



Étude du couplage des hautes pressions hydrostatiques et de l'ultrafiltration pour la récupération et la purification d'une fraction enrichie en alpha- lactalbumine

Mémoire

Elie Jean

Maîtrise en sciences des aliments - avec mémoire

Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Elie Jean, 2019

Résumé

L'alpha-lactalbumine (α -LAC), représentant environ 22% des protéines du lactosérum, est riche en tryptophane, lysine et cystéine, est ajoutée dans les formules lactées pour mieux mimer la composition d lait humain, ce qui en fait un ingrédient de choix pour la fortification des aliments infantiles, la nutrition des personnes âgées et pour l'amélioration de la performance musculaire. L'obtention d' α -LACC pure présente des défis technologiques du fait que les méthodes de fractionnement des protéines laitières par les procédés existants présentent des contraintes technologiques et environnementales. Il est donc important de se tourner vers des procédés matures, éco-coefficients et capables d'être implantés à l'échelle industrielle. En ce sens, les traitements par hautes pressions hydrostatiques (HPH) gagnent de l'intérêt par leurs capacités à être appliquées à tous les types d'aliments pour réduire la charge microbienne et prolonger leurs durées de conservation.

Appliquées au lait, de nombreux auteurs ont démontré que les HPH permettent de réduire la taille des caséines de 33 à 38 % (à 300 MPa et 600 MPa respectivement), de générer des agrégats entre les CN/ β -LG et β -LG/ β -LG tandis que l' α -LAC est peu affectée. Cette étude propose donc de moduler ces interactions et d'utiliser les d'agrégats de tailles et de composition spécifiques formés par les HPH pour séparer l' α -LAC des autres protéines laitières par ultrafiltration (UF) via une membrane de 300 kDa. Les interactions protéiques sous HPH, la caractérisation des fractions générées et les performances de filtration ont été étudiés.

L'analyse des données révèle une variation de la composition physico-chimique dans le perméat et le rétentat d'UF. Pour les solutions non-traitées, près de 83,12% de l' α -LAC et

78,37% de la β -LG sont retrouvées dans le rétentat alors que pour les solutions pressurisées ces valeurs sont de 76.74% pour l' α -LAC et 53.46% pour la β -LG. Le perméat de la solution pressurisée obtenu après le couplage des HPH et de l'UF présente un profil plus important en α -LAC que les solutions non traitées.

Le rapport α -LAC / β -LG obtenu dans les rétentats pour le lait non traité par HPH (0,38) est plus élevé que le ratio α -LAC/ β -LG de la solution pressurisée (0.20). Ce qui explique que plus de β -LG est resté dans le retentat de la solution pressurisée lors de la filtration membranaire par rapport à la solution témoin. Toutefois, les performances de filtration sont drastiquement diminuées à cause de l'apparition d'un colmatage. Ces premiers résultats montrent ainsi l'intérêt du couplage de ces deux procédés (HPH-UF) pour la séparation d'une protéine d'intérêt. Il est cependant nécessaire de mettre en place des stratégies visant à minimiser le colmatage tout en augmentant les rendements et les taux de purification de la protéine cible.

Table des matières

Résumé	ii
Table des matières	iv
Liste des abréviations	x
Remerciements	xi
Avant-propos	xiv
Introduction	1
Chapitre 1	5
Revue de littérature.....	5
1. Les protéines laitières.....	6
1.1. Les caséines	7
1.1.1. Les différents types de CN	8
1.1.2. Propriétés structurales des micelles de caséines.....	10
1.2. Les protéines sériques.....	14
1.2.1. <i>La bêta-lactoglobuline</i>	14
1.2.1.1. <i>Propriétés structurales et physico-chimiques</i>	14
1.2.2. <i>L'alpha-lactalbumine</i>	18
1.2.3. <i>Les protéines mineures du lactosérum</i>	19
1.2.3.1. <i>L'albumine de sérum bovin</i>	19
1.2.3.2. <i>Les immunoglobulines</i>	20
1.2.3.3. <i>La lactoferrine</i>	21
2. Les hautes pressions hydrostatiques.....	22
2.1. Intérêt pour le procédé à hautes pressions hydrostatiques.....	23
2.1.1. Avantages du procédé	25
2.1.2. Inconvénients du procédé.....	25
2.2. Effet des HPH sur les protéines -Généralités.....	26
2.3. Impact des HPH sur les protéines laitières	27
2.3.1. Impact des HPH sur les micelles de caséine	27
2.5.1. Impact sur la β -lactoglobuline.....	29
2.5.2. Impact sur l' α -lactalbumine	29

2.6.	Interactions des protéines laitières engendrées par les HPH	30
2.6.1.	Interaction β -LG- α -LAC	31
2.6.2.	Interaction CN- β -LG	31
3.	Les procédés membranaires	33
3.1.	Généralités	33
3.3.1.	Paramètres liés aux systèmes de filtration baromembranaires	35
3.3.1.1.	<i>Les modes opératoires</i>	35
3.3.1.2.	<i>Nature des matériaux membranaires</i>	36
b)	<i>Matériaux membranaires</i>	36
-	<i>Nature des matériaux</i>	36
-	<i>Porosité</i>	37
-	<i>Les membranes composites : structure</i>	37
-	<i>Les différents types de modules</i>	37
-	<i>Les membranes planes</i>	38
-	<i>Les membranes tubulaires</i>	38
C	38
-	<i>Les membranes à fibres creuses</i>	39
-	<i>Les membranes spiralées</i>	39
3.3.2.	<i>Conditions opératoires</i>	40
3.3.2.1.	<i>Flux de perméation</i>	40
3.3.2.2.	<i>Facteur de concentration volumique</i>	40
3.3.2.3.	<i>Pression transmembranaire</i>	41
3.3.2.4.	<i>Vitesse tangentielle</i>	41
3.3.2.5.	<i>Coefficient de transmission</i>	42
3.3.2.6.	<i>Coefficient de rejet</i>	42
3.4.	Le colmatage membranaire	43
3.4.2.	<i>L'affinité chimique de la solution avec le matériau membranaire</i>	44
3.4.3.	<i>Mécanisme de blocage des pores</i>	44
3.4.4.	<i>Stratégies de nettoyage membranaire</i>	46
4.	Fractionnement des protéines du lait par les procédés membranaires	47
Chapitre 2	51

Hypothèse et Objectifs.....	51
1. Hypothèse	52
2. Objectifs	52
Chapitre 3:	53
Fractionnement des protéines du lactosérum par couplage des hautes pressions hydrostatiques et de l’ultrafiltration	53
Résumé	54
Abstract.....	56
1. Introduction	57
2. Matériels et Méthodes	61
2.1. <i>Préparation des échantillons</i>	61
2.3. Ultrafiltration	61
2.3.1. <i>Système utilisé et caractéristique de la membrane</i>	61
2.3.2. <i>Filtration en mode recirculation totale</i>	62
2.3.3. <i>Filtration en mode concentration</i>	62
2.4. Analyses.....	63
2.4.1. <i>Profil protéique par SDS-PAGE</i>	63
2.4.2. <i>Analyse de la teneur protéique des échantillons</i>	63
2.4.3. <i>Profil protéique par chromatographie en phase liquide à haute performance</i> .	64
2.4.3.1. <i>Récupération et purification de l’alpha-lactalbumine</i>	64
2.4.3.2. <i>Calcul de la concentration, du rendement et du taux de purification</i>	64
3. Résultats et discussion.....	65
3.1. <i>Performance de l’UF lors du fractionnement des protéines du lait</i>	65
3.1.1. <i>En mode recirculation totale</i>	65
3.1.2. <i>En mode concentration</i>	67
4. Récupération de l’alpha-lactalbumine.....	69
4.1. <i>Impact des HPH sur la concentration des protéines du lactosérum</i>	69
4.2. <i>Profil protéique des rétentats des laits témoins et pressurisés</i>	71
Chapitre 4	73
Retour sur l’hypothèse, conclusion et perspectives	73
5. Retour sur l’hypothèse initiale.....	74

Conclusion	75
Perspectives	75
Bibliographie	77

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés des caséines bovines.....	8
Tableau 2: Caractéristiques de la micelle de caséine (adapté de, McMahon et Brown 1984, FOX, P.F. et BRODKORB, A. (2008).....	10

Liste des figures

Figure 1: Modèle micellaire proposé par Walstra et al. 1999	12
Figure 2 : Modèle micellaire proposé par Holt (1992).....	13
Figure 3 : Représentations chimique des états conformationnels rencontrés lors du repliement de la β -LG selon 3 états : déplié, intermédiaire et natif (Heinrich Roder et al. 2001).	16
Figure 4: Structure de la beta-lactoglobuline présentant les emplacements des sites de liaisons entre les variantes A et B. (Delano. 2002)	17
Figure 5 : Structure 3D de l' α -LAC avec les sites de liaisons du Ca^{2+} et du Zn^{2+} (Fox & McSweeney. 1998).....	19
Figure 6: Structure tridimensionnelle de la BSA	20
Figure 7: Structure 3D de la lactoferrine avec ses lobes et sous lobes (Tiré de Vogel. 2012)	21
Figure 8: Représentation schématique de la pression appliquée en transformation des aliments (adaptée de Considine et al. 2007).	22
Figure 9: Représentation de l'effet potentiel des HPH sur les micelles de caséines (Kulozik <i>et al.</i> 2006)	28
Figure 10: Les différents procédés de filtration baromembranaires (tirée de Koros <i>et al.</i> (1996), IUPAC).	34
Figure 11: Illustration de la filtration frontale (A)/ (Dead-end) et la filtration tangentielle (B)/ (cross flow) tirée de A. Y. Tamime. 2013).	35
Figure 12: représentation schématique d'un module à membrane plane. Koen & Thien. 2011.	38
Figure 13: Module de membrane tubulaire. Image tirée Koen & Thien. 2011.	38
Figure 14: Module de membrane en fibres creuses. Récents progrès en génie des procédés, Numéro 98-2009, 2-910239-72-1, Ed. SFGP, Paris, France.	39
Figure 15: Schéma d'une membrane spiralée. Tirée de Baker. 2012.....	39

Figure 16 Schématisation du colmatage, a) adsorption en surface; b) blocage des pores c) gel ou gâteau (Paulen et Fikar. 2015).....	44
Figure 17 : Séparation des protéines du lactosérum selon le montage de Nelson & Barbano (2005)	48
Figure 18: Flux de perméation en fonction de la pression transmembranaire en mode recirculation totale d'un lait non traité (rond noir) et pressurisé (rond vide) à 600 MPa pendant 5 min.	66
Fig. 19: Évolution du flux de perméation en fonction du temps pour le lait non traité (rond vide) et le lait pressurisé à 600 MPa/5 min (rond noir).....	68
Fig. 20: Profils protéiques des perméats des laits témoins (A et B) et pressurisés à 600 MPa/5min (C et D).....	70
Figure 21: Chromatogrammes des rétentats de lait témoin (gauche) et pressurisé (droite) à 600 MPa/5min.....	71

Liste des abréviations

α -LAC : alpha-lactalbumine
Al : aluminium
Arg : Arginine
ASB : albumine de sérum bovin
Asp : Asparagine
 β -LG : bêta-lactoglobuline
Ca : calcium
CA : acétate de cellulose
Cm² : centimètre carre
Cm³ : centimètre cube
CMP: caséinomacropéptide
CN : caséines
CR : Coefficient de rejet
Da : Dalton
FCV : facteur de concentration volumique
g/cm³ : gramme par centimètre cube
g/L: gramme par litre
Gln : glutamine
H Φ : hydrophobicité
HIV : virus de l'immuno- déficience humaine
HPH : haute pression hydrostatique
Ig : immunoglobuline
J : flux de perméation (L*m²*h⁻¹)
KJ: Kilojoule
Lf: lactoferrine
m³: mètre cube
mm : millimètre
MF : microfiltration
 μ : viscosité de l'eau
mV: millivolt
MWCO: molecular weight cut-off
nm: nanometre
NF: nanofiltration
OI: osmose inverse
(PO₄)₂Ca₃ : phosphate de calcium
PA: polyacrylamide
PES: polyethersulfone
pH: potentiel hydrogène
PP: polypropylène
PVDF : polyfluorure de vinylidene
R : résistance hydraulique totale
TiO₂ : oxyde de titane
Ti : coefficient de transmission
UF : ultrafiltration
UHT : ultra-haute température
Zn : zinc
Zr : zirconium

Remerciements

Mes remerciements les plus sincères sont adressés en premier lieu à mon directeur de maîtrise, le professeur Alain Doyen. D'abord, merci pour ce sujet intéressant et stimulant qui m'a fait découvrir des nouvelles connaissances dans le champ d'étude de la science des aliments. Tu as été pour moi au cours de cette maîtrise tel un père portant attention au besoin de son fils. Ta disponibilité, ta patience, ton jugement et ta clarté sont des qualités rares qui font ta force. Merci de m'avoir permis de faire partie de cette équipe vivante, progressiste et scientifiquement équilibré. Je n'ai pas de mots pour exprimer la joie que j'ai eu au cours de cette maîtrise au sein de l'équipe, ma maîtrise s'achève mais l'expérience est gravée dans mon esprit jusqu'à la fin de mes jours.

Un remerciement spécial aux professionnels de recherche qui ont mis de l'amour en m'accompagnant dans de nombreux pratique de laboratoire. Merci à toi Véronique pour ton support immédiat, ta minutie et ta disponibilité. Merci à toi Diane Gagnon pour ton professionnalisme et ta façon de faire évoluer les choses au sein des différents laboratoires. Merci à toi Jacinthe pour ta gentillesse et ton sens de l'humour lors des rares rencontres qu'on a eues.

Il serait mal poli de ma part de ne pas adresser des remerciements à des personnes spéciales au sein de l'équipe qui ont su faire preuve d'un grand professionnalisme et d'une ouverture scientifique hors du commun. Abir, Alice, Shyam, merci pour le temps accordé, les connaissances et les savoirs partagés. Merci à toute l'équipe pour vos conseils et vos suggestions lors des réunions mensuels d'équipe.

Merci à tous mes amis de la faculté d'agronomie et de médecine vétérinaire (FAMV) qui m'ont fait vivre de bons moments fraternels lors des différentes activités réalisées sur et hors campus.

Un grand merci à ma famille spécialement ma femme et mon fils qui chaque jour ont apporté de la joie et du bonheur à ma vie. Nadège, merci de m'avoir montré qu'avec la persévérance et la patience on arrivera à l'objectif que l'on s'est fixé.

Merci au Programme Canadien de Bourses de la Francophonie pour le soutien financier et l'accompagnement tout au long du cheminement. Les différentes sessions (acclimatations, mi-parcours et fin de séjour) ont permis de cerner les enjeux et d'être prêt à toute éventualité.

Enfin, merci au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour le support financier.

Toutes les grandeurs dépendent du point de vue, tout est rapports ; mais la grande différence de la science à l'ignorance, est que la science se rapporte à bien peu de chose, et que notre ignorance se rapporte presque à tout.

Joseph Michel Antoine Servan

Avant-propos

Ce mémoire de maîtrise est composé de quatre chapitres :

Le **chapitre 1** est consacré à la littérature pertinente sur le sujet d'étude. Il est divisé en trois (3) parties : la première partie traite des protéines laitières, plus spécifiquement les caséines (CN) qui ont été étudiées pour leurs structures et leurs modifications lorsque soumises aux HPH. La deuxième partie se focalise sur la bêta-lactoglobuline qui fait partie intégrante de la problématique de séparation des protéines majeures du lactosérum. La revue de littérature sur l'alpha-lactalbumine compose la troisième partie du chapitre 1. Par la suite, les HPH sont traitées ainsi que les applications liées à cette technologie au niveau de l'industrie laitière et ses impacts sur les matrices laitières. En dernier lieu, une étude approfondie de l'UF est présentée ainsi que des paramètres opératoires à maîtriser lors de l'utilisation de cette technologie. **Le chapitre 2** présente l'hypothèse de recherche ainsi que les objectifs à atteindre. **Le chapitre 3** présente un article scientifique intitulé *“Fractionnement des protéines du lactosérum par couplage des hautes pressions hydrostatiques et de l’ultrafiltration”*. Il a été rédigé en lien avec les résultats expérimentaux générés en laboratoire. Les auteurs de cet article sont les suivants : Elie Jean, 1^e auteur qui a rédigé l'article, réalisé les travaux de laboratoire, la collecte de données, l'analyse et l'interprétation des résultats; Véronique Perreault, professionnelle de recherche, qui a participé à la formation de l'auteur principal pour diverses expérimentations ; Shyam Suwal, a porté son soutien dans la correction de l'article et à certaines interprétations des résultats; Alain Doyen directeur et porteur de l'idée du projet, a supervisé, corrigé, validé les résultats et révisé l'article. **Le chapitre 4** revient sur l'hypothèse de recherche initialement proposée, présente la conclusion et des perspectives au présent projet de recherche.

Introduction

En 2017, 2.5 milliards de litres de lait de consommation ont été vendu au Canada (Canadian Dairy Info. 2017) ce qui classe le secteur laitier comme un des principaux leviers économiques dans l'industrie alimentaire. La valeur monétaire des produits laitiers vendus augmente et les prévisions du Financement agricole Canada pour 2018 est très prometteur selon les fortes tendances de consommation actuelle. Au Québec, c'est 8.7 milliards de dollars qui sont générés par les 6513 fermes laitières et les 12000 producteurs laitiers qui évoluent dans le secteur sur l'ensemble de la vente du lait au Canada (Producteurs de lait du Québec. Site web 2018).

Le lait est un fluide composé d'une fraction lipidique sous forme de globules de gras, une fraction glucidique (le lactose), des fractions protéiques colloïdales (caséines) et solubles (protéines sériques) et une quantité importante de minéraux en équilibre entre les phases soluble et colloïdale (Thompson *et al.* 2014). La concentration des principaux constituants du lait de vache est la suivante : 87,7% d'eau, 4,9% de lactose, 3,4% de matière grasse, 3,3% de protéines et 0,7% de minéraux (Jouan. 2002). Dans le lait, environ 67% du calcium, 35% du magnésium et 44% du phosphate sont des sels liés aux caséines. Les principales protéines sont les caséines (CN) et les protéines du lactosérum (Jouan. 2010; Fox *et al.* 2015).

La consommation des protéines laitières et de leurs dérivés (caséinates) est très répandue dans l'alimentation humaine. Ces protéines entrent également dans la composition des formulations infantiles (Williams *et al.* 2014). Les protéines laitières sont d'une grande importance sur le plan nutritionnel, fonctionnel et économique. A cet effet, leur purification est d'intérêt majeur pour les industries alimentaires, nutraceutiques et pharmaceutiques pour

la génération d'ingrédients à fortes valeurs ajoutées. Il existe divers procédés pour purifier les protéines laitières (chromatographie, séparation sur membrane et précipitation sélective) mais ils présentent des contraintes technologiques, de coût et environnementales. Ainsi, il est important d'évaluer de nouvelles stratégies afin de générer des fractions protéiques ayant un taux de pureté et/ou rendement plus élevé tout en prenant en compte le facteur environnemental. Par conséquent, il devient intéressant d'utiliser de nouvelles stratégies de purification utilisant des procédés matures et innovants.

Les HPH est un procédé, dont l'étude a débuté au 19^e siècle, consiste à appliquer une pression statique sur un produit alimentaire emballé en utilisant l'eau comme transmetteur de pression. Cette pression varie entre 50 et 1000 MPa avec pour effet une augmentation de la température dans l'enceinte de 3°C par tranche de 100 MPa (Huppertz *et al.* 2011; Balasubramanian *et al.* 2016). Les HPH sont soumis aux respects des principes de Le Chatelier, le principe isostatique, le principe d'arrangement microscopique et la théorie de l'état de transition énergétique. Quand un système est soumis aux HPH, il y a un déséquilibre au niveau de la cohésion de ce système. L'application des HPH permet un changement des propriétés physiques des aliments (viscosité, solubilité, densité.) (Patel *et al.* 2005); une dissociation des liaisons faibles et peut induire une variation du pH (Balasubramanian *et al.* 2016).

Ces différents effets des HPH sur les matrices alimentaires se traduisent principalement par des modifications de structures des protéines (Bravo *et al.* 2012). Plus spécifiquement, les HPH provoquent la dénaturation des protéines et la formation d'agrégats entre les espèces protéiques (Messens *et al.* 1997; Huppertz *et al.* 2003; Marciniack *et al.* 2018). Dans le cas de la micelle de CN, la pressurisation engendre leur déstructuration par

solubilisation du phosphate de calcium colloïdale, la déstabilisation des liens hydrophobes et des interactions électrostatiques (Huppertz *et al.* 2004). Finalement, différentes interactions protéiques sont créées, ainsi, les CN peuvent se lier avec la β -LG pour former des agrégats via des ponts disulfures à partir de 200 MPa (Patel *et al.* 2006; Considine *et al.* 2007).

À la différence des CN, les protéines sériques, de structure globulaire, réagissent différemment à la pression. En effet, sous HPH, la β -LG présente une certaine résistance à la pression entre 50-100 MPa puis commence à se dénaturer à partir de 150 MPa tandis que l' α -LAC, la plus résistante des protéines aux HPH à cause de sa structure formée de quatre (4) ponts disulfures liés par un atome de calcium commence à se dénaturer seulement à partir de 400 MPa (Patel *et al.* 2005). Dans le lait, la β -LG traitée par HPH est dénaturée à 90% vers 400 MPa et est associée aux molécules de CN majoritairement avec la κ -CN pour former des complexes de poids moléculaires élevés (Huppertz *et al.* 2004; Considine *et al.* 2007). Plusieurs facteurs, en plus des HPH, peuvent accentuer la dénaturation des protéines sériques, soient la température, le pH et la force ionique (Chatterton *et al.* 2006). Les interactions protéiques générées sous HPH représenteraient ainsi un pré-traitement novateur afin d'induire, de manière spécifique, des interactions entre les protéines laitières. Par la suite, le couplage des HPH avec d'autres procédés tels que les technologies baromembranaires, permettrait une séparation sélective des protéines laitières pressurisées. Cependant, les modifications d'équilibres physico-chimiques dans le lait et les phénomènes de dénaturation/agrégation protéiques à la suite de sa pressurisation impactent négativement sur les performances de la filtration (Leu *et al.* 2017). Par conséquent, l'objectif de ce travail de recherche est de moduler spécifiquement les interactions des protéines du lait sous HPH afin

de générer un gradient de taille permettant une séparation spécifique des protéines majeures du lactosérum par UF.

Chapitre 1

Revue de littérature

1. Les protéines laitières

Le lait bovin est composé d'environ 3,2 à 3,5% de protéines. Ces protéines sont divisées en 2 classes spécifiques : les protéines colloïdales et les protéines solubles. La fraction colloïdale est représentée par les caséines (CN) (-78% w/v) qui sont insolubles à pH 4,6 alors que la fraction soluble est constituée des protéines du lactosérum qui, par définition, sont solubles à pH 4,6. Les protéines du lactosérum sont constituées de bêta-lactoglobuline (β -LG) (55% w/v), d'alpha-lactalbumine (α -LAC)(-20% w/v), des immunoglobulines (Ig) (13%), de l'albumine de sérum bovin (ASB) (7%), de la lactoferrine (Lf) (4%) et des fragments de CN appelés les protéoses-peptones (Ribadeau-Dumas, 1981; Cayot et Lorient. 1998; Jeantet *et al.*, 2007 ; Boland *et al.*, 2014 ; Fox *et al.*, 2015).

D'un point de vue technologique et physico-chimiques, les protéines laitières représentent la fraction des constituants du lait la plus importante et la plus étudiée (Fox. 2003) en lien avec leurs propriétés nutritionnelles et techno-fonctionnelles. À cet effet, elles peuvent être intégrées dans diverses matrices alimentaires pour une amélioration de la qualité physico-chimique et sensorielle des produits. Dans le lait, la concentration des protéines varie en fonction de plusieurs facteurs : l'alimentation, la race, la période de lactation et l'état de santé de l'animal (Jeantet *et al.*, 2007).

Dans les paragraphes qui suivent, seules les protéines laitières et leurs caractéristiques structurales et physico-chimiques seront détaillées pour un approfondissement des connaissances sur le sujet.

1.1. Les caséines

Les CN sont des hétéroprotéines présentes dans le lait sous forme de micelles. Chaque micelle est constituée d'un nombre différent des quatre (4) espèces caséiques : la *caséine alpha-s1* (α_1 -CN), la *caséine alpha-s2* (α_2 -CN), la *caséine bêta* (β -CN) et *caséine kappa* (κ -CN) dont les teneurs dans la micelle sont respectivement de 38%, 10%, 36% et 15% (Jouan. 2002). Cependant, il existe une cinquième catégorie la γ -CN représentant 2 à 3% des CN totales issue des réactions de dégradation de la β -LG par les protéases du lait (Jeantet *et al.* 2007 ; Jouan. 2002).

En 1818, Schùbler a été le premier scientifique ayant démontré que les CN existent dans le lait de la plupart des mammifères terrestre sous la forme de larges particules suspendues dans une phase aqueuse. Elles sont responsables de la couleur blanche et opaque du lait (Jeantet *et al.* 2007) et possèdent des propriétés biologiques intéressantes notamment puisque leur hydrolyse enzymatique permet la génération de peptides bioactifs ayant des propriétés anti-opioïdes et anti-hypertenseur. (Nongonierma *et al.* 2015). Riche en phosphore et en calcium [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], les CN peuvent être isolées et identifiées selon les techniques courantes de séparation des protéines laitières (précipitation isoélectrique, filtration membranaire, centrifugation) (Fox & Brodkorb. 2008 ; Jouan. 2002; Horne. 2014).

Le nombre de groupements phosphorylés est un critère d'hétérogénéité permettant de classer les CN en fonction et de leurs sensibilités à la précipitation en présence d'ions Ca^{2+} (Horne. 2005). Ce classement des CN en fonction de leurs sensibilités aux ions Ca^{2+} est la suivante : α_2 -CN > α_1 -CN > β -CN > κ -CN. Il existe de nombreuses variantes génétiques des CN en fonction de leurs compositions en acides aminés et des substitutions qui peuvent

être effectuées sur leurs chaînes peptidiques, ce polymorphisme génétique affecte leurs stabilités et leurs propriétés à la coagulation (Jouan. 2002; Thompson *et al.* 2014). Les différentes propriétés des CN sont détaillées dans le Tableau 1.

Tableau 1: Propriétés des caséines bovines (données tirées de Jeantet *et al.* 2010)

Protéines	Masse molaire moléculaire (kDa)	Nombre d'acides aminés	Groupement phosphore	Résidus cystéines
<i>CN-α_1</i>	23.6	199	7-9	0
<i>CN-α_2</i>	25.2	207	10-13	2
<i>CN-β</i>	23.9	209	5	0
<i>CN-κ</i>	19.1	169	1	2

1.1.1. Les différents types de CN

a) Caséine α_1

La α_1 -CN est la phosphoprotéine la plus abondante dans le lait soit 34-40% de la masse nette des caséines (Ribadeau-Dumas et Grappin. 1989). Il existe 5 variants connus composés de 199 acides aminés pour un poids moléculaire de 23 kDa. La α_1 -CN présente 3 zones hydrophobes et 2 zones hydrophiles qui lui confère une hydrophobicité globale de 4,89 Kj/résidu (Ribadeau-Dumas et Grappin. 1989; Jouan. 2002). Elle possède une capacité de se lier avec les ions phosphocalciques, ce qui permet par la suite de créer des liens entre les constituants micellaires et les autres caséines pour former les sous-micelles.

b) Caséine α_2

La concentration de la α_2 -CN dans le lait est de 2,6 g/L. Il s'agit d'une protéine riche en résidus phosphorylés et sérines, ce qui permet de la différencier des autres caséines (Ribadeau et Dumas. 1989). Cette espèce caséique a une masse molaire comprise entre 25,15 et 25,4

kDa, une hydrophobicité moyenne de 4,64 kJ/résidu et une charge nette positive de +9,5mV dans sa partie C-terminale. Elle porte aussi une charge négative de -21mV dans sa partie N-terminale (Cayot et Lorient., 1998). Dans sa structure, deux groupements cystéine sont dénombrés ce qui permet de former des dimères ou polymères de α_2 -CN via des ponts disulfures (Cayot et Lorient. 1998).

c) Caséine β

La β -CN possède une structure secondaire désordonnée avec 7-13% d'hélices α et 13 à 22% de feuillets β . Six variants ont été dénombrés. Elle possède 2 régions qui déterminent la polarité et le pouvoir amphiphile de la molécule. Dans la région N-terminale, la β -CN est fortement acide et hydrophile (Jouan *et al.* 2002) en raison de sa teneur élevée en acide glutamique. Sa partie C-terminale quant à elle est hydrophobe et, en fonction de la température, joue un rôle dans la propension des β -CN à s'associer entre-elles pour former des néomicelles. Quand la température augmente, l'association entre les β -CN augmente dû aux diverses interactions hydrophobes (Cayot et Lorient. 1998).

d) Caséine κ

La κ -CN est l'espèce caséique la plus étudiée du fait de son rôle dans la coagulation du lait en fabrication fromagère. Elle existe en un assemblage de monomères reliés par des ponts disulfures (Cayot et Lorient. 1998). Il existe 2 variants génétiques de la κ -CN dérivés de la substitution de deux acides aminés localisés en position 136 et 148 du caséinomacropéptide (CMP) (Jouan. 2002). La partie N-terminale de la κ -CN est hydrophobe (Swaisgood. 1982) et porte une charge globale nette négative soit -3.0 mV pour le variant A et -3.9 mV pour le variant B (Cayot et Lorient. 1998). Une caractéristique rare de la κ -CN est qu'elle est la seule

à posséder dans sa chaîne peptidique une molécule de pyroglutamate. De plus, elle est la seule espèce CN glycosylée (Mercier *et al.* 1973). La κ -CN est soluble en présence du calcium à toutes les échelles de température ce qui lui permet de jouer un rôle stabilisateur pour les autres caséines (Jouan. 2002).

1.1.2. Propriétés structurales des micelles de caséines

En microscopie électronique, les CN existent en un assemblage de 50 à 100 espèces caséiques sous forme de micelles avec un diamètre moyen de 180 nm et de poids moléculaire avoisinant les 10^8 Da (Fox & Brodkorb. 2008). Les micelles sont des particules sphériques colloïdales composées de plusieurs unités sous-micellaires de 15 à 20 millimètres (nm) de diamètre, stable selon un potentiel Zêta de -20mV (Fox & Brodkorb. 2008). En plus de la présence des CN (94%), les micelles renferment du phosphate de calcium (Ca) et du citrate de magnésium (Mg) à 6 % (Fox *et al.* 2015). Les autres caractéristiques de la micelle de caséines sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2: Caractéristiques de la micelle de caséine (adapté de, McMahon et Brown 1984, Fox, P.F. et Brodkorb, A. (2008))

Caractéristique	Valeur moyenne
Diamètre	120 nm (50-500 nm)
Surface	$8.0 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2$
Volume	$2.1 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^3$
Masse	$2.2 \cdot 10^{-10} \text{ g}$
Densité (hydratée)	1.0632 g/cm^3
Teneur en eau (hydratée)	63%
Hydratation	$3.7 \text{ g H}_2\text{O/g}^{-1} \text{ protéine}$
Voluminosité	$4.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}$
Potentiel Zeta (25°C)	$-18.7 \pm 0.3 \text{ mV}$
Nombre de chaînes peptidiques	$5 \cdot 10^3$
Nombre de particules par ml de lait	$10^{14} - 10^{16}$
Surface des micelles par ml de lait	$5 \cdot 10^4 \text{ cm}^3$

La micelle de CN fait l'objet de nombreuses études et les modèles qui permettent de la présenter font tous mention de la présence du Ca^{2+} et du phosphate inorganique comme éléments centraux assurant l'intégrité de la micelle et la présence de la κ -CN en surface de la micelle. Le calcium est souvent associé au phosphore pour former le phosphate de calcium colloïdal en association avec les CN. Les autres ions monovalents (K, Na, Cl) ainsi qu'une partie des ions Ca, Mg, citrate et phosphate sont dans la phase aqueuse et permet de faire l'équilibre avec la micelle.

Le retrait du Ca^{2+} colloïdal de la micelle cause une déstabilisation de celle-ci en des particules de masse moléculaire avoisinant les 10^6 Da (Thompson *et al.* 2014). Les différents modèles traitant les micelles ont été sujets à de nombreuses discussions. Ainsi, plusieurs modèles ont été développés au fil des avancées scientifiques sur la structure des micelles de CN.

a) *Le modèle « core-coat »*

Selon ce modèle, basé sur un complexe caséinique (α , β) au cœur de la molécule, la micelle ne précipite pas en présence du calcium mais forme de préférence une monocouche stabilisée par la caséine κ . Le modèle de Schmidt revue par Walstra en 1999 est une des variantes de ce modèle qui fait mention des interactions hydrophobes engendrées par les sous-unités sub-micellaires tandis que le modèle de Holt présente une structure micellaire dont l'intégrité est assurée par les interactions entre les caséines et le phosphate de calcium.

b) *Le modèle de Schmidt revu par Walstra et al. (1999).*

Dans le modèle de Schmidt 1980, revue par Walstra *et al.* (1999) ; il est indiqué que les unités sous-micellaires sont les éléments constitutifs des micelles et sont différentes les unes des autres. Au cœur ou au centre de la micelle il y a la présence des α_{S1} -CN, α_{S2} -CN et β -CN qui lui confère un caractère hydrophobe dont la responsabilité revient à la présence de fragments apolaires de CN. En périphérie de la micelle il y a la présence principalement de la κ -CN de nature hydrophile entourée de certains fragments issus de CN provenant du cœur de la molécule lui conférant sa stabilité.

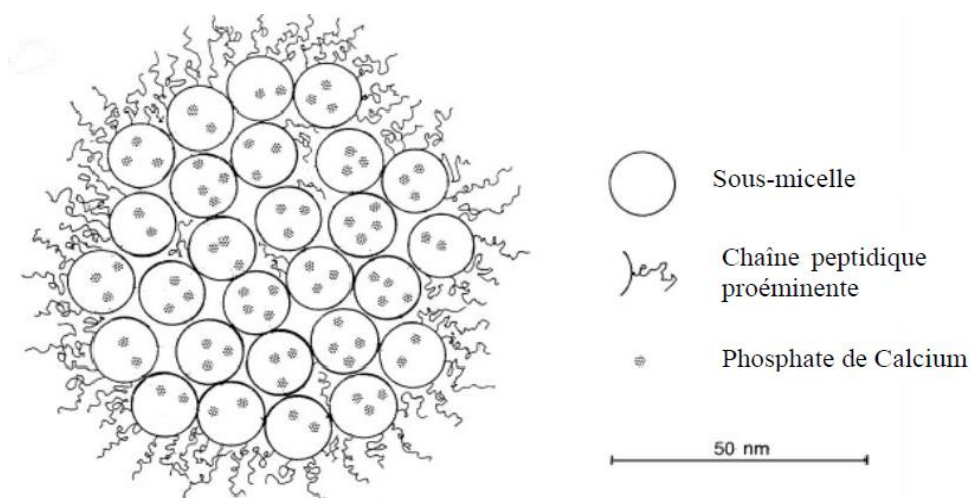


Figure 1: Modèle micellaire proposé par Walstra et al. 1999

Ce modèle présente une certaine limite par le fait que certaines des sous-unités comprennent des κ -CN tandis que les autres non. Le phosphate et le calcium jouent un rôle dans la phosphorylation avant la formation de la micelle tandis que le phosphate de calcium fait son entrée tardive dans la micelle. Ce point est discutable et c'est pour cela que d'autres modèles ont été développés en incluant le phosphate de calcium précocement dans l'association des micelles.

c) *Le modèle de nano-cluster de Holt*

Pour Holt, le phosphate de calcium forme des nanoclusters qui interagissent avec les molécules de phosphosérines. C'est au niveau des sites de liaisons, que les échanges entre le calcium et les phosphosérines se réalisent puis se regroupent avec les chaînes peptidiques pour former des *clusters* (Holt. 1992 ; 2004). Il s'en suit des interactions hydrophobes et électrostatiques par le fait que certaines caséines ne sont pas totalement liées aux *nanoclusters* (Horne. 2006).

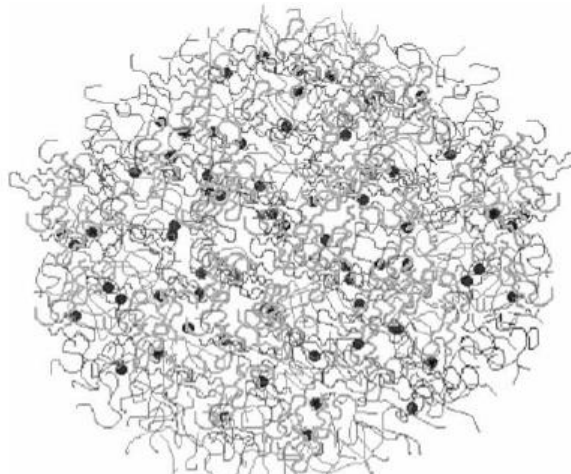


Figure 2 : Modèle micellaire proposé par Holt (1992)

En surface, la κ -CN restreint l'association des caséines et permet ainsi de stabiliser la micelle en une structure tridimensionnelle (Dalglish *et al.* 1988; Fox *et al.* 2015). Ce modèle tient compte des CN qui ne sont pas liées aux *nanoclusters* mais plutôt par des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes et électrostatiques. Dans le lait, les charges négatives présentes à la surface de la micelle engendrent des répulsions électrostatiques empêchant l'association des micelles entre-elles. Les micelles sont hydrophiles, possèdent un pouvoir d'hydratation élevé et peuvent fixer 4g d'eau/g de protéine (Dalglish et Corredig. 2012).

1.2. Les protéines sériques

Les protéines du lactosérum représentent la fraction soluble du lait après l'atteinte du point isoélectrique des CN (pH 4,6) à la suite de l'ajout de présure pour la formation du caillé fromager. Ces protéines sont de nature globulaire et existent en proportions variables. Les sections suivantes traiteront plus spécifiquement des caractéristiques structurales et physico-chimiques des protéines sériques.

1.2.1. La bêta-lactoglobuline

1.2.1.1. Propriétés structurales et physico-chimiques

La β -LG est une protéine de la famille des lipocalines dérivant de la superfamille des calycines, c'est-à-dire les protéines qui sont capables de se lier aux acides gras et de transporter des molécules hydrophobes (Cayot & Lorient. 1998). Elle représente 50% des protéines du lactosérum et 12% des protéines totales du lait soit (Jouan. 2002). Chez les ruminants et les monogastriques, elle est synthétisée par les cellules épithéliales des glandes mammaires. Elle est absente dans le lait humain et celui des rongeurs. De poids moléculaire de 18,4 kDa, elle est présente sous forme dimérique (36,8 kDa) dans le lait pour des valeurs de pH se situant entre 5,1 et 7,5 (Chatterton *et al.* 2006).

La β -LG, composée de 162 acides aminés (Fox *et al.* 2015), présente dans sa structure tertiaire deux ponts disulfures formés à partir de quatre cystéines (Jayat *et al.* 2004). De plus, un résidu cystéique libre est situé au cœur de la molécule permettant des liaisons SH/S-S inter et intramoléculaire (Considine *et al.* 2007). Il existe 10 variants génétiques connus dont

les principaux sont les variants A et B (Jouan. 2010). Ces 2 variants diffèrent seulement par deux acides aminés *Asp-64-Gly* et *Val-119-Ala* respectivement et par la position de la cystéine libre qui peut être située en position 106, 119 ou 121.

La structure secondaire de la β -LG est constituée de 10% d'hélice- α contenant les brins B, C, D et A₁, 43% de feuillet- β antiparallèle contenant les brins D, E, F, G, H, I et A₂ et 47% de structure désordonnée (Fox *et al.* 2015). La structure quaternaire de la β -LG varie parmi les monomères, dimères et oligomères en fonction du pH, la température, la force ionique. En effet, à pH neutre il n'y a pas de différence marquée entre les dimères et les monomères tandis que l'abaissement du pH à 3 permet une dissociation des dimères en monomères contenant un résidu S-H et 2 liaisons S-S formées entre la Cys-160 et la Cys-66, la Cys-119 et Cys-106 sans modification dans la disposition moléculaire en raison des forces de répulsions électrostatiques (Pérez-Gago & Krochta. 2002).

L'augmentation du pH à 8 augmente la réactivité de la β -LG à la suite de l'exposition des groupes carbonyles et S-H/S-S conduisant à la formation d'octamères. La température a un effet sur la conformation de la β -LG de manière irréversible après dépliement des dimères en monomères par exposition des groupes internes SH, hydrophobes et amines (Pérez-Gago & Krochta. 2002).

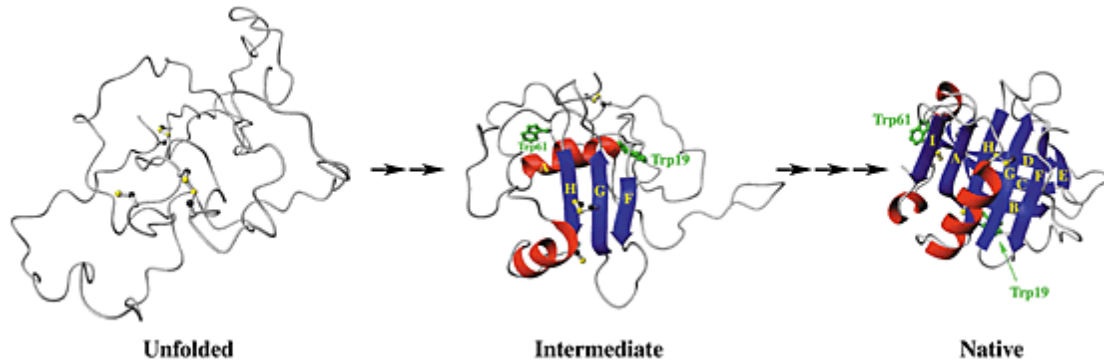


Figure 3 : Représentations chimique des états conformationnels lors du repliement de la β -LG selon 3 états : déplié, intermédiaire et natif (Heinrich Roder et al. 2001).

Dans la partie hydrophobe de la molécule, il y a la présence des acides aminés Leu (10, 46, 54, 58, 103), Ile (12, 56, 71,84) Val (15, 41, 43, 02, 94), Ala (73, 80), Met107 et Phe (82, 105) dont les chaînes latérales créent un emplacement favorisant la liaison de ligands (acides gras saturés/polyinsaturés et des molécules aromatiques) de natures hydrophobes repoussant ainsi vers l'extérieurs les molécules hydrophiles (Pérez-Gago & Krochta. 2002; Cayot et Lorient. 1998; Sawyer *et al.* 1998). De plus, elle permet de nombreux liens au niveau de ces 3 sites de liaisons : le premier site au niveau du calice de la poche hydrophobe comme c'est le cas de sa liaison *in vitro* avec le rétinol (Chatterton *et al.* 2006); le deuxième site au niveau des résidus Trp19, Trp20, Trp42, Glu44, Gln59, Gln68, Leu156, Glu157, Glu158 et His161; le troisième site de liaison fait intervenir les résidus Tyr102, Leu104 et Asp129 (Edwards *et al.* 2014).

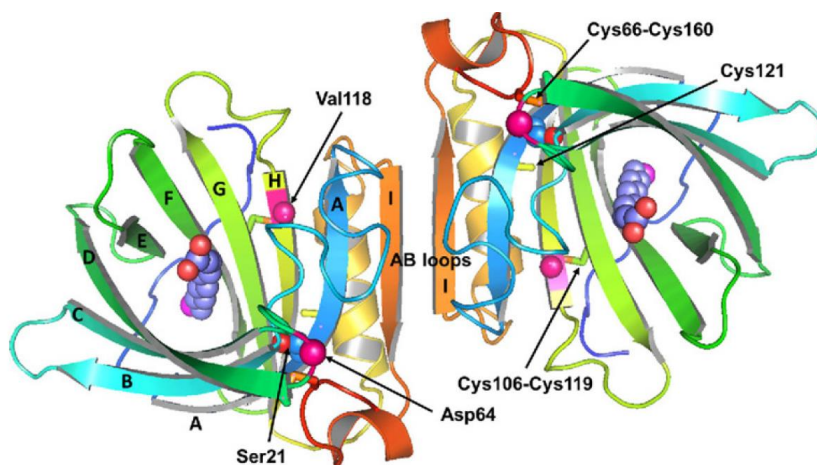


Figure 4: Structure de la bêta-lactoglobuline présentant les emplacements des sites de liaisons entre les variantes A et B. (Delano. 2002)

Sur le plan fonctionnel, elle présente des propriétés intéressantes qui sont utilisées dans l'élaboration de nombreux produits alimentaires. C'est le cas de ses capacités moussantes et émulsifiantes qui peuvent être considérées comme une alternative à l'œuf dans la fabrication des produits fouettés (Chatterton *et al.* 2006).

L'hydrolyse enzymatique de la β -LG permet la génération de nombreux peptides bioactifs composés de 3 à 20 résidus d'acides aminés ayant des propriétés opioïdes par la présence du β -lactomorphine inhibiteur de conversion de l'angiotensine I (Mullaly *et al.* 1997). D'autres peptides bioactifs de la β -LG participent à la régulation de la pression sanguine, à l'inhibition de la croissance des souches d'*Escherichia coli* CP 812 et HB01, de *Bacillus* et *Staphylococcus aureus* et l'HIV-1 dans les infections virales humaines (Vermeissen *et al.* 2002 ; Chatterdon *et al.* 2006).

1.2.2. L'*alpha*-lactalbumine

L' α -LAC est une métalloprotéine constituée de 123 acides aminés qui possède un poids moléculaire de 14,2 kDa et un point isoélectrique compris d'environ 4,2. Elle est la deuxième des protéines du lactosérum dans le lait bovin en termes de concentration soit 1,20 g/L de lait et représente la composante majeure du lait humain (Fox *et al.* 1998). Sa structure présente une homologie avec celle du lysozyme du blanc d'œuf et du lysozyme de l'humain à hauteur de 40% (Brew *et al.* 1970). De plus, il y a au sein de la molécule, 26% d'acides aminés formant quatre hélices α , 14% de sa structure forme un feuillet de type β avec la présence de huit résidus de cystéines formant quatre ponts disulfures (Katsutoshi *et al.* 1989 ; Permyakov *et al.* 2013). Il faut aussi noter la richesse en tryptophane (6% d'acides aminés), en lysine (11% d'acides aminés) et en cystéine (6% d'acides aminés) qui sont facilement hydrolysables par les enzymes digestives (Soenen *et al.* 2011).

En microscopie électronique, l' α -LAC existe sous la forme de 2 variantes Holo- (Ca^{++} liée à la molécule) et Apo- (Ca^{++} non liée à la molécule). Cette présence de sites de liaison du Ca^{++} et du Zn^{++} assure la stabilité de la structure de la protéine (Jouan. 2010). Toutefois, par rapport au Ca^{++} la structure de l' α -LAC n'est pas dépendante du Zn^{++} et des autres ions monovalents qui se retrouve dans la protéine. Il est intéressant de mentionner qu'elle présente un aspect sphérique et plié à l'état natif. (Walstra *et al.* 1999).

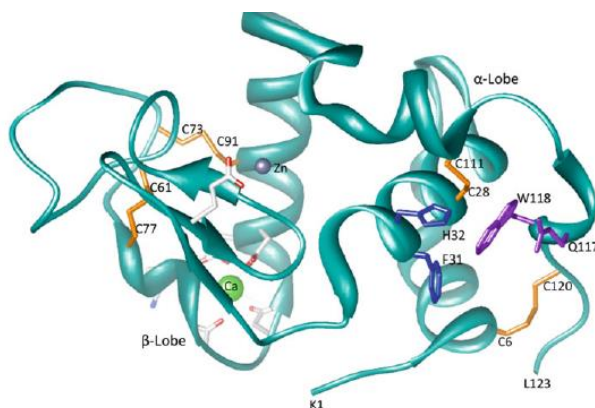


Figure 5 : Structure de l'α-LAC avec les sites de liaisons du Ca²⁺ et du Zn²⁺ (Fox & McSweeney. 1998).

La protéine est capable de se lier avec d'autres molécules à partir de son site de liaison du Ca²⁺ (Permyakov et Berliner. 2000). Il a été démontré qu'elle possède le pouvoir d'inhiber la croissance de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses par apoptoses (Permyakov et Berliner. 2000). De plus, lorsqu'associée avec l'acide oléique, cette protéine laitière permet la destruction de certaines cellules cancéreuses par le mécanisme désigné sous le nom de *HAMLET/BAMLET* (*human/bovine alpha-lactalbumin made lethal to tumour cells*), ((Permyakov et Berliner. 2000; Brew. 2003; Fast *et al.* 2005; Fox *et al.* 2015). Finalement, son hydrolyse enzymatique génère des peptides bioactifs spécifiques ayant démontré des propriétés antihypertensives de par l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Brew. 2013).

1.2.3. Les protéines mineures du lactosérum

1.2.3.1. L'albumine de sérum bovin

L'albumine de sérum bovin (ASB) est une protéine globulaire abondante dans le système circulatoire des bovins mais présente en très faible quantité dans le lait soit entre 0,1-0,4 g/L (Fox., 2003). Elle est composée de 583 acides aminés pour un poids moléculaire

de 66,43 kDa avec la présence dans sa structure de 17 ponts disulfures dont une cystéine impaire en position 34 (Fox., 2003; Jouan., 2010). Sa structure secondaire présente 68% d'hélices α divisés en trois régions distincts (I, II, III) elles même subdivisés en deux sous régions (A, B) et 18% de feuillets β tandis que sa structure tertiaire n'est pas bien connue (Fox *et al.* 2015).

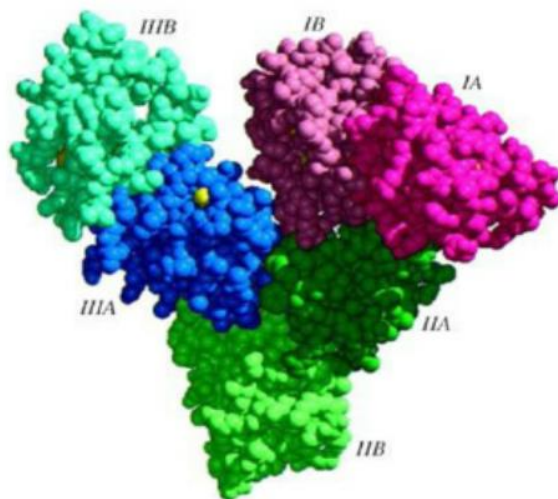


Figure 6: Structure de la BSA

1.2.3.2. Les immunoglobulines

La concentration des immunoglobulines (Igs) est comprise entre 0,6-1,0 g/L dans le lait et le colostrum. Présentes dans le lait de la plupart des mammifères, les Igs ont pour fonction biologique l'immunoprotection contre les agents pathogènes et les toxines. Il existe 5 classes d'Ig soit l'IgA, l'IgD, l'IgE, l'IgM et en dernier l'IgG qui est la plus dominante (Fox *et al.* 2015).

1.2.3.3. La lactoferrine

La lactoferrine est une protéine de transfert glycosylée formée de 689 acides aminés et de poids moléculaires 80 kDa (Magnen *et al.* 1989). Elle contient tous les acides aminés dont 34% d'acides aminés essentiels dans sa structure. Elle est formée de deux lobes dont un lobe acétyle nommé C et un lobe aminé nommé N divisés chacun en deux sous lobe (N₁/N₂ & C₁/C₂) reliés par des sites de fixation de fer et de bicarbonate agissant en synergie dans le transport des atomes ferriques dans le sang (Baldi *et al.* 2005).

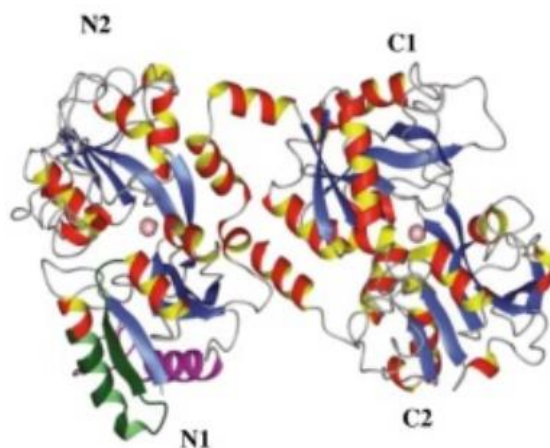


Figure 7: Structure de la lactoferrine avec ses lobes et sous lobes (Tiré de Vogel. 2012)

Comme mentionné précédemment, divers facteurs physico-chimiques affectent les structures des protéines laitières, leur état de dénaturation et leur potentiel d'agrégation. Les prochaines sections s'intéresseront particulièrement aux hautes pressions hydrostatiques (HPH), procédé d'importance dans ce projet de recherche.

2. Les hautes pressions hydrostatiques

Le procédé à hautes pressions hydrostatiques (HPH), également appelé pressurisation isostatique ou pascalisation, est une technologie de conservation des aliments (sous forme liquide ou solide) développée à la fin du 19^e siècle dont le principe consiste à soumettre les aliments à une pression variant de 50-1000 MPa en utilisant l'eau comme fluide de transmission de la pression (Figure8). La pression appliquée sert d'agent létal pour la réduction des microorganismes pathogènes et d'altération sans modifications majeures des propriétés nutritionnelles et organoleptiques de la matrice alimentaire pressurisée (Balasubramanian *et al.* 2016). Cette technologie présente un énorme potentiel pour l'industrie alimentaire car elle permet d'augmenter la durée de vie des aliments et leurs caractéristiques d'aliments frais (Considine *et al.* 2008).

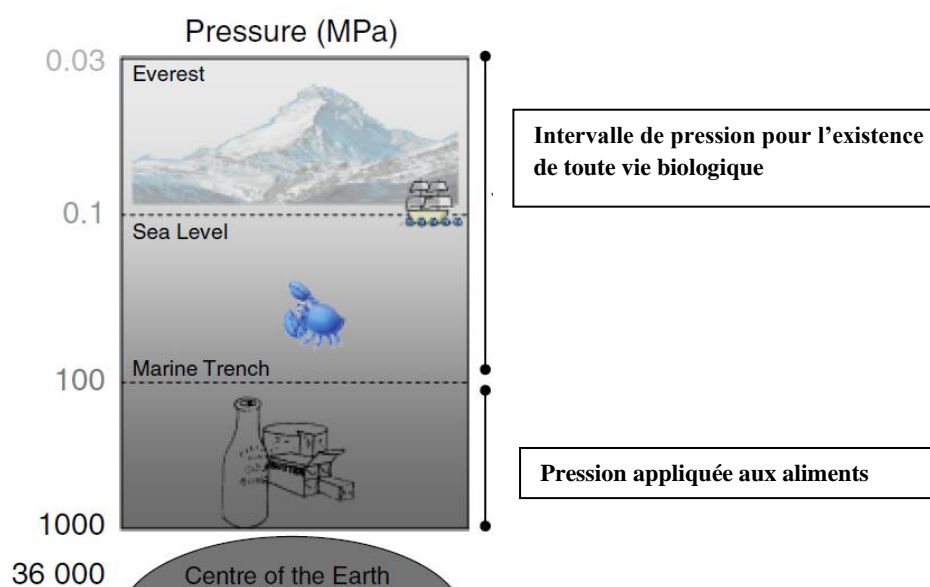


Figure 8: Représentation schématique de la pression appliquée en transformation des aliments (adaptée de Considine *et al.* 2007).

La pression est un paramètre physique qui, par définition, représente une force par unité de surface. Elle est régie par deux principes fondamentaux : le principe de le Chatelier sur l'équilibre des systèmes conformément avec la 2^e loi de la thermodynamique et le principe isostatique. Le principe de le Chatelier stipule que, en imposant une modification (pression température, force ionique, concentration) à un système en équilibre, le système évolue vers un état d'équilibre nouveau de sorte qu'il contrebalance la modification qui lui a été imposée (Cheftel. 1995). Le terme isostatique traduit l'état d'équilibre dans lequel un système existe sous l'effet d'une force ou de la pression. Dans le cas de l'eau, considérée comme fluide standard lors des transmissions de la pression dans les systèmes à hautes pressions, le principe s'explique par le fait que la force agissante sur le fluide est transportée de manière uniforme dans le produit quel que soit sa géométrie et le fluide en l'occurrence l'eau a la capacité de transmission de cette force vers le produit (Yuste *et al.* 2001).

2.1. Intérêt pour le procédé à hautes pressions hydrostatiques

L'application des HPH pour la préservation des aliments est considérée comme une stratégie de conservation novatrice depuis le 18^e lors de l'utilisation de la chaleur pour préserver les aliments dans des bouteilles en verres scellées par Nicolas Appert (Balasubramanian *et al.* 2016). Les HPH présentent l'intérêt d'éviter les traitements thermiques pour les produits sensibles à la chaleur et est perçu comme éco-efficace en raison de l'efficacité énergétique lors du procédé (Balasubramanian *et al.* 2016). Un nombre important de travaux ont montré que les HPH engendrent une dénaturation des protéines alimentaires et la création d'agrégats protéiques spécifiques présentant diverses propriétés physico-chimiques (Huppertz et De Kruif. 2006).

Les HPH sont appliquées à l'échelle commerciale pour inhiber la croissance des microorganismes pathogènes et d'altération afin d'augmenter la durée de conservation des aliments, l'extraction des biomolécules végétales et l'amélioration de l'hydrolyse enzymatique (Balasubramanian *et al.* 2016). L'efficacité du procédé est cependant dépendante de la composition physico-chimique et de l'activité de l'eau des aliments et de la température du fluide de pressurisation (Balasubramanian *et al.* 2016). De plus, les HPH peuvent engendrer une dénaturation des composés biochimiques et des enzymes liées à la membrane cellulaire des microorganismes occasionnant ainsi une déstructuration du matériel génétique (Balasubramanian *et al.* 2016).

Au courant du 19^e siècle de nombreuses recherches ont été réalisées sur les matrices alimentaires. Par exemple, les HPH ont été appliquées sur les fruits, la viande, les jus et les sauces (Chawla *et al.* 2011; Tonello. 1998). Dans tous les travaux, il a été démontré que les HPH permettent d'inhiber les microorganismes tout en préservant globalement la qualité des aliments (Hite. 1899 ; Tonello. 1998). Par ailleurs, l'utilisation des HPH dans l'industrie alimentaire, à l'échelle commerciale, date de 1980 au Japon à partir des travaux du professeur Rikimaru Hayashi sur le potentiel de pasteurisation des HPH sur des produits acides, y compris le yaourt et la confiture de fraises. Dans la moitié du 20^e siècle, le système haute pression n'a pu être compatible dans une usine de transformation lors de la conception, l'opérationnalisation et le coût d'exploitation ne pouvait pas avoir une application à grande échelle. De plus, les aliments complexes tels que les viandes, les fruits et légumes présentaient un problème du point de vue de la forme et de la texture (Chawla *et al.* 2011). Par la suite, les recherches se sont tournées davantage sur l'effet des HPH sur les protéines alimentaires. Les travaux sur la structure des protéines ont été entrepris au début du 20^e siècle.

Il a par exemple été montré que les HPH engendraient la coagulation de l'albumine de l'œuf (Tonello., 1998 et Royer., 2002).

2.1.1. Avantages du procédé

Les HPH permettent d'augmenter la durée de vie des aliments, les produits traités ayant globalement une durée de conservation égale ou supérieure comparativement aux aliments traités thermiquement. Lors du processus, il n'y a pas d'utilisation de solvants chimiques, la consommation énergétique est faible ainsi que l'utilisation des ressources naturelles (Considine *et al.* 2007; Balasubramanian *et al.* 2016). De plus la conservation des composantes nutritionnelles et organoleptiques est maximisée par rapport aux traitements thermiques (Chawla *et al.* 2011). Les HPH peuvent être appliquées sur une large gamme d'aliments et ce, de manière indépendante de la masse et de la forme de l'aliment (Tonello. 1998).

2.1.2. Inconvénients du procédé

Les HPH ne peuvent pas être appliquées à tous les types d'aliments (Considine *et al.* 2007). Son usage n'est pas conseillé pour les aliments à faible teneur en eau, ceux de faible densité comme le poivre ou la farine et certains produits animaux frais du fait de changements de couleur (conversion de l'oxymyoglobine en metmyoglobine par oxydation de l'hème conduisant à une modification) (Tonello. 1998; Jung *et al.* 2003; Considine *et al.* 2007). Au niveau microbiologique, les HPH ne permettent pas, aux pressions commerciales utilisées (maximum 600 MPa) une destruction des spores bactériennes. Ainsi, un produit alimentaire pressurisé doit être réfrigéré afin de limiter la germination des spores. Toutefois, un couplage de la pression et de la température permet de diminuer considérablement le nombre de spores

bactériennes (Patterson. 1998). Finalement, les systèmes à hautes pression d'échelle commerciale demandent un investissement important en termes de capital et de ressources humaines car ce sont des procédés en batch.

2.2. Effet des HPH sur les protéines -Généralités

Les acides aminés formant la structure des protéines sont liés par différentes liaisons, soient les liaisons peptidiques, disulfures hydrogènes, hydrophobes, électrostatiques, de Van der Waals. Les HPH agissent sur certaines de ces liaisons et engendrent des modifications structurales plus ou moins drastiques selon le type de molécules à l'étude et les paramètres de pressurisation appliqués. Ces changements au niveau de la structure des protéines engendreront des modifications de taille et de fonctionnalité de ces dernières (Lopez-Fernandino. 2006). Cependant, les liaisons covalentes, les ponts disulfures permettant la stabilisation de la structure tertiaire et quaternaire des protéines sont rarement affectés par les HPH (Balasubramanian *et al.* 2016).

Les liaisons hydrophobes sont les plus sensibles aux HPH et jouent un rôle important dans la stabilisation de la structure tertiaire des protéines. Elles subissent une déstabilisation à la pression ce qui engendre une dissociation des unités sous micellaires, l'exposition de certains acides aminés et le dépliement des protéines (Rivalain *et al.* 2010). La pression peut favoriser la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires à cause du phénomène d'hydratation des protéines (Hendryxx *et al.* 1998). Toutefois, les groupements polaires chargés négativement permettent de déstabiliser les liens électrostatiques causant une polarisation de la structure. Cette polarisation créée par l'effet de la pression permet aussi de stabiliser les forces de Van der Waals par l'augmentation des interactions protéine-eau, la

réduction de volume de la protéine qui se traduit par la suite à une augmentation de l'énergie de liaison (Sarma et Paul. 2012). L'application des HPH peut également causer le passage de la molécule d'eau du milieu environnant vers l'intérieur de la protéine et ainsi engendrer sa dénaturation et l'exposition de ces groupements en surface de la protéine (Patazca *et al.* 2007).

2.3. Impact des HPH sur les protéines laitières

2.3.1. Impact des HPH sur les micelles de caséine

Les caséines existent dans le lait sous forme de micelles dont la structure et la stabilité sont fortement maintenue par les équilibres minéraux dans le lait, les interactions des groupes phosphosérines et les ponts phosphocalciques. De plus, leurs structures sont renforcées par des interactions entre les caséines elles-mêmes majoritairement par des liaisons faibles (De Kruif et Holt. 2003). Les HPH, tout dépendamment les paramètres de pressurisation appliqués (pression et durée du traitement), induisent une modification de la structure de la micelle. Sur le plan visuel, le lait change de couleur à cause de la diminution de sa capacité à diffuser la lumière (Huppertz *et al.* 2006). Plus spécifiquement, entre 100 et 200 MPa, les HPH n'induisent pas de modifications majeures aux caséines. À des pressions supérieures (≥ 300 MPa), les HPH induisent une modification de la taille des caséines. Lorsque la pression est égale ou supérieure à 400 MPa, une réduction irréversible de plus de 50% de la taille de la micelle est observée comparativement à la taille d'une micelle non traitée (Lopez-Fernandino. 2006). Ces effets sont présentés à la Figure 9.

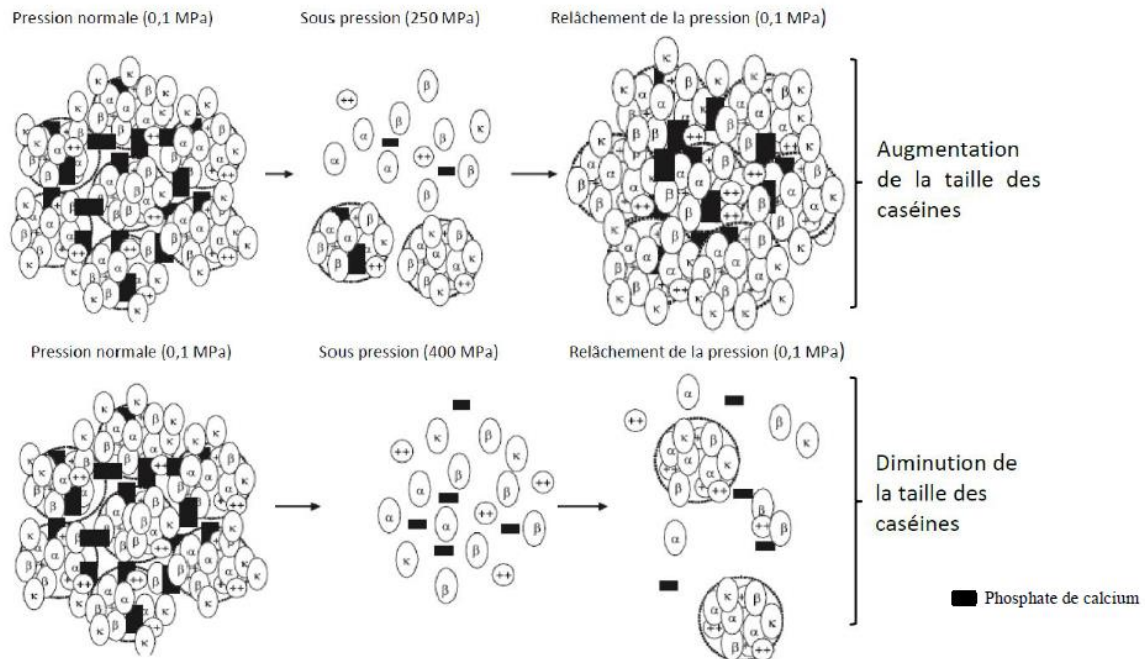


Figure 9: Représentation de l'effet potentiel des HPH sur les micelles de caséines (Kulozik *et al.* 2006)

Une augmentation ou une diminution de la température, du pH ou de l'ajout du chlorure de calcium (CaCl_2) peuvent diminuer ou augmenter l'effet des HPH sur les modifications de structures micellaires (Huppertz et De Kruif. 2007). Cependant, il est à noter que lors de la décompression, il y a stabilisation de la micelle par le bris des ponts phosphocalciques et la formation de sous-micelles liées par des liaisons hydrophobes.

Cette déstabilisation de la micelle de caséine s'explique premièrement par la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal (CCP) engendrant par la suite une dissociation micellaire (Huppertz *et al.* 2006 ; Griffiths., 2010). Selon le temps et le niveau de pression appliqués, la déstabilisation complète de la micelle peut être atteinte à un maximum compris entre 400 à 800 MPa. Impact des HPH sur les protéines majeures du lactosérum

La dénaturation des protéines du lactosérum sous HPH est un phénomène complexe qui dépend de plusieurs paramètres : la pression, la température, la force ionique et la concentration protéique. À faible concentration (0,05-0,2%) la dénaturation des protéines du lactosérum est partielle ou complètement réversible tandis qu'à forte concentration les interactions entre les protéines sériques sont favorisées avec les caséines ainsi que des agrégations irréversibles dans le lait (Patel *et al.* 2006).

2.5.1. Impact sur la β -lactoglobuline

La β -LG est la protéine du lactosérum la plus sensible aux HPH. Sous sa forme monomérique, elle commence à subir une dénaturation partielle à partir de 50 MPa pour être dépliée à des pressions supérieures à 100 MPa (Huppertz *et al.* 2006; Lopez-Fandino. 2006; Considine *et al.* 2007). Toutefois, la partie hydrophobe de la protéine est exposée ce qui la rend disponible pour certains échanges. À partir de 400 MPa, la β -LG s'agrège et forme des oligomères de β -LG par échanges de liens SH/S-S (Belloque *et al.* 2000, Considine *et al.* 2007).

2.5.2. Impact sur l' α -lactalbumine

Comparativement à la β -LG, et comme mentionné précédemment, l' α -LAC présente une meilleure stabilité face aux HPH. À partir de 200 MPa, elle passe de l'état de *molten globule* (un état stable de la protéine partiellement repliée) à l'état dépliée mais perd progressivement sa solubilité au fur et à mesure que la pression augmente (Bravo et al., 2015). Sa dénaturation débute à une valeur de pression proche de 400 MPa et continue jusqu'à atteindre près de 70% lorsque la pression atteint de 900 MPa (Huppertz *et al.*, 2006; Lopez-Fandino. 2006; Considine *et al.* 2007; Bravo et al. 2015).

2.5.3. Impact sur les protéines mineures du lactosérum

L'impact des HPH sur les Igs, l'ASB et la Lf n'a pas été approfondi mais les recherches qui ont été effectuée par certains auteurs démontrent que l'ASB présente une certaine résistance à la pression comparée aux autres protéines du fait de sa rigidité (nombre important de ponts disulfures (Kubow *et al.* 2002). La classe des Igs a été la plus étudiée du fait de ses intérêts dans les domaines pharmaceutique et médical. Elles sont stables à des pressions inférieures à 500 MPa pendant 5 min (Indyk *et al.* 2008). Néanmoins, la Lf et les Ig ont démontrés être drastiquement dénaturées à des pressions de 700 MPa, cette dénaturation augmentant proportionnellement avec l'augmentation de la température (Bravo *et al.* 2015).

2.6. Interactions des protéines laitières engendrées par les HPH

Les effets des HPH sur les protéines laitières ont été largement étudiés. Sous HPH, les protéines laitières forment des agrégats de tailles et de compositions différentes. He *et al.* (2011) ont décrit le mécanisme d'interaction des protéines sous HPH par le dépliement de la β -LG sous l'effet de l'entrée de l'eau dans la molécule. Par la suite, des échanges par ponts disulfures sont favorisées et des interactions entre CN-CN, CN- β -LG, CN- β -LG/- α -LAC sont créés (Huppertz *et al.* Fox *et al.* Lopez-Fandiño *et al.* 2006 ; Balasubramanian *et al.* Dans le lait écrémé traité à 600 MPa, la majorité de la β -LG dénaturée se retrouve principalement associées avec les micelles de caséines et moindrement entre elles (Huppert *et al.* 2004). Les feuilletts β_1 et β_2 sont associées avec la CN- κ par les ponts disulfures (Patel *et al.* 2006) et la réactivité du groupement S-H₁₂₁ augmente (Patel & Huppertz. 2014).

La présence des protéines du lactosérum n'influence aucunement la déstabilisation micellaire sous pression (Huppertz et De Kruif. 2007). Toutefois, à des pressions proches de 800 MPa, la majorité de la β -LG s'associe sous forme de larges agrégats avec des CN (β et k) (Patel *et al.* 2006). Néanmoins, l' α -LAC est dénaturée à des proportions moindres que la β -LG. Cette résistance est expliquée par la présence de 4 ponts disulfures au sein de sa structure lui conférant une grande stabilité β -LG et l'absence de groupements thiols libres (Lopez-Fernandiho. 2006). En termes d'association avec les CN, la présence d'agrégats entre les CN et l' α -LAC n'a pas été observée.

2.6.1. Interaction β -LG- α -LAC

La barorésistance de l' α -LAC ne permet pas de trouver en grande quantité une association β -LG/ α -LAC dans le lait sous HPH (Mazri *et al.* 2011). La différence de pression pour la dénaturation de ces deux protéines va jouer un rôle important sur leurs capacités à s'associer. Les pressions qui peuvent dénaturer la β -LG sont dans le même ordre de grandeur des pressions qui déstabilisent les CN. (Considine *et al.* 2007). Par conséquent, les HPH vont favoriser l'agrégation entre les CN et la β -LG. Toutefois, des études réalisées à partir d'une solution modèle de β -LG et d' α -LAC ont permis de mettre en évidence la formation d'agrégats de types hétérogènes. Cependant, dans le cas du lait, les études n'ont pas observé de nombreux agrégats de type β -LG/ α -LAC (Patel *et al.* 2006).

2.6.2. Interaction CN- β -LG

À la suite d'un traitement du lait par HPH, la majorité des protéines sériques dénaturées sont liées avec les CN (Huppertz *et al.* 2004). Il a été reporté que les ponts

disulfures et les interactions de nature hydrophobes favorisent les interactions entre la β -LG et les CN (Corredig & Dalgleish, 1999). Selon les propriétés physicochimiques des CN, deux types d'agrégats peuvent être observés sous HPH. Premièrement, des agrégats formés par les κ -CN, α s2-CN, β -CN et une grande partie de β -LG principalement liées par les liaisons disulfures et des agrégats formés par la α s1-CN, α s2-CN, β -CN et une petite quantité de β -LG lié par les interactions hydrophobes (Marciniack *et al.* 2018). L'association de la β -LG avec les CN augmente avec le pH, l'augmentation de la pression et du temps de pressurisation permet d'augmenter le niveau d'association entre les CN et la β -LG. (Huppertz *et al.* 2004). Un abaissement du pH après pressurisation permet la complexion de la β -LG avec les caséines pour former des agrégats solubles dans le sérum (He *et al.* 2011). Il peut en résulter une perte de β -LG dans le sérum à cause de son auto-agrégation en tant qu'agrégats non solubles et à son interaction avec les CN (Patel *et al.* 2006; Huppertz *et al.* 2004; Marciniack *et al.* 2018)

Par conséquent, l'application des HPH sur les protéines laitières permet la modulation des interactions protéiques et la formation d'agrégats de composition spécifique. De plus, cette formation d'agrégats est susceptible de générer un gradient de taille au sein de la matrice laitière, propriété pouvant être exploitée comme pré-traitement avant l'application d'un procédé de fractionnement tel que les procédés baromembranaires.

3. Les procédés membranaires

3.1. Généralités

L'utilisation des procédés membranaires remonte au 18^e siècle selon le résultat des travaux de l'Abbé Nolet sur le passage de l'eau à travers le diaphragme de porcins (Baker. 2012). Ces travaux décrivaient mieux le phénomène d'osmose jusqu'à la découverte en 1920 des premières membranes. Depuis, les systèmes membranaires jouent un rôle majeur dans la purification et le fractionnement de composés biotechnologiques. Durant les 30 dernières années, de nouvelles membranes et systèmes membranaires ont été développées afin de respecter les exigences de l'industrie biotechnologique (Reiss & Zydney. 2007).

Les procédés membranaires sont largement utilisés pour la séparation de constituants alimentaires, en particulier les protéines. Quatre procédés de séparation par membrane, qui diffèrent par le seuil de coupure de la membrane et les pressions appliquées existent, soient la microfiltration (MF), l'UF, la nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (OI) (Figure 10) (Baker. 2012). Dans la section suivante, seule l'UF sera approfondie en lien avec les objectifs du projet de recherche visant spécifiquement ce procédé.

Microfiltration (MF) Bacteria, suspended solids	>0.1 μm	1–3 bar
Ultrafiltration (UF) Colloids, macromolecules, viruses	0.1 μm to 2 nm	3–10 bar
Nanofiltration (NF) Sugars, divalent salts	<2 nm	10–40 bar
Reverse osmosis (RO) Monovalent salts	dense	>osmotic pressure
Water		

Figure 10: Les différents procédés de filtration baromembranaires (tirée de Koros *et al.* (1996), IUPAC).

3.2. Le procédé d’ultrafiltration

L’UF est largement utilisée en industrie laitière lors des processus de concentration et de fractionnement des protéines dans le but d’obtenir des ingrédients à forte valeur ajoutée. La pression appliquée lors des procédés d’UF varie de 3 à 7 bars et le principe de séparation se base principalement sur le seuil de coupure (variant de 1 à 800 kDa), sur la charge des protéines et leurs affinités pour la membrane (Marcelo & Rizvi. 2009). Actuellement, l’UF est utilisée pour la standardisation du lait de fromagerie, la pré-concentration du lait de fromagerie (Lawrence *et al.* 2008; Baldasso *et al.* 2011) et pour la concentration des protéines sériques.

3.3. Les paramètres de filtration

Dans le but d’optimiser le procédé de séparation par UF, il est important de déterminer les facteurs ayant une incidence sur les divers constituants des matrices alimentaires lors des processus de filtration. L’efficacité économique et énergétique dépend en grande partie du dimensionnement du système, du contrôle des paramètres opératoires et du matériau

membranaire. Dans les paragraphes suivants, les paramètres de filtration à contrôler lors d'un traitement par filtration membranaire seront détaillés.

3.3.1. Paramètres liés aux systèmes de filtration baromembranaires

3.3.1.1. Les modes opératoires

Un système de filtration peut être opéré selon deux modes : le mode frontal (*dead-end*) et le mode tangentiel (*cross-flow*) (Figure 11). La filtration en mode frontal est réalisée par un écoulement perpendiculaire du liquide à filtrer sur la surface de la membrane via une pression constante. Elle est peu utilisée car elle engendre un colmatage rapide de la membrane, occasionnant ainsi une baisse conséquente du flux de perméation. Actuellement, la filtration tangentielle est très largement utilisée. Le liquide à filtrer est en écoulement laminaire parallèle à la surface de la membrane (Jeantet *et al.* 2007; Koen & Thien. 2011). L'avantage majeur est un colmatage beaucoup moins important en surface de la membrane.

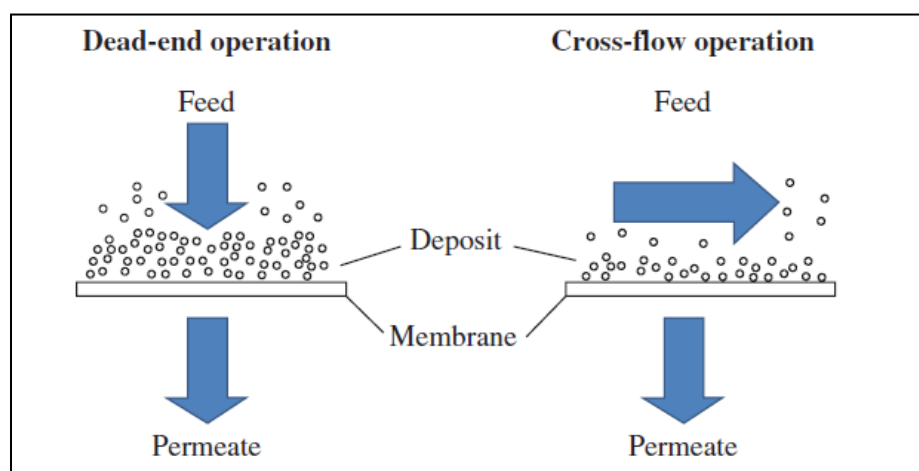


Figure 11: Illustration de la filtration frontale (A)/ (Dead-end) et la filtration tangentielle (B)/ (cross flow) tirée de A. Y. Tamime. 2013).

3.3.1.2. *Nature des matériaux membranaires*

a) *Propriétés physico-chimiques*

Les matériaux membranaires représentent un critère de choix à considérer avant de débiter une filtration d'un fluide alimentaire. L'hydrophobicité et l'hydrophilicité sont responsables de la polarité des membranes ce qui détermine la perméabilité et la mouillabilité. Généralement les membranes sont neutres or la majorité des protéines sont hydrophobes ou amphiphiles ce qui fait que leur adsorption aux matériaux de nature hydrophobes est favorisée (Bottino *et al.* 2000). Toutefois, il a été démontré que de nombreux aliments ont tendance à préférer les membranes hydrophiles (Zheng *et al.* 2008).

b) *Matériaux membranaires*

- *Nature des matériaux*

Les matériaux membranaires sont composés de polymères ou de céramiques. Les membranes polymériques sont constituées de matières organiques et sont en grande majorité hydrophobes. Au niveau industriel les membranes polymériques peuvent être à base d'acétate de cellulose (CA), de polyethersulfone (PES), de polyfluorure de vinylidene (PVDF), de polyacrylamide (PA) et de polypropylène (PP), (Baker. 2012).

Les membranes céramiques ou minérales sont produites à base de matériaux inorganiques et sont des composites présentant une certaine stabilité physico-chimique et une résistance mécanique plus importante. Leurs fabrications passent par une série d'oxydation de métaux comme le zirconium (Zr), l'aluminium (Al), l'oxyde de titane (Ti) ou elles sont totalement faites de carbone ou d'alumine. Elles peuvent être utilisées sous une large gamme de pH et sont plus tolérantes aux températures (>100°C) et aux agents puissants de nettoyage

(Koen & Thien. 2011). Leurs durées de vie sont de 2 à 10 ans comparativement à 1 an pour celles en polymères organiques. Cependant, les membranes en céramique sont beaucoup plus coûteuses que les membranes polymériques (Henning *et al.* 2006).

- *Porosité*

La porosité des membranes est un critère important lors de leurs conceptions. Une séparation des solutés par les membranes poreuses est faite en fonction de la taille moléculaire ou seuil de coupure qui est la masse molaire critique pour laquelle 90 % des solutés sont retenus par la membrane (Azarte. 2008). Les membranes denses quant à elles sont faites de film dense. Lors de la filtration, le transfert de perméat est dirigé par diffusion sous l'effet de la pression transmembranaire, la concentration du soluté et la différence de potentiel électrique (Baker. 2012). Donc, deux composés de tailles moléculaires similaires peuvent être séparés si leurs solubilités sont différentes (Koen & Thien. 2011).

- *Les membranes composites : structure*

Ce sont les membranes de type organique et anisotrope formées de deux couches de polymères différents. Chacune des couches peut être isotropique ou anisotropique avec des tailles de pores différentes. Ces types de membrane sont retrouvés dans les industries de traitement d'eau par osmose inverse (Reiss & Zydney. 2007; Kelly. 2011).

- *Les différents types de modules*

En fonction de la forme des membranes, il existe quatre grandes catégories : les membranes planes, les membranes tubulaires, à fibres creuses ou spiralées. Les différents modules sont caractérisés par leur surface filtrante, le coût de fabrication et leur consommation énergétique (Bacchin. 2004).

- *Les membranes planes*

Ce sont des membranes composées de plusieurs couches empilées et montées sur un cadre solide, flexible et identique à un échangeur de chaleur. Elles permettent un nettoyage facile mais présentent un débit élevé en début de filtration. Le colmatage rapide qui s'en suit permet une diminution drastique du débit pendant la filtration (Kelly. 2011).

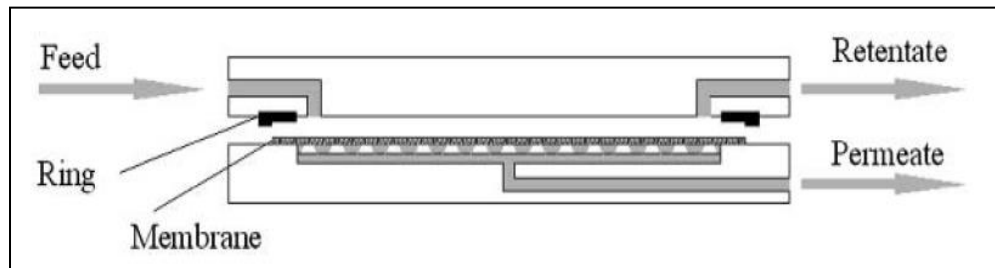


Figure 12: représentation schématique d'un module à membrane plane. Koen & Thien. 2011.

- *Les membranes tubulaires*

Ces membranes sont constituées d'un ensemble de tubes de diamètres intérieur comprises entre 4 à 25 mm dont le matériau peut être organique ou inorganique (céramique) (Baker *et al.* 2012). Lors de la filtration le perméat est recueilli à l'extérieur des tubes et sont peu portés au colmatage. Toutefois, elles présentent un coût de production élevé et sont plus efficaces en écoulement turbulent (Koen & Thien. 2011; Kelly. 2011).

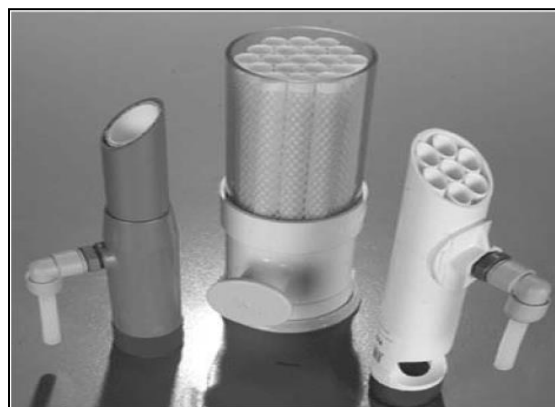


Figure 13: Module de membrane tubulaire. Image tirée Koen & Thien. 2011.

- *Les membranes à fibres creuses* : Elles sont constituées d'un ensemble de fibres creuses de diamètre inférieur à 1 mm. Elles sont très compactes, leur coût de production est moindre que celui des membranes tubulaires. (Voir figure 14).

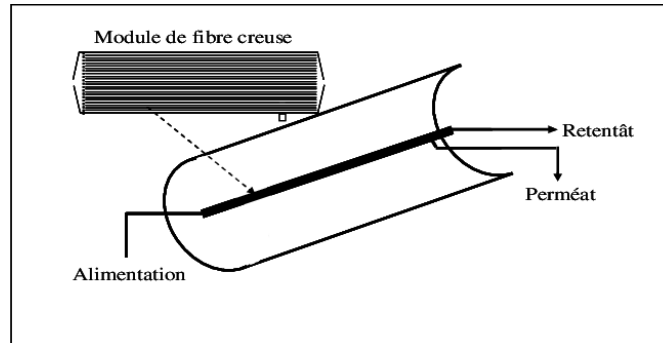


Figure 14: Module de membrane en fibres creuses. Récents progrès en génie des procédés, Numéro 98-2009, 2-910239-72-1, Ed. SFGP, Paris, France.

- *Les membranes spiralées*

Elles sont constituées de tubes perforés enroulés sous forme d'un cylindre compact. À l'intérieur du cylindre il y a un espaceur qui facilitera le passage du perméat. Ces membranes présentent un coût de production faible et permet un allègement de la consommation énergétique en fonction pour un système bien dimensionné (Cheryan. 1994).

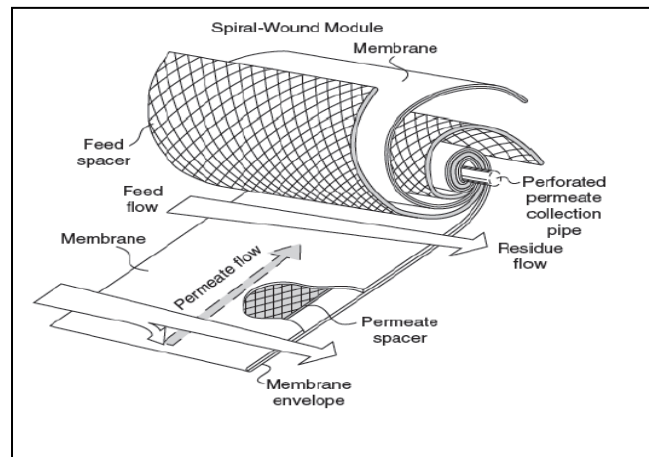


Figure15: Schéma d'une membrane spiralée. Tirée de Baker. 2012.

3.3.2. Conditions opératoires

3.3.2.1. Flux de perméation

Le flux de perméation est un paramètre qui permet d'obtenir une valeur qualitative de la performance de la filtration. Il est généralement noté par la lettre 'J' et exprime en filtration frontale la quantité de liquide qui passe perpendiculairement la membrane en fonction du temps et de la surface de la membrane. Pour un écoulement laminaire, le flux de perméation s'exprime selon la loi de Darcy en $L.m^{-2}.h^{-1}$ (Koen & Thien. 2011).

$$J = \frac{\Delta p}{\mu R}$$

- μ représente est la viscosité de l'eau ($\mu_w = 0.55 \times 10^{-3} Pa. s$),
- ΔP est la pression transmembranaire (sans unité),
- R la résistance hydraulique totale (sans unité).

3.3.2.2. Facteur de concentration volumique

Le facteur de concentration volumique (FCV) est une donnée sans dimension physique, obtenu en fin de filtration et qui exprime le rapport du volume initial de fluide traité sur le volume de rétentat obtenu. Koen & Thien. 2011).

$$FCV = \frac{V_i}{V_r}$$

- V_i : volume initial de la solution à filtrer en m^3 ou en L
- V_r : volume du rétentat en m^3 ou en L

3.3.2.3. *Pression transmembranaire*

C'est un paramètre qui permet le transfert de solutés entre le perméat et le rétentat en un point de la membrane. En filtration tangentielle, la PTM est habituellement exprimée en kPa ou en bar et fait le lien de manière proportionnelle avec le flux du perméat. Cette relation avec le flux n'est pas linéaire et varie proportionnellement avec la PTM (Koen & Thien. 2011).

$$TMP = \frac{P1 + P2}{2} - P3$$

- P1 : pression à l'entrée du système (kPa);
- P2 : pression à la sortie du système (kPa);
- P3 : pression à la sortie du perméat (kPa).

3.3.2.4. *Vitesse tangentielle*

Elle représente la vitesse à laquelle le flux de soluté traverse la surface de la membrane et dépend de la vitesse d'écoulement du liquide. Toutefois, si la membrane est rapidement colmatée, il résulte une vitesse tangentielle faible car le débit d'écoulement du liquide à filtrer devient faible (Koen & Thien. 2011).

$$Vt = \frac{D}{A}$$

- Vt: vitesse tangentielle en m/s;
- A : surface de la membrane en m².

3.3.2.5. Coefficient de transmission

Ce coefficient détermine le flux de soluté qui traverse la surface de la membrane. Il est utilisé dans le but de déterminer la sélectivité de la séparation et le coefficient de transmission est inversement proportionnel à la résistance de la membrane (Koen & Thien, 2011).

$$Ti = \frac{Ci,p}{Ci,r} * 100$$

- Ti : coefficient de transmission ;
- $C_{i,p}$: concentration du soluté dans le perméat en $g.L^{-1}$ ou $mol.l^{-1}$;
- $C_{i,r}$: concentration du soluté dans le rétentat en $g.L^{-1}$ ou $mol. L^{-1}$.

3.3.2.6. Coefficient de rejet

Le coefficient de rejet est un paramètre qui permet une évaluation de la sélectivité de séparation de la membrane. Il correspond à la quantité de matière retenue par la membrane et détermine l'efficacité de la séparation (Reis & Zydney, 2007). Ce coefficient est fonction de la concentration du soluté dans le perméat et le rétentat ($C_{i,p}$ et $C_{i,r}$) (Koen & Thien, 2011).

$$CR = 1 - \frac{Ci,p}{Ci,r}$$

- $C_{i,p}$: concentration du soluté dans le perméat en $g.l^{-1}$ ou $mol.l^{-1}$
- $C_{i,r}$: concentration du soluté dans le rétentat en $g.l^{-1}$ ou $mol. l^{-1}$

Les paramètres de filtration membranaire sont des outils qui peuvent être ajustés de manière à obtenir un rendement de filtration élevé et de réduire le temps d'apparition du colmatage membranaire. En dépit d'un contrôle rigoureux des paramètres et des conditions opératoires, le phénomène de colmatage ne peut être évité et est associé à tout système de filtration et réduit du coup les performances du procédé.

3.4. Le colmatage membranaire

3.4.1. Définition et principe

Le colmatage membranaire est le facteur limitant la séparation des protéines du lait. C'est un phénomène qui agit en contre sens de la filtration et provoque une diminution des performances de la filtration. Au cours de la filtration il y a retenue de la matière par la membrane réduisant de ce fait le flux de perméation à cause de la résistance qui est créée et aussi à cause des changements dans les propriétés physicochimiques du rétentat. La membrane est une structure sélective et semi-perméable, toutes les particules ne passent pas, ce qui fait qu'il y a un dépôt naturel de substance sur sa couche (Proctor *et al.* 2011). C'est une conséquence de la sélectivité de la membrane qui se traduit par une modification du gradient de concentration. Ce phénomène appelé polarisation de la concentration bien que réversible est inhérent au procédé de filtration membranaire et ne produit pas de changement dans les propriétés de la membrane. Sur le plan économique, le colmatage engendre l'augmentation des coûts de production et une diminution de la productivité.

À l'inverse du phénomène de polarisation de la concentration il y a le colmatage irréversible occasionné par la formation d'un dépôt à la surface de la membrane ou entre les

pores de la membrane. Elle provoque une diminution de la perméabilité de la membrane pendant le processus. Des modèles ont été étudiés dans le but d'avoir une meilleure compréhension du phénomène de colmatage au cours de la filtration.

3.4.2. *L'affinité chimique de la solution avec le matériau membranaire*

Le dépôt de macromolécules se fait par adsorption de particules colmatantes dont les tailles sont inférieures au seuil de coupure de la membrane. La charge des molécules peut alors créer des liens électrostatiques de nature répulsive avec d'autres composés potentiellement chargés pour augmenter le colmatage (Koen *et al.* 2011). Dans le cas des interactions protéines-membrane, les liaisons hydrophobes sont de nature à causer un réarrangement dans la structure des protéines et ainsi un changement dans l'ordre des liaisons.

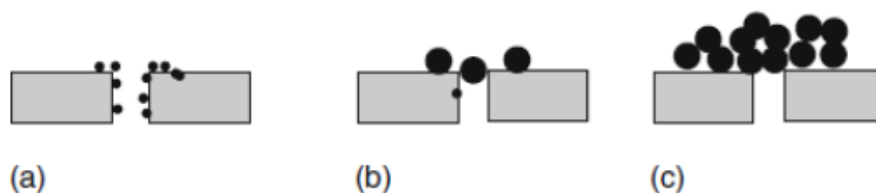


Figure 16 Schématisation du colmatage, a) adsorption en surface; b) blocage des pores c) gel ou gâteau (Paulen et Fikar. 2015)

3.4.3. *Mécanisme de blocage des pores*

Le blocage des pores se fait par les particules de taille équivalente avec celles de la membrane. La taille des molécules créant un effet dit stérique vis-à-vis du tamis membranaire et les pores vont être obstrués partiellement ou totalement la membrane. Il peut aussi avoir un dépôt de matière particulaire sur la surface de la membrane entraînant un colmatage

réversible. Toutefois, le colmatage peut devenir irréversible à cause de la persistance d'une résistance hydraulique supplémentaire par accumulation successive des particules. Quantitativement, les études caractérisent le colmatage à travers l'examen des flux critique et limites. Le flux critique se définit comme étant le flux selon lequel le colmatage est irréversible et correspond au moment où la droite de flux n'est pas linéaire. Il fait le lien entre le passage de la polarisation de la concentration au colmatage membranaire (Bacchin *et al.* 2006). Le flux limite est la valeur maximale de flux observé lorsque la PTM est constante. Les flux critique et limite peuvent être déterminés à partir de la courbe du flux de perméation en fonction de la PTM en fixant l'un ou l'autre de ces paramètres ou par la méthode de la résistance en série.

La méthode de la résistance en série permet d'étudier tous les aspects du colmatage car elle décrit la baisse du flux de perméation par la résistance causée par le colmatage membranaire, l'adsorption des pores et la polarisation de la concentration (Li *et al.* 1998; Cheng *et al.* 1997). Les formules suivantes sont utilisées pour décrire le modèle de la résistance en série (Gesán-Guizou *et al.* 1999) :

- la résistance membranaire hydraulique (R_T) est calculée comme suit :

$$R_T = R_M + R_{IR} + R_{REV}$$

- R_M : résistance hydraulique de la membrane avant filtration;
- R_{IR} : résistance hydraulique de la membrane colmatée irréversiblement;
- R_{REV} : résistance hydraulique dû au colmatage réversible.

- La résistance hydraulique de la membrane avant filtration est calculée comme suit :

$$R_M = \Delta P \mu J$$

- La résistance hydraulique de la membrane colmatée est calculée comme suit :

$$R_{IR} = \Delta P \mu J' - R_M$$

- La résistance hydraulique de la membrane du au colmatage réversible est calculée comme suit :

$$R_{REV} = \Delta P \mu J'' - R_M - R_{IR}$$

- μ représente est la viscosité de l'eau ($\mu_w = 0.55 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$);
- ΔP est la pression transmembranaire;
- J_w : flux de perméation initial ($\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$);
- J_w' : flux de perméation final avant rinçage ($\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$);
- J_w'' : flux de perméation après rinçage ($\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$).

3.4.4. Stratégies de nettoyage membranaire

Pour faire face au phénomène de colmatage membranaire, des procédés de nettoyage ou de modification des conditions opératoires sont exploités. Par exemple, agir sur la PTM, augmenter la turbulence, pratiquer *le blackpulsing* et *le blackflushing*. Ces deux dernières méthodes consistent à inverser le sens de la circulation du flux (rétro-filtration) de perméation par une contre-pression qui facilitera le décolmatage des solutés de la membrane vers le rétentat (Salladini *et al.* 2007). Le *blackpulsing* est différent du *blackflushing* par deux paramètres : la force et la durée. Dans le *blackflushing*, l'écoulement inverse est lent et ne dure quelque secondes pendant plusieurs minutes tandis que le *blackpulsing* est lieu à fréquence élevée pendant un temps très court et se fait en fonction du fluide considéré (Brans *et al.* 2004). Les procédés de nettoyage sont une combinaison successive de solutions

chimiques (acides, alcalins et enzymatiques) dans le but de dissoudre les macromolécules organiques, inorganiques et la coupure de liaisons protéiques.

4. Fractionnement des protéines du lait par les procédés membranaires

En choisissant adéquatement les conditions de filtration (type de membrane, tampon de solubilisation et flux de perméation) il est possible de fractionner de manière efficiente les protéines laitières. En effet, les CN peuvent être séparées des protéines du lactosérum en se basant simplement sur leurs différences de taille en filtration membranaire (Jimenez *et al.* 2008; Kelly. 2011). Le montage d'un système de filtration en cascade sur un disque rotatif composé de six membranes céramiques de 0,2 μm a permis le fractionnement efficace des CN des protéines du lactosérum. L'efficacité du procédé était modulée en fixant la PTM et la vitesse d'écoulement de 7 à 8 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ en mode recirculation afin d'atteindre 99% de rétention en CN (Espina *et al.* 2008). Une étude récente de Lawrence *et al.* (2008) sur le fractionnement des protéines laitières a montré que le taux de récupération des CN peut être de 96% à un PTM de 50 kPa, 98% à un PTM de 150 kPa et 100% à un PTM de 258 kPa. Le procédé consiste à filtrer successivement sur une membrane plane de PVDF de 0,3 μm à 50 °C à une vitesse de 0,44 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et une membrane spiralée de 0,5 μm à 40 °C la même vitesse à l'échelle pilote. A noter qu'au cours du procédé la transmission de la β -LG diminue de 22%, 8% et 1% pour chacun des PTM choisies respectivement. Dans le schéma ci-dessous, un dispositif de purification de protéines de lactosérum à partir du lait écrémé en couplant la MF et une double diafiltration a été mise en place pour la récupération de 95% de protéines de lactosérum dans le perméat tandis que le rétentat retenait les CN (Nelson & Barbano. 2005).

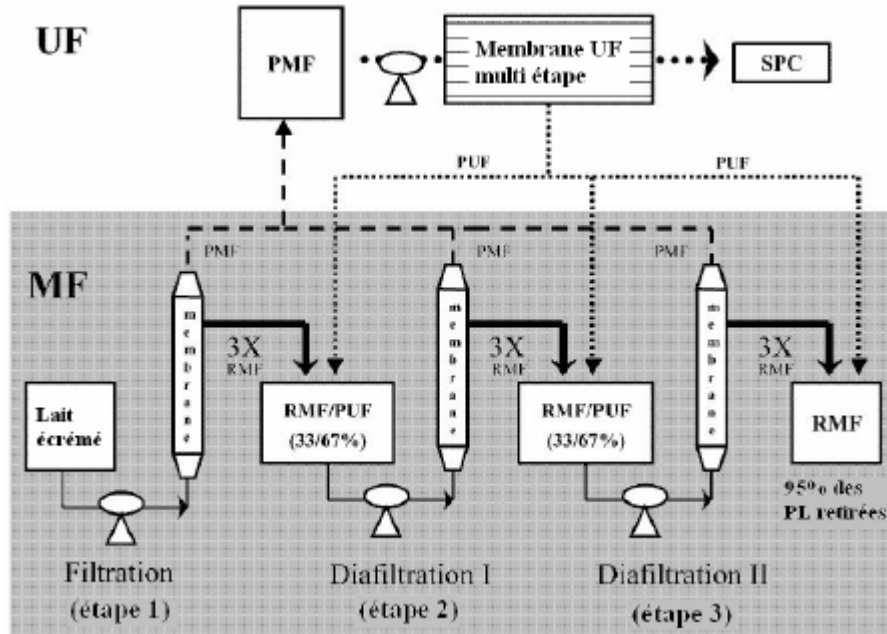


Figure 17 : Séparation des protéines du lactosérum selon le montage de Nelson & Barbano (2005)

Une fois les CN séparées des protéines du lactosérum, il revient à séparer les protéines du lactosérum entre-elles. En ce sens, Cheang et Zydney (2004) en couplant deux filtrations membranaires successives et en utilisant deux membranes de 30 kDa et 100 kDa ont fractionnée l' α -LAC de la β -LG à partir d'un isolat de protéines de lactosérum. Les rendements atteignent 95% en α -LAC et 85% en β -LG et un taux de purification équivalant de plus de près de 10 fois supérieur à la solution initiale.

De plus, Gésan-Guiziuo *et al.* (1999) ont précipité et ultrafiltré le lactosérum afin d'obtenir des fractions enrichies d' α -LAC et de β -LG. Pour cela, une membrane céramique (Kerasep 0,1 μ m, Techsep Miribel, France) a été utilisée. Le flux mesuré à une température de 50 °C était de 80 L.h⁻¹.m⁻² et la transmission de l' α -LAC était de 50-80%. Toutefois, la turbidité du perméat était relativement élevée de 100 à 200 NTU (unité de turbidité

néphalométrie) correspondant à un taux de rejection caséique de 80%. Finalement, Toro-Sierra *et al.*, (2013) par précipitation sélective ont séparés l' α -LAC de la β -LG. Les conditions opératoires ont permis de détecter des agrégats insolubles par microfiltration sur membrane de 0,1 μ m. Par la suite, l'UF (10 à 25 kDa) a permis de purifier l' α -LAC et la β -LG à 91,3% et 97,2% respectivement. Le rendement en α -LAC était de 60% tandis que celui de la β -LG de 90%.

La sélectivité de fractionnement de la β -LG de l' α -LAC peut être améliorée en utilisant une membrane d'UF chargée positivement. Une amélioration des paramètres physico-chimiques tels que le pH et la force ionique peut aussi contribuer à obtenir de meilleur rendement de séparation. Appliquée sur une membrane de 300 kDa avec un système de filtration à deux stages, 87% d' α -LAC pure a été obtenu à partir d'une solution binaire d' α -LAC et de β -LG (Arunkumar et Etzel. 2012). L'électro-acidification a été utilisée par Bazinet *et al.* (2004) pour séparer la β -LG à un taux de pureté de 98% dans une solution d'IPL en couplant une membrane bipolaire et l'électro-acidification (2 A, 60V). Toutefois, les performances de l'UF sous HPH sont guidées par la PTM. Les résultats obtenus par Abir *et al.* (2018) montrent qu'à partir de 400 MPa le flux de perméation diminue considérablement à cause d'une couche de matière sur la surface de la membrane ce qui affecte la performance générale de l'UF.

Au vu des différentes études réalisées sur la séparation des protéines du lait par les procédés membranaires et les contraintes qui existent, il est important de développer de nouvelles techniques pour améliorer l'efficacité des séparations par membrane. L'utilisation

d'un lait soumis aux HPH pourrait avoir un effet sur la filtration par les procédés, peut induire à une meilleure séparation des protéines et réduire l'apparition du colmatage membranaire.

Chapitre 2

Hypothèse et Objectifs

Le procédé à HPH permet de moduler les interactions entre les protéines laitières selon la barosensibilité des protéines. Par exemple, la β -LG est très sensible aux HPH, alors que l' α -LAC est davantage résistante. De plus, en présence de CN, des complexes protéiques spécifiques sont générés, principalement entre CN-CN et CN/ β -LG. La modulation des interactions protéiques couplées à la formation de complexes de tailles spécifique représenterait ainsi une nouvelle stratégie de prétraitement avant l'application d'une séparation membranaire afin de fractionner des protéines de poids moléculaires similaires. Par conséquent, il est proposé de coupler les HPH et l'UF afin de générer une fraction enrichie en α -LACC dans le perméat.

1. Hypothèse

La pressurisation hydrostatique d'un lait écrémé permet de moduler les interactions CN/ β -LG et ainsi créer un gradient de taille permettant ainsi un fractionnement facilité par UF dans l'optique de générer une fraction de perméat enrichie en alpha-lactalbumine.

2. Objectifs

Objectif 1. Déterminer les interactions protéiques en fonction des paramètres de pressurisation appliqués (pression et temps) sur du lait écrémé.

Objectif 2. Fractionner par UF les laits pressurisés et caractériser les fractions générées.

Objectif 3. Étudier les performances de l'étape d'UF (flux de perméation en mode recirculation totale et en mode concentration).

Chapitre 3:

Fractionnement des protéines du lactosérum par couplage des hautes pressions hydrostatiques et de l'ultrafiltration

Résumé

Le fractionnement par les procédés membranaires est l'une des techniques largement utilisées pour la séparation des protéines du lait. Cependant, du fait de poids moléculaires similaires des principales protéines de lactosérum (bêta-lactoglobuline (β -LG) et alpha-lactalbumine (α -LAC), leur fractionnement par filtration baromembranaire conventionnelle est impossible. Un prétraitement du lait écrémé par les hautes pressions hydrostatiques (HPH) permettrait cependant de moduler certaines interactions protéiques et ainsi faciliter le fractionnement de la β -LG et de l' α -LACC. Dans le présent travail, le fractionnement et la récupération de l' α -LAC ont été effectuées par couplage des HPH et de l'UF. Le lait écrémé a été pressurisé à 600 MPa pendant 5 min pour générer la formation d'agrégats principalement entre les caséines (CN) et la β -LG en raison de la stabilité de l' α -LAC sous HPH. Après la pressurisation, l'UF a été réalisée en modes recirculation totale et concentration (jusqu'à l'atteinte d'un FCV de 2X), pour respectivement déterminer la PTM optimale et récupérer un perméat enrichi en α -LACC.

Un traitement HPH à 600 MPa pendant 5 minutes permet une diminution de la taille des micelles de caséines et la génération d'agrégats entre les CN et la β -LG. L' α -LAC, étant plus résistante aux HPH est peu dénaturée (Creamer *et al.* 2006; Patel *et al.* 2006; Considine *et al.* 2007; Leu *et al.* 2017; Marciniack *et al.* 2018). L'analyse des données révèle une variation de la composition physico-chimique dans le perméat et le rétentat d'UF. Pour la solution témoin, près de 83,12% de l' α -LAC et 78,37% de la β -LG sont retrouvées dans le rétentat alors que pour la solution pressurisée ces valeurs sont de 76.74% pour l' α -LAC et 53.46% pour la β -LG. Le perméat de la solution pressurisée obtenu après le couplage des

HPH et de l'UF présente une concentration plus importante en α -LAC que les solutions non traitées.

Le rapport α -LAC / β -LG obtenu dans les rétentats pour le lait non-traité par HPH (0,38) est plus élevé que le ratio α -LAC/ β -LG de la solution pressurisée (0,20). Ce résultat indique que plus de β -LG est restée dans le retentat de la solution pressurisée lors de la filtration membranaire par rapport à la solution témoin.

En conséquence, les HPH ont diminué les performances de l'UF mais ont permis d'obtenir un perméat enrichi en α -LAC pour la solution pressurisée par rapport à la solution témoin. Toutefois, le procédé de récupération d'un perméat plus enrichi peut être amélioré si des étapes de diafiltration sont appliquées et aussi en augmentant le facteur de concentration volumique.

Abstract

Membrane based fractionation is one of the most widely used technique for the separation of milk proteins. However, due to similar molecular size of major whey proteins (beta-lactoglobulin (β -LG) and alpha-lactalbumin (α -LAC)), their fractionation remains challenging at industrial scale. High hydrostatic pressure (HHP) treatment induces interaction between milk proteins forming larger aggregates. In the present work, α -LAC recovery and purification were performed by coupling HHP and ultrafiltration (UF). Skim milk were pressurised at 600 MPa for 5 minutes to form aggregates mainly between caseins (CN) and β -LG due to higher stability of α -LAC under HHP. After pressurisation, UF has been done in total recycle mode for determining the optimal filtration parameters and in concentration mode with a fixed TMP to recuperate a permeate enriched with α -LAC. UF in concentration mode showed that permeate flux drop of 23.94% for 600 MPa due to concentration of polarisation and reversible fouling.

Data analysis reveals a variation of chemical composition in the permeate and the retentate of UF. For the untreated solution, nearly 83.12% of the α -LAC and 78.37% of the β -LG are found in the retentate whereas for pressurized solution these values are 76.74% for the α -LAC and 53.46% for β -LG. The permeate of the pressurized solution obtained after the HPH and UF coupling has a larger α -LAC profile than the untreated solutions.

Consequently, HHP decreased UF performance but did allow to recover a permeate fraction enriched in α -LAC at different concentration. It may be possible to recuperate higher purification rate by applying diafiltration steps and/or by increasing the volume concentration factor.

1. Introduction

Le lactosérum de fromagerie a longtemps été considéré comme un sous-produit de peu de valeur générée par l'industrie laitière. De nos jours, il est largement valorisé comme ingrédient alimentaire. Il est commercialisé sous forme de concentré de protéines de lactosérum (CPL) ainsi que sous la forme d'isolat de protéine de lactosérum (IPL) en raison de son intérêt nutritionnel, ses propriétés fonctionnelles et bioactives de sa fraction protéique (Gupta *et al.* 2014) (Octavio *et al.* 2008). La fraction majeure de protéines dans le lactosérum (environ 0,7% poids / volume) est principalement composée de β -lactoglobuline (β -LG) (environ 50%) et d'alpha-lactalbumine (α -LAC) (environ 20%). Les glycomacropéptides (uniquement dans le lactosérum de fromagerie), les immunoglobulines, la lactoferrine, la lactopéroxydase, la sérum albumine, le lysozyme et les facteurs de croissance sont considérés comme la fraction protéique mineure (30%) (Smithers. 2008).

Plus spécifiquement, la β -LG a été étudiée pour ses propriétés de gélification, moussante et émulsifiante. Elle a été également utilisée en tant que ligand pour la protection et la libération d'un grand nombre de molécules bioactives afin d'obtenir un aliment présentant des propriétés fonctionnelles améliorées (Stanciuc *et al.* 2015). En outre, plusieurs recherches scientifiques ont porté sur la production de peptides bioactifs obtenus après hydrolyse enzymatique de β -LG natif (Jouan *et al.* 2010). En revanche, l' α -LAC représente une protéine intéressante en raison de sa teneur élevée en acides aminés essentiels tels que le tryptophane (4-5%), lysine (11%) et la cystéine (6%) par rapport aux acides aminés totaux (Jouan. 2002).

L' α -LAC est facilement hydrolysée par les enzymes digestives et joue un rôle clé dans la synthèse des neurotransmetteurs, la sérotonine et la glutathion (Chatterton *et al.* 2006). Pour ces raisons, l' α -LAC est principalement utilisée dans les préparations pour nourrissons pour mimer le profil protéique du lait humain et constitue une source importante de protéines pour les personnes âgées (Katsanos *et al.* 2008). De plus, l' α -LAC est également étudiée pour sa capacité à interagir avec certaines molécules hydrophobes (peptides, acides gras) afin de générer des ingrédients présentant des fonctionnalités intéressantes.

Par conséquent, plusieurs technologies de fractionnement et de purification ont été étudiées afin de générer des fractions pures d' α -LAC et de β -LG individuelles, dotées de propriétés nutritionnelles, biologiques et fonctionnelles améliorées. Le taux de pureté maximal obtenu lors de la séparation de l' α -LAC de la β -LG dans le lactosérum est obtenu par chromatographie à échange d'ions, la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ou la chromatographie par perméation de gel (Bonaillie *et al.* 2008). Cependant, ces procédés génèrent de grandes quantités de solvants (sels et solutions de lavages) peu favorable pour l'environnement. Dans l'industrie laitière, l'ultrafiltration (UF) est l'une des techniques les plus largement utilisées pour le fractionnement des protéines sériques (α -LAC et β -LG) à partir du lactosérum de fromagerie. Des études ont montré que, malgré le fait qu'elles soient écologiquement durables, leur séparation reste difficile par ces procédés en raison de la similitude de leur poids moléculaire (Ganjam *et al.* 1997; Marella *et al.* 2011).

Plusieurs approches novatrices ont été développées pour le fractionnement des protéines de lactosérum au cours de la dernière décennie, exploitant certaines des caractéristiques telles que la dépendance au pH, le point isoélectrique et l'agrégation

thermique couplée aux procédés membranaires. Plus spécifiquement, Marella *et al.* (2000) ont mis au point un procédé pour séparer l' α -LAC à 63% de pureté par microfiltration couplée à une membrane UF de 50 KDa. Une récupération d' α -LAC à un taux de pureté élevé a été obtenue à l'aide d'une membrane UF chargée positivement (300 kDa) pour séparer l' α -LAC d'une solution binaire contenant du β -LG en se basant sur leurs différences de point isoélectrique (Arunkumar & Etzel. 2013).

L'effet des hautes pressions hydrostatiques sur la structure protéique et sur l'interaction protéine-protéine a fait l'objet de nombreuses études. Les protéines du lait sont affectées différemment par les HPH en fonction des paramètres appliqués tels que la pression et le temps. Par exemple, les molécules de β -LG sont à l'état pré-dénaturé à basse pression (50 MPa) puis commencent à former des dimères stables à partir de 200 MPa via des liaisons disulfure et forment des agrégats moléculaires à des pressions supérieures à 400 MPa (Patel *et al.* 2006; Lopez -Fandino. 2006). Cependant, l' α -LAC s'avère très résistante aux hautes pressions allant jusqu'à 400 MPa en raison de sa plus grande stabilité avec dans sa structure la présence de 4 ponts disulfures comparée à 2 pour la β -LG (Lopez-Fandino 2006; Patel *et al.* 2006; Mazri *et al.* 2006; Marciniak *et al.* 2018).

Patel *et al.* (2005) ont montré que dans un concentré de protéine de lactosérum (12% p/v) soumis aux HPH, l' α -LAC pouvait interagir avec la β -LG via la formation de liaisons disulfures intermoléculaires uniquement lors d'un traitement à haute pression au-dessus de 800 MPa. L'effet des HPH dépend aussi largement des propriétés physico-chimiques de la solution, telles que la concentration en protéines, le pH, la force ionique et la concentration en glucides. Des travaux ont démontré que les protéines de lactosérum, principalement la β -LG, peut interagir avec les CN, telles que l' α s2-CN et la κ -CN (Patel *et al.* 2006; Leu *et al.*

2017). Marciniak *et al.* (2018) ont découvert que l'interaction entre les protéines du lait telles que les CN avec la β -LG pouvait être modulée en utilisant les HPH puis par acidification et centrifugation afin de récupérer les agrégats et ainsi récupérer l' α -LAC dans le surnageant avec une pureté de 86%.

L'interaction sélective de β -LG avec les CN et la formation subséquente d'agrégats stables sous HPH permettraient donc de créer un gradient de taille entre la β -LG et l' α -LAC, offrant une opportunité de séparation par procédé de filtration membranaire. Par conséquent, le présent travail étudie l'effet d'un prétraitement par HPH du lait écrémé sur les propriétés des protéines du lait et l'efficacité de la séparation de l' α -LAC par ultrafiltration (UF) afin de développer une approche innovante et novatrice du fractionnement des protéines du lait.

Les objectifs spécifiques étaient de déterminer les paramètres optimaux de pressurisation (pression) et d'évaluer les performances de l'UF du lait écrémé sous pression en termes de flux de perméat, de rendement et de pureté de l' α -LAC dans le perméat.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Préparation des échantillons

Deux lots de lait écrémé commercial ont été achetés au supermarché local et stockés à 4 ° C. Chacun des lots a été divisé en fractions différentes pour les processus ultérieurs de traitement sous pression et d'ultrafiltration.

2.2. Prétraitement du lait par HPH

Chacun des lots de lait écrémé a été transféré et scellé dans des sacs en plastique flexibles puis traité sous pression à 600 MPa à température ambiante pendant 5 min à l'aide d'un système à HPH de marque ISO-LAB, model S-IL-085-O9-A0 (Stansted Fluid Power, Essex, UK). La pression dans le système augmentait à raison de 60 MPa/min tandis que la dépressurisation était instantanée.

2.3. Ultrafiltration

2.3.1. Système utilisé et caractéristique de la membrane

La filtration a été réalisée à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel (Millipore Labscale TFF, Darmstadt, Germany) équipé d'une membrane Biomax Pelicon XL-PXB300C50 en polyéthersulfone ayant un seuil de coupure de 300 kDa (Merck, KG Allemagne). Avant la filtration des solutions de lait écrémé, le lavage de la membrane a été réalisé en quatre étapes. La première étape consistait en un lavage basique à l'aide de NaOH 0,1N. La deuxième étape était un rinçage du système. Après avoir vidé le contenant de l'eau de rinçage, un lavage avec le NaOCl à 250 ppm a été réalisé pendant 30 minutes. Par la suite la membrane a été une nouvelle fois rincée avec de l'eau à 40 °C. Finalement, le détergent

tergazyne (0,2%) a été utilisé pour finir le lavage et un rinçage de la membrane à l'eau à 40 °C pendant 30 minutes a été réalisé à la suite de cette étape.

2.3.2. *Filtration en mode recirculation totale*

La filtration en mode recirculation totale a été réalisée à 20°C en triplicata. Cinq pressions transmembranaires (PTM) (68,94; 137,89; 206,84; 275,79; 344,73 kPa) ont été testées pour les échantillons de laits témoin et de laits pressurisés. Pour chaque PTM, le flux de perméation a été calculé. Le débit d'alimentation mesuré variait entre 10 et 70 mL/ min. Après chaque répétition, la membrane a été rincée à l'eau à 40 °C, lavée et conditionnée selon la procédure décrite au point 2.3.1. Après le processus de conditionnement de la membrane, le flux à l'eau a été mesuré à différentes PTM et l'UF du lait non-traité (0,1 MPa) et du lait pressurisé a été réalisée en recirculation pour déterminer la PTM optimal.

2.3.3. *Filtration en mode concentration*

Les filtrations en mode concentration ont été réalisées à la PTM optimale déterminée à l'étape précédente après lavage et conditionnement de la membrane (*voir section 2.3.1*). Les échantillons de laits pressurisés et de laits non-pressurisés ont été filtrés en triplicata. Le débit a été collecté et le flux de perméation pour chacun des échantillons a été calculé toutes les dix minutes jusqu'à l'atteinte d'un facteur de concentration volumétrique (FCV) de 2X. Les rétentats et perméats finaux ont été collectés et stockés à -20 °C pour la réalisation des analyses physico-chimiques. Le système et la membrane ont finalement été nettoyés suivant la procédure décrite dans la *section 2.3.1* avant et après chaque traitement jusqu'à la récupération d'un flux à l'eau après lavage identique au flux à l'eau obtenu lors de l'étape de conditionnement.

2.4. Analyses

2.4.1. Profil protéique par SDS-PAGE

Le profil protéique des échantillons de lait initial, des laits témoin et des laits pressurisés a été obtenu par SDS-PAGE via l'utilisation de gels TGX Bio Prot de Bio-Rad à 12% d'acrylamide (Bio-Rad Laboratories. Hercules. CA, USA). Un mélange contenant 25 μ L d'échantillons et 75 μ L d'eau a été préparé. Par la suite, 10 μ L de ce mélange ont été prélevés pour être mélangés à 10 μ L de tampon (β -mercaptoéthanol et tampon 2x Laemmli). Ce mélange a été porté à ébullition pendant 5 min. Trois marqueurs moléculaires ont été utilisés: un marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad. Hercules. CA, USA), un standard d' α -LAC et un standard de β -LG Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad. Hercules. CA, USA). Dix microlitres de chaque échantillon ont été ajoutés au gel et ont migré à 15 mA pendant environ une heure. Le tampon de migration consistait en 100 mL de tampon Tris / Glycine / SDS 10x pour 900 mL d'eau déminéralisée.

À la suite de l'étape de migration, le gel a été placé dans une solution de bleu de Coomassie (1 g de bleu de Coomassie dans 10% d'acide acétique, 40% d'éthanol et 50% d'eau déminéralisée) pendant 2 h. Ensuite, le gel a été maintenu pendant 12h dans une solution de décoloration de méthanol à 10%, d'acide acétique à 10% et d'eau déminéralisée à 80%. Finalement, les gels décolorés ont été analysés à l'aide de Gel DocTM XR de Bio-Rad.

2.4.2. Analyse de la teneur protéique des échantillons

La teneur totale en protéines des perméats et des rétentats du lait pressurisé et du lait non-traité ainsi que le lait initial ont été obtenue par l'analyseur de lait Lactoscope (Delta

Instruments, PerkinElmer Company. KelvIaan 3, Dairy Solver, MA00090055, Netherlands) utilisant la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Avant l'analyse des échantillons et pour une meilleure caractérisation et identification des fractions présentes, les échantillons ont été chauffés à 40 °C dans un bain marie pendant 5 minutes.

2.4.3. Profil protéique par chromatographie en phase liquide à haute performance

2.4.3.1. Récupération et purification de l'alpha-lactalbumine

Des solutions de lait initial et des rétentats du lait pressurisé et du lait non-traité ayant une teneur protéique de 0.25 % (p / v) ont été tout d'abord filtrées sur une membrane en PVDF (VWR international. Radnor. USA) de 0,45 µm afin de retirer les particules qui peuvent interférer avec la molécule à analyser ou qui peuvent provoquer un encrassement de la colonne de séparation. La concentration en α -LAC et en β -LG a été déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) en utilisant le système Agilent 110 (Agilent Technologies. Palo Alto. CA. USA). La séparation a été réalisée en utilisant une colonne C18 Luna (250 mm x 2 mm) (Phenomenex. Torrance, CA, USA). Un volume de 20 µL d'échantillon de la solution à analyser a été élué avec de l'acide trifluoracétique (TFA) à 0,11% (v / v) dans de l'eau (solvant A) et de l'acétonitrile. L'eau, et le TFA ont été utilisés comme solvant B à un débit 0,2 mL / min.

2.4.3.2. Calcul de la concentration, du rendement et du taux de purification

Pour le calcul de la concentration, l'aire sous la courbe du pic d' α -LACC et de β -LG dans le lait initial ainsi que les aires sous la courbe dans les rétentats ont été utilisés. L'aire sous la courbe dans le lait initial de la protéine cible (α ou β) représente 100% puis avec la valeur sous la courbe dans les rétentats un pourcentage de récupération a été calculé. Les résultats ont été calculés avec les standards d'alpha et de beta.

Pour le taux de purification, les aires sous la courbe ont été calculés pour chacun des pics ce qui correspondrait à 100%. Puis, l'aire sous la courbe de la protéine cible (α -LAC ou β -Lg) a été calculé ce qui permet par une simple règle de trois de déterminer le taux de pureté.

3. Résultats et discussion

3.1. Performance de l'UF lors du fractionnement des protéines du lait

3.1.1. En mode recirculation totale

La figure 18, montre la variation du flux de perméation pour la solution non traitée et la solution pressurisée. La relation flux de perméation-PTM n'est pas linéaire contrairement à celle du flux à l'eau observé tout au long du processus. En effet, le flux à l'eau a augmenté linéairement de 50 à 370 L.m⁻².h⁻¹ entre la PTM initiale et finale (données non présentées). Le flux de perméation des solutions témoins et pressurisées a été inférieur par rapport au flux à l'eau qui est la résultante des effets de concentration de polarisation et du colmatage. Le flux maximum observé pour la solution non traitée (33.96± 8.27 L.m⁻².h⁻¹) et pour la solution pressurisée à 600 MPa/5 min était de 27.56±6.7 L.m⁻².h⁻¹. Le flux de perméation augmente proportionnellement avec la PTM pour le lait témoin jusqu'à atteindre leur maximum vers 300 kPa et par la suite le flux décroît drastiquement. Dans le cas de la

solution pressurisée, le flux a été croissant au début du processus puis devient stable entre 200 et 500 kPa. Finalement, il y a une décroissance de ce flux jusqu'à 600 kPa.

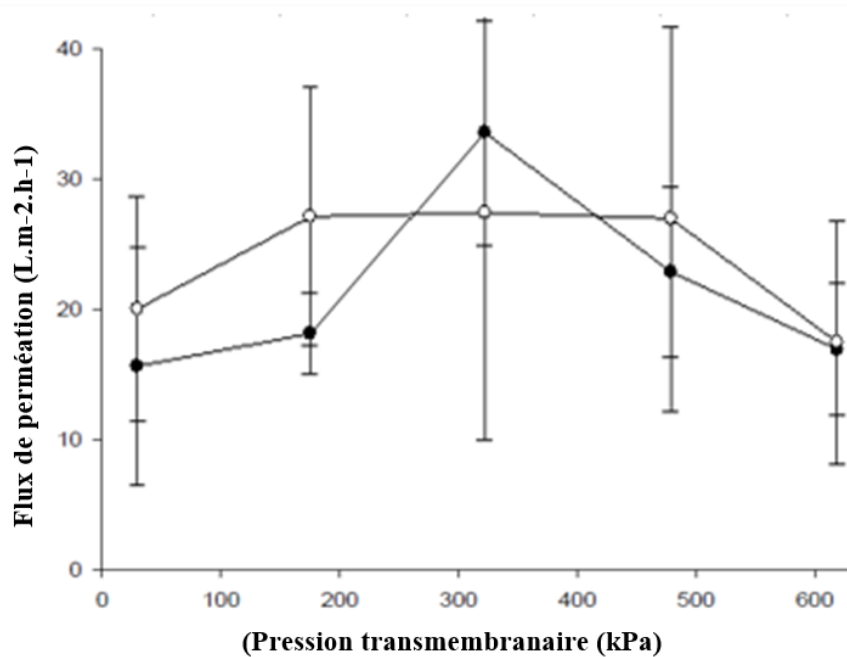


Figure 18: Flux de perméation en fonction de la pression transmembranaire en mode recirculation totale d'un lait non traité (rond noir) et pressurisé (rond vide) à 600 MPa pendant 5 min.

Il a été établi que l'augmentation de la PTM (200-300 MPa) est corrélée avec une augmentation du flux de perméation. Cependant, cette corrélation n'est plus valide lors de l'apparition du phénomène d'encrassement de la membrane (Aimar *et al.* 1988). Dans le cas de l'UF d'un lait non pressurisé, il a été démontré que les principales protéines responsables de l'encrassement sont les caséines (Patel *et al.* 2006; Considine *et al.* 2007). Dans le cas de l'UF de laits pressurisés, Leu *et al.* ont observé, qu'hormis les caséines, une faible quantité de β -LG, des agrégats CN / β -LG formés à 600 MPa ainsi que quelques traces d' α -LAC et d'IgG sont responsables du colmatage (Leu *et al.* 2017).

3.1.2. *En mode concentration*

La figure 19 présente l'évolution du flux de perméation en fonction du temps pour le lait non traité et le lait pressurisé lorsque la PTM a été fixée à 206,84 kPa kPa. Au début du processus, les flux initiaux sont similaires et ont diminué rapidement après 30 min de filtration. La valeur du flux de perméation pour la solution témoin au début de la filtration était de $14.96 \pm 0.14 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Cette valeur est similaire pour la solution pressurisée à 600 MPa ($14.47 \pm 0.20 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$).

Ce n'est qu'en cours de processus que les valeurs commencent à se différencier tout en gardant la même tendance de flux décroissant. Le déclin de flux total était de 86% pour le témoin contre 95% pour la solution pressurisée à 600 MPa. Différentes hypothèses peuvent expliquer la diminution de flux de perméation en UF. Premièrement, l'impact des HPH sur la taille des caséines et la dénaturation et l'agrégation des protéines du lactosérum.

Les travaux de Leu *et al.* 2017 & Marciniack *et al.* 2018 sur l'impact des hautes pressions hydrostatiques sur du lait écrémé à 600 MPa pendant 5 min ont validé les résultats des travaux faits par de nombreux auteurs sur la modification de la taille des micelles de caséine et la génération d'agrégats entre les CN et la β -LG. L' α -LAC est moins dénaturé à cause des forces impliquées dans la stabilisation de sa structure et de sa faible affinité à se lier aux complexes CN / β -LG ou β -LG / β -LG (Creamer *et al.* 2006; Patel *et al.* 2006; Considine *et al.* 2007; Leu *et al.* 2017; Marciniack *et al.* 2018).

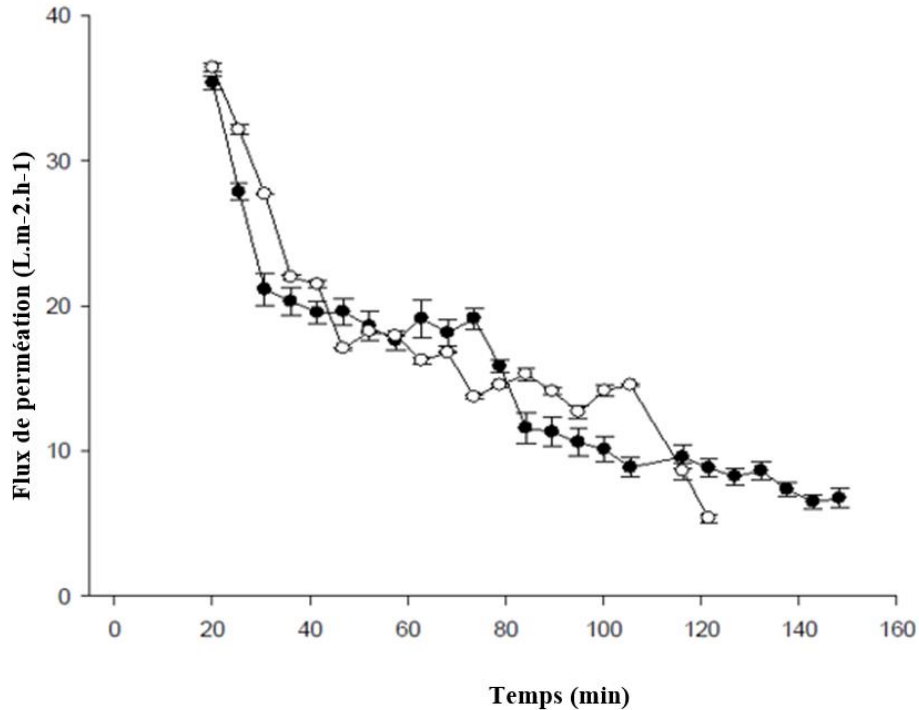


Fig. 19: Évolution du flux de perméation en fonction du temps pour le lait non traité (rond vide) et le lait pressurisé à 600 MPa/5 min (rond noir)

Lors de la pressurisation à 600 MPa, il y a une déstructuration de la micelle puis, à la décompression, la reformation de caséines de plus petite taille via l'établissement de liaisons hydrophobes entre $\alpha s1$ -CN, $\alpha s2$ -CN et la β -CN (Huppertz *et al.* 2004). La diminution de la taille des micelles de caséines varie généralement de 35 à 40% tout dépendamment la pression appliquée. Dans le cas des protéines sériques, la β -LG, initialement sous forme de dimères, va s'agréger entre-elle pour former des structures de haut poids moléculaires (trimères à hexamères). Cette protéine va également interagir avec d'autres protéines du lait, en particulier avec les caséines (Creamer *et al.* 2006). Cette interaction est proportionnelle à la quantité de β -LG dénaturée (Huppertz, Fox & Kelly. 2004). Ainsi, cette présence d'agrégats peut affecter négativement le processus d'UF en termes de diminution du flux de perméation, l'augmentation du temps nécessaire pour concentrer le perméat à un FCV fixé et sur le taux de récupération des protéines de lactosérum (Huppertz, Fox et Kelly. 2004).

Plus une solution est concentrée, plus faible sera son flux de perméation à cause de la pression osmotique et de l'accumulation de protéines sur la surface de la membrane occasionnant la résistance à la perméation (Bacchin. 2006; Cheryan. 1986). En fait, Aimar *et al.* (1988) décrivent qu'un phénomène similaire d'adsorption de particules sur la membrane pour un soluté pur peut également décrire le comportement de solutions variées dans le sens de la diminution du flux de perméation en mode concentration. De plus les interactions protéines-membrane et protéines-protéines peuvent favoriser l'encrassement irréversible de la membrane en cours de filtration (Tong *et al.* 1988 ; Bouzid *et al.* 2008; Jimenez-Lopez *et al.* 2008).

C'est une contrainte de la filtration membranaire et de nombreux phénomènes agissant simultanément en sont responsables; concentration de polarisation, blocage des pores, formation de gâteaux, adsorption organique, précipitation des minéraux, encrassement biologique et dépôt de particules de protéines pour consolider la couche d'encrassement (Marshall *et al.* 1993; Li *et al.* 1998). Spécifiquement, les facteurs conduisant à l'encrassement de la membrane et par conséquent au déclin du flux de perméation pour un PTM fixé au début de la filtration sont la taille et la forme des agrégats, la précipitation du calcium et les interactions hydrophobes (Cheryan, 1998).

4. Récupération de l'alpha-lactalbumine

4.1. Impact des HPH sur la concentration des protéines du lactosérum

La figure 20 montre le profil des protéines présentes dans les perméats récupérés pour le lait témoin et pressurisé. Les bandes correspondant à l' α -LAC étaient drastiquement plus intenses dans le perméat des solutions pressurisées par rapport aux perméats des solutions

témoins (figure 20). Cette augmentation de l'intensité des bandes d' α -LAC dans le perméat est corrélée à une diminution de l'intensité des bandes de β -LG. Il est à noter qu'il n'y avait aucune bande correspondant aux autres protéines du lactosérum dans les perméats. Cela est dû par leurs concentrations qui sont faibles dans les perméats.

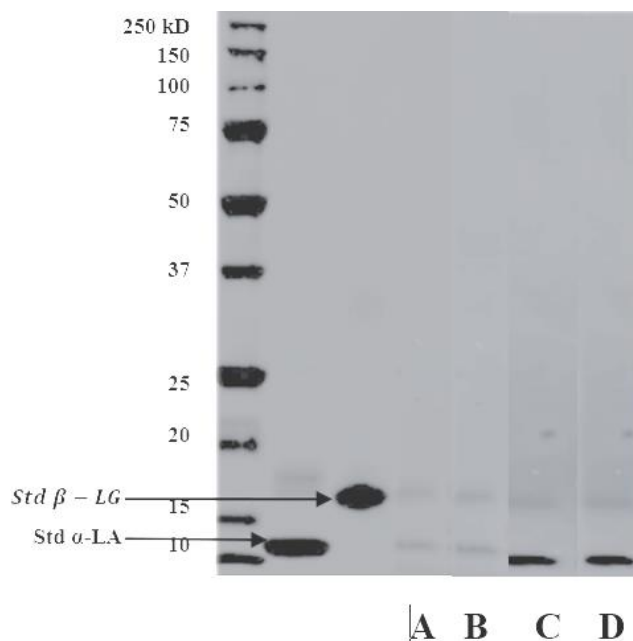


Fig. 20: Profils protéiques des perméats des laits témoins (A et B) et pressurisés à 600 MPa/5min (C et D)

Les HPH augmentent la rétention des protéines dans le rétentat, majoritairement les caséines et la β -LG. En effet, la β -LG est la plus sensible aux HPH alors que l' α -LAC est plus résistante (Huppertz *et al.* 2002). Les travaux réalisés par Leu *et al.* 2017 & Marciniack *et al.* 2018 sur les impacts des hautes pressions sur les matrices laitières à 600 MPa pendant 5 min ont montré qu'il y a une modification de la taille des micelles de caséines et la génération d'agrégats entre les CN et la β -LG. L' α -LAC est moins dénaturée à cause des forces impliquées dans la stabilisation de sa structure et de sa faible affinité à se lier au complexe CN / β -LG ou β -LG / β -LG (Creamer *et al.* 2006; Patel *et al.* 2006; Considine *et al.* 2007; Leu *et al.* 2017; Marciniack *et al.* 2018).

4.2. Profil protéique des rétentats des laits témoins et pressurisés

À la figure 21, le chromatogramme de gauche représentant le rétentat de lait témoin, le pic correspondant à la β -LG est de plus forte intensité par rapport au pic de la β -LG de la solution pressurisée dans la figure 21 de droite. L'analyse des résultats permettent ainsi de supposer qu'il y a une augmentation de la concentration en β -LG dans le perméat pour la solution pressurisée concentrée 2X par rapport à la solution témoin. Il est à noter que les perméats n'ont pas pu être analysés du fait de leur trop faible concentration en protéines. Pour le rétentat de lait non traité, près de 83.12% de l' α -LAC et 78.37% de la β -LG n'ont pas été transmis dans le perméat alors que ces valeurs sont de 76.74% et 53.46% pour l' α -LAC et la β -LG respectivement pour le rétentat de lait pressurisé.

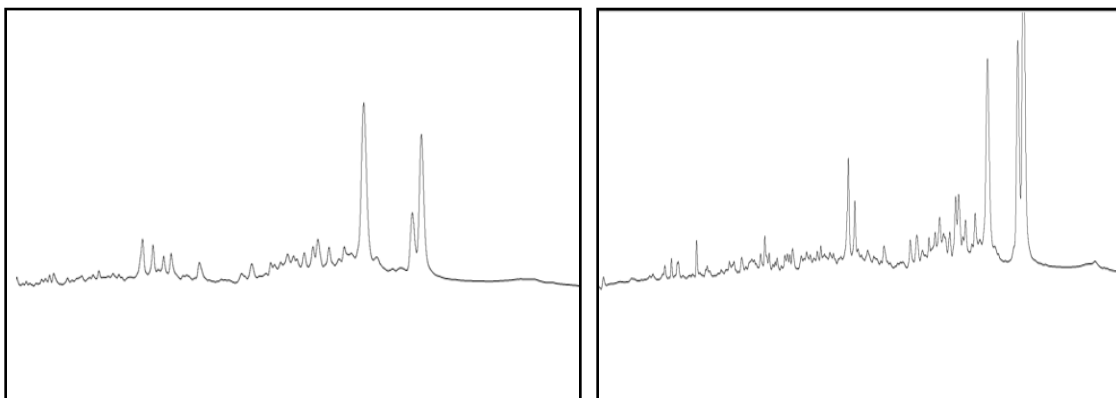


Figure 21: Chromatogrammes des rétentats de lait témoin (gauche) et pressurisé (droite) à 600 MPa/5min.

Un calcul du ratio (α -LAC / β -LG) d'aire sous la courbe obtenu pour le rétentat de lait témoin (0.38) est plus élevé que ce même ratio calculé pour la solution pressurisée (0.20). Ceci s'explique la présence d'une plus grande quantité d' α -LAC dans le témoin et plus de β -LG que d' α -LAC dans le lait pressurisé. Ainsi, une plus grande rétention de la β -LG a été

observée dans le rétentat de lait pressurisé ce qui peut éventuellement permettre une récupération sélective de l' α -LAC dans le perméat. Cependant, il sera nécessaire de valider cette affirmation et de comparer ces résultats à ceux de la littérature traitant du fractionnement des 2 protéines majeures du lactosérum. A noter qu'on a observé d'autres matériels dans le retentât du lait pressurisé qu'on n'a pas pu caractériser.

Des techniques courantes de fractionnement des protéines du lactosérum combinant plusieurs procédés permettent d'obtenir un taux de purification de 70-80% avec un taux de récupération de l' α -LAC inférieur à 50%. Huppertz *et al.* (2004) ont montré que plus de 80% de la β -LG est associé à des micelles de caséines lorsque la pression varie de 300 à 800 MPa. Leu *et al.* (2017) en étudiant l'effet des HPH sur le colmatage membranaire ont observés une diminution de la concentration de β -LG de plus de 60% pour les solutions pressurisées à 600 MPa dans le perméat. Récemment, Marciniack *et al.* (2018) en combinant les HPH (300s/600 MPa) et l'acidification à pH 4,6 ont réussi à générer une fraction enrichie d' α -LAC avec un taux de pureté de 86% et un taux de récupération de 73.1% par précipitation des solutions pressurisées modèles constituées de caséines isoélectriques, de β -LG et d' α -LAC.

Chapitre 4

Retour sur l'hypothèse, conclusion et perspectives

5. Retour sur l'hypothèse initiale

Dans cette étude, l'objectif principal était de récupérer l' α -LAC à partir d'un lait écrémé par un prétraitement aux HPH, afin de générer des agrégats spécifiquement entre les CN et la β -LG, puis par UF pour fractionner l' α -LAC des agrégats générés sous HPH. Les résultats montrent que les solutions traitées aux HPH permettent une meilleure rétention de la β -LG et favorisent le passage d'une plus grande quantité d' α -LAC par rapport aux laits non traitées. Donc, l'hypothèse de départ sur la récupération d'un perméat enrichi après traitement par HPH et UF est validée. La pressurisation a cependant diminué les performances de l'UF possiblement en favorisant les phénomènes de concentration de la polarisation et de colmatage de la membrane du fait de la génération d'agrégats protéiques.

Conclusion

Les résultats de cette étude permettent de tirer les conclusions suivantes:

- a) Bien qu'il n'y ait pas de différence significative du flux de perméation en fonction de la PTM pour les laits témoin et pressurisés à 600 MPa/5 min, la tendance montre un aspect plus linéaire lorsque le lait pressurisé est recirculé. Cela démontrerait ainsi un colmatage important de la membrane d'UF et ce, même à faible PTM.
- b) Bien qu'il n'y ait pas de différence significative du flux de perméation en fonction du temps pour les laits témoin et pressurisés à 600 MPa/5 min, le temps nécessaire pour l'atteinte du FCV 2X est plus important pour le lait pressurisé.
- c) Les agrégats formés par les protéines du lait sous HPH seraient responsables de l'encrassement de la membrane engendrant ainsi une diminution du flux de perméation lors de l'étape de concentration.
- d) La solution de lait traitée par HPH à 600 MPa/5min a permis une transmission plus efficace de α -LAC dans le perméat comparativement au lait non traité.

Perspectives

L'intérêt de cette étude réside dans le fait que le procédé à HPH peut être exploité comme technologie de prétraitement afin de générer des fractions protéiques d'intérêt par filtration membranaire. Il a été montré que l'UF du lait pressurisé permet un réel compromis entre la rétention de caséines et de β -LG et une perméation intéressante de l' α -LAC. Les perspectives de ce travail pourraient être plus intéressantes si toutes les conditions opératoires étaient optimisées. Pour l'UF, il serait important après avoir fait une première filtration, de diafiltrer le rétentat afin d'augmenter la teneur en α -LAC. De plus, comme la charge des membranes

a une influence sur la transmission des protéines, il serait intéressant d'étudier l'effet des charges de la membrane et la variation du pH du lait sur la transmission des protéines dans le compartiment du perméat. De plus, il serait intéressant de tester d'autres couples pressions/temps et de calculer le taux de pureté et la concentration de l' α -LAC dans les perméats. En dernier lieu, il faudrait tester la méthode à l'échelle industrielle sur le lactosérum de fromagerie afin de déterminer une voie de valorisation potentielle des protéines du lactosérum.

Bibliographie

1. Alice Marciniak, Shyam Suwal, Michel Britten, Yves Pouliot and Alain Doyen The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interactions for the production of an alpha-lactalbumin enriched-fraction.
2. Ana-Maria Simion Ciuciu, Iuliana Aprodu, Petru Alexe, Nicoleta Stănciuc. Thermally driven interactions between α -lactoglobulin and retinol acetate investigated by fluorescence spectroscopy and molecular modeling methods. Dairy Science & Technology, EDP sciences/Springer, 2016, 96 (3), pp.405-423.
3. Arunkumar, A. and Etzel, M. 2013. Fractionation of α -LACctalbumin from β -lactoglobulin using positively charged tangential flow ultrafiltration membranes. Separation and Purification Technology. 105, (2013), 121–128
4. Arzate, A. (2008). Procédés de séparation membranaire et leur application dans l'industrie alimentaire. Revue de littérature. Entre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole. Canada.
5. Bacchin, P. (2004). Journal of Membrane Science., 2004, 228, 237–241.
6. Bacchin, P., Aimar, P. & Field, R. W. Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications. J. Membr. Sci. 281, 42–69 (2006).
7. Baker, R. W. Membrane Technology and Applications, Wiley, Chichester, 2004.
8. Baldasso, T. Barros, I. Tessaro (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration, Desalination 278 (2011) 381–386.

9. Baldi, A., Politis, I., Pecorini, C., Fusi, E., Roubini, C., & Dell'Orto, V. (2005). Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem. *Journal of Dairy Research*, 72, 66–72.
10. Balasubramaniam, V. Barbosa-Cánovas, G. V. and Lelieveld, H. L. (2016). *High Pressure Processing of Food: Principles, Technology and Applications*, Springer, 2016.
11. Barbano, D. M. Sciancalepore, V. Rudan, M.A. (1988). Characterization of Milk Proteins in Ultrafiltration Permeate1, *Journal of Dairy Science*, Volume 71, Issue 10, 1988, Pages 2655-2657.
12. Bravo, F.I., Molina, E., & López-Fandiño, R. (2012). Effect of the high-pressure-release phase on the protein composition of the soluble milk fraction. *Journal of Dairy Science*, 95, 6293–6299.
13. Bravo, F. I., Felipe, X., López-Fandiño, R. & Molina, E. (2015). Skim milk protein distribution as a result of very high hydrostatic pressure. *Food Res. Int.* 72, 74–79 (2015)
14. Brans, G., Schroën, C.G.P.H., van der Sman, R.G.M. & Boom, R.M. (2004). Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *Journal of Membrane Science*. 243(1-2), 263-272.
15. Belloque, C.J. Recio, J. & Lopez-Fandino, R. (2006). Influence of high hydrostatic pressure on the proteolysis of beta-lactoglobulin A by trypsin. *Journal of Dairy Research*, 73(1), 121-128.
16. Bottino, A., Capannelli, G., Monticelli, O. & Piaggio, P. (2000) Poly (vinylidene fluoride) with improved functionalization for membrane production. *Journal of Membrane Science*, 166, 23–29.
17. Brew, K. (2013). *Advanced Dairy Chemistry*. 261–273 (Springer, 2013). DOI :10.1007/978-1-4614-4714-6_8

18. Canadian Dairy Info. 2017
19. Cayot, P. & Lorient, D. Structures et technofonctions des protéines du lait. (1998).
20. Chatterton, D. et al. 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -LACctalbumin— Technological implications for processing. *International Dairy Journal*. 16, 11 (2006), 1229–1240
21. Chawla, R., Patil, G. R. & Singh, A. K. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *J. Food Sci. Technol.* **48**, 260–268 (2011).
22. Cheng, T. W., Yeh, H. M. & Gau, C. T. Resistance Analyses for Ultrafiltration in Tubular Membrane Module. *Sep. Sci. Technol.* **32**, 2623–2640 (1997).
23. Cheang B. and Zydney, A. L. (2004). *Journal of Membrane Science.*, 2004, 231, 159–167.
24. Cheryan M. and K. P. Kuo, *J. Dairy Sci.*, 1984, 67, 1406–1413.
25. Cheryan, M. (1998) *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*, Technomic Publication, Lancaster.
26. Cheftel, J.C. 1995. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol. Intern. I*, 75-90
27. Considine, T., Patel, H. A., S.G. Anema, Singh., Creamer, L.K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8 (2007) 1-23

28. Considine, T., Patel, H. a., Anema, S. G., Singh, H. & Creamer, L. K. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments - A Review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8, 1–23 (2007).
29. Corredig, M., Dalgleish, D. G. The mechanisms of the heatinduced interaction of whey proteins with casein micelles in milkseffect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Int. Dairy J.* 1999, 9, 233-236.
30. Dalgleish, D.G., Law, A.J.R., 1988. pH-induced dissociation of bovine casein micelles: Analysis of liberated caseins. *Journal of Dairy Research* 55, 529–538
31. De Kruif, C.G. Casein micelle interactions, *International Dairy Journal*, Volume 9, Issues 3–6, 1999, Pages 183-188, ISSN 0958-6946, [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00058-8).
32. De Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S. & Petukhov, A. V. Casein micelles and their internal structure. *Adv. Colloid Interface Sci.* 171-172, 36–52 (2012).
33. Demazeau, G., & Rivalain, N. (2011). High hydrostatic pressure and biology: a brief history. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1305-1314.
34. Edwards, P. J. B. & Jameson, G. B. in *Milk Proteins* 201–242 (2014). doi:10.1016/B978-12-405171-3/00007-6
35. Espina, V. S., Michel Y. J., Matthieu, F., Lu-Hui D., (2008). Separation of casein micelles from whey proteins by high shear microfiltration of skim milk using rotating ceramic membranes and organic membranes in a rotating disk module. *Journal of Membrane Science* 325 (2008) 872–879
36. Fox, P.F., Brodtkorb, (2008). The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18, 667±684.

37. Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., O'Mahony, J. A. (2015). Dairy chemistry and biochemistry.
38. Fast et al. 2005 Fast, J., Ann-Kristin, M., Catharina, S., Linse, S. (2005). Stability of HAMLET—A kinetically trapped α -lactalbumin oleic acid complex. *Protein Science*.
39. Fox, P. F. & Mcsweeney, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. *Dairy Chemistry and Biochemistry* (1998). doi:10.1007/978-3-319-14892-2
40. Fox, P. F. & Mcsweeney, P. L. H. in *Dairy Chemistry and Biochemistry* 478 (1998). doi:10.1007/978-3-319-14892-2
41. Fox, P.F. (2003). The major constituents of milk, Editor(s): Gerrit Smit, In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Dairy Processing*, Woodhead Publishing, 2003, Pages 5-41, ISBN 9781855736764.
42. Ganjam, L. S., W. H. Jr. Thornton, R. T. Marshall, and R. S. Mac Donold. 1997. Antiproliferative effect of yoghurt fractions obtained by membrane dialysis on cultured mammalian intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 80:2325–2329.
43. Gebhardt, R., Doster, W., Friedrich, J. & Kulozik, U. Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM. *Eur. Biophys. J.* **35**, 503–509 (2006)
44. Gésan-Guiziou, G., Daufin, G., Timmer, M., Allersma, D. & Van Der Horst, C. (1999) Process steps for the preparation of purified fractions of α -LACtalbumin and β -lactoglobulin from whey protein concentrates. *Journal of Dairy Research* 66(2), 225 - 236.

45. Geoffrey W. Smithers, Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’, *International Dairy Journal*, Volume 18, Issue 7, 2008, Pages 695-704, ISSN 0958-6946, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>.
46. Griffiths, M.W. (2010). *Improving the Safety and Quality of Milk*, Volume 1 - Milk Production and Processing - 16.3.5.1 Effect of High Pressure on Caseins. Woodhead Publishing.
47. Hasmukh A. Patel, Harjinder Singh, Palatasa Havea, Thérèse Considine, Lawrence K. Creamer. Pressure-Induced Unfolding and Aggregation of the Proteins in Whey Protein Concentrate Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005** 53 (24), 9590-9601, DOI: 10.1021/jf0508403
48. Hasmukh A. Patel, Harjinder Singh, Palatasa Havea, Thérèse Considine, Lawrence K. Creamer. Effects of Heat and High Hydrostatic Pressure Treatments on Disulfide Bonding Interchanges among the Proteins in Skim Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006** 54 (9), 3409-3420, DOI: 10.1021/jf052834
49. HAYASHI, R. (1992). Utilization of pressure in addition to temperature in food science and technology, *High Pressure Biotechnology*. Colloque INSERM/John Libbey and Co., Ltd., 1992, pages 185-193.
50. He, J. S. et al. As-Casein Inhibits the Pressure-Induced Aggregation of B-Lactoglobulin Through Its Molecular Chaperone-Like Properties. *Food Hydrocolloids*. 25, 1581–1586 (2011).
51. Henning, R. Baer, R. J. Hassan A. N. and Dave, R. J. *Dairy Sci.*, 2006, 89, 1179–1188.
52. Hendricxx M, Ludikhuyze L, Van den Broeck I, Weemaes C (1998) Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends Food Sci Technol* 9:197–203

53. Heinrich, R. Yuji, G. Carl, A.B. Masaru, H. Hong, C. Ramachandra, S. Kuwata, K. (2001). Structural and kinetic characterization of early folding events in β -lactoglobulin. *Nature Structural Biology* volume 8, pages 151–155 (2001)
54. Hite B. (1899). The effect of pressure in the preservation of milk. Bull West Virginia University Agricultural Experiment Station 58:15-35.
55. Horne, D. S. Casein micelle structure: Models and muddles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 148–153 (2006).
56. Horne, D. S., (2014). Milk proteins. Formerly Hannah Research Institute, Ayr, Scotland. DOI: 10.1016/B978-0-12-405171-3.00006-4 (2014). Elsevier Inc. All rights reserved
57. Huppertz, T. et al. 2004. High pressure-induced denaturation of α -LACtalbumin and β -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research*. 71, 4 (2004), 489–495.
58. Huppertz, T., Fox, F. P., & Kelly, A. L. (2004). High pressure treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. *Journal of Dairy Research*, 71, 97–106.
59. Huppertz, T., & de Kruif, C. G. (2007). Disruption and reassociation of casein micelles during high pressure treatment: influence of whey proteins. *The Journal of Dairy Research*, 74(2), 194–7. <http://doi.org/10.1017/S0022029906002263>
60. Huppertz, T., Smiddy, M. A., Upadhyay, V. K., Kelly, A. L., (2006). High-pressure-induced changes in bovine milk: a review. Department of Food and Nutritional Sciences, University College Cork, Cork, Ireland
61. Huppertz, T., Fox, P. F., de Kruif, K. G. & Kelly, A. L. High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1764**, 593–598 (2006).

62. Indyk, H. E, Williams, J. W., and Patel, H. A. (2008), 'Analysis of denaturation of bovine IgG by heat and high pressure using an optical biosensor', *Int Dairy J*, 18, 359-366.
63. J. Octavio Rodiles-López, Ma. Eugenia Jaramillo-Flores, Gustavo F. Gutiérrez-López, Andrés Hernández-Arana, Rosa E. Fosado-Quiroz, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Humberto Hernández-Sánchez, Effect of high hydrostatic pressure on bovine α -LACctalbumin functional properties, *Journal of Food Engineering*, Volume 87, Issue 3, 2008, Pages 363-370.
64. Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P., Brulé, G. (2007). *Sciences des aliments, technologie des produits laitiers*. Volume 2, p15-25
65. Jimenez-Lopez, A.J.E., Leconte, N., Dehainault, O., Geneste, C., Fromont, L., Gésan-Guiziu, G. (2008). Role of milk constituents on critical conditions and deposit structure in skimmilk microfiltration (0.1 μm), *Séparation and Purification Technology*, Volume 61, Issue 1, 6 June 2008, Pages 33-43, ISSN 1383-5866, <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2007.09.023>.
66. José T.-S., Alexander T., & Ulrich K., (2011). Fractionation of α -LACctalbumin and β -Lactoglobulin from Whey Protein Isolate Using Selective Thermal Aggregation, an Optimized Membrane Separation Procedure and Resolubilization Techniques at Pilot Plant Scale. *Food Bioprocess technology*.
67. Jung S., Ghoul M., de Lamballerie-Anton M. (2003). Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. *LWT - Food Sci. Technol.* 36, 625-631.
68. Katsanos, C., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Asle, A., Robert W. (2006). A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* (2006). **DOI:** 10.1152/ajpendo.00488.2005

69. Katsutoshi N. Shintaro S. (1989). The evolution of lysozyme and α -lactalbumin. From the analysis of phylogenetic trees constructed from the amino acid sequences and metal-binding properties of various lysozymes. Department of Polymer Science, Faculty of Science, Hokkaido University
70. Koen, D., Thien, T., (2011). Membrane Separations in Food Processing LE Laboratory of Food Technology and Engineering, Department of Food Safety and Food Quality, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University.
71. Hosseini, T. Ismail, A.A., Kubow, S. (2002). Journal of food science-Vol. 67, Nr. 4, 2002.
72. Laetitia Bonnaillie, Peggy M. Tomasula, Protein fractionation. Whey processing, functionality and health benefits. John Wiley & Sons. 2009
73. Li, H., Fane, A. G., Coster, H. G. L. & Vigneswaran, S. Direct observation of particle deposition on the membrane surface during crossflow microfiltration. *J. Membr. Sci.* **149**, 83–97 (1998).
74. Marcelo P. A. and Rizvi, S. S. H. in Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food and Biotechnological Applications, ed. A. K. Pabby, S. S. H. Rizvi and A. M. Sastre, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2009, pp. 635–669.
75. McMahon, D. J. Brown, R.J. (1982). Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review¹, Journal of Dairy Science, Volume 67, Issue 3, 1984, Pages 499-512, ISSN 0022-0302, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81332-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81332-6).
76. Messens, W., Van Camp, J.; Huyghebaert, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. Trends Food Sci. Technol. 1997, 8, 107-112.

77. Mullally, M.M. Meisel, H. FitzGerald, R.J. (1997). Identification of a novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin, *FEBS Lett.* 402 (1997) 99–101.
78. Marella, C. et al. 2011. Evaluation of commercially available, wide-pore ultrafiltration membranes for production of α -LACtalbumin-enriched whey protein concentrate. *Journal*
79. Marshall, A.D. Munro, P.A. Trägårdh, G. (1993). The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: A literature review, *Desalination*, Volume 91, Issue 1, 1993, Pages 65-108, ISSN 0011-9164.
80. Mathilde Leu, Alice Marciniak, Julien Chamberland, Yves Pouliot, Laurent Bazinet, Alain Doyen, Effect of skim milk treated with high hydrostatic pressure on permeate flux and fouling during ultrafiltration, *Journal of Dairy Science*, Volume 100, Issue 9, 2017, Pages 7071-7082, ISSN 0022-0302.
81. Mazri, C. et coll. 2012. Effect of high-pressure treatment on denaturation of bovine β -lactoglobulin and α -LACtalbumin. *European Food Research and Technology*. 234, 5 (2012), 813–819
82. Nelson, B.K. Barbano, D.M. (2005). A Microfiltration Process to Maximize Removal of Serum Proteins from Skim Milk Before Cheese Making*, *Journal of Dairy Science*, Volume 88, Issue 5, 2005, Pages 1891-1900, ISSN 0022-0302, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72865-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72865-4).
83. Nongonierma, B, A., Richard J. F., Department of Life Sciences, and Food for Health Ireland (FHI), University of Limerick, Limerick, Ireland. *Journal of Functional Foods* 17 (2015) 640–656

84. Octavio Rodiles Lopez, J., Gustavo, F.G., Humberto, H., 'aria, J-F. (2008) Effects of high hydrostatic pressure on bovine alpha-lactalbumin functional properties. *Journal of Food Engineering* 87 (2008) 363–370
85. Paulen, R. & Fikar, M. Optimal operation of batch membrane processes. *Optimal Operation of Batch Membrane Processes* (2015). doi:10.1007/978-3-319-20475-8.
86. Patazca, E., Koutchma, E., Balasubramaniam, V., 2007. Quasi-adiabatic temperature increase during high pressure processing of selected foods. *J. Food Eng.*
87. Patel, A. H., Singh H., Skelte, G., Anema, S.G., Lawrence K. Creamer, K.J. (2006). Effects of Heat and High Hydrostatic Pressure Treatments on disulfide Bonding Interchanges among the Proteins in Skim Milk. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 3409-3420 3409. American Chemical Society.
88. Patterson, M. F. And Kilpatrick, D. J. (1998). The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *J Food Protect*, 61, 432-436.
89. Pérez-Gago, M. & Krochta, J.M. (2002) Formation and properties of whey proteins films and coatings. In *Protein-based Films and Coatings*, p. 650. Edited by A. Gennadios. USA: CRC Press.
90. Permyakov, E., Berliner, L. (2000). α -Lactalbumin : structure and function. *Febs Lett* 473, 269–274
91. Permyakov, A.E. Kretsinger, R.H., Uversky, V.N. (2013). *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer 2013.

92. Premaratne, R.J. Cousin, M.A. Changes in the Chemical Composition During Ultrafiltration of Skim Milk¹, *Journal of Dairy Science*, Volume 74, Issue 3, 1991, Pages 788-795, ISSN 0022.
93. Producteurs de lait du Québec. Site web 2018
94. Proctor, Andrew. (2011). *Alternatives to Conventional Food Processing*. Royal Society of Chemistry. 184-253
95. Pierre Aimar., Christine Taddei., Jean-Pierre Lafaille., Victor Sanchez. (1988). Mass transfer limitations during ultrafiltration of cheese whey with inorganic membranes. *Journal of Membrane Science*, Volume 38, Issue 3, 1988, Pages 203-221, ISSN 0376-7388.
96. Pierre Jouan. (2002). *Lacto-protéines et lacto-peptides : propriétés biologiques*. 2002. Institut national de la recherche agronomique, France.
97. Pieter Walstra, On the Stability of Casein Micelle, *Journal of Dairy Science*, Volume 73, Issue 8, 1990,
98. P.S. Tong, D.M. Barbano, M.A. Rudan, Characterization of Proteinaceous Membrane Fouling and Flux Decline During the Early Stages of Whole Milk Ultrafiltration, *Journal of Dairy Science*, Volume 71, Issue 3, 1988, Pages 604-612.
99. Robert van Reis, Andrew Zydney, Bioprocess membrane technology, *Journal of Membrane Science*, Volume 297, Issues 1–2, 2007, Pages 16-50, ISSN 0376-7388,
100. Rosina López-Fandiño. (2006). High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology, *International Dairy Journal*, Volume 16, Issue 10, 2006.

101. Ribadeau-Dumas, B. (1981). Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. *Rev. Lait*, 17-32.
102. Ribadeau-Dumas, B. 1979. Progrès récent dans la biochimie des protéines du lait. *Revue laitière Française.*, 1979, 371.45-49.
103. Ribadeau-Dumas et Grappin, R. (1989). Milk protein analysis. *Lait* 69 (1989) 357-416 DOI: 10.1051/lait:1989527
104. Rivalain, N., Roquain, J. & Demazeau, G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. *Biotechnol. Adv.* **28**, 659–672 (2010).
105. Salladini, A., Prisciandaro, M. & Barba, D. (2007) Ultrafiltration of biologically treated wastewater by using backflushing. *Desalination* 207(1-3), 24-34.
106. Sarma, R. Sandip P. (2012). Effect of pressure on the solution structure and hydrogen bond properties of aqueous N-methylacetamide, *Chemical Physics*, Volume 407, 2012, Pages 115-123, ISSN 0301-0104.
107. Sawyer, L. in *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th Edition **1**, 1–548 (2013).
108. Smiddy, M., Goff, H. D. & Kelly, A. L. Effects of high-pressure treatment of mix on ice cream manufacture. *Int. Dairy J.* **21**, 718–726 (2011).
109. Soenen, S., Waelen, A.H., Margaret, S.W-P. (2011). Efficacy of α -Lactalbumin and Milk Protein on Weight Loss and Body Composition During Energy Restriction. *Obesity*. 19, 2 (2011), 370–379.

110. Shübler, H. (1818). Cité par Fox, P.F. et Brodkorb, A. (2008), the casein micelle: historical aspects, current concepts and significance.
111. Standard IDF 20B: 1993/ISO CD 8968/AOAC 991.20.
112. Swaisgood, H.E., 1982. Chemistry of milk protein. In: Fox, P.F. (Ed.), Proteins. Developments in Dairy Chemistry, vol. 1. Elsevier Applied Science, London, UK, pp. 1–59
113. Thompson, Abby Boland, Mike Singh, Harjinder. (2014). Milk Proteins - from Expression to Food. Elsevier 2014. 202-232. Online version available at: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMPEF0001/milk-proteins-from-expression/milk-proteins-from-expression>
114. Tan, TJ et coll. 2014. A physicochemical investigation of membrane fouling in cold microfiltration of skim milk. *Journal of Dairy Science*. 97, 8 (2014), 4759–4771
115. Tolkach, A. & Kulozik, U. (2006) Transport of whey proteins through 0.1 mm ceramic membrane: phenomena, modelling and consequences for concentration or diafiltration processes. *Desalination*, **199**, 340–341.
116. Tanford, T. Paritosh, K. Valerie, G. T. (1960). The Role of the α -Helix in the Structure of Proteins. Optical Rotatory Dispersion of β -Lactoglobulin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82 (23), pp 6028–6034. **DOI:** 10.1021/ja01508a015
117. Boland, M. Singh, H. and Thompson, A. Milk Proteins: From Expression to Food, Elsevier Science, 2nd edn, 2014.
118. Tonello, C. (1998). Applications des hautes pressions en agroalimentaire. *Techniques de l'Ingénieur*, traité de Génie des procédés. F 3 220, 14 p

119. Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstrete, W. (2002). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 51, 1 (2002), 75–87
120. Voigt, D. D., Kelly, A. L. & Huppertz, T. in *Emerging Dairy Processing Technologies: Opportunities for the Dairy Industry*, First Edition (2015). doi: 10.1002/9781118560471.ch3
121. Voswinkel, L., Kulozik, U., 2011. Fractionation of whey proteins by means of membrane adsorption chromatography. *Food Process Engineering and Dairy Technology*, ScienceDirect, *Procedia Food Science* 1 (2011) 900 – 907
122. Williams, Peter A Phillips, Glyn O. (2014). *Gums and Stabilisers for the Food Industry 17 - The Changing Face of Food Manufacture - The Role of Hydrocolloids - 2.3 Milk Protein Ingredients*. Royal Society of Chemistry
123. Wenshan Guo, Huu-Hao Ngo, Jianxin Li (2012). A mini-review on membrane fouling, *Bioresource Technology*, Volume 122, 2012, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.089>.
([Http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412007134](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412007134)).
124. Yuste, J. Capellas, M. R. Fung, D. Y. And Mor-Mur, M. (2001). High pressure processing for food safety and preservation: a review1. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 9: 1-10. doi:10.1111/j.1745-4581. 2001.tb00223.x
125. Zheng, F., Li, C., Yuan, Q. & Vriesekoop, F. (2008) Influence of molecular shape on the retention of small molecules by solvent resistant nanofiltration (SRNF) membranes: A suitable molecular size parameter. *Journal of Membrane Science*, **318**, 114–122.

126. Zulewska, J. & Barbano, D. M. (2013). Influence of casein on flux and passage of serum proteins during microfiltration using polymeric spiral-wound membranes at 50°C, *Journal of Dairy Science*, Volume 96, Issue 4, 2013, Pages 2048-2060, ISSN 0022-0302.