirability region.

The subsequent rise in G' for all samples might be related to rearrangements in the products' microstructure induced by the heat treatment. Samples containing adequate levels of WPXC and moisture (for example, sample No. 9) display a notable resemblance to the full fat control characteristics. This is seemingly due to the attainment of an optimum ingredients level that permitted the appropriate interactions to occur and yielded a low fat

product with satisfactory viscosity as well as textural, melting and mechanical deformation profiles.

6.5.5. Water activity

Low fat samples containing WPXC had an A_w of 0.82 ± 0.02 . The commercial cake frosting controls had a similar A_w ; therefore, the optimized low-fat samples are suitable cake frostings. On the other hand, the prepared and commercial sandwich cookie filling controls had an A_w ranging from 0.4 to 0.53. A sandwich cookie filling must have an A_w close to that of the cookie shell (usually between 0.2-0.6); otherwise the excess humidity will migrate, resulting in a soggy cookie that lacks the desirable crunchy sensation (Manley, 2000). Thus, for the development of a low fat sandwich cookie filling, the use of emulsifiers, humectants and bulking agents such as lecithin, polydextrose, sorbitol, acacia gum, mono- and diglycerides, glycerin and microcrystalline cellulose must be considered to achieve and maintain a low A_w (Manley, 2000; Ward, 1997; Glicksman, 1991).

6.6. Conclusions

This study showed that WPXC could be successfully used in neutral pH food systems as fat replacer. Response surface methodology and mixture experimental design were used to optimize formulations of low fat cake frostings containing 160 or 80 g/kg fat, with textural, rheological, and melting profiles similar to those of a full fat control. This approach also permitted to find the optimum levels of WPXC and moisture to use in order to fully develop the fat mimetic ability of the functional ingredient. On the other hand, WPXC were not hygroscopic enough for the production of sandwich cookie fillings. Thus, for the latter application the use of other ingredients, such as humectants and emulsifiers, is essential to maintain a low A_w .

6.7. Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from NSERC industrial chair and industrial partners Agropur, Parmalat, and Novalait Inc.

“I do not know what I may appear to the world; but to myself I seem to have been only like a boy playing on the seashore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me.”

Isaac Newton (1642–1727)
Physicien anglais

Chapitre 7

Conclusions Générales

Notre hypothèse de travail était que l'étude, à un niveau fondamental de l'interaction associative entre la β lg et le xanthane (natif ou microfluidisé), permettrait de déterminer l'effet de différents paramètres, tel le ratio protéine - polysaccharide, le cisaillement, le pH, et le poids moléculaire du polysaccharide, sur le développement, l'évolution et les caractéristiques finales des structures complexes formées. Pour arriver à cette fin, plusieurs méthodes chimiques et physiques ont été utilisées qui ont permis de faire le lien entre les paramètres contrôlés et les structures obtenues.

Le but de cette étude a été atteint, puisqu'une compréhension accrue sur l'interaction entre les protéines et les polysaccharides anioniques, sous des conditions de compatibilité thermodynamique, a été acquise. Les résultats obtenus ont permis de déterminer les conditions environnementales nécessaires et les mécanismes suivis pour l'obtention d'une variété de textures, en passant des complexes fibreux aux complexes particulés et allant jusqu'à la formation d'un réseau gélifié. Ainsi, des outils nécessaires pour le développement de structures complexes, possédant des propriétés fonctionnelles façonnées, ont été mis en place.

Dans un premier temps, l'effet de la microfluidisation (un traitement aux hautes pressions dynamiques) sur le xanthane a été déterminé tant au niveau chimique que physique. Il a été trouvé que la microfluidisation produit une transition d'ordre - désordre dans la molécule et que, selon la sévérité du traitement, différents niveaux de dégradation sont obtenus. Lorsque le traitement est léger, e.g. une seule passe à travers la chambre de microfluidisation, l'effet principal est celui de détruire les microgels et les agrégats de xanthane en solution. Ceci est caractérisé par une diminution de la viscosité uniquement aux faibles taux de cisaillement, et aussi par une biréfringence plus élevée de l'échantillon

traité. Le xanthane conserve dans ce cas sa capacité d'agrégation en solution et présente des signes de récupération de viscosité quelque temps après le traitement. Cependant, pour des traitements plus sévères, la molécule se trouve dépliée et est plus susceptible d'être affectée par les forces de cisaillement et cavitation rencontrées lors du traitement par hautes pressions. Ainsi, en augmentant la sévérité du traitement, la récupération de la molécule est de plus en plus faible et, à la limite, une dégradation de la chaîne principale est détectée chimiquement. Ceci est aussi accompagné par une importante diminution de la viscosité, du caractère pseudoplastique, de la biréfringence et du poids moléculaire de la molécule. D'autre part, à de hautes forces ioniques, la molécule est plus affectée par le traitement, excepté pour les traitements moins sévères, étant donnée sa conformation hélicoïdale ordonnée. Nos travaux ont permis d'acquérir une connaissance approfondie du comportement de ce polysaccharide et de produire des échantillons de xanthane possédant différents poids moléculaires dont les propriétés sont bien caractérisées, ce qui a permis une meilleure interprétation des résultats obtenus dans la suite des travaux.

Dans un deuxième temps, l'interaction entre la β lg et le xanthane (natif ou microfluidisé), sous des conditions de compatibilité thermodynamique, a été étudiée. Le xanthane étant un polysaccharide anionique, interagit spontanément avec la β lg lorsque le pH du milieu s'approche ou se trouve en dessus du pH isoélectrique (IEP) de la protéine (pH = 5.1). Des structures très différentes sont obtenues selon la méthode d'acidification utilisée et selon l'application d'un cisaillement ou non pendant l'interaction. À un ratio protéine – polysaccharide donné, sous cisaillement, et lorsque l'acidification se fait par ajout d'un acide concentré, la réaction est rapide et alors des complexes fibreux ou particulés peuvent être obtenus selon l'état du xanthane, natif ou microfluidisé. Alors que si l'acidification se fait de façon graduelle, par exemple à l'aide de l'acide glucono- δ -lactone, toujours sous cisaillement, les complexes formés seront plus petits et de nature particulaire, peu importe si du xanthane natif ou microfluidisé est utilisé. Ceci est dû au fait que les pontages protéiques nécessaires pour former des fibres n'ont lieu que lorsque la réaction est rapide. En plus, dans le cas d'une acidification graduelle, la taille des complexes formés est proportionnelle au poids moléculaire du polysaccharide. D'autre part, si l'interaction se fait par acidification graduelle et au repos, la structuration du système mène à la formation d'un

réseau gélifié, et ce, à des concentrations en solides totaux très faibles (0.1% p/p). Ce réseau est stabilisé par les interactions électrostatiques associatives entre les deux biopolymères.

Le ratio protéine – polysaccharide a un effet très important sur la taille, la composition, la structure interne des complexes et même sur la cinétique de formation et croissance de ceux-ci. Des études chimiques, ainsi que des mesures de viscosité et de diffusion de la lumière ont permis de trouver qu'il existe un ratio stœchiométrique (entre 2:1 et 5:1) et un pH optimal, qui dépend du ratio, pour lesquels la stabilité des complexes est maximale et leur taille est optimale pour la production d'ingrédients alimentaires. Ainsi, les molécules de xanthane sont capables de lier une certaine quantité de protéines, mais une fois le ratio stœchiométrique dépassé, i.e. lorsque les complexes lient un excès de protéine, ils sont complètement déstabilisés et une sur-agrégation survient, résultant en une production de particules trop grandes. Dans le cas des systèmes gélifiés, le ratio protéine – polysaccharide détermine le caractère solide du réseau tridimensionnel et il existe aussi un ratio optimal, autour de 2:1, qui rend le gel plus viscoélastique et stable.

Dans un troisième temps, des études de diffusion statique de la lumière aux petits angles, et sous acidification graduelle, ont permis de déterminer que le mécanisme de séparation de phases, suivi par le système β lg – xanthane, est une nucléation et croissance. Les complexes formés initialement sont composés d'un noyau de xanthane qui génère une couche dépourvue de protéine à son alentour donnant ainsi origine à une longueur de corrélation. Celle-ci se traduit par la présence d'un pic dans le profil de lumière diffusée. Les complexes croissent ensuite par des mécanismes d'agrégation menant à la formation de structures fractales. Des mesures de turbidimétrie ont démontré que l'interaction entre la β lg et le xanthane, sous cisaillement ou en repos, s'effectue en deux étapes délimitées par les pH critiques pH_c et pH_ϕ . Le pH_c dénote le début d'interaction correspondant à la formation de complexes primaires solubles. Ce pH est indépendant du ratio macromoléculaire et se trouve au-dessous du IEP de la β lg, à un $pH = 5.8$. Ceci indique que l'interaction électrostatique est initiée dans des régions chargées positivement sur la surface de la protéine. Ensuite à pH_ϕ , les complexes primaires s'agrègent en complexes

interpolymères insolubles. Sous cisaillement, pH_ϕ démarque le début d'une séparation de phases macroscopique, alors qu'en repos il précède la gélification. La méthode de diffusion de la lumière permet aussi de faire le suivi de l'évolution de la structure interne des complexes ou du gel au cours de l'acidification, par le biais de la mesure du degré fractal (d_f) des domaines structuraux. Il a été trouvé que les complexes primaires ont une structure diffuse avec un $d_f \sim 1.4 - 2.0$, indiquant un mécanisme d'agrégation limité par la diffusion (DLCA). Au fur et à mesure que le pH descend, une restructuration et une compactation des complexes a lieu, dû au fait de l'augmentation des charges opposées entre les molécules et à la tendance de la protéine à former des liens coopératifs. Cette restructuration résulte en des complexes interpolymères ou, le cas échéant, en un gel avec une structure interne plus dense avec des $d_f \sim 2.1 - 2.5$.

Enfin, la fonctionnalité des complexes particulés, comme substitut de matière grasse, a été évaluée dans des formulations modèles de garniture à biscuit ou de glaçage à gâteaux. Les résultats démontrent que l'utilisation de complexes peut être adaptée pour obtenir diverses textures en ajustant leur niveau d'hydratation. Ainsi des produits faibles en gras, possédant des profils de texture et de viscosité se rapprochant à ceux des produits témoins, ont été obtenus. Cependant, l'utilisation d'autres ingrédients s'avère nécessaire lorsqu'il est essentiel de maintenir un faible taux d'humidité dans le produit.

Perspectives de recherche

Nos travaux ouvrent la voie à un grand nombre d'investigations. Pour compléter les travaux réalisés dans cette thèse, il serait très intéressant de vérifier si la stabilisation dans la taille des complexes, obtenue à des faibles teneurs en protéine (Chapitre 4), est due à l'atteinte d'un équilibre électrostatique dans le système. De la même façon, il serait souhaitable de vérifier si le deuxième processus d'agrégation, trouvé à des hautes teneurs en protéine (Chapitres 3 et 4), est dû à la neutralisation des complexes, suivi d'une agrégation par des interactions hydrophobes. Ceci pourrait être fait par des mesures de mobilité électrophorétique. Finalement, étant donnée que les traitements de pasteurisation sont couramment utilisés en industrie alimentaire, il serait intéressant d'étudier quel est l'impact d'un traitement thermique sur la taille des complexes. Il est possible qu'un tel traitement induise une trop grande agrégation de protéines dénaturées et masque, par exemple, l'effet d'utiliser du xanthane de différentes tailles moléculaires.

Il serait aussi fort intéressant d'étudier les changements de conformation moléculaire que subissent les biopolymères lors de leur interaction associative. Notamment, les méthodes de spectroscopie infrarouge et de dichroïsme circulaire peuvent donner des informations sur la structure tertiaire des protéines et du polysaccharide. D'autre part, il a été évident dans ces travaux que la conformation et la rigidité des chaînes polysaccharidiques jouent un rôle important sur la structuration et formation de complexes, il serait donc important de vérifier jusqu'à quel point la rigidité du polysaccharide (longueur de persistance, densité de charges) influence les processus de structuration et formation de complexes, notamment, la formation de complexes fractals versus la formation de coacervats, ainsi que sur la formation des structures gélifiées.

Les résultats obtenus dans cette thèse ont mis en évidence la possibilité de créer une structure gélifiée stabilisée par des interactions électrostatiques associatives entre biopolymères, ce résultat n'étant jamais auparavant cité en littérature, nous a mené à déposer une demande de brevet provisoire. Nécessairement, il reste plusieurs études à effectuer, notamment pour vérifier les hypothèses émises. Il faudrait étudier plus en détail

le mécanisme de gélification et la structure des gels. Des résultats préliminaires, sur la formation de ces gels, suggèrent que des liaisons hydrogène soient aussi mises en jeu. La vérification de l'importance de ces liens sur la stabilité du gel, ainsi que la mobilité des constituants dans celui-ci, compléterait les connaissances acquises jusqu'à présent.

D'autre part, il reste à bien comprendre quelles sont les propriétés qu'un polysaccharide doit posséder pour qu'un gel puisse être formé sous des conditions de compatibilité thermodynamique. Par exemple, est-ce que la formation du gel est liée à la capacité du xanthane à s'agréger et former un réseau faible en solution? Des études avec d'autres types de polysaccharides, e.g. des polysaccharides sulfatés, permettraient d'identifier les attributs qu'un polysaccharide doit posséder pour former ce type de gel, et ainsi mieux comprendre ce phénomène. De la même façon, d'autres conditions environnementales doivent être explorées, e.g. différentes forces ioniques et concentrations, pour déterminer l'étendu de la plage de conditions dans lesquelles ce type de gel peut être obtenu.

D'un point de vue pratique/application, l'effet trouvé sur le type d'ajustement de pH (acidification lente par GDL versus par titrage avec HCl) sur la structuration des systèmes contenant des protéines et des polysaccharides est également un facteur intéressant en industrie alimentaire. Ceci est dû au fait qu'une acidification lente rejoint toutes les applications de type yaourt. Dans ce type de produits, les souches bactériennes qui acidifient le milieu et qui sont aussi productrices d'exopolysaccharides peuvent contribuer de façon importante à la texturation et stabilisation du produit.

D'autre part, la gélification à froid de protéines présente une option fort prometteuse, en pharmaceutique ou pour la fortification d'aliments, du fait qu'il serait possible de développer des matrices protectrices pour des protéines ou autres substances bioactives (enzymes, drogues) sensibles à la chaleur. Il serait donc intéressant de faire des études sur la capacité du gel pour former des matrices stables pour délivrer ou protéger des molécules bioactives ou des micronutriments tel le calcium ou le fer, qui présentent de l'intérêt pour la fortification des aliments.

Appendice A

Statistical Analysis for low-fat products

In this section, PCA analysis, response surface and formulae optimization results that were not developed in chapter 6, are presented. Four low-fat products were prepared, two cake frostings and two cookie fillings containing either 160 or 80 g/kg fat, i.e. 50% or 75% less fat than a prepared control. In Chapter 6, the full analysis for a cake frosting containing 80 g/Kg fat was presented; here the results for the other three products are summarized. Two other formulations were added to the tests to prepare 160 g/Kg fat products, these formulation are marked as A and B in Figure A.2a.

A.1. 160 g/Kg fat cookie filling and cake frosting

Main Variation among Samples

The PCA was carried out on the Brookfield apparent viscosity and on the texture attributes, springiness, hardness, cohesiveness, adhesiveness, and gumminess. The first and second principal components (PC) explained about 93% of the variation among samples (Figure A.1), which was mainly described by the hardness, cohesiveness, adhesiveness, and apparent viscosity.

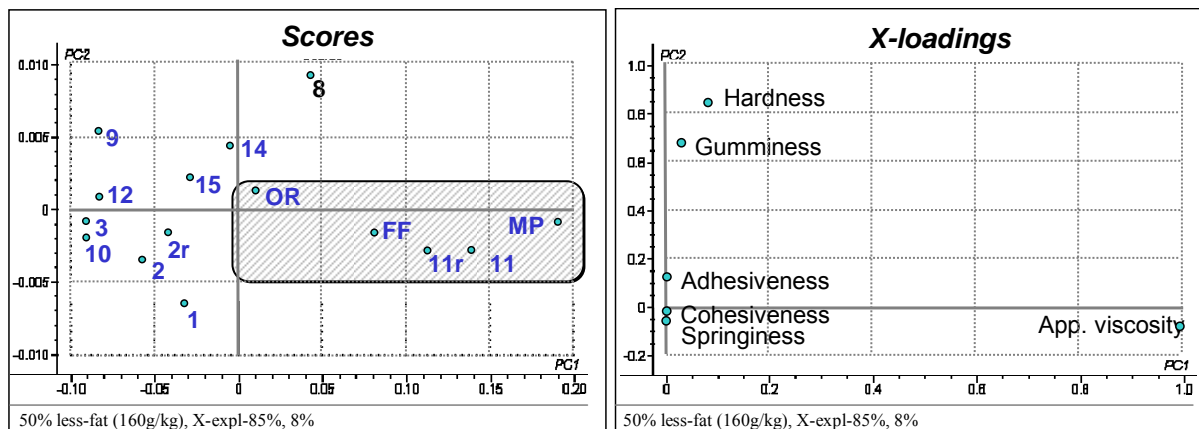


Figure A.1. Scores and loadings for PC1 and PC2 of texture and viscosity data for a cookie filling. Samples with preferred characteristics are shaded. FF = full fat prepared control; OR and MP are full fat commercial controls.

Response surface

The response surfaces for the more influential attributes (hardness, cohesiveness, adhesiveness, and apparent viscosity) are presented in Figure A.2. The adequacy of the models fit was demonstrated by the significant F-values: the models explained 99.87% of the variation in the experimental data. General equations describing each response are presented in Table A.1. Analyses of variance for model fits are presented in Table A.2.

Hardness. The water, sugar, and WPI-XG complexes had an effect ($p < 0.0001$) on the hardness. The contours of response surface for hardness are parallel (Figure A.2), indicating that water exhibits a linear blend, i.e., as its proportion increases, the effect of the remaining components diminishes proportionally. This response is common when a component serves as a diluent.

Cohesiveness. This parameter presented dependence of the interaction of moisture with the solid ingredients, sugar and complexes ($p < 0.01$), and the response formed a saddle point. This saddle point separates the samples that were too compact and/or dry to be fluid (points 4, 5, 6, 7, and 13 in Figure 6.1a) from the rest of the samples.

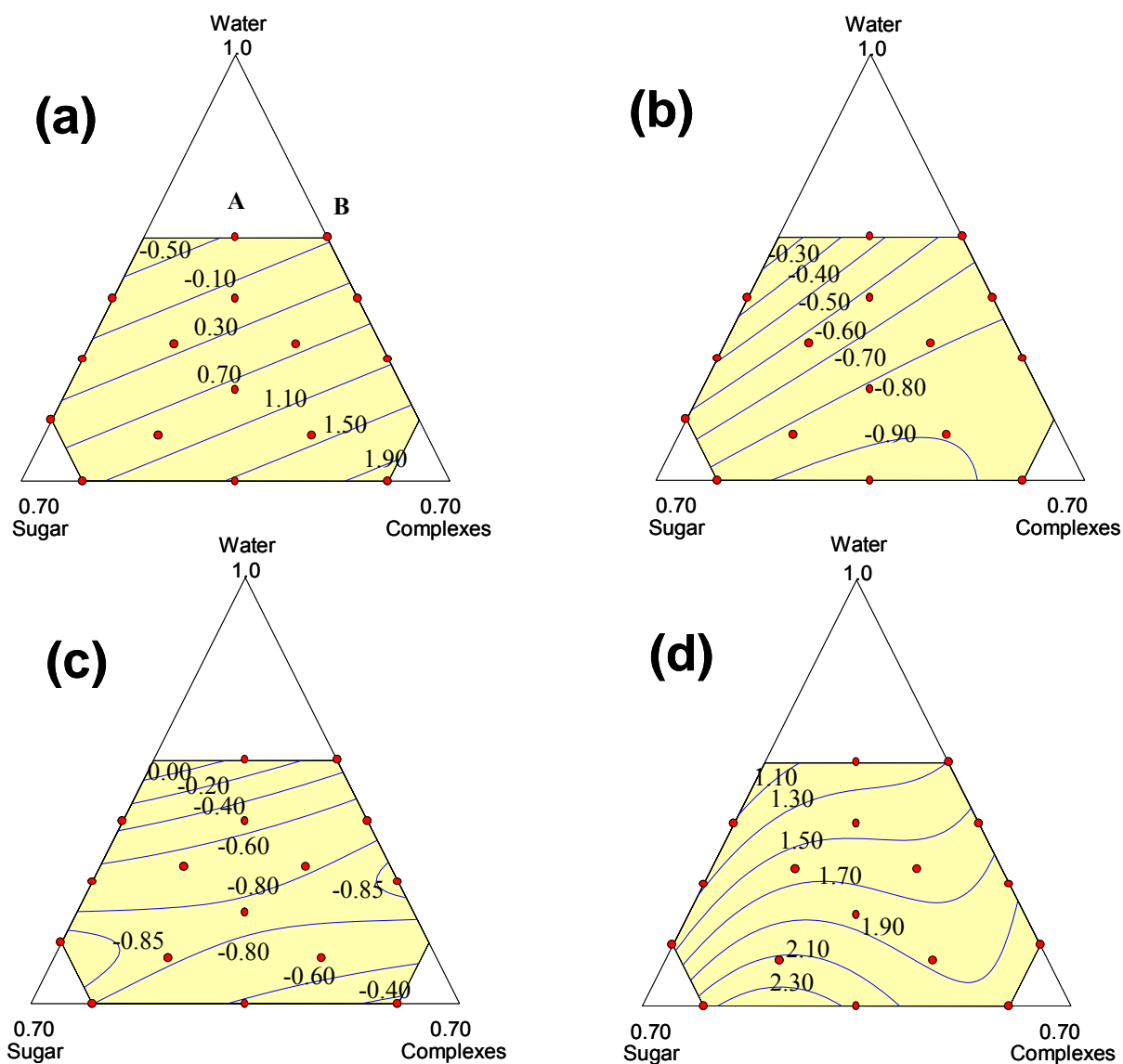


Figure A.2. Contour plots for (a) hardness, (b) cohesiveness, (c) adhesiveness, and (d) apparent viscosity for a 50% less-fat product.

Adhesiveness. The adhesiveness of samples was highly dependent on the interaction of moisture with complexes ($p < 0.0003$). The adhesiveness is a characteristic that is principally conferred by fat, and complexes seemed to fulfill this effect better than sugar (Table A.1).

Apparent viscosity. The apparent viscosity was principally controlled by an interaction between sugar and complexes ($p < 0.001$). Complexes were more effective in increasing the hardness and the viscosity of the product, likely due to the greater water absorption and thickening capacity of complexes compared to sugar.

Table A.1. Predictive regression models describing the relationship between textural and viscosity responses with mixtures composition (pseudocomponents) for 50%-less fat products. X_1 = moisture, X_2 = icing sugar, and X_3 = WPXC

Hardness, N
$\text{Log}_{10}(Y_1) = -1.937X_1 + 0.8222X_2 + 2.248X_3$
Cohesiveness, dimensionless
$\text{Log}_{10}(Y_2) = 0.161X_1 - 0.750X_2 - 0.764X_3 - 1.641 X_1X_3 - 0.7422 X_2X_3$
Adhesiveness, N
$Y_3 = 2.772 X_1 - 0.894X_2 - 0.253X_3 - 4.125X_1X_2 - 7.221X_1X_3$
Apparent Viscosity, cp
$\text{Log}_{10}(Y_4) = 0.605X_1 + 1.539X_2 + 2.433X_3 + 0.946X_2X_3 + 4.920X_2X_3(X_2 - X_3)$

* The models with 2nd order terms indicate synergism in some of the binary blends.

Table A.2. Analysis of variance. Fitting of experimental data to surface response models.

Response	Source	df	Sum of squares	Mean square	F value	Prob > F
Hardness	Regression (linear)	2	8.122	4.061	61.92	<0.0001
	Lack of fit	13	0.8471	0.0652	0.973	0.571
	Pure error	4	0.268	0.067		
Cohesiveness	Regression (quadratic)	4	0.4697	0.1174	35.74	<0.0001
	Lack of fit	11	0.0289	0.0026	0.5159	0.825
	Pure error	4	0.0204	0.051		
Adhesiveness	Regression (quadratic)	4	0.9665	0.2416	7.812	<0.01
	Lack of fit	11	0.4237	0.0385	3.827	0.13
	Pure error	4	0.0403	0.0101		
Apparent Viscosity	Regression (quadratic)	4	2.113	0.528	31.04	<0.0001
	Lack of fit	11	0.198	0.018	1.256	0.448
	Pure error	4	0.057	0.014		

Formulae optimization

Formulae optimizations to produce a 50%-less fat cookie filling or cake frosting are presented in Figure A.3 and Figure A.4 respectively. Optimization was carried out by superimposing contour plots of the selected responses and applying the desirability specifications of acceptable product quality presented in Table 6.5.

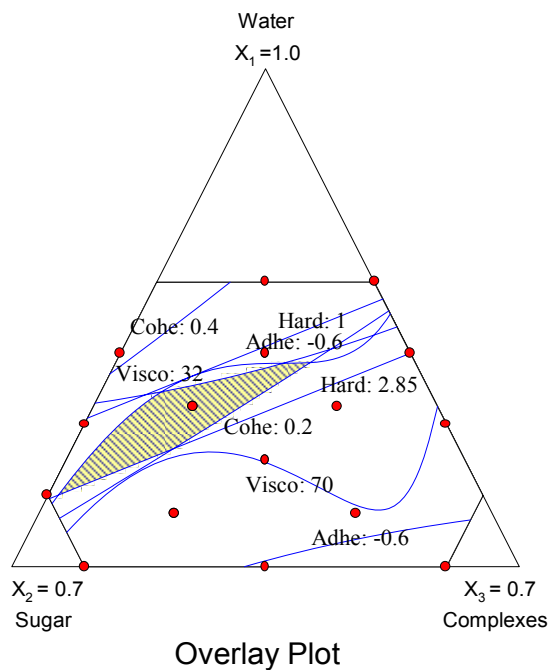


Figure A.3. Overlay contour plot for a 160g/kg fat (50% less-fat) cookie filling. The shaded region identifies the optimum formulation space.

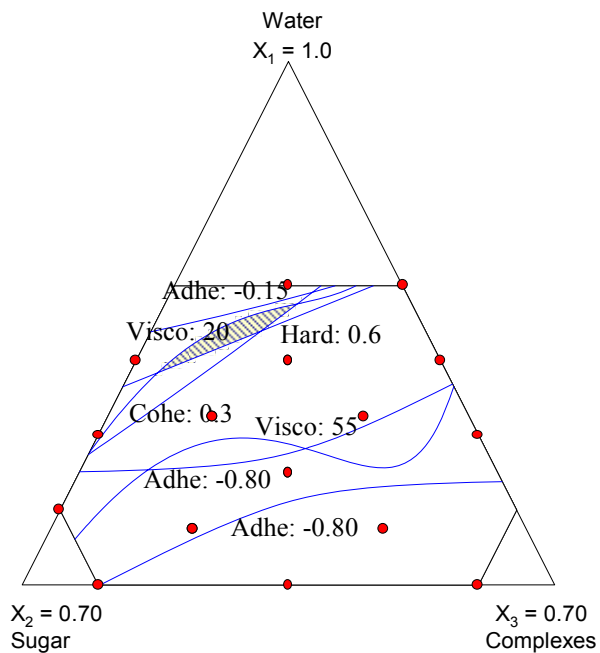


Figure A.4. Overlay contour plot for a 160 g/Kg fat 50% (less-fat) cake frosting. The shaded region identifies the optimum formulation space.

The plot in Figure A.3 shows that sample No.11 lies inside the desirability region to produce a cookie filling with 160g/Kg fat in agreement with the PCA analysis. The plot in Figure A.4 shows the optimal region to produce a 60g/Kg fat cookie filling; none of the tested samples were inside the region. One formulation meeting the desirability specifications for both these products is presented in Table 6.6.

A.2. 80 g/kg fat cookie filling

The PCA and surface response analysis for this product are presented in Chapter 6 (Figure 6.2 and Figure 6.3) and the optimization plot is presented in Figure A.5.

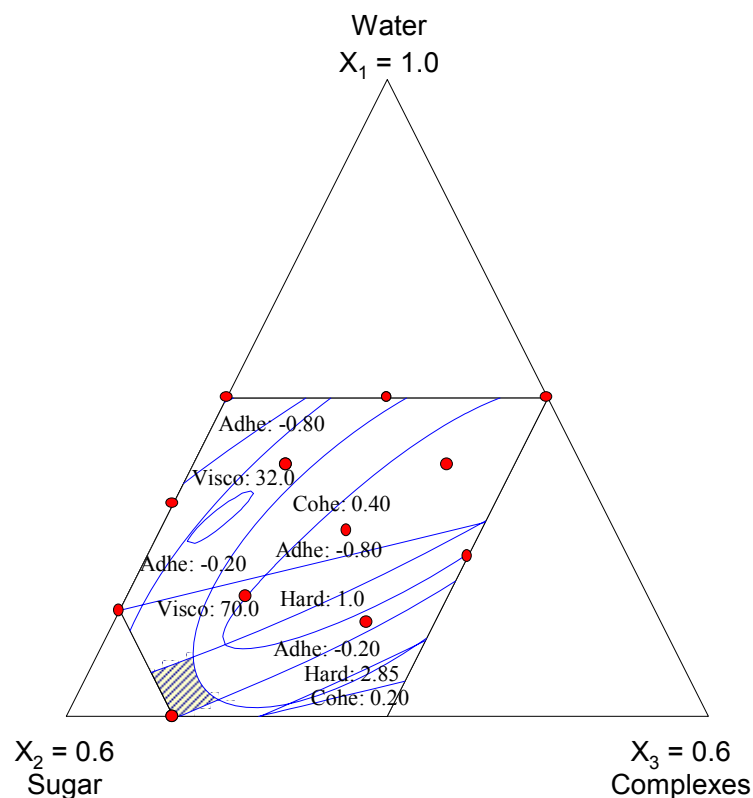


Figure A.5. Overlay contour plot for 75% less-fat cookie filling acceptability (80 g/Kg fat).

Shaded area identifies the formulation space that meets the desirability specifications.

It can be seen that sample No. 6 lies inside the desirability region. One formulation meeting the desirability specifications for this product is presented in Table 6.6.

Bibliographie

- Ahmed L.S., Xia J., Dubin P. & Kokufuta E. (1994). Stoichiometry and the mechanism of complex formation in protein- polyelectrolyte coacervation. *J.M.S.-Pure and Applied Chemistry*, A31 (1): 17-29.
- Åkerstrom B., Flower D.R. & Salier J.-P. (2000). Lipocalins: unity in diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482: 1-8.
- Akoh C.C. (1998). Fat replacers. *Food Technology*, 52: 47-53.
- Allen R.J. & Warren P.B. (2004). Complexation and Phase Behavior of Oppositely Charged Polyelectrolyte/Macroion Systems. *Langmuir*, 20: 1997-2009.
- Alyzadehfard M.R. & Wiley D. (1996). Non-newtonian behavior of whey protein solutions. *Journal of Dairy Research*, 63: 315-320.
- Anderson V.J. & Jones R.A.L. (2001). The influence of gelation on the mechanism of phase separation of a biopolymer mixture. *Polymer*, 42: 9601-9610.
- Antonov Y.A., Grinberg, V.Y., Zhuravskaya, N.A. & Tolstoguzov, V.B. (1980). Liquid two-phase water - protein - polysaccharide systems and their processing into textured protein products. *Journal of Texture Studies*, 11: 199-215.
- AOAC (1990). *Official Methods of Analysis*, 13th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Asnaghi D., Giglio M., Bossi A. & Righetti P.G. (1995). Large-scale microsegregation in polyacrylamide gels (spinodal gels). *Journal of Chemical Physics*, 102 (24): 9736-9742.
- Badui D.S. (1990). *Química de los Alimentos*. 2ème édition. Editorial Alhambra Mexicana, S.A. de C.V. Mexico.
- Baeza R., Gugliotta L.M. & Pilosof A.M.R. (2003). Gelation of β -lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: Kinetics and gel properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31 (1-4): 81-93.
- Bakker M.A.E., Konig M.M.G. & Visser J. (1994). *Fatty ingredient*. Unilever NV, assignee. World Patent Application WO94/14334.
- Bansil R. & Liao G. (1997). Kinetics of spinodal decomposition in homopolymers solutions and gels. *Trends in Polymer Science*, 5: 146-156.
- BeMiller, J.N. (1996). Gums/Hydrocolloids Analytical Aspects. In: *Carbohydrates in Foods*, pp. 265-318. Eliasson A.C. (Ed.), Marcel Dekker, NY.
- Bezemer L., Ubbink J.B., Kooker J.A., Kuil M.E. & Leyte J.C. (1993). On the Conformational Transitions of Native Xanthan. *Macromolecules*, 26 (24): 6436-6446.

- Binder K. (1991). Spinodal Decomposition. In: *Materials Science and Technology. A Comprehensive Treatment. Vol. 5. Phase Transformations in Materials*; Chap. 7, pp. 405-471. Cahn R.W., Haasen P. & Kramer E.J. (Eds.), VCH, Weinheim.
- Bishay I.E. & Clark D.R. (1996). *Carbohydrate / Protein Cream Substitutes*. The Nutrasweet Co., assignee. US Patent 5,536,514.
- Bohdanecky M. & Kovař J. (1982). *Viscosity of polymer solutions*. Vol. 2. Jenkins A.D. (Ed.), Elsevier Scientific Pub. Co., New York. 286 pp.
- Bossart J. & Öttinger H.C. (1997). Orientation of Polymer Coils in Dilute Solutions Undergoing Shear Flow: Birefringence Experiments. *Macromolecules*, 30: 5527-5540.
- Bourriot S., Garnier C. & Doublier J-L. (1997). Séparation de Phase, Rhéologie et Structure des Mélanges Caséine Micellaire - Galactomannanes. In: *Les Cahiers de Rhéologie. Rhéologie des Matériaux pour les Industries Agro-alimentaires, Cosmétiques et Pharmaceutiques*, 15 (4) : 284-293. 32ème Colloque Annuel du Groupe Française de Rhéologie. Nantes.
- Bourne M.C. (1978). Texture Profile Analysis. *Food Technology*, 32: 62-66, 72.
- Britten M. & Giroux H.J. (2001). Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. *Food Hydrocolloids*, 15 (4-6): 609-617.
- Brownlow S., Cabral J.H.M., Cooper R., Flower D.R., Yewdall S.J, Polikarpov I., North A.C.T. & Sawyer L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution - still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5 (4): 481-495.
- 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 (4): 383-390.
- Bryant C.M. & McClements D.J. (1998). Molecular Basis of Protein Functionality with Special Consideration of Cold-set Gels Derived from Heat-Denatured Whey. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 143-151.
- Bungenberg de Jong H.G. (1936). *La coacervation complexe et son importance en biologie. Tome I : Généralités et coacervats complexes*. Actualité Scientifiques et industrielles VI. Exposés de Biologie. Hermann et cie, éditeurs.
- Burgess D.J. (1994). Complex Coacervation: Micro-Capsule Formation. In: *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*; Chap. 17, pp. 285-300. Dubin P., Bock J., Davies R.M., Schulz D.N. & Thies C. (Eds.), Springer, Berlin.
- Burgess D.J. & Carless J.E. (1984). Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation. *Journal of Colloid and interface Science*, 98 (1): 1-8.
- Burova T.V., N.V. Grinberg, I.A. Golubeva, A.Y. Mashkevich, V.Y. Grinberg & Tolstoguzov V.B. (1999). Flavour release in Model Bovine Serum albumin / pectin /2-octanone Systems. *Food Hydrocolloids*, 13: 7-14.

- Bushell G. & Amal R. (2000). Measurement of Fractal Aggregates of Polydisperse Particles Using Small-Angle Light Scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*, 221: 186-194.
- Bushell G.C., Yan Y.D., Woodfield D., Raper J. & Amal R. (2002). On techniques for the measurement of the mass fractal dimension of aggregates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 95: 1-50.
- Butler M.F. (2002). Mechanism and Kinetics of Phase Separation in a gelatin/Maltodextrin Mixture Studied by Small-Angle Light Scattering. *Biomacromolecules*, 3: 676-683.
- Butler M.F. & Heppenstall-Butler M. (2003a). "Delayed" Phase Separation in a Gelatin/Dextran Mixture Studied by Small-Angle Light Scattering, Turbidity, Confocal Laser Scanning Microscopy, and Polarimetry. *Biomacromolecules*, 4 (4): 928-936.
- Butler M.F. & Heppenstall-Butler M. (2003b). Phase separation in gelatin/dextran and gelatin/maltodextrin mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17(6): 815-830.
- Capron I., Alexandre S. & Muller G. (1998). An atomic force microscopy study of the molecular organisation of xanthan. *Polymer*, 39 (23): 5725-5730.
- Capron I., Brigand G. & Muller G. (1997). About the Native and Renatured Conformation of Xanthan Exopolysaccharide. *Polymer*, 38 (21): 5289-5295.
- Carlsson F., Malmsten M. & Per Linse P. (2003). Protein - Polyelectrolyte Cluster Formation and Redissolution: A Monte Carlo Study. *Journal of the American Chemical Society*, 125: 3140-3149.
- Carnali J.O. (1991). A Dispersed Anisotropic Phase as the Origin of the Weak-Gel Properties of Aqueous Xanthan Gum. *Journal of Applied Polymer Science*, 43: 929-941.
- Carpinetti M. & Giglio M. (1992). Spinodal-type dynamics in fractal aggregation of colloidal clusters. *Physical Review Letters*, 68 (22): 3327-3330.
- Carreau P.J. (1972). Rheological equations from molecular network theories. *Transactions of the Society of Rheology*, 16 (1): 99-127.
- Carreau P.J., de Kee D.C.R. & Chhabra R.P. (1997). *Rheology of Polymeric Systems, Principles and Applications*, pp. 1-15. Hanser / Gardner Publications, Inc. Cincinnati. ~520p.
- Castelain C. (1986). Interaction Protéines - Polyosides. In: *Propriétés Fonctionnelles des Polysaccharides*, pp. 281-296. Colonna M. & Thibault M. (Eds.), Éditions Apria.
- Cayot P. & Lorient D. (1997). Structure-Function Relationship of Whey Proteins. In: *Food Proteins and Their Applications*, Chap. 8, pp. 225-256. Damodaran S. & Paraf A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York. 696p.

- Cencia-Rohan L. & Silvestri S. (1993). Effect of solvent system on microfluidization - induced mechanical degradation. *International Journal of Pharmaceutics*, 95 (1-3): 23-28.
- Chai C.K., Creissel J. & Randrianantoandro H. (1999). Flow-induced birefringence of linear and long chain-branched metallocene polyethylene melts subject to steady start-up flow. *Polymer*, 40 (15): 4431-4436.
- Chaplin M.F. (1986). Monosaccharides. In: *Carbohydrate Analysis: A practical Approach*, Chap. 1, pp. 1-36. Chaplin M.F. & Kennedy J.F. (Eds.), IRL Press, Oxford Washington.
- Chassapis D., Balouktsis A. & Karapantsios T.D. (2002). Flow birefringence of temporary polymer networks. *European Polymer Journal*, 38 (6): 1071-1078.
- Chauveteau G. (1982). Rodlike polymer solutions flow through fine pores: influence of pore size on rheological behavior. *Journal of Rheology*, 26 (2): 111-142.
- Chauveteau G. & Kohler N. (1984). Influence of microgels in polysaccharide solutions on their flow behavior through porous media. *Society of Petroleum Engineers of AIME*, June, 361-368.
- Cheftel J.C. & Dumay E. (1993). Microcoagulation of proteins for development of "creaminess". *Food Reviews International*, 9 (4): 473-502.
- Cheftel J.-C., Cuq J.-L. & Lorient D. (1985). Protéines Alimentaires. In: *Biochimie - Propriétés Fonctionnelles - Valeur Nutritionnelle - Modifications Chimiques*, pp. 156-192. Technique et Documentation Lavoisier, Paris.
- Chen S.-P. & Archer L.A. (1999). Relaxation Dynamics of Salt-Free Polyelectrolyte Solutions Using Flow Birefringence and Rheometry. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 37: 825-835.
- Chen H. & Chakrabarti A. (1998). Hydrodynamic effects on domain growth in off-critical polymer blends. *Journal of Chemical Physics*, 108 (14): 6006-6013.
- Chen W.S. & Soucie W.G. (1985). *Edible Fibrous Serum Milk Protein - Xanthan Gum Complexes*. KRAFT Inc. assignee, US Patent 4,559,233.
- Chen W.S., Henry G.A., Gaud S.M., Miller M.S., Kaiser J.M., Balmaceda R.G., Morgan R.G., Baer C.C., Borwanker R.P., Helgeth L.C., Strandholm J.J., Hasenheuttl G.L., Kerwin P.J., Chen C.C., Kratochvíl J.F. & Lloyd W.L. (1989). *Microfragmented Ionic Polysaccharide / Protein Complexes Dispersions*. KRAFT Inc., assignee. European Patent Application EP0340035.
- Chen W., Li X. & Jiang M. (1998). Spinodal decomposition induced by copolymerization in the mixture of methyl methacrylate/vinyl acetate/ poly[ethylene-co-(vinyl acetate)]. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 199: 319-325.
- Chou C.-M. & Hong P.-D. (2004). Nucleation, Growth, Fractal Aggregation, and Late-Stage Coarsening on Structural Development of Polymer Physical Gels. *Macromolecules*, 37 (15): 5596-5606.

- Chow A.W., Fuller G.G., Wallace D.G. & Madri J.A. (1985). Rheoptical Response of Rodlike Chains Subject to Transient Shear Flow. 2. Two-Color Flow Birefringence Measurements on Collagen Protein. *Macromolecules*, 18: 793-804.
- Christen G.L. & Smith J.S. (2000). *Food Chemistry: principles and application*. West Sacramento, California: US Science Technology Systems. 454 p.
- Christensen B. & Smidsrød O. (1991). Hydrolysis of Xanthan in Dilute Acid: Effects on Chemical Composition, Conformation, and Intrinsic Viscosity. *Carbohydrate Research*, 214 : 55-69.
- Christensen B., Myhr M. & Smidsrød O. (1996). Degradation of Double-Stranded Xanthan by Hydrogen Peroxide in the presence of Ferrous Ions: Comparison to Acid Hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 280: 85-99.
- Christensen B., Smidsrød O. & Stokke B. (1993a). Xanthans with Partially Hydrolyzed Side Chains: Conformation and Transitions. In: *Carbohydrate and Carbohydrate Polymers, Analysis, Biotechnology, Modification, Antiviral, Biomedical and Other Applications*, pp. 166-173. Yalpani M. (Ed.), ATL Press.
- Christensen B.E., Smidsrød O., Elgsaeter A. & Stokke B.T. (1993b). Depolymerization of Double-Stranded Xanthan by Acid Hydrolysis: Characterization of Partially Degraded Double Strands and Single-Stranded Oligomers Released from the Ordered Structures. *Macromolecules*, 26 (22): 6111-6120.
- Christensen B.E., Knudsen K.D., Smidsrød O., Kitamura S. & Takeo K. (1993c). Temperature-Induced Conformational Transition in Xanthans with Partially Hydrolyzed Side Chains. *Biopolymers*, 33: 151-161.
- Chu B. (1991). *Laser light scattering*. Academic Press, Boston.
- Clark A.H. (1998). Gelation of globular proteins. In: *Functional properties in food macromolecules*, pp. 77-142. Mitchell J.R. (Ed.), Elsevier Applied Science, London.
- Clasen C. & Kulicke W.-M. (2001). A convenient way to interpret rheoptical data of semidilute polymer solution. *Rheologica Acta*, 40: 74-85.
- Corredig M. & Wicker L. (2001). Changes in the molecular weight distribution of three commercial pectins after valve homogenization. *Food Hydrocolloids*, 15 (1): 17-23.
- Coviello T., Kajiwarra K., Burchard W., Dentini M. & Crescenzi V. (1986). Solution Properties of Xanthan 1. Dynamic and Static Light Scattering from Native and Modified Xanthan in Dilute Solutions. *Macromolecules*, 19: 2826-2831.
- Croguennec T., O'Kennedy B.T. & Mehra R. (2004). Heat-induced denaturation / aggregation of β -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, 14: 399-409.
- Cross M.M. (1969). Polymer rheology: influence of molecular weight and polydispersity. *Journal of Applied Polymer Science*, 13: 765-774.

- Da Silva J.A.L. & Rao M.A. (1992). Viscoelastic Properties of Food Hydrocolloid Dispersions. In: *Viscoelastic Properties of Foods*, pp. 285-315. Rao M.A. & Steffe J.F. (Eds.), Elsevier Applied Science, London - New York.
- Dautzenberg H. (2000). Light scattering studies on polyelectrolyte complexes. *Macromoleculuar Symposia*, 162: 1-21.
- de Wit J.N. (1989). Functional Properties of Whey Protein. In: *Developments in Dairy Chemistry-4. Functional Milk Proteins*, pp. 285-323. Fox P.F. (Ed.), Elsevier Applied Science, London - New York.
- Dea I.C.M. (1982). Polysaccharide Conformation in Solutions and Gels. In: *Food Carbohydrates*. IFT Basic Symposium Series, 420-457.
- Decruppe J.P. & Ponton A. (2003). Flow birefringence, stress optical rule and rheology of four micellar solutions with the same low shear viscosity. *The European Physical Journal E*, 10: 201-207.
- Delben F. & Stefancich S. (1997). Interaction of food proteins with polysaccharides, I. Properties upon mixing. *Journal of Food Engineering*, 31: 325-346.
- dell'Erba R. (2001). Rheo-mechanical and rheo-optical characterisation of ultra high molecular mass poly(methylmethacrylate) in solution. *Polymer*, 42 (6): 2655-2663.
- Dentini M., Crescenzi V. & Blasi D. (1984). Conformational Properties of Xanthan Derivatives in Dilute Aqueous Solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 6: 93-98.
- Dickinson E. (2003). Interfacial, emulsifying and foaming properties of milk proteins. In: *Advanced Dairy Chemistry: Proteins, Vol. 1, Part B*, Chap. 27, pp. 1229-1260. 3rd edition. Fox P.F. & McSweeney P.L.H. (Eds.), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. 603p.
- Dickinson E. (1999). Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15 (2): 161-176.
- Dickinson E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 9 (10): 347-354.
- Dickinson E. (1993). Protein - Polysaccharide Interactions in Food Colloids. In: *Food Colloids & Polymers: Stability & Mechanical Properties*, pp. 77-93. Dickinson E. & Walstra P. (Eds.), Royal Society of Chemistry.
- Dickinson E. & Pawlowsky K. (1998). Influence of κ -carrageenan on the properties of protein-stabilized emulsion. *Food Hydrocolloids*, 12 (4): 417-423.
- Dickinson E. & McClements D.J. (1996). Protein – Polysaccharide interactions. In: *Advances in Food Colloids*; Chap. 3. Blackie Academic & Professional. Chapman & Hall, Glasgow. 350 pp.
- Dickinson E. & Matsumura Y. (1994). Proteins at liquid interfaces: role of the molten globule state. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3: 1-17.

- Donald A.M., Durrani C.M., Jones R.A.L., Rennie A.R. & Tromp R.H. (1995). Physical methods to study phase separation in protein-polysaccharide mixtures. In: *Biopolymer Mixtures*; pp. 99-116. Harding S.E., Hill S.E. & Mitchell J.R. (Eds.), Nottingham University Press, Redwood Books, Trowbridge, Wiltshire.
- Doublier J.-L., Garnier C., Renard D. & Sanchez C. (2000). Protein-Polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5 (3-4): 202-214.
- Doublier J.-L. & Cuvelier G. (1996). Gums and Hydrocolloids Functional Aspects. In: *Carbohydrates in Foods*, pp. 283-318. Eliasson A.C. (Ed.), Marcel Dekker, NY.
- Doublier J.-L. (1993). *Rhéologie des Polyosides en Milieu Aqueux: Solutions, Gels et Mélanges*. Cahier Scientifique. Conférence présente au Congrès IFTEC à la Haye.
- Doublier J.-L. & Launay B. (1981). Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum. *Journal of Texture Studies*, 12 (2): 151-172.
- Dubin P.L. & Murrell J.M. (1988). Size Distribution of Complexes Formed between Poly (dimethyldiallylammonium chloride) and Bovine Serum Albumin. *Macromolecules*, 21: 2291-2293.
- Dumitriu S. & Chornet E. (1998). Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31: 223-246.
- El-Aneed A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 94: 1-14.
- Eliçabe G.E., Larrondo H.A. & Williams R.J.J. (1998). Light Scattering in the Course of a Polymerization-Induced Phase Separation by a Nucleation-Growth Mechanism. *Macromolecules*, 31: 8173-8182.
- Eliçabe G.E., Larrondo H.A. & Williams R.J.J. (1997). Polymerization-Induced Phase Separation: A Maximum in the Intensity of Scattered Light Associated with a Nucleation-Growth Mechanism. *Macromolecules*, 30: 6550-6555.
- Evans M.T.A. & Marrs W.M. (1997). Enhanced functionality for food hydrocolloids by molecular weight control: innovation and the regulatory maze. *European Food & Drink Review*; Autumn, 65-68.
- Flores Candia J.-L. & Deckwer W.-D. (1999). Effect of the Nitrogen Source on Pyruvate Content and Rheological Properties of Xanthan. *Biotechnology Progress*, 15: 446-452.
- Floury J., Desrumaux A., Axelos M.A. & Legrand J. (2002). Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenisation, *Food Hydrocolloids*, 16 (1): 47-53.
- Flower D.R., North A.C. & Sansom C.E. (2000). The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482 (1-2): 9-24.
- Flower, D.R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemistry Journal*, 318: 1-14.

- Foss P., Stokke B.T. & Smidsrød O. (1987). Thermal Stability and Chain Conformational Studies of Xanthan at Different Ionic Strengths. *Carbohydrate Polymers*, 7: 421-433.
- Fox P.F. (2003). Milk Proteins : general and historical aspects. In: *Advanced Dairy Chemistry: Proteins Part A*, Vol. 1, Chap. 1. 3rd edition. Fox P.F. & McSweeney P.L.H. (Eds.), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. 603p.
- Fox P.F. (1989). The milk protein system. In: *Developments in Dairy Chemistry - 4. Functional Milk Proteins*, pp. 1-53. Fox P.F. (Ed.), Applied Science Publishers. New York.
- Fuller G.G. (1995). *Optical Rheometry of Complex Fluids*. Oxford University Press, New York, 268p.
- Frangou S.A., Morris E.R., Rees D.A., Richardson R.K. & Ross-Murphy S.B. (1982). Molecular Origin of Xanthan Solution Rheology: Effect of urea on Chain Conformation and Interactions. *Journal of Polymer Science*, 20: 531-538.
- Freedonia Group, Inc. 2003. *Artificial Sweeteners & Fat Replacers to 2004 - Market Size, Market Share and Demand Forecast*. Study 1346. Available from: <http://www.freedoniagroup.com/>. Accessed June 15.
- Gamini A. & Mandel M. (1994). Physicochemical Properties of Aqueous Xanthan Solutions : Static Light Scattering. *Biopolymers*, 34 (6): 783-797.
- Gamini A., de Bleijser J. & Leyte J.C. (1991). Physico-chemical properties of aqueous solutions of xanthan: An n.m.r. study. *Carbohydrate Research*, 220, 33-47.
- Ganz A.J. (1974). How gum reacts with proteins. *Food Engineering*, 6 (1): 67-69.
- Gatzonis Y., Siddiquee S.K. & van Egmond J.W. (1997). Rheo-Optical Investigation of Wormlike Polymers in Solution. *Macromolecules*, 30: 7253-7262.
- Georgalis Y., Umbach P., Saenger W., Ihmels B. & Soumpasis D.M. (1999). Ordering of Fractal Clusters in Crystallizing Lysozyme Solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 121 (8): 1627- 1635.
- Giese J. (1996). Fats, Oils and Fat Replacers. *Food Technology*, 50: 77-83.
- Girard M., Sanchez C., Laneuville S.I., Turgeon S.L. & Gauthier S.F. (2004). Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35 (1): 15-22.
- Girard M., Turgeon S.L. & Gauthier S.F. (2003). Quantification of the Interactions between β -Lactoglobulin and Pectin through Capillary Electrophoresis Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6043-6049.
- Girard M., Turgeon S.L. & Paquin P. (2002). Emulsifying properties of Whey Protein-Carboxymethylcellulose complexes. *Journal of Food Science*, 67 (1): 113-119.
- Glicksman M. (1991). Hydrocolloids and the search for the "Oily Grail". *Food Technology*, 10: 94, 96-102.

- Gray D.G. (1994). Chiral nematic ordering of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 25: 277-284.
- Guinard J.-X. & Mazzucchelli R. 1996. The sensory perception of texture and mouthfeel. *Trends in Food Science and Technology*, 7: 213-219.
- Gunton J.D., San Miguel M. & Sahmi P. (1983). The Dynamics of first-order phase transitions. In: *Phase transitions and critical phenomena*, Vol. 8, Chap. 3. Domb C. & Lebowitz J.L. (Eds), Academic Press Inc., London.
- Hacche L. S., Washington G.E. & Brant D.A. (1987). A Light-Scattering Investigation of the Temperature-Driven Conformation Change in Xanthan. *Macromolecules*, 20: 2179-2187.
- Hagiwara T., Kumagai H. & Nakamura K. (1998). Fractal analysis of aggregates in heat-induced BSA gels, *Food Hydrocolloids*, 12 (1): 29-36.
- Hambling S.G., McAlpine A.S. & Sawyer L. (1992). β -Lactoglobulin. In: *Advanced Dairy Chemistry I : Proteins*, pp. 141-190. Fox P.F. (Ed.), Elsevier Sci. Publisher Ltd., England.
- Harrington R.E. & Zimm B.H. (1965). Degradation of Polymers by Controlled Hydrodynamic Shear. *The Journal of Physical Chemistry*, 69 (1) : 161-175.
- Harris W.E. & Kratochvíl B. (1974). *Chemical separations and measurements: background and procedures for modern analysis*. Saunders Golden Series, Philadelphia, 108-110.
- Hashimoto T., Itakura M. & Hasegawa H. (1986). Late stage spinodal decomposition of a binary polymer mixture. I. Critical test of dynamical scaling on scattering function. *Journal of Chemical Physics*, 85: 6118-6128.
- Hassler R.A. & Doherty D.H. (1990). Genetic engineering of polysaccharide structure: Production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Progress*, 6: 182-187.
- Hecht E. (2002). The propagation of light. In: *Optics*, 4th edition, Addison-Wesley, San Francisco, California, pp. 86-148.
- Hjerde T., Kristiansen T.S., Stokke B.T., Smidsrød O. & Christensen B.E. (1994). Conformation dependent depolymerisation kinetics of polysaccharides studied by viscosity measurements. *Carbohydrate Polymers*, 24: 265-275.
- Hodge J.E. & Hofreiter B.T. (1962). Determination of Reducing Sugars and Carbohydrates. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 1, pp. 380-394. Whistler R.L., Wolfrom M.L., BeMiller J.N. & Shafizadeh F. (Eds.), Academic Press, NY - London.
- Hoefler, A.C., Sleaf, J. & Trudso, J. (1994). *Fat Substitute*. Hercules Inc., assignee. U.S. Patent 05324531.
- Hollingsworth P. (1996). The Leaning of the American Diet. *Food Technology*, 50: 87-89.

- Hong P.-D. & Chou C.-M. (2000). Phase Separation and gelation behaviors in poly(vinylidene fluoride)/tetra(ethylene glycol) dimethyl ether solutions. *Polymer*, 41: 8311-8320.
- Hongsprabhas P., Barbut S. & Marangoni A.G. (1999). The structure of cold-set whey protein isolate gels prepared with Ca^{++} . *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 32 (4): 196-202.
- Holzwarth G. (1978). Molecular weight of xanthan polysaccharide. *Carbohydrate Research*, 66 (1): 173-186.
- Holzwarth G.M. (1976). Conformation of the extracellular Polysaccharide of *Xanthomonas campestris*. *Biochemistry*, 15 (19): 4332-4339.
- Holzwarth G. & Ogletree J. (1979). Pyruvate Free- Xanthan. *Carbohydrate Research*, 76: 277-280.
- Holzwarth G. & Prestidge E.B. (1977). Multistranded Helix in Xanthan Polysaccharide. *Science*, 197: 757-759.
- Hone J.H.E., Howe A.M. & Cosgrove T. (2000). A Small-Angle Neutron Scattering Study of the Structure of Gelatin/Polyelectrolyte Complexes. *Macromolecules*, 33: 1206-1212.
- Ikeda S. (2003). Heat-induced gelation of whey proteins observed by rheology, atomic force microscopy, and Raman scattering spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 17 (4): 399-406.
- Ikeda S. & Morris V.J. (2002). Fine-Stranded and Particulate Aggregates of Heat-Denatured Whey Proteins Visualized by Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules*, 3 (2): 382 -389.
- Ikeda S. & Nishinari K. (2001). Structural Changes During Heat-Induced Gelation of Globular Protein Dispersions. *Biopolymers*, 59: 87-102.
- Ikeda S., Foegeding E.A. & Hagiwara T. (1999). Rheological Study on the Fractal Nature of the Protein Gel Structure. *Langmuir*, 15 (25): 8584-8589.
- Imeson, A.P., Ledward, D.A. & Mitchell, J.R. (1977). On the nature of the interaction between some polysaccharides and proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28: 661-668.
- Immaneni A., Kuba A.L. & McHugh A.J. (1997). Effects of Temperature and Solvent on the Rheo-optical Behavior of Hydroxypropylcellulose Solutions. *Macromolecules*, 30: 4613-4618.
- Jansson P.E., Kenne L. & Lindberg B. (1975). Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, 45: 275-282.
- Jeannes A., Pittsley J.E. & Senti F.R. (1961). Polysaccharide B-1459: A New Hydrocolloid Polyelectrolyte Produced from Glucose by Bacterial Fermentation. *Journal of Applied Polymer Science*, 5 (17): 519-526.
- Jenkins F.A. & White H.E. (1976). *Fundamentals of Optics*. McGraw Hill Inc., New York.

- Jeyarajah S. & Allen J.C. (1994). Calcium Binding and Salt-Induced Structural Changes of Native and Preheated β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 80-85.
- Kang K.S. & Pettitt D.J. (1992). Xanthan, Gellan, Wellan and Rhamsan. In: *Industrial Gums*, 3rd edition, Chap. 13, pp. 341-397. Whistler R.L. & Bemiller J.N. (Eds.), Elsevier Science & Technology.
- Kavanagh G.M., Clark A.H. & Ross-Murphy S.B. (2000). Heat-Induced Gelation of Globular Proteins: 4. Gelation Kinetics of Low pH β -Lactoglobulin Gels. *Langmuir*, 16: 9584-9594
- KELCO Co. (1996). *Xanthan Gum. Natural Biogum for Scientific Water Control*. 6th edition.
- Kim A.Y. & Berg J.C. (2000). Fractal Heteroaggregation of oppositely Charged Colloids. *Journal of Colloid & Interface Science*, 229: 607-614.
- Kinsella J.E. (1984). Milk proteins physicochemical and functional properties. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21 (3): 197-262.
- Kita R., Kaku T., Kubota K. & Dobashi T. (1999). Pinning of phase separation of aqueous solutions of hydroxypropylmethylcellulose by gelation. *Physical Letters A*, 259: 302-307.
- Kitamura S., Takeo K., Kuge T. & Stokke B. (1991). Thermally Induced Conformational Transition of Double-stranded Xanthan in Aqueous Salt Solutions. *Biopolymers*, 31: 1243-1255.
- Kojima T., Tabata K., Ikumono T. & Yanaki T. (1984). Depolymerization of Schizophyllan by Controlled Hydrodynamic Shear. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48 (4): 915-921.
- Kokufuta E. (1994). Complexation of Proteins with Polyelectrolytes in a Salt-Free System and Biochemical Characteristics of the Resulting Complexes. In: *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. Dubin P., Bock J., Davis R., Schulz D.N. & Thies C. (Eds.), Springer-Verlag.
- Kontopidis G., Holt C. & Sawyer L. (2004). β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science*, 87: 785-796.
- Kontopidis G., Holt C. & Sawyer L. (2002). The Ligand-binding Site of Bovine β -Lactoglobulin: Evidence for a Function?. *Journal of Molecular Biology*, 318 (4): 1043-1055.
- Krall A.H. & Weitz D.A. (1998). Internal Dynamics and Elasticity of Fractal Colloidal Gels. *Physical Review Letters*, 80 (4): 778-781.
- Kratochvíl P. (1987). *Classical Light Scattering from Polymer Solutions*, Elsevier, Amsterdam.
- Kravtchenko T.P. & Pilnik W. (1990). A simplified Method for the Determination of the Intrinsic Viscosity of Pectin Solutions by Classical Viscosimetry. In: *Gums and*

Stabilizers for the Food Industry 5. pp. 281-285. Phillips G.O., Williams P.A. & Wedlock D.J. (Eds.), IRL Press, Oxford University Press.

- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lagoueyte N. & Paquin P. (1998). Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 12: 365-371.
- Lambert F. & Rinaudo M. (1985). On the Thermal Stability of Xanthan Gum. *Polymer*, 26, 1549-1553.
- Lambert S., Thill A., Ginestet P., Audic J.M. & Bottero J.Y. (2000). Structural Interpretations of Static Light Scattering Patterns of Fractal Aggregates I. Introduction of a Mean Optical Index: Numerical Simulations. *Journal of Colloid & Interface Science*, 228: 379-385.
- Laneuville S.I., Lavoisier A., Brissonnet S. & Turgeon S.L. (1997). *Effet des Traitements Hautes Pressions Dynamiques sur le Xanthane*. Poster présenté au Congrès de l'ACFAS, Québec, Canada.
- Langton M. & Hermansson A.-M. (1992). Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*, 5: 523-539.
- Lapasin R. & Pricl S. (1995). *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*. Chap. 4, pp. 250-494. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall. Glasgow, Great Britain. 620pp
- Laplante S. (2004). *Étude des propriétés stabilisantes d'émulsion du chitosane en présence d'isolat de protéines de lactosérum*. Ph.D. Thesis. Université Laval, Québec, Canada.
- Larichev N.A., Gurov A.N. & Tolstoguzov V.B. (1983). Protein - polysaccharide complexes at the interphase. 1. Characteristics of decane/water emulsions stabilized by complexes of bovine serum albumin with dextran sulphate. *Colloids and Surfaces*, 6 (1): 27-34.
- Lattuada M., Wu H., Hasmy A. & Morbidelli M. (2003). Estimation of Fractal Dimension in Colloidal Gels. *Langmuir*, 19 (15): 6312-6316.
- Lawson M.A. & Lin S.W. (1991). *Shortening substitute for bakery products*. Merck & Co. Inc., assignee. European patent application 0,468,552,A2.
- Le Hénaff S. (1996). *Microparticules de Complexes de Protéines de Lactosérum et de Xanthane Comme Substitut de Matière Grasse*. M. Sc. Thesis. Laval University, Québec, Canada.
- Lecourtier J., Chauveteau G. & Muller G. (1986). Salt-induced Extension and Dissociation of Native Double-Stranded Xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8: 306-310.

- Ledward D.A. (1994). Protein-polysaccharide interactions. In: *Protein Functionality in Food Systems*, pp. 225-259. Hettlerachchy, N.S. & Ziegler, G.R. (Eds.), Marcel Dekker Inc., NY.
- Ledward D.A. (1979). Protein - Polysaccharide Interactions. In: *Polysaccharides in Foods*, pp. 205-217. Blanshard J.M.V. & Mitchel D.A. (Eds.), Butterworths, London.
- Lee T. & McHugh A. J. (1999). The Effect of Simple Shear Flow on the Helix–Coil Transition of Poly-L-Lysine. *Biopolymers*, 50: 589-594.
- Lefèbvre J. (1995). *La Microparticulation de Complexes de Protéines et de Polysaccharides*. M. Sc. Thesis - Université Laval, Québec, Canada.
- Li J.-M., Burghardt W. R., Yang B. & Khomami B. (2000). Birefringence and computational studies of a polystyrene Boger fluid in axisymmetric stagnation flow. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 91: 189-220.
- Li Y., Xia J. & Dubin P.L. (1994). Complex formation between polyelectrolyte and oppositely charged mixed micelles: static and dynamic light scattering study of the effect of polyelectrolyte molecular weight and concentration. *Macromolecules*, 27 (24): 7049-7055.
- Lii C.-y., Chen C.-H., Yeh A.-I. & Lai V.M.-F. (1999). Preliminary study on the degradation kinetics of agarose and carrageenans by ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 13 (6) : 477-481.
- Lim T., Uhl J.T. & Prud'homme R.K. (1984). Rheology of Self-Associating Concentrated Xanthan Solutions. *Journal of Rheology*, 28 (4): 367-379.
- Lin M.Y., Lindsay H.M., Weitz D.A., Ball R.C., Klein R. & Meakin P. (1990). Universal reaction-limited colloid aggregation. *Physical Review A*, 41: 2005-2020.
- Liu T. & Chu B. (2002). Light Scattering of proteins In: *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, pp. 3023-3043. Marcel Dekker, Inc.
- Liu W. & Norisuye T. (1988). Order-disorder conformation change of xanthan in 0.01M aqueous sodium chloride : dimensional behavior. *Biopolymers*, 27: 1641-1654.
- Liu W., Sato T., Norisuye T. & Fujita H. (1987). Thermally induced conformational change of xanthan in 0.01M aqueous sodium chloride. *Carbohydrate Research*, 160: 267-281.
- Manley D.J.R. (2000). *Technology of biscuits, crackers, and cookies*. 3rd ed. CRC Press/Woodhead Pub., Boca Raton, Florida. 499 p.
- Marsh P., Bushell G. & Amal R. (2001). Scattering behavior of restructured aggregates: A simulation study. *Journal of Colloid & Interface Science*, 241: 286-288.
- Martin J.E., Wilcoxon J.P., Schaefer D. & Odinek J. (1990). Fast aggregation of colloid silica. *Physical Review A*, 41 (8): 4379-4391.
- Mastersizer Co. (2002). *The Mastersizer S – Flexibility in particle sizing*, Users manual.

- Mattison K.W., Wang Y., Grymonpré K. & Dubin P.L. (1999). Micro- and Macro-phase behavior in protein-polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Symposia*, 104: 53-76.
- Mattison K.W., Brittain I.J. & Dubin P.L. (1995). Protein-Polyelectrolyte phase boundaries. *Biotechnology Progress*, 11 (6): 632-637.
- Maugey J., van Nuland T. & Navard P. (2001). Small angle light scattering investigation of polymerisation induced phase separation mechanisms. *Polymer*, 42: 4353-4366.
- Meyer E.L., Fuller G.G., Clark R.C. & Kulicke W.M. (1993). Investigation of Xanthan Gum Behavior under Shear Flow Using Rheoptical Techniques. *Macromolecules*, 26 (3): 504-511.
- Milani F.X. (1993). *Modification and Pilot Production of Induced Complex Formation between Xanthan Gum and Whey Proteins at Reduced pH Value*. Ph. D. Thesis. University of Wisconsin-Madison.
- Milas M. & Rinaudo M. (1986). Properties of Xanthan Gum in Aqueous Solutions: Role of the Conformational Transition. *Carbohydrate Research*, 158: 191-204.
- Milas M. & Rinaudo M. (1984). On the Existence of Two Different Secondary Structures for the Xanthan in Aqueous Solutions. *Polymer Bulletin*, 12: 507-514.
- Milas M. & Rinaudo M. (1981). Investigation on Conformational Properties of Xanthan in Aqueous Solutions. In: *Solution Properties of Polysaccharides*, ACS Symposium Series 150, pp. 25-30. Brant D.A. (Ed.), American Chem. Soc., Washington D.C.
- Milas M. & Rinaudo M. (1979). Conformational Investigation on the Bacterial Polysaccharide Xanthan. *Carbohydrate Research*, 76: 189-196.
- Milas M., Reed W.F. & Printz S. (1996). Conformations and flexibility of native and re-natured xanthan in aqueous solutions. *Biological Macromolecules*, 18: 211-221.
- Milas M., Rinaudo M., Knipper M. & Schuppiser J.L. (1990). Flow and viscoelastic properties of Xanthan gum, solutions. *Macromolecules*, 23: 2506-2511.
- Milas M., Rinaudo M. & Tinland B. (1986a). Comparative depolymerization of xanthan gum by ultrasonic and enzymic treatments. Rheological and structural properties. *Carbohydrate Polymers*, 6: 95-107.
- Milas M., Rinaudo M. & Tinland B. (1986b). Role of the Structure on the Rheological Behaviour of Xanthan Gum. In: *Gums and Stabilizer for the Food Industry 3*, pp. 637-644. Phillips G.O., Wedlock D.J. & Williams P.A. (Eds.), Pergamon Press, Oxford.
- Milas M., Rinaudo M. & Tinland B. (1985). The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. *Polymer Bulletin*, 14: 157-164.
- Miller M.S. (1994). Proteins as fat substitutes. In: *Protein Functionality in Food Systems*, pp. 435-365. Hettlerachy, N.S. & Ziegler, G.R. (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York.

- Molina-Bolívar J.A., Galisteo-González F. & Hidalgo-Álvarez R. (1998). Cluster Morphology of Protein-Coated Polymer Colloids. *Journal of Colloid & Interface Science*, 208: 445-454.
- Moorhouse R., Walkinshaw M.D. & Arnott S. (1977). Xanthan Gum-Molecular Conformation and Interactions. In: *Extracellular Microbial Polysaccharides*, ACS Symposium Series 45, pp. 90-102. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Morr C.V. (1989). Whey Protein Manufacture. In: *Developments in Dairy Chemistry-4. Functional Milk Proteins*, pp. 245-284. Fox P.F. (Ed.), Elsevier Applied Science, London - New York.
- Morris E.R. (1977). Molecular Origin of Xanthan Solutions Properties. In: *Extracellular Microbial Polysaccharides*, ACS Symposium Series 45, pp. 81-89. Sandford P.A. & Laskin A. (Eds.), American Chemical Society, Washington D.C.
- Morris E.R., Rees D.A., Young G., Walkinshaw M.D. & Darke A. (1977). Order-disorder Transition for a Bacterial Polysaccharide in Solution. *Journal of Molecular Biology*, 110: 1-16.
- Morris V.J. (1995). Bacterial Polysaccharides. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*, Chap. 11, pp. 341-375. Stephen A.M. (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York.
- Morris V.J. (1990). Science, structure and applications of microbial polysaccharides. In: *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, Vol. 5, pp. 315-328. Phillips, G.O., Williams, P.A. & Wedlock, D.J. (Eds.), Oxford University: IRL Press.
- Muller G. & Lecourtier J. (1988). Temperature-Induced Extension and Dissociation of Native Xanthan. *Carbohydrate Polymers*, 9, 213-225.
- Muller G., Anrhourache M., Lecourtier J. & Chauveteau G. (1986). Salt dependence of the conformation of a single-stranded xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8: 167-172.
- Muller G., Lecourtier J., Chauveteau G. & Allain C. (1984). Conformation of the Xanthan Molecule in an Ordered Structure. *Makromolekular Chemistry Rapid Communications*, 5: 203-208.
- Myers R.H. & Montgomery D.C. (1995). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 658 pp.
- Norton I.T., Goodall D.M., Frangou S.A., Morris E.R. & Rees D.A. (1984). Mechanism and dynamics of conformational ordering in xanthan polysaccharide. *Journal of Molecular Biology*, 175: 371-394.
- Oh M.-H., So J.-H. & Yang S.-M. (1999). Rheological Evidence for the Silica-Mediated Gelation of Xanthan Gum. *Journal of Colloid & Interface Science*, 216 (2): 320-328.
- Okuyama K., Arnott S., Moorhouse R. & Walkinshaw M.D. (1980). Fiber diffraction studies of bacterial polysaccharides. In: *Fiber Diffraction methods*. ACS Symp.

Ser. 141, pp. 411-427. French A.D. & Gardner K.H. (Eds.), American Chemical Society, NY.

- Olsson C., Langton M. & Hermansson A.-M. (2002). Microstructures of β -lactoglobulin / amylopectin gels on different length scales and their significance for rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 16 (2): 111-126.
- Oviatt H.W. Jr. & Brant D.A. (1994). Viscoelastic behavior of thermally treated aqueous xanthan solutions in the semi dilute concentration regime. *Macromolecules*, 27 (9): 2402-2408.
- Painter P.C. & Coleman M.M. (1997). *Fundamentals of Polymer Science. An Introduction*. 2nd edition. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- Paoletti S., Cesaro A. & Delben F. (1983). Thermally induced conformational transition of xanthan polyelectrolyte. *Carbohydrate Research*, 123, 173-178.
- Papiz M.Z., Sawyer L., Eliopoulos E.E., North A.C.T., Findlay J.B.C., Sivaprasadarao R., Jones T.A., Newcomer M.E. & Kraulis P.J. (1986). The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Letters to Nature*, 342: 383-385.
- Paquin P., Lebeuf Y., Richard J.M. & Kalab M. (1993). Microparticulation of Milk Proteins by High Pressure Homogenization to Produce a Fat Substitute. In: *Fat Globule Modifications by Heat Treatment, Homogenization and Other Technological Means for High Quality Products*, pp. 389-396. Special Issue No. 9303, International Dairy Federation, Brussels.
- Paradossi G. & Brant D.A. (1982). Light scattering study of a series of xanthan fractions in aqueous solution. *Macromolecules*, 15 (3): 874-879.
- Park J.M., Muhoberac B.B., Dubin P.L. & Xia J. (1992). Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules*, 25 (1): 290-295.
- Pavlov G.M., Kolbina G.F., Shtenninkova I.N., Michailova N.A. & Korneeva E.V. (2001). Dynamo-optical properties of methylcellulose solutions and the optical anisotropy of glucopyranose ring. *European Polymer Journal*, 37: 1219-1225.
- Pearson D., Herbolzheimer E., Grizzuti N. & Marrucci G. (1991). Transient behavior of entangled polymers at high shear rates. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 29 (13): 1589-1597.
- Pérez M.D. & Calvo M. (1995). Interaction of β -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *Journal of Dairy Science*, 78: 978-988.
- Pervaiz S. & Brew, K. (1987). Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB Journal*, 1: 209-214.
- Pessen H., Purcell J.M. & Farrel H.M. Jr. (1985). Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation

- with structural changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 828: 1-12.
- Pettitt D.J. (1980). Xanthan Gum. In: *Food Hydrocolloids*, pp. 128 - 149. Glicksman M. (Ed.), CRC Press Inc., Boca Raton.
- Pettitt D.J. (1979). Xanthan gum. In: *Polysaccharides in Food*, pp. 263-282. Blanshard J.M.V. & Mitchell J.R. (Eds.), Butterworths, London.
- Poon W.C.K. & Haw M.D. (1997). Mesoscopic structure formation in colloidal aggregation and gelation. *Advances in Colloid & Interface Science*, 73: 71-126.
- Pons M., Fizsman S.M. (1996). Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. *Journal of Texture Studies*, 27: 597-624.
- Poon W.C.K., Pirie A.D., Haw M.D. & Pusey P.N. (1997). Non-equilibrium behaviour of colloid-polymer mixtures. *Physica A*, 235: 110-119.
- Ptitsyn O.B., Pain R.H., Semisotnov G.V., Zerovnik E. & Razgulyaev O.I. (1990). Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Letters*, 262 (1): 20-24.
- 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 β -Lactoglobulin. *Biochemistry*, 37 (40): 14014-14023.
- Rahway N.J. (1988). *Xanthan Gum*. Merck & Co., Inc. Kelco Division.
- Raju K.V.S., Krishna D., Rama-Devi G., Reddy P.J. & Yaseen M. (1993). Assessment of Applicability of Carreau, Ellis, and Cross Models to the Viscosity Data of Resin Solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, 48: 2101-2112.
- Ramírez-Santiago G. & González A.E. (1997). Growth laws and spinodal decomposition type of scaling in fractal aggregation of colloids, *Physica A*, 236 (1-2): 75-84.
- Rao Y.M. & Sureshkumar G.K. (2001). Improvement in Bioreactor Productivities Using Free Radicals: HOCl-Induced Overproduction of Xanthan Gum from *Xanthomonas campestris* and Its Mechanism. *Biotechnology & Bioengineering*, 72 (1): 62-68.
- Rees D.A., Morris E.R., Thom D. & Madden J.K. (1982). Shapes and Interactions of Carbohydrate Chains. In: *The Polysaccharides. Vol. 1*. pp. 195-290. Aspinall G.O. (Ed.). Academic Press, Inc. USA.
- Relkin P. (1998). Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of β -lactoglobulin: their role in heat-induced sol-gel state transition. *Biological Macromolecules*, 22: 59-66.
- Renard D., Robert P., Lavenant L., Melcion D., Popineau Y., Gueguen J., Duclairoir C., Nakache E., Sanchez C. & Schmitt C. (2002). Biopolymeric colloidal carriers for encapsulation or controlled release applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 242 (1-2): 163-166.

- Renard D., Lefèbvre J., Griffin M.C.A. & Griffin W.G. (1998). Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22 (1): 41-49.
- Rha C. & Pradipasena, P. (1985). Viscosity of proteins. In: *Functional Properties of Food Macromolecules*, pp. 79-120. Mitchel, J.R. & Ledward, D.A. (Eds.), Elsevier Applied Science Publishers, New York.
- Rheometric Scientific (1998). *Optical Analysis Module, User's guide*. Rheometric Scientific, Piscataway, New-Jersey, USA.
- Richardson R.K. & Kasapis S. (1998). Rheological Methods in the Characterization of Food Biopolymers. In: *Instrumental Methods in Food and Beverage Analysis*, pp. 1-48. Wetzel D. & Charalambous G. (Eds.), Elsevier Science B.V.
- Richardson R.K. & Ross-Murphy S.B. (1987). Non-Linear viscoelasticity of Polysaccharide Solutions. 2 : Xanthan Polysaccharide Solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 9: 257-264.
- Rinaudo M. & Milas M. (1982). Xanthan properties in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 2: 264-269.
- Rinaudo M. & Milas M. (1978). Polyelectrolyte Behavior of a Bacterial Polysaccharide from *Xanthomonas campestris* Comparison with Carboxymethylcellulose. *Biopolymers*, 17: 2663-2678.
- Rinaudo M., Milas M., Lambert F. & Vincendon M. (1983). ^1H and ^{13}C NMR Investigation of Xanthan Gum. *Macromolecules*, 16: 816-819.
- Robin O., Turgeon S., Paquin P. (1992). Functional Properties of Milk Proteins, In: *Dairy Science and Technology Handbook. Principles and Properties*. Vol. 1, pp. 277-354. Hui, Y.H. (Ed.), VCH Publishers Inc., New York.
- Rocherfort W.E. & Middleman S. (1987). Rheology of Xanthan Gum: Salt, Temperature, and Strain Effects in Oscillatory and Steady Shear Experiments. *The Society of Rheology*, 31 (4): 337-369.
- Rodd A.B., Dunstan D.E. & Boger D.V. (2000). Characterization of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. *Carbohydrate Polymers*, 42: 159-174.
- Roff C.F. & Foegeding E.A. (1996). Dicationic-induced Gelation of Pre-denatured Whey Protein Isolate. *Food Hydrocolloids*, 10 (2): 193-198.
- Roschinski C. & Kulicke W.-M. (2000). Rheological characterization of aqueous hydroxypropyl cellulose solutions close to phase separation. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 201: 2031-2040.
- Samant S.K., Singhal R.S., Kulkarni P.R. & Rege D.V. (1993). Review, Protein - Polysaccharide Interactions: A New Approach in Food Formulations. *International Journal of Food Science & Technology*, 28: 547-562.

- Sanchez C. & Paquin P. (1997). Protein and Protein - Polysaccharide Microparticles. In: *Food Proteins and Their Applications*, pp. 503-528. Damodaran S. (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York.
- Sanchez C., Mekhloufi G., Schmitt C., Renard D., Robert P., Lehr C.-M., Lamprecht A. & Hardy J. (2002). Self-assembly of β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous solvent: Structure and phase-ordering kinetics. *Langmuir*, 18: 10323-10333.
- Sanchez C., Despond S., Schmitt C. & Hardy J. (2001). Effect of Heat and Shear on β -Lactoglobulin-Acacia Gum Complex Coacervation. In: *Food Colloids: Fundamentals of Formulation*, pp. 332. Dickinson E. & Miller R. (Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Sanchez C., Schmitt C., Babak V.G. & Hardy J. (1997). Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels: effect of pH and xanthan concentration. *Nahrung*, 41 (6): 336-343.
- Sandford P.A., Pittsley J.E., Knutson C.A., Watson P.R., Cadmus M.C. & Jeanes A. (1977). Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: Characterization of Xanthan Products of Differing Pyruvic Acid Content. In: *Extracellular Microbial Polysaccharides*, ACS Symposium Series 45, pp. 192-210. Sandford P.A. & Laskin A. (Eds.), American Chemical Society, Washington D.C.
- Sandkuhler P., Sefcik J. & Morbidelli M. (2004). Kinetics of gel formation in dilute dispersions with strong attractive particle interactions. *Advances in Colloid & Interface Science*, 108-109: 133-143.
- Santos N.C. & Castaño M.A.R. (1996). Teaching Light Scattering Spectroscopy: The Dimension and Shape of Tobacco Mosaic Virus. *Biophysical Journal: Teaching Biophysics*, 71: 1641-1646.
- Sato T., Kakihara T. & Teramoto A. (1990). Isotropic-liquid crystal phase equilibrium in semiflexible polymer solutions: xanthan, a rigid polyelectrolyte. *Polymer*, 31 (5): 824-828.
- Sato T., Norisuye T. & Fujita H. (1985). Double-stranded helix of xanthan: dissociation behavior in mixtures of water and cadoxen. *Polymer Journal*, 17 (5): 729-735.
- Sato T., Norisuye T. & Fujita H. (1984a). Double-stranded helix of xanthan in dilute solutions: evidence from light scattering. *Polymer Journal*, 16 (4): 341-350.
- Sato T., Kojima S., Norisuye T. & Fujita H. (1984b). Double-stranded helix of xanthan in dilute solutions: further evidence. *Polymer Journal*, 16 (5): 423-429.
- Sato T., Norisuye T. & Fujita H. (1984c). Double-Stranded Helix of Xanthan: Dimensional and Hydrodynamic Properties in 0.1 M Aqueous Solution. *Macromolecules*, 17 (12): 2696-2700.
- Sawyer L. (2003). β -lactoglobulin. In: *Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1: Proteins, Part A*. Chap. 7. 3rd edition, Fox P.F. & McSweeney P.L.H. (Eds.), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. 603p.

- Sawyer L. & Kontopidis G. (2000). The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482 (1-2): 136-148.
- Schmitt C., Sanchez C., Despond S., Renard D., Robert P. & Hardy J. (2001). Structural modification of β -lactoglobulin as induced by complex coacervation with acacia gum. In: *Food Colloids: Fundamentals of Formulation*, pp. 323-331. Dickinson E. & Miller R. (Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Schmitt C., Sanchez C., Thomas F. & Hardy J. (1999). Complex Coacervation between β -lactoglobulin and Acacia Gum in Aqueous Medium. *Food Hydrocolloids*, 13: 483-496.
- Schmitt C., Sanchez C., Desorby-Banon S. & Hardy J. (1998). Structure and Technofunctional Properties of Protein – Polysaccharide Complexes: A Review. *CRC Critical Reviews in Food Science*, 38 (8): 689-753.
- Schorsch C., Garnier C., Tassin J.-F. & Doublier J.-L. (1996). Comportement Rhéo-optique des solutions de xanthane et des mélanges xanthane/guar. *Les Cahiers de Rhéologie*, 15 (1): 375-380.
- Selomulya C., Amal R., Bushell G. & Waite T. D. (2001). Evidence of Shear Rate Dependence on Restructuring and Breakup of Latex Aggregates. *Journal of Colloid & Interface Science*, 236: 67-77.
- Shatwell K.P., Sutherland I.A. & Ross-Murphy S.B. (1990). Influence of Acetyl and Pyruvate substituents on the solutions properties of Xanthan Polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 12: 71-78.
- Shieh J.-Y. & Glatz Ch.E. (1994). Precipitation of Proteins with Polyelectrolytes: Role of Polymer Molecular Weight. In: *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, pp. 273-284. Dubin P., Bock J., Davis R., Schulz D.N. & Thies C. (Eds.), Springer-Verlag.
- Shtennikova I.N., Kolbina G.F., Shibaev V.P. & Ekaeva I.V. (1990). Conformational properties of hydroxypropylcellulose-II. Flow birefringence and optical anisotropy of hydroxypropylcellulose macromolecules. *European Polymer Journal*, 26 (7): 787-790.
- Shu C.-H. & Yang S.-T. (1990). Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 35: 454-468.
- Shu Y.-W., Sahara S., Nakamura S. & Kato A. (1996). Effects of the length of polysaccharide chains on the functional properties of the maillard-type lysozyme-polysaccharide conjugate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2544-2548.
- Silvestri S. & Gabrielson G. (1991). Degradation of Tragacanth by High Shear and Turbulent Forces during Microfluidization. *International Journal of Pharmaceutics*, 73: 163-169.

- Smith I.H., Symes K.C., Lawson C.J. & Morris E.R. (1981). Influence of the Pyruvate Content of Xanthan on Macromolecular Association in Solution. *International Journal Biological Macromolecules*, 3: 129-134.
- Société Satia (1986). Utilisations des hydrocolloïdes dans les Applications Alimentaires. In: *Propriétés Fonctionnelles des Polysaccharides* pp. 161-186. Colonna M. & Thibault M. (Eds), Laboratoire de Biochimie et Technologie des glucides -INRA Nantes. Édition Apria, Paris.
- Soucie W.G., Chen W.-S., Witte V.C., Henry G.A. & Drehkoff W.D. (1988). *Shelf Stable Acid Food Dressings Containing Fibrous Protein Complexes*. KRAFT Inc. (Glenview, IL, USA) assignee. U.S. Patent 4,762,726.
- Southwick J.G., Jamieson A.M. & Blackwell J. (1982). Conformation of Xanthan Dissolved in Aqueous Urea and Sodium Chloride Solutions. *Carbohydrate Research*, 99: 117-127.
- Southwick J.G., Jamieson A. M., Blackwell J. (1981). Quasielastic Light Scattering Studies of Xanthan in Solution. In: *Solution Properties of Polysaccharides*, ACS Symposium Series 150, pp. 1-14. Brant D.A. (Ed.), American Chemical Society, Washington D.C.
- Southwick J.G., Lee H., Jamieson A.M. & Blackwell J. (1980). Self-Association of Xanthan in Aqueous Media. *Carbohydrate Research*, 84: 287-295.
- Stading M., Langton M. & Hermansson A.-M. (1992). Inhomogeneous fine-stranded β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, 6 (5): 455-470.
- Stein R.S. & Keane J.J. (1955). The scattering of light from thin polymer films. I. Experimental procedure. *Journal of Polymer Science*, 17: 21-44.
- Stokke B.T. & Christensen B.E. (1996). Release of disordered xanthan oligomers upon partial hydrolysis of double-stranded xanthan. *Food Hydrocolloids*, 10 (1): 83-89.
- Stokke B.T., Christensen B.E. & Smidsrød O. (1998). Macromolecular properties of Xanthan. In: *Polysaccharides, Structural Diversity and Functional Versatility*, pp. 433-472. Dimitriu S. (Ed.). Marcel Dekker Inc., New York.
- Stokke B.T., Smidsrød O. & Elgsaeter A. (1989). Electron Microscopy of Native Xanthan and Xanthan Exposed to Low Ionic Strength. *Biopolymers*, 28: 617-637.
- Stokke B.T., Elgsaeter A. & Smidsrød O. (1986). Electron microscopic study of single- and double-stranded xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8: 217-225.
- Sutherland I.W. (1990). *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. Cambridge University Press. Melbourne.
- Sutherland I.W. (1981). Xanthomonas Polysaccharides – Improved Methods for Their Comparison. *Carbohydrate Polymers*, 1: 107-115.

- Syrbe A. (1998). *Polymer Incompatibility in Aqueous Whey Protein and Polysaccharide Solutions. Phase Separation Phenomena and Microgel Particel Formation*. Ph.D. Thesis. Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 14, Nr. 86. Düsseldorf: VDI Verlag.
- Syrbe A., Bauer W. & Klostermeyer H. (1998). Polymer Science Concepts in Dairy Systems – An Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloid Interaction. *International Dairy Journal*, 8: 179-193.
- Tainaka K. (1979). Study of complex coacervation in low concentration by virial expansion method. I. Salt free systems. *J. Physical Society Japan.*, 46: 1899-1906.
- Tako M. & Nakamura S. (1984). Rheological Properties of Deacetylated Xanthan in Aqueous Media. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48: 2887-2993.
- Tanford C., Bunville L.G. & Nozaki Y. (1959). The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5. *Journal of the American Chemical Society*, 81: 4032-4036.
- Tang S., Preece J.M., McFarlane C.M. & Zhang Z. (2000). Fractal Morphology and Breakage of DLCA and RLCA Aggregates. *Journal of Colloid & Interface Science*, 221: 114-123.
- Tolstoguzov V.B. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation, *Food Hydrocolloids*, 17: 1-23.
- Tolstoguzov V.B. (1997). Protein - Polysaccharide Interaction. In: *Food Proteins and their Applications*, pp. 171-198. Damodaran S. & Paraf A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York.
- Tolstoguzov V.B. (1996). Structure-property relationships in foods. In: *Macromolecular Interactions in Foods Technology*, ACS Symposium Series 650, pp. 2-14. Parris N., Kato A., Creamer L. & Pearce J. (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC.
- Tolstoguzov V.B. (1994). Some Physico-chemical aspects of Protein Processing in Foods. Functional Properties. In: *Gums and Stabilizers for the Food Industry 7*, pp. 115-124. Phillips G.O., Williams P.A. & Wedlock D.J. (Eds.), Oxford University Press.
- Tolstoguzov V.B. (1991). Functional Properties of Food Proteins and Role of Protein-Polysaccharide Interaction. Review. *Food Hydrocolloids*, 4 (6): 429-468.
- Tolstoguzov V.B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: *Functional properties of food macromolecules*, pp 385-415. Elsevier Applied Science, London.
- Tolstoguzov V.B. (1985). Functional properties of protein - polysaccharide mixtures. In: *Functional Properties of Food Macromolecules*, pp. 385-415. Mitchell J. & Ledward D.A. (Eds.), Elsevier Applied Science Publishers.
- Torres L.G., Brito E., Galindo E. & Choplin L. (1993). Viscous Behaviour of Xanthan Aqueous Solutions from a Variant Strain of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75 (1): 58-64.

- Tromp R.H. & Jones R.A.L. (1996). Off-Critical Phase Separation and Gelation in Solutions of Gelatin and Dextran. *Macromolecules*, 29 (25): 8109-8116.
- Tsuboi A., Izumi T., Hirata M., Xia J., Dubin P.L. & Kokufuta E. (1996). Complexation of Proteins with a Strong Polyanion in an Aqueous Salt-free System. *Langmuir*, 12 (26): 6295-6303.
- Tsuchida E., Abe K. & Honma M. (1976). Aggregation of Polyion Complexes between Synthetic Polyelectrolytes. *Macromolecules*, 9 (1): 112-117.
- Tsvetkov V.N. (1989). Flow birefringence theory. In: *Rigid-Chain polymers, hydrodynamic and optical properties in solution*, pp. 233-397. Consultants bureau, NY.
- Tuinier R., Dhont J.K.G. & de Kruif C.G. (2000). Depletion-Induced Phase Separation of Aggregated Whey Protein Colloids by an Exocellular Polysaccharide. *Langmuir*, 16: 1497-1507.
- Turgeon S.L. & Beaulieu M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, 15 (4-6): 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.
- Veis A. & Aranyi C.J. (1960). Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. *Journal of Physical Chemistry*, 64: 1203-1210.
- Verheul M., Pedersen J.S., Roefs S.P.F. & de Kruif K.G. (1999). Association Behavior of Native β -Lactoglobulin. *Biopolymers*, 49: 11-20.
- Verheul M., Roefs S.P.F.M., Mellema J. & de Kruif K.G. (1998). Kinetics of Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 896-903.
- Wagner R. & Kampmann R. (1991). Homogeneous Second Phase Separation. In: *Materials Science and Technology. A Comprehensive Treatment. Vol. 5, Phase Transformations in Materials*, Chap. 4, pp. 213-303. Cahn R.W., Haasen P. & Kramer E.J. (Eds.), VCH, Weinheim.
- Walstra P. & Jenness R. (1984). *Dairy Chemistry and Physics*, A Wiley-Interscience publication, New York, 467 pp.
- Wang Y., Kimura K., Dubin P.L. & Jaeger W. (2000). Polyelectrolyte-Micelle Coacervation: Effects of Micelle Surface Charge Density, Polymer Molecular Weight, and Polymer/Surfactant Ratio. *Macromolecules*; 33 (9): 3324-3331.
- Ward F.M. (1997). Hydrocolloid Systems as Fat Mimetics in Bakery Products: Icings, Glazes, and Fillings. *Cereals Foods World*, 42: 386-390.
- Weinbreck F., de Vries R., Schrooyen P. & de Kruif C.G. (2003a). Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. *Biomacromolecules*, 4 (2): 293-303.

- Weinbreck F., Nieuwenhuijse H., Robijn G.W. & de Kruif C.G. (2003b). Complex Formation of Whey Proteins: Exocellular Polysaccharide EPS B40. *Langmuir*, 19: 9404-9410.
- Whitcomb P.J., Ek B.J. & Macosko C.W. (1977). Rheology of Xanthan Gum Solutions. In: *Extracellular Microbial Polysaccharides*, ACS Symposium Series 45, pp. 160-173. Sandford P.A. & Laskin A. (Eds.), Am. Chem. Soc., Washington D.C.
- Wong D.W.S., Camirand W.M. & Pavlath A.E. (1996). Structures and Functionalities of Milk Proteins. *CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36: 807-844.
- Xia J. & Dubin P.L. (1994). Protein-Polyelectrolyte Complexes. In: *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*; Chap. 15, pp. 247-271. Dubin P., Bock J., Davies R.M., Schulz D.N. & Thies C. (Eds.), Springer, Berlin.
- Xia J., Dubin P.L., Kim Y., Muhoberac B.B. & Klimkowski V.J. (1993). Electrophoretic and quasi-elastic light scattering of soluble protein-polyelectrolyte complexes. *Journal of Physical Chemistry*, 97 (17): 4528-4534.
- Yalpani M. (1988). Polysaccharides. In: *Syntheses, Modifications and Structure / Property Relations*. Elsevier Sci. Publishers B.V. Amsterdam; New York, 499p.
- Yevlampieva N.P., Pavlov G.M. & Rjuntsev E.I. (1999). Flow birefringence of xanthan and other polysaccharide solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26 (4): 295-301.
- Young S.-L., Martino M., Kienzle-Sterzer C. & Torres A. (1994). Potentiometric Titration Studies on Xanthan solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54: 121-127.
- Zaleska H., Ring S.G. & Tomasik P. (2000). Apple pectin complexes with whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 14 (4): 377-382.
- Zhang G. & Foegeding E.A. (2003). Heat-induced phase behavior of β -lactoglobulin / polysaccharide mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17 (6): 785-792.
- Zhang J., Zhang H. & Yang Y. (1999). Polymerization-Induced Bimodal Phase Separation in a Rubber-Modified Epoxy System. *Journal of Applied Polymer Science*, 72: 59-67.
- Zhang L., Liu W., Norisuye T. & Fujita H. (1987). Double-stranded helix of xanthan: Rigidity in 0.01M aqueous sodium chloride containing 0.01 N hydrochloric acid. *Biopolymers*, 26 (3): 333-341.
- Zolper J.T. (1995). *Fat Substitutes Based on Carrageenan Gels, Processes for Producing the Same and Food Products Containing the Fat Substitutes*. US Patent Application 5,458,904.