

SOPHIE IZMIROGLU

**EFFETS DE LA PASTEURISATION SUR LES
INTERACTIONS ENTRE LES PROTÉINES DE LA
MEMBRANE DE GLOBULE DE GRAS LAITIER ET
LES MICELLES DE CASÉINE DU BABEURRE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en sciences et technologie des aliments
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences, M.Sc.

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

2010

RÉSUMÉ

Le babeurre constitue la phase aqueuse extraite de la masse de beurre obtenue lors du barattage de la crème. Avec une composition similaire à celle du lait écrémé, le babeurre présente un fort potentiel de valorisation pour l'industrie fromagère. Son utilisation en fromagerie demeure toutefois limitée par plusieurs défauts technologiques. Par exemple, il augmente le temps de coagulation à la présure, conduit à des caillés plus friables et diminue leur fermeté. Pour expliquer ce phénomène, les présents travaux sont basés sur l'hypothèse que les fragments de la membrane de globule de gras laitier interagiraient directement avec les micelles de caséine suite à l'application d'un traitement thermique et interféreraient de ce fait dans l'environnement physicochimique de ces dernières, nuisant par conséquent à leur coagulation.

Le but du projet de recherche est de caractériser les interactions liant les micelles de caséine aux protéines du babeurre afin de mieux comprendre le comportement du babeurre en système fromager. Pour ce faire, des micelles de caséine de babeurre de crème crue et de babeurre de crème pasteurisée (90°C, 20 secondes) ont été isolées par centrifugation. Leur taille, leur charge et leur composition protéique ont été déterminées. Les résultats obtenus ont permis de montrer que la pasteurisation favorisait la création de complexes entre les micelles de caséine et les protéines de la membrane de globule de gras laitier. Selon des résultats obtenus à partir de gels électrophorétiques de polyacrylamide réalisés en 2 dimensions (1^{ère} dimension en conditions non-réductrices et 2^{ème} dimension en conditions réductrices), ces complexes seraient maintenus par des liens covalents mettant en jeu des liaisons disulfures. Les résultats de gels électrophorétiques de polyacrylamide cette fois réalisés en 1 dimension, alternativement avec et sans ajout d'agent réducteur, montrent que les mécanismes d'interaction feraient notamment intervenir la PAS 6/7, la butyrophiline ainsi que la caséine κ . Par ailleurs, les caséines κ jouent un rôle majeur dans la coagulation fromagère et leurs liens avec les autres protéines sont reconnus pour diminuer cette fonction. Les liens unissant ces dernières aux protéines de la membrane de globule de gras laitier peuvent donc constituer une explication des défauts technologiques apportés par l'utilisation du babeurre de crème pasteurisée en fromagerie.

AVANT-PROPOS

Ces travaux ont été subventionnés par l'action concertée FQRNT-Novalait-MAPAQ, en collaboration avec Agriculture et Agroalimentaire Canada. Ce mémoire regroupe les résultats obtenus lors de mes travaux de maîtrise portant sur les effets de la pasteurisation sur les interactions entre les protéines de la membrane de globule de gras laitier et les micelles de caséine du babeurre. Ces résultats ont fait l'objet de deux affiches présentées lors d'un colloque provincial, celui de Novalait, et international, celui de la FIL.

La réalisation de ces travaux n'aurait pu être possible sans la contribution de plusieurs personnes dont je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude envers mon directeur de recherche, le Dr Yves Pouliot, qui m'a permis de développer et d'élargir tout au long de cette maîtrise mes connaissances et mes compétences techniques, mon autonomie et mon sens critique. Sa patience, sa sagesse et son savoir-faire m'ont été indispensables pour la réalisation de ces travaux.

Je tiens également à remercier mon co-directeur, le Dr Laurent Bazinet, tant pour ses admirables qualités humaines que pour ses précieux conseils et son continuel soutien tout au long de ce projet.

Je remercie également le Dr Michel Britten pour ses judicieux conseils et son soutien pour plusieurs parties de ce mémoire. Sa rigueur scientifique m'a été des plus profitables tout au long de mon apprentissage.

Je tiens à remercier tous les professionnels de recherche et tous les techniciens qui m'ont aidé à réaliser mes expérimentations et qui ont facilité l'avancement de mes travaux. Je souligne en particulier l'aide incalculable de Madame Diane Gagnon, Monsieur Gaétan Desnoyers, Madame Mélanie Martineau, Madame Jocelyne Giasson et Monsieur Pascal Cliche.

Je tiens également à souligner l'aide technique et le soutien moral de mes collègues de travail. Leur présence a rendu ces années inoubliables.

Finalement, mes plus profonds remerciements à mes parents, Rolande Bégin et Unal Izmiroglu pour le soutien moral et financier qu'ils m'ont offert, leurs continuels encouragements et les précieuses valeurs qu'ils m'ont transmises.

*À mes parents,
Unal Izmiroglu et Rolande Bégin
pour tous les sacrifices
qu'ils ont dû faire pour moi*

TABLES DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 LE GLOBULE DE GRAS LAITIER (GGL).....	4
2.2 OBTENTION DU BABEURRE	6
2.3 COMPOSITION DU BABEURRE.....	8
2.3.1 <i>Les lipides du babeurre</i>	8
2.3.2 <i>Les protéines du babeurre</i>	10
2.3.3 <i>Les minéraux</i>	20
2.3.4 <i>Le lactose</i>	20
2.4 EFFETS DES TRAITEMENTS THERMIQUES SUR LES INTERACTIONS PROTEIQUES DU BABEURRE.....	21
2.4.1 <i>Interactions impliquant les protéines sériques et les micelles de caséine</i> 21	
2.4.2 <i>Interactions impliquant les protéines sériques et les protéines de la MGGL</i> 23	
2.4.3 <i>Interactions impliquant les micelles de caséine et les protéines de la MGGL</i> 24	
2.5 UTILISATION DU BABEURRE EN FROMAGERIE.....	25
2.5.1 <i>Principes de la fabrication fromagère</i>	26
2.5.2 <i>Performances du babeurre en fromagerie</i>	28
CHAPITRE 3 BUT, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	32
CHAPITRE 4 EFFET DE LA PASTEURISATION DE LA CREME SUR LA TAILLE ET LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES MICELLES DE CASEINE DU BABEURRE	33
<i>Résumé</i>	33
4.1 INTRODUCTION.....	34
4.2 MATERIEL ET METHODES.....	37
4.2.1 <i>Fabrication des babeurres de crème crue (BCC) et des babeurres de crème pasteurisée (BCP)</i>	37
4.2.2 <i>Isolation des micelles de caséine</i>	37
4.2.3 <i>Analyse de composition</i>	38
4.2.4 <i>Détermination de la taille des micelles de caséine</i>	38
4.2.5 <i>Détermination de la mobilité électrophorétique</i>	39
4.2.6 <i>Analyses statistiques</i>	42
4.3 RESULTATS	43
4.3.1 <i>Données de composition</i>	43
4.3.2 <i>Effet de la pasteurisation sur la taille et la mobilité électrophorétique des micelles de caséine</i>	45
4.4 DISCUSSION	50
4.5 CONCLUSION	53
CHAPITRE 5 EFFET DE LA PASTEURISATION DE LA CREME SUR LA DISTRIBUTION DES PROTEINES DE LA MGGL AU SEIN DE LA FRACTION CASEIQUE	54
<i>Résumé</i>	54
5.1 INTRODUCTION.....	55

5.2 MATERIEL ET METHODES.....	57
5.2.1 <i>Obtention des fractions de babeurre de crème crue et babeurre de crème pasteurisée</i>	57
5.2.2 <i>Analyse de composition</i>	58
5.2.3 <i>Électrophorèse sur gels de polyacrylamide (SDS-PAGE)</i>	59
5.2.4 <i>Analyse de la densité colorimétrique</i>	62
5.2.5 <i>Analyses statistiques</i>	63
5.3 RESULTATS	64
5.3.1 <i>Analyse de composition</i>	64
5.3.2 <i>Composition protéique</i>	66
5.3.3 <i>Gels électrophorétiques 2D-NR-R-SDS-PAGE</i>	69
5.3.4 <i>Densité colorimétrique</i>	71
5.4 DISCUSSION	74
5.5 CONCLUSION	77
CHAPITRE 6 CONCLUSION GENERALE.....	78
CHAPITRE 7 BIBLIOGRAPHIE	80

TABLE DES FIGURES

Figure 1 Structure d'un globule de gras laitier avec la disposition des principaux constituants de la MGGL	6
Figure 2 Étapes de la formation du beurre	7
Figure 3 Représentation schématique de l'arrangement des sous-micelles dans la formation des micelles de caséine.....	11
Figure 4 Représentation schématique de la micelle de caséine	11
Figure 5 Représentation schématique du potentiel zêta d'un colloïde chargé en suspension	12
Figure 6 Photographie en microscopie à transmission électronique d'une micelle de caséine	13
Figure 7 Séparation des principales protéines de la MGGL par l'utilisation de gels de polyacrylamide colorés au Bleu de Coomassie.....	16
Figure 8 Diagramme de la β -Ig et de la formation de liens disulfures.....	22
Figure 9 Gel électrophorétique (15% acrylamide, conditions réductrices) d'échantillons de MGGL isolés à partir de lait traité à différentes températures pendant 10 minutes.....	24
Figure 10 Photographie au microscope électronique à transmission d'un babeurre de crème crue (à gauche) et d'un babeurre de crème pasteurisée (à droite)	25
Figure 11 Phases de coagulation enzymatique du lait et formation du réseau	27
Figure 12 Photographie au microscope électronique de gels présures faits de a) lait cru b) babeurre de crème crue c) babeurre de crème pasteurisée.....	29
Figure 13 SDS-PAGE (12 % acrylamide) de lait de fromagerie fait à partir de babeurre de crème crue, de babeurre de crème pasteurisée et de babeurre de crème de lait entier pasteurisé.....	30
Figure 14 Représentation schématisée de l'ensemble des étapes effectuées pour la fabrication des lots de babeurre, l'isolation des micelles de caséine et la préparation des échantillons de ces micelles en vue de leur caractérisation	41
Figure 15 Diamètre des micelles (nm) des caséines du babeurre et des fractions laitières contrôles de lait écrémé et de crème en fonction de la pasteurisation et du pH.....	48
Figure 16 Mobilité électrophorétique ($\mu\text{m.cm/V.s}$) des caséines du babeurre et des fractions laitières contrôles de lait écrémé et de crème en fonction de la pasteurisation et du pH.....	49
Figure 17 Schéma du 2D-PAGE (première dimension NR-SDS-PAGE; seconde dimension R-SDS-PAGE).....	61
Figure 18 Séparation des principales protéines de la MGGL par l'utilisation de gels de polyacrylamide colorés au Bleu de Coomassie	62
Figure 19 Gels NR-SDS-PAGE et R-SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide des fractions de babeurre, de lait écrémé et de crème.....	68
Figure 20 Gels 2D-NR-R-SDS-PAGE 12,5% acrylamide sur les échantillons BCCcc (a) et BCPcc (b).....	70
Figure 21 Délimitation des régions d'intérêt pour l'analyse de la densité colorimétrique des gels 1D-R-SDS-PAGE des échantillons de babeurre	71
Figure 22 Proportion relative occupée par les protéines de la MGGL dans les culots caséiques des fractions de BCC et BCP en fonction de l'application d'une pasteurisation.....	73

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 Composition moyenne estimée du GGL et de la MGGL _____	5
Tableau 2 Comparaison de la composition chimique du babeurre et du lait écrémé _____	8
Tableau 3 Composition lipidique du babeurre _____	9
Tableau 4 Variation du potentiel zêta (ζ) des micelles de caséine en fonction du pH et de la température du lait _____	13
Tableau 5 Poids moléculaires des protéines majeures de la MGGL du babeurre en comparaison avec les autres principales protéines _____	17
Tableau 6 Comparaison de la composition minérale du babeurre et du lait écrémé _____	20
Tableau 7 Effet du pH sur l'association des protéines sériques aux micelles de caséine dans le lait, résultant d'un chauffage à 90°C pendant 30 minutes _____	23
Tableau 8 Composition en solides totaux, lipides et protéines des fractions laitières de babeurre, de lait écrémé et de crème, pour les fractions crues et pasteurisées _____	44
Tableau 9 Diamètre (nm) et mobilité électrophorétique ($\mu\text{m.cm/V.s}$) des micelles des caséines du babeurre et des fractions laitières contrôles, en fonction de la pasteurisation et du pH _____	47
Tableau 10 Abréviations des différentes fractions laitières analysées _____	58
Tableau 11 Composition en protéines (% sur base sèche) des culots et des surnageants des différentes fractions laitières de babeurre, de lait écrémé et de crème obtenus par centrifugation, pour les fractions crues et pasteurisées _____	65
Tableau 12 Proportion relative (%) des différentes régions d'intérêt dans les surnageants et les culots de babeurre de crème crue et de crème pasteurisée _____	72

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

ADPH	Adipophiline
α -la	Alpha-lactalbumine
β -lg	Bêta-lactoglobuline
BTN	Butyrophiline
CD 36	Cluster of differentiation
CER	Céramide
CMP	Caséinomacropéptide
FABP	Fatty Acid Binding Protein
GGL	Globule de gras laitier
MGGL	Membrane de globule de gras laitier
MUC1	Mucine 1
NR-SDS-PAGE	Non-Reducing Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAS III	Periodic Acid Schiff III
PAS 6/7	Periodic Acid Schiff 6/7
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine

PI	Phosphatidylinositol
PM	Poids moléculaire
PS	Phosphatidylsérine
R-SDS-PAGE	Reducing Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SM	Sphingomyéline
UF	Ultrafiltration
XDH/XO	Xanthine déhydrogénase/oxydase
2D SDS-PAGE	2 Dimensions Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Chapitre 1 Introduction

Au Québec, l'industrie du beurre implique annuellement un volume de production pouvant atteindre 30 701 tonnes, duquel peut être estimée une quantité similaire de babeurre, l'unique co-produit généré (Groupe Agéco, 2009). Le babeurre constitue la phase aqueuse extraite de la masse butyrique obtenue suite au barattage de la crème et contient essentiellement tous les composés hydrosolubles laitiers, soit le lactose, les protéines et les minéraux. Cette composition apparente fortement le babeurre au lait écrémé. Le babeurre se distingue toutefois de ce dernier et des autres systèmes laitiers par une teneur accrue en lipides polaires, due à la présence des fragments de membranes de globules de gras laitiers (MGGL), qui se retrouvent libérés lors du processus de barattage. Ces fragments de composition essentiellement lipidique et protéique constituent une source unique de phospholipides auxquels sont d'ailleurs attribuées de nombreuses propriétés fonctionnelles intéressantes pour l'industrie de la formulation alimentaire. Ces lipides polaires, ainsi que certains complexes lipoprotéiques présents dans le babeurre, seraient également aptes à procurer des fonctions nutraceutiques aux produits, notamment en agissant positivement sur la cholestérolémie et sur la réduction du risque de certains types de cancers (Astaire et al., 2003; Noh & Koo, 2004; Spitsberg, 2005; Rombaut & Dewettinck, 2006; Dewettinck et al., 2007).

À l'heure actuelle, c'est principalement à l'industrie de la biscuiterie, de la boulangerie et de l'alimentation animale à qui revient la plus grande utilisation des volumes disponibles de babeurre. L'utilisation optimale du babeurre demeure toutefois limitée par quelques défauts technologiques. Notamment, de par son contenu lipidique, ce co-produit est facilement oxydable. De plus, les fragments de MGGL qu'il contient nuiraient à sa capacité stabilisatrice dans les mousses et les émulsions formées et dans sa capacité à retenir le gras (Wong & Kitts, 2003). Afin d'améliorer ces particularités technologiques, de nombreux travaux ont visé à réduire la teneur de ces fragments contenus dans le babeurre par des méthodes de filtration membranaire (Surel & Famelart, 1995; Astaire et al., 2003; Morin et al., 2004; Morin et al., 2007a, Morin et al., 2007b). Or, la similitude des tailles entre les particules, la capacité des caséines à favoriser les phénomènes de polarisation des membranes et le potentiel de réactivité entre les caséines et les fragments de MGGL limitent

grandement les possibilités de fractionnement sur la base de la taille. Pour toutes ces raisons, l'homologue de composition du babeurre, le lait écrémé, demeure bien souvent une alternative plus profitable.

Cette situation peu favorable pour l'industrie du beurre suscite la recherche de nouvelles voies de valorisation du co-produit pour rentabiliser les volumes disponibles. De récents travaux prometteurs, à cet effet, ont permis d'évaluer la possibilité de récupérer les volumes de babeurre dans les laits destinés à l'industrie fromagère. En effet, la forte ressemblance du babeurre au lait écrémé, particulièrement en ce qui a trait au contenu caséique, motive cette avenue qui permettrait ainsi de réduire les quantités de babeurre disponibles au profit d'une meilleure rentabilité de la production fromagère. Les résultats de ces travaux ont toutefois montré que l'incorporation d'une quantité supérieure à 5-10% de babeurre menait à l'apparition de certains défauts fromagers tels que l'obtention d'une friabilité accrue, d'une humidité supérieure, d'une augmentation du temps de coagulation et requerrait inévitablement l'instauration de plusieurs changements dans le procédé fromager afin de pallier à ces défauts (Joshi et al., 1994; Turcot et al., 2002; Govindasamy-Lucey et al., 2006; Govindasamy-Lucey et al., 2007). Bien que le fort contenu en phospholipides du babeurre et la présence des fragments de MGGL dans l'environnement physicochimique des micelles de caséine pourraient en partie expliquer les défauts technologiques observés, d'autres travaux ont permis de montrer que les traitements thermiques commercialement appliqués à la crème préalablement au barattage jouaient également un rôle majeur sur le comportement fromager du babeurre (Morin et al., 2008). Le manque d'informations sur la composition fine du babeurre et son mode d'interaction suite à des traitements thermiques laissent toutefois peu d'indices quant aux mécanismes pouvant expliquer ce phénomène. Ces travaux soulèvent tout de même l'hypothèse que l'établissement de liens physicochimiques et/ou chimiques résultant des traitements thermiques serait favorisé, ce qui nuirait à la coagulation enzymatique des micelles et expliquerait de ce fait la friabilité des caillés obtenus et l'augmentation du temps de coagulation.

Le présent projet de recherche vise donc à caractériser les effets des traitements thermiques sur les interactions entre les micelles de caséine du babeurre et les

fragments de MGGL. Les résultats obtenus permettront une maîtrise accrue des propriétés technologiques du babeurre utilisé en fromagerie en apportant des pistes sur les conditions pouvant contrer les défauts fonctionnels observés. Dans une plus large optique, le gain de connaissances sur les propriétés physicochimiques des constituants du babeurre et leurs interactions permettra aussi de développer des nouvelles voies de valorisation de ce co-produit du beurre.

Chapitre 2 Revue de littérature

2.1 Le globule de gras laitier (GGL)

Le babeurre est la phase aqueuse extraite de la masse de beurre obtenue suite au barattage de la matière grasse laitière. Cette matière grasse laitière constitue entre 3% et 5% de la composition totale du lait cru (Jensen, 2002). Celle-ci peut être concentrée à partir du lait par un traitement de centrifugation (Walstra et al., 2006).

À son état initial, la matière grasse de la crème se présente sous la forme de petites gouttelettes appelées globules de gras. Ces globules de gras, dont le diamètre varie entre <1 et $10\ \mu\text{m}$, se développent dans les cellules de l'épithélium sécrétoire de la glande mammaire bovine (Jensen, 2002; Jiménez-Flores & Brisson, 2008). Au centre du globule se retrouvent les triglycérides à plus bas points de fusion sur lesquels sont superposés les triglycérides à plus hauts points de fusion. La périphérie du globule est quant-à elle constituée d'une membrane appelée MGGL (membrane de globule de gras laitier). Cette membrane d'épaisseur variant entre 10 et 20 nm est composée à 90% de son poids sec de lipides (neutres et polaires) et de protéines, permettant de faire le lien entre le centre apolaire du globule et son environnement aqueux. Le rôle premier de la membrane est de protéger le globule de l'action des enzymes et maintenir celui-ci en suspension colloïdale dans le lait (Singh, 2006; Dewettinck et al., 2007; Jiménez-Flores & Brisson, 2008). Le tableau 1 indique la composition moyenne estimée du GGL (globule de gras laitier) et de la MGGL.

Tableau 1 Composition moyenne estimée du GGL et de la MGGL

(Tableau tiré de Dewettinck et al., (2007))

Constituants	mg /100g de GGL	g/100g de MGGL sur base sèche
Protéines	1800	70
Phospholipides	650	25
Cérébrosides	80	3
Cholestérol	40	2
Monoglycérides	*	?
Eau	*	-
Caroténoïdes et vit A	0,04	0,0
Fe	0,3	0,0
Cu	0,01	0,0
Total	>2570	100

**Présent mais impossible à évaluer*

La composition fine des constituants lipidiques et protéiques ainsi que leur répartition au sein de la MGGL n'ont pas encore été élucidées en raison des limitations des méthodes d'extraction et d'analyse de ces constituants. La distribution des constituants de la MGGL au sein de la membrane serait toutefois dirigée par leur formation dans la glande mammaire, leurs propriétés physicochimiques et leurs affinités. Ainsi, cette répartition asymétrique définirait trois couches distinctes servant au maintien et à l'intégrité du globule de gras, dont une couche interne composée de cholestérol, de lipides polaires et de complexes lipoprotéiques, ayant davantage d'affinités avec le centre apolaire, et une double-couche externe, chargée négativement, permettant d'assurer la stabilité colloïdale du globule dans les matrices laitières (Walstra et al., 2006).

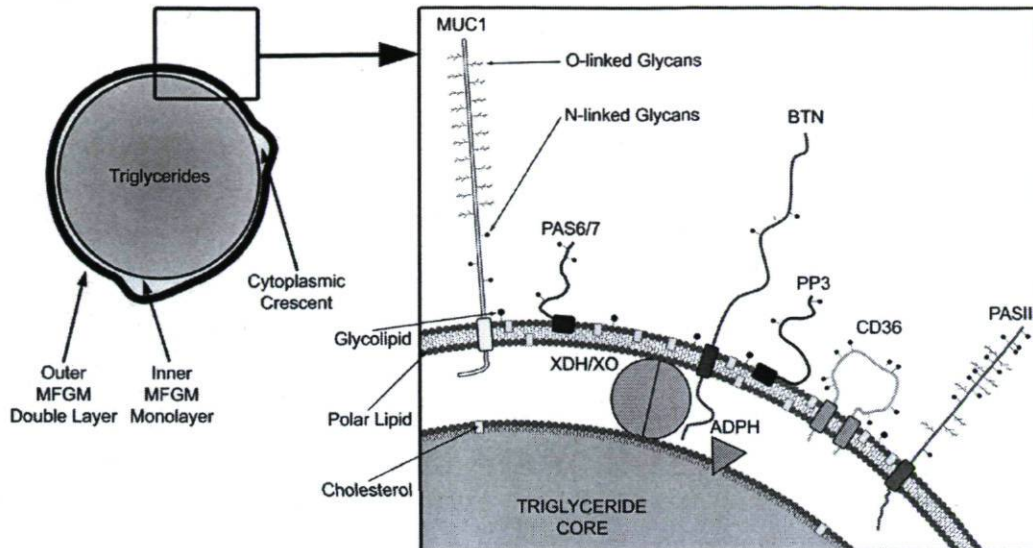


Figure 1 Structure d'un globule de gras laitier avec la disposition des principaux constituants de la MGGL

(Figure tirée de Dewettinck et al., (2007))

2.2 Obtention du babeurre

La MGGL est très sensible aux traitements technologiques tels que le barattage, qui permet la conversion de la crème en beurre, libérant parallèlement le babeurre, la phase aqueuse qui en est extraite. Le barattage est une étape physique qui consiste à déstabiliser la matière grasse laitière préalablement concentrée par l'écémage du lait jusqu'à ce qu'une inversion de phase se produise. Cette déstabilisation s'effectue par l'application de chocs mécaniques qui provoquent l'incorporation d'air à la crème. Un film interfacial est ainsi généré et conduit au déplissement de la β -lactoglobuline (β -lg), de l' α -lactalbumine (α -la) et de la β -caséine qui, en s'établissant aux interfaces des bulles d'air, provoquent la création d'une écume plutôt instable. Les globules de gras, ayant la capacité de réduire la tension de surface, déplacent par la suite les protéines laitières, s'intègrent aux interfaces puis s'agglomèrent. Les chocs de l'agitation mécanique combinés à l'action du refroidissement et de l'incorporation d'air mènent alors à la cristallisation étagée des triglycérides commençant par les plus saturés possédant les plus hauts points de fusion. Une contraction est alors générée causant des fissures qui permettent aux triglycérides liquides, logés au centre du globule, d'être libérés. Une coalescence des globules de gras se produit

alors et provoque une inversion de phase qui débute par la formation de grains de beurre. C'est à partir de ces grains de beurre qu'est générée la masse de beurre, laissant dans le babeurre les composés hydrosolubles de la crème (lactose, protéines, minéraux) et les fragments de la MGGL (Hui, 2006).

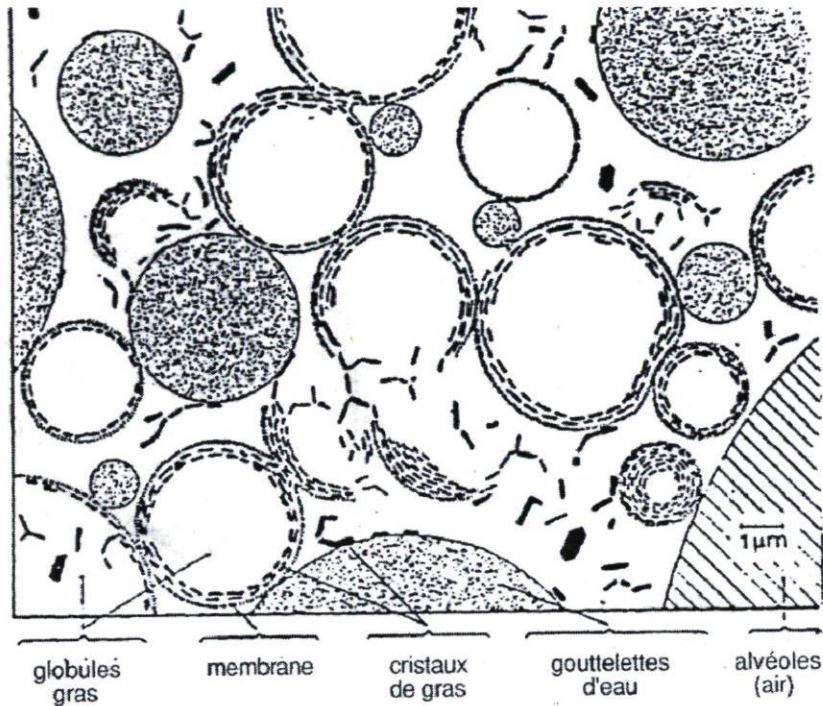


Figure 2 Étapes de la formation du beurre

(Figure tirée de Vuilleumard, (2005))

Un traitement thermique de pasteurisation doit être appliqué à la crème lors de la production commerciale du babeurre afin d'assurer la destruction des microorganismes pathogènes du lait. Les barèmes de pasteurisation appliqués à la crème pour la production de beurre sont plus élevés que ceux normalement appliqués lors de la pasteurisation du lait en raison de la résistance accrue des microorganismes à la chaleur due à l'effet protecteur de la matière grasse. Au minimum, la crème utilisée à la production de beurre doit obligatoirement atteindre 74,4°C pendant 16 secondes afin de détruire les levures, les moisissures, les enzymes (lipases, oxydases) et les bactéries pathogènes susceptibles de s'y retrouver. Toutefois, afin d'améliorer la conservation du beurre, des températures de

chauffage pouvant atteindre jusqu'à 90-95°C sont commercialement appliquées (Hui, 2006).

2.3 Composition du babeurre

La composition du babeurre s'apparente à celle du lait écrémé puisqu'il contient tous les composés hydrosolubles de la crème soit les protéines laitières (caséines et protéines sériques), les minéraux et le lactose. Le babeurre se distingue toutefois des autres systèmes laitiers par la présence de fragments de MGGL générés par le barattage. Ces fragments procurent au babeurre une teneur supérieure en lipides polaires et une diversification accrue en protéines. Le tableau 2 permet de comparer la composition du babeurre à celle du lait écrémé en mettant en évidence le plus fort contenu en lipides totaux du babeurre.

Tableau 2 Comparaison de la composition chimique du babeurre et du lait écrémé

(Données tirées de Ramachandra Rao et al., (1995); Walstra et al., (2006))

Constituants	Babeurre	Lait écrémé
	(g/100mL)	(g/100mL)
Solides totaux	9,5 - 10,6	9,40
Protéines totales	3,30 - 3,90	3,36
Lipides totaux	0,30 - 0,70	0,07
Lactose	3,60 - 4,30	4,80
Minéraux	0,70 - 0,88	0,88

2.3.1 Les lipides du babeurre

Selon les auteurs, la phase lipidique représente entre 30% et 40% de la MGGL et se compose de 28% à 37% de lipides polaires, essentiellement constitués par les phospholipides, des glycolipides et des gangliosides (Danthine et al., 2000). Ce type de lipides a depuis quelques temps été intensivement étudié pour ses effets santé potentiels, notamment en raison de son action positive sur la cholestérolémie, sur

l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses, la dépression, le stress, l'alzheimer et le déclin cognitif associé au vieillissement (Spitsberg, 2005; Dewettinck et al., 2007). D'autres lipides dits neutres, tels que certains triglycérides, diglycérides, monoglycérides ainsi que du cholestérol sont également retrouvés. Les proportions respectives de ces constituants lipidiques sont données au tableau 3.

Tableau 3 Composition lipidique du babeurre

(Tableau tiré de Walstra et al., (2006))

Constituants	g/100mL
Lipides totaux	0,3-0,7
Phospholipides	0,07-0,13
<i>Proportion relative (% des phospholipides totaux) :</i>	
PE	42,90
PI	8,91
PS	8,55
PC	19,10
SM	12,83
CER	7,7
Cholestérol	0,005-0,011

PE= phosphatidyléthanolamine

PI= phosphatidylinositol

PS= phosphatidylsérine

PC= phosphatidylcholine

SM= sphingomyéline

CER= céramides

2.3.2 Les protéines du babeurre

Le contenu protéique du babeurre se compose principalement des caséines et des protéines sériques, constituant près de 90% du contenu protéique du babeurre (Surel, 1993; Turcot et al., 2001). Le reste est occupé par les protéines de la MGGL et les protéines mineures.

2.3.2.1 Les caséines

Les caséines constituent plus de 75% du contenu protéique total du babeurre (Walstra et al., 2006). Celles-ci sont divisées en quatre groupes soit les caséines α -s1, α -s2, β , et κ , chacune occupant un ratio respectif de 11 :3 :10 :4. Ces quatre catégories de caséines se différencient essentiellement par la nature et leur nombre d'acides aminés, le nombre de résidus phosphorylés qu'elles contiennent, leur sensibilité au calcium qui en découle, leur degré d'hydrophobicité et la présence de certains groupements particuliers (Fox, 1992).

Dans le babeurre comme dans le lait, les caséines se retrouvent sous forme de micelles, i.e., de particules colloïdales possédant un arrangement particulier leur attribuant une forme plus ou moins sphérique. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer l'organisation structurale de la micelle. Le modèle sur lequel les présents travaux sont basés est celui élaboré par Slattery & Evard, (1973), puis raffiné par Walstra & Jenness, (1984), selon lequel la micelle formerait un complexe sphérique résultant de la juxtaposition d'un nombre variable de sous-unités (sous-micelles), généralement compris entre 400 et 500, de tailles comprises entre 10 et 15 nm chacune, et dont la cohésion est assurée par la présence d'interactions hydrophobes, électrostatiques et de liens phosphocalciques. Deux types de sous-micelles sont répertoriés, le premier étant composé essentiellement de caséines α et β lui procurant une nature hydrophobe, le second étant quant-à lui formé de caséines α et κ , davantage hydrophile. Selon ce modèle, le centre apolaire des micelles serait essentiellement constitué du premier type de sous-micelles riches en caséine β . La périphérie de la micelle serait quant-à elle composée du second groupe de sous-

micelles riches en caséine κ , dont le résidu glycosylé en C-terminal leur conférerait une hydrophilicité accrue. La figure 3, tirée d'une revue de littérature réalisée par Horne, (2006), sur les principales voies d'organisation micellaire, illustre ce modèle.

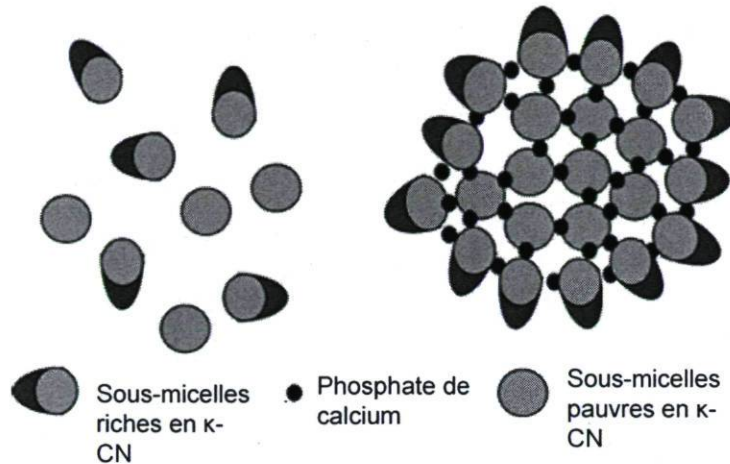


Figure 3 Représentation schématique de l'arrangement des sous-micelles dans la formation des micelles de caséine

(Figure tirée de Horne, (2006))

Tel que récapitulé par Phadungath, (2005), la région C-terminale de la caséine κ serait exposée à l'extérieure de la micelle, lui donnant ainsi une allure qualifiée de « chevelue » dont l'encombrement stérique généré, de pair avec le degré d'hydratation de la micelle, serait un des facteurs stabilisant la structure micellaire.

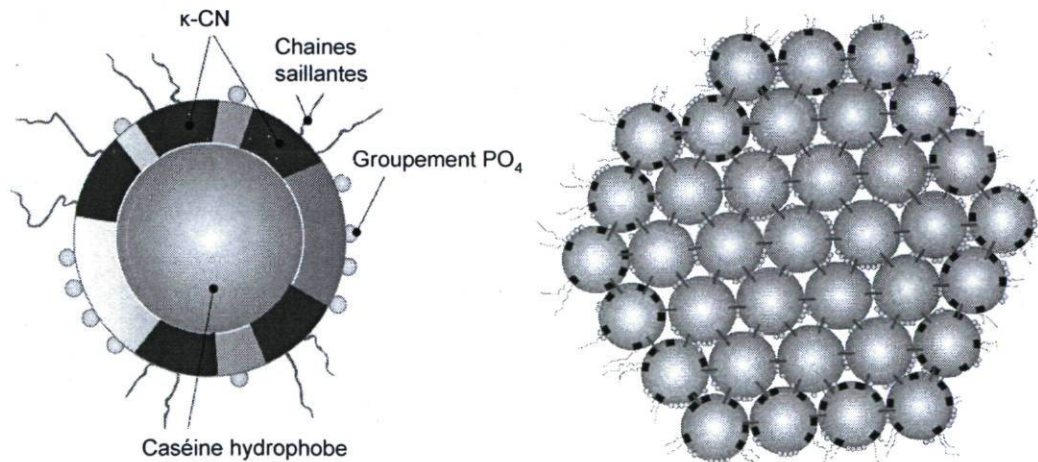


Figure 4 Représentation schématique de la micelle de caséine

(Qi, 2007)

Un second facteur d'importance à la stabilité des micelles de caséine est la charge portée par celles-ci. Au pH normal du lait (6,8), la présence des résidus phosphoséryles, d'acide aspartique et d'acide glutamique de la caséine κ confèrent à la micelle une charge négative uniformément distribuée. Dans le sérum laitier, cette charge est mesurée par le potentiel zêta (ζ) qui prend en considération la présence des contre-ions interagissant à la surface des micelles. Le modèle de la double couche ionique est souvent utilisé pour visualiser de façon générale ce concept (Adamson, 1997). Tel que schématisé à la figure 5, une première double-couche de contre-ions, appelée la couche de Stern, se forme à la surface de la particule chargée. Une seconde couche additionnelle d'ions, à la fois attirés par la particule elle-même et repoussés par la couche de Stern, se superpose à celle-ci. Lorsqu'un champ électrique est appliqué, certains de ces ions se déplacent avec la particule et lui procurent alors une charge nette globale au plan de glissement qui correspond donc au potentiel zêta.

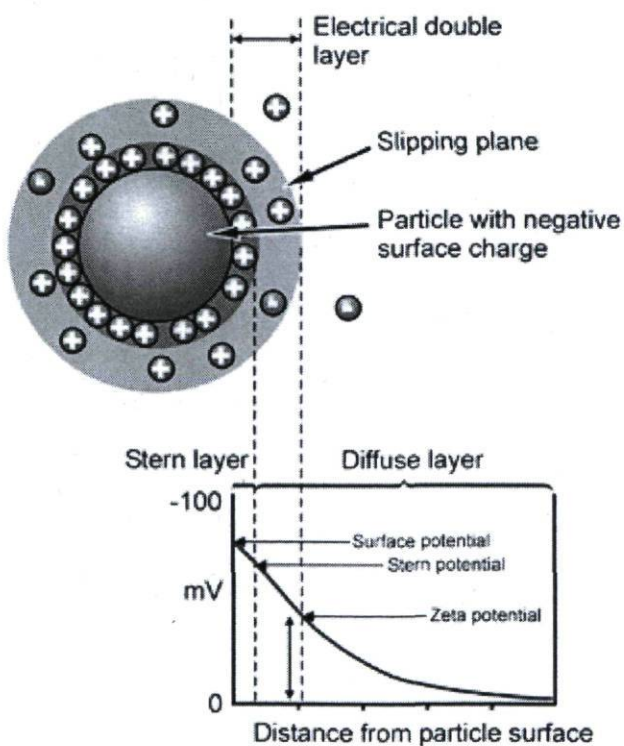


Figure 5 Représentation schématique du potentiel zêta d'un colloïde chargé en suspension

(Figure tirée du site de Malvern Instruments SA, (2009))

Le potentiel zêta est une propriété physicochimique de surface des micelles. Leurs valeurs sont donc dépendantes des conditions environnantes (tableau 4). Au pH normal du lait, soit de 6,8, le potentiel zêta des micelles est inférieur à -20 mV (Mc Mahon & Brown, 1984). Étant ainsi chargées, les micelles demeurent maintenues en suspension colloïdale dans le sérum laitier. La variation de l'environnement micellaire des caséines amenée par la présence d'interactions protéiques, d'une baisse de pH, d'une augmentation du contenu salin ou d'une hydrolyse est toutefois reconnue pour réduire le potentiel zêta et ainsi perturber la stabilité colloïdale des micelles.

Tableau 4 Variation du potentiel zêta (ζ) des micelles de caséine en fonction du pH et de la température du lait

(McMahon & Brown, 1984)

pH	Potentiel (mV)		
	20°C	30°C	45°C
5,7	- 8	- 10	- 14
6,8	- 13	- 17	- 22

Un autre facteur de stabilisation de l'intégrité de la micelle est la fraction minérale composée principalement de phosphate de calcium formant des ponts salins fixés aux résidus phosphorylés des caséines. Cette concentration saline influence fortement la taille de la micelle, celle-ci augmentant directement proportionnellement au contenu salin. La taille des micelles de caséine varie entre 60 et 500 nm, dont la distribution moyenne est estimée à 120 nm (Phadungath, 2005; Fox & Brodkorb, 2008).

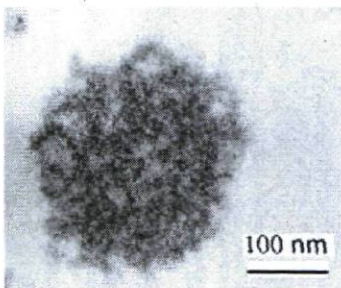


Figure 6 Photographie en microscopie à transmission électronique d'une micelle de caséine

(Figure tirée de Mc Mahon & Mc Manus, (1998))

La micelle de caséine se caractérise par une forte résistance face à la dénaturation thermique, au pH normal laitier (6,8). Cette résistance est due à la présence de résidus proline qui procurent aux caséines une structure plutôt désordonnée, quasi insensible aux effets des traitements thermiques.

L'acidification du lait peut affecter l'intégrité des micelles de caséine. En effet, la diminution du pH du lait permet au phosphate de calcium, liant la structure micellaire, de passer de la phase colloïdale à soluble. Parallèlement, les charges négatives portées par la micelle diminuent graduellement jusqu'à la neutralisation de la micelle, au point isoélectrique des caséines se situant aux environs de pH 4,6. Cette neutralisation favorise le rapprochement des micelles et provoque leur floculation. N'étant plus maintenues en suspension colloïdale, les micelles de caséine se déstabilisent et précipitent.

Outre les traitements acidifiants, la perte d'intégrité des micelles peut aussi être provoquée par voie enzymatique par l'action de la présure, laquelle est impliquée lors de la coagulation fromagère (section 2.5.1). Cette enzyme agit sur la caséine κ située à la surface des micelles et hydrolyse le lien peptidique situé en position 105-106, lequel est constitué d'un résidu de phénylalanine et de méthionine. La micelle, appelée « para-caséine » suite à l'hydrolyse, devient davantage hydrophobe et sensible à la présence de calcium ionique (Ca^{2+}). Sa charge et son degré d'hydratation étant diminués, une agglomération des micelles se produit. La présence d'ions calcium contribue par ailleurs à renforcer ces liens micellaires et facilite la formation du gel présure (Fox, 1992).

2.3.2.2 Les protéines sériques

Les protéines de lactosérum du babeurre représentent la seconde fraction protéique en importance et se retrouvent sous forme soluble. Les deux principales sont la β -lg et l' α -la, constituant 75% des protéines sériques totales, suivies des immunoglobulines, de la sérulalbumine bovine et de la lactoferrine (Fox, 1992). Les protéines de lactosérum se distinguent des micelles de caséine du fait qu'elles ne précipitent pas à pH 4,6, celles-ci ayant des points isoélectriques variant de 5,0 à 5,3. Aussi, leur conformation globulaire les rend très sensibles à la dénaturation

thermique. Cette dénaturation thermique mène à la formation d'interactions avec les autres constituants protéiques dont l'effet peut se répercuter sur les propriétés physicochimiques du système laitier entier. Ces interactions seront abordées à la section 2.4.

2.3.2.3 Les protéines de la MGGL

Avec une concentration variant entre 1% et 2% du contenu protéique total du babeurre, les protéines de la MGGL constituent une autre catégorie de protéines retrouvée dans le babeurre. Celles-ci se retrouvent disposées de façon asymétrique au sein de la membrane (Riccio, 2004; Jiménez-Flores & Brisson, 2008). La principale caractéristique qui distingue les protéines de la MGGL des autres protéines laitières est leur nature fortement glycosylée. Étant principalement isolées par des méthodes électrophorétiques sur gels de polyacrylamide, les protéines de la MGGL se dénombrent à huit protéines majeures, bien qu'une quarantaine ait pu être observée (Mather, 2000). Les principales sont la butyrophiline, constituant 40% du contenu des protéines de la MGGL, suivie de la xanthine déhydrogénase/oxydase représentant quant-à elle 20% (Spitsberg, 2005; Singh, 2006). La figure 7 et le tableau 5 suivants illustrent leur séparation sur gel polyacrylamide et leurs poids moléculaires.

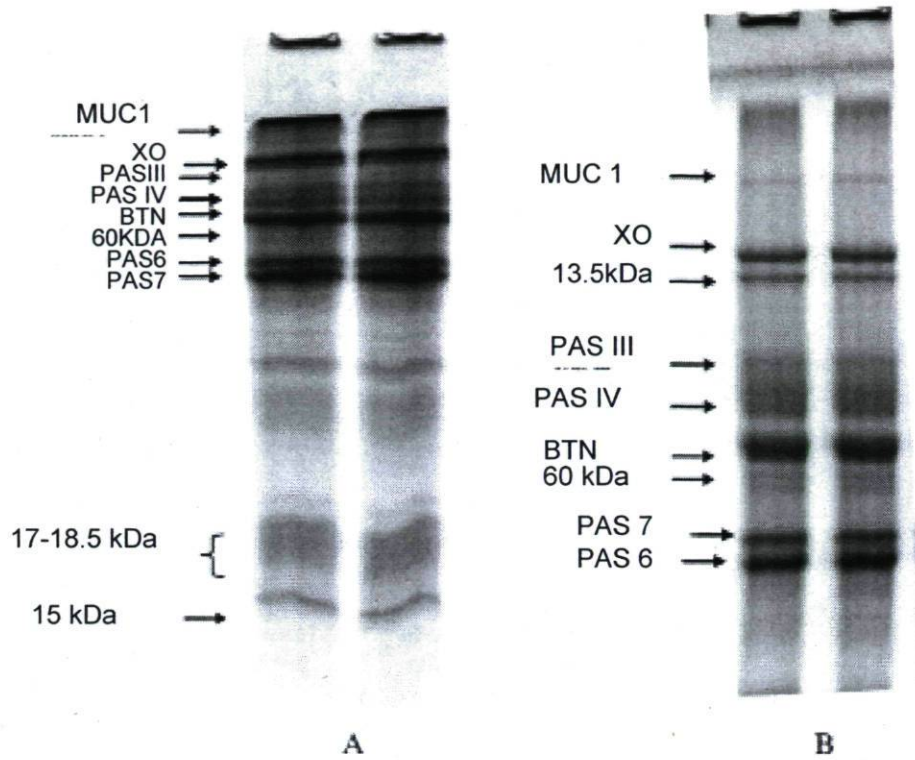


Figure 7 Séparation des principales protéines de la MGGL par l'utilisation de gels de polyacrylamide colorés au Bleu de Coomassie A) 15% et B) 8% de polyacrylamide

(Figure tirée de Singh, (2006))

Tableau 5 Poids moléculaires des protéines majeures de la MGGL du babeurre en comparaison avec les autres principales protéines

(Mather, 2000, Fox 1992)

Protéines majeures de la MGGL du babeurre	Abréviation	Poids moléculaire (Da)
Mucine 1	MUC 1	160 000 - 200 000
Xanthine déhydrogénase/oxidase	XDH/XO	150 000
Periodic Acid Schiff III	PAS III	95 000 – 100 000
Cluster of differenciation	CD 36	76 000 – 78 000
Butyrophiline	BTN	67 000
Adipophiline	ADPH	52 000
Periodic Acid Shiff 6/7	PAS 6/7	48 000 - 54 000
Fatty acid binding protein	FABP	13 000
Autres protéines du babeurre	Abréviation	Poids moléculaire (Da)
Caséine kappa	κ -CN	19 000
Bêta- lactoglobuline	β -lg	18 000
Alpha-lactalbumine	α -la	14 000

Mucine 1 (Muc 1)

La MUC 1 est une protéine hautement glycosylée située sur la surface externe de la membrane. Son point isoélectrique se situe aux alentours de 5,0. Son contenu est estimé à 50% de glucides (sur base sèche) sous forme de fucose, de galactose, de mannose et de N-acetylglucosamine et d'acide sialique. La MUC 1 peut être détectée

par gel électrophorétique de type SDS-PAGE par coloration au bleu de Coomassie par une bande apparaissant autour de 200 kDa (Huott et al., 1995; Mather, 2000). En conditions normales, la MUC 1 est fortement attachée à la membrane. Elle peut toutefois s'y dissocier suite à un refroidissement ou une agitation intense (Singh, 2006). Le rôle premier de cette protéine serait de protéger le globule des chocs mécaniques et des microorganismes pathogènes.

Xanthine déhydrogénase/Oxidase (XDH/XO)

La XDH/XO est la plus abondante des protéines possédant une activité enzymatique. Cette protéine apparaît à 150-155 kDa lorsque résolue sur gel électrophorétique et colorée au bleu de Coomassie (Mather, 2000; Singh, 2006). Cette protéine n'est pas reconnue comme étant glycosylée mais serait fortement attachée à la membrane. Le point isoélectrique de cette protéine se situe entre pH 6,9 et 7,6. La fonction biologique de cette protéine est encore mal définie, cependant la littérature lui attribue des fonctions anti-microbiennes et anti-inflammatoires (Mather, 2000).

Periodic Acid Schiff III (PAS III)

La PAS III est une glycoprotéine de poids moléculaire variant entre 95 et 100 kDa dont la distribution serait principalement concentrée sur la surface externe de la membrane. Cependant, peu d'informations sur les propriétés de cette protéine existent à ce jour (Mather, 2000; Singh, 2006).

Cluster of differentiation (CD36)

La protéine CD 36 compte pour 5% des protéines retrouvées dans la MGGL (Mather, 2000; Singh, 2006). Cette protéine peut être identifiée par une bande sur gel électrophorétique correspondant à un poids moléculaire variant entre 76 à 78 kDa. De nature fortement glycosylée (26% de glucides sur base sèche), cette protéine contient 2 résidus cystéine sur sa structure N et C terminal, pouvant favoriser des liens protéiques lors de l'application de traitements thermiques. Cette protéine aux fonctions biologiques variées (transport d'acides gras, récepteurs, ligands aux cellules apoptotiques) est logée à la surface externe de la MGGL. Son point isoélectrique se situe près de pH 7,5 (Mather, 2000).

Butyrophiline (BTN)

La BTN constitue entre 34% à 43% des protéines de la MGGL ce qui en fait la plus importante des protéines en terme de quantité (Mather, 2000; Singh, 2006). Cette protéine possède un poids moléculaire situé entre 66 et 67 kDa et un point isoélectrique situé à pH 4,96. La BTN dont le nom provient du grec *Butyros Philos*, signifiant affinité pour le gras de beurre, est très fermement retenue à la surface interne de la membrane. La protéine contient des liens disulfures qui semblent jouer un rôle important dans sa stabilité (Mather, 2000).

Adipophiline (ADPH)

L'ADPH est une protéine de poids moléculaire semblable à la PAS 6/7, c'est-à-dire, près de 52 kDa. Bien que ses fonctions soient encore mal connues, elle jouerait un rôle dans le transport intracellulaire des lipides et de la sécrétion du globule de gras. Selon la littérature, cette protéine ne serait pas glycosylée. Elle serait située sur la surface interne de la membrane (Mather, 2000).

Periodic Acid Schiff 6/7 (PAS 6/7)

La PAS 6/7 est une protéine dont le poids moléculaire varie entre 43 et 59 kDa et ayant un point isoélectrique près de pH 7. Cette protéine se retrouve à la surface de la MGGL. Il s'agit d'une protéine glycosylée contenant plusieurs liens disulfures dans sa structure mais sans aucun groupement sulfhydrile libre. Sur gels de polyacrylamide colorés au Bleu de Coomassie, cette protéine apparaît comme une série de bandes complexes (Mather, 2000). Sa fonction principale serait d'ordre immunitaire : elle protégerait le système digestif du nouveau-né en se liant à certains virus (rotavirus) (Mather, 2000).

Fatty Acid Binding Protein (FABP)

La FABP est pour sa part non-glycosylée et de poids moléculaire de 13 kDa. Elle forme une famille d'une vingtaine de protéines dont la fonction physiologique ne serait pas encore complètement élucidée. Elle aurait toutefois un rôle dans la différenciation des cellules mammaires (Mather, 2000).

2.3.3 Les minéraux

Les principaux minéraux retrouvés dans le babeurre sont le calcium, le phosphore, le magnésium, le potassium, le chlore et le sodium. Encore une fois, cette charge minérale apparente le babeurre au lait écrémé bien qu'elle se distingue généralement par des concentrations légèrement plus faibles dans le babeurre, (Walstra & Jenness, 1984; Surel, 1993; O'Connell & Fox, 2000). Le tableau 6 présente la composition minérale contenue dans la poudre de babeurre et la poudre de lait écrémé.

Tableau 6 Comparaison de la composition minérale du babeurre et du lait écrémé

(Walstra & Jenness, 1984)

	Poudre de babeurre	Poudre de lait écrémé
	mg/100g	mg/100g
Cendres	7000-8000	7500-8000
Na	380-530	400-550
K	1550-1650	1550-1750
Ca	1200-1260	1200-1300
Mg	120-140	110-140
Fe	0.5-1	0.3-1.1
P	900-1000	900-1000

2.3.4 Le lactose

Le lactose est le sucre principal du lait et du babeurre. Ce diholoside est composé d'une unité α ou β -glucose et de β -galactose unies par un lien glycosidique C1(β)-C4. Il constitue le seul sucre fermentescible du lait. Le caractère réducteur de ce sucre le rend propice à réagir avec la fonction amine de certains acides aminés basiques tels que la lysine, pour provoquer, sous l'action d'un traitement thermique, un brunissement non enzymatique appelé réaction de Maillard. Mise à part l'aspect visuel, cette réaction amène une saveur particulière pouvant être la cause de certains défauts organoleptiques (Vignola et al., 2002; Walstra, 2006).

2.4 Effets des traitements thermiques sur les interactions protéiques du babeurre

La littérature suggère que les traitements thermiques appliqués lors de la production commerciale de babeurre induisent de nombreux changements physicochimiques au sein des constituants du babeurre. Bien que certains des mécanismes de réaction demeurent encore obscurs, les travaux menés sur ce sujet suggèrent que des interactions entre les micelles de caséine, les fragments de la MGGL et les protéines sériques se produiraient et pourraient expliquer le comportement physicochimique particulier du babeurre.

2.4.1 Interactions impliquant les protéines sériques et les micelles de caséine

Les traitements thermiques ont des effets similaires sur les systèmes laitiers, c'est-à-dire dénaturer et agréger les protéines sériques (Considine et al., 2007). Chez ce type de protéines, ces effets deviennent irréversibles à une température supérieure à 70°C -78°C (De Wit & Klarenbeek, 1984; Kinsella & Whitehead, 1989; Fox, 1995). Un des types d'interactions protéiques les plus documentés concernant les protéines sériques est la formation de liens covalents avec les micelles de caséine. Ces interactions seraient essentiellement attribuables à la β -lg, qui présente dans sa structure deux liens disulfures et un groupement thiol libre, la rendant fortement réactive. Le mécanisme de réaction entre la β -lg et les caséines, plus précisément la fraction κ est présenté à la figure 8. Le groupement thiol Cys 121 libre se lie au groupement Cys 106 laissant le Cys 119 libre. Celui-ci réagit alors avec un second lien disulfure en attaquant le groupement Cys 66 libérant de ce fait le groupement Cys 160. C'est précisément ce lien qui réagirait par la suite avec d'autres groupements sulfures tels que ceux contenus sur la caséine κ ou tout autre groupement sulfure instable porté par les autres protéines du milieu, pouvant soit appartenir à d'autres protéines sériques, aux protéines de la MGGL ou à d'autres types de caséines.

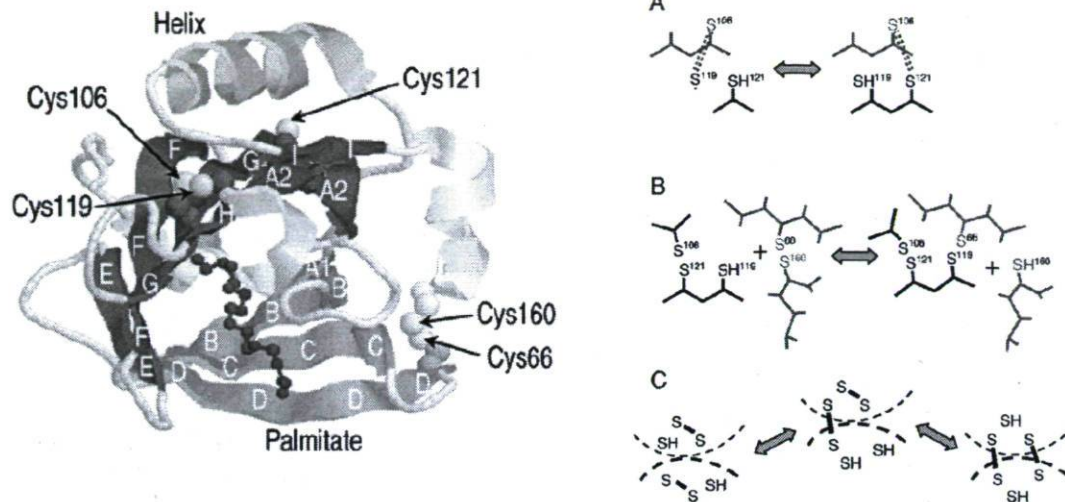


Figure 8 Diagramme de la β -lg et de la formation de liens disulfures
 (a) formation du lien intermoléculaire entre le groupement Cys 106 et Cys 121 b) second lien possible impliquant le lien Cys 66 et 119 c) dimère résultant de l'association de deux moléculaires de β -lg

(Figure tirée de Considine et al., (2007))

Le degré d'association entre les protéines sériques et les micelles de caséine, sous l'action de la chaleur, est fortement dépendant du pH du milieu. Tel que présenté au tableau 7, certains travaux ont démontré que, à un pH de 6,5, près de 70% du total des protéines sériques dénaturées sont associées aux micelles par le biais des caséines κ , davantage accessibles que les autres caséines de la micelle (Anema & Li, 2003). À un pH de 6,7, cette proportion diminue à 31,5%. En effet, à ce pH, une forte proportion des caséines κ se retrouvent dissociées de l'entité micellaire, inhibant alors la création de liens. Cette dissociation peut être observée par une diminution du diamètre micellaire (Anema, 2007). La présence de certaines substances particulières (palmitate, acide linoléique conjugué (CLA), rétinol) sont par ailleurs connues comme étant capables de diminuer la force de ces interactions protéiques (Considine et al., 2007).

Tableau 7 Effet du pH sur l'association des protéines sériques aux micelles de caséine dans le lait, résultant d'un chauffage à 90°C pendant 30 minutes

(Anema & Li, 2003)

pH	Proportion de protéines sériques dénaturées associées aux micelles (%)	Augmentation de la taille des micelles de caséine résultant des interactions (nm)
6,50	70,10	31,5
6,55	59,70	25,5
6,60	51,00	19,3
6,65	44,80	15,3
6,70	31,50	7,8

L' α -la quant-à elle contribue dans une moindre mesure à la création d'interactions protéiques, principalement en raison du fait que malgré ses quatre ponts disulfures, aucun groupement thiol ne soit libre, et aussi parce qu'elle est présente en plus faible concentration. Un de ses liens (Cys 6-120) devient toutefois plus sensible à la coupure en raison de son instabilité et peut expliquer la formation de liens avec les caséines dont le mécanisme se ferait en partie via la β -lg (Kuwajima et al., 1990).

2.4.2 Interactions impliquant les protéines sériques et les protéines de la MGGL

Plusieurs études ont montré la présence d'interactions entre les protéines de la MGGL et les protéines sériques (Dalgleish & Banks, 1991; Houlihan et al., 1992; Sharma & Dalgleish, 1993; Kim & Jiménez-Flores, 1995; Gassi et al., 2008). Les protéines de la MGGL contiennent de nombreux liens disulfures et des thiols libres qui pourraient expliquer cette grande réactivité. Les principaux complexes créés à partir des protéines de la MGGL et des protéines sériques feraient intervenir essentiellement la β -lg et à un moindre degré l' α -la. Ces complexes seraient créés aux environs de 87°C et l'intensité des réactions serait proportionnelle à la

température appliquée (Considine et al., 2007). Bien que les liens disulfures seraient les principaux impliqués, d'autres interactions encore non identifiées pourraient coexister (Kim & Jiménez-Flores, 1995).

Le mécanisme d'interactions entre les protéines de la MGGL et les protéines sériques ferait intervenir la PAS 6/7 (Houlihan, 1992). Suite aux traitements thermiques, ces fragments seraient relâchés dans le sérum laitier. La perte de ces fragments pourrait être le résultat de l'action des protéines de β -lg, ce qui faciliterait ainsi la formation des liens avec les autres protéines de la MGGL (Ye et al., 2004b).

2.4.3 Interactions impliquant les micelles de caséine et les protéines de la MGGL

Les interactions entre les protéines de la MGGL et les différentes fractions caséiques demeurent quant-à elles mal définies. Les travaux menés par Ye et al., (2004b) utilisant les techniques de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions réductrices ont montré que l'application de traitements de chaleur supérieurs à 75°C provoquait une fixation de la caséine κ sur la MGGL isolée par centrifugation (figure 9). Les expérimentations n'ont toutefois pas pu définir si ces liens entre les deux composantes protéiques étaient créés de façon directe ou bien de façon indirecte, c'est-à-dire en faisant intervenir les protéines sériques, reconnues pour interagir tant avec les protéines de la MGGL et les caséines. Ainsi, le recouvrement des caséines κ dans les échantillons de MGGL pourrait provenir du fait que celles-ci aient interagi avec la β -lg avant que cette dernière ne se fixe aux protéines de MGGL.

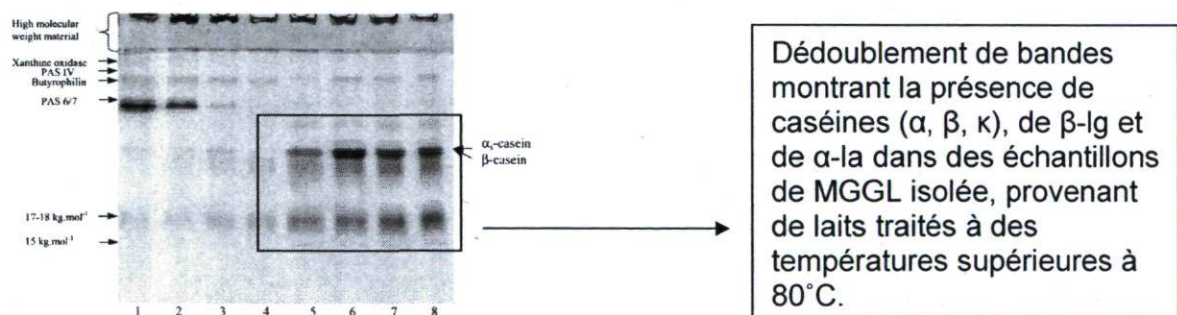


Figure 9 Gel électrophorétique (15% acrylamide, conditions réductrices) d'échantillons de MGGL isolés à partir de lait traité à différentes températures pendant 10 minutes.

1) MGGL crue 2) 65°C 3) 70°C 4) 75°C 5) 80°C 6) 85°C 7) 90°C 8) 95°C

(Figure tirée de Ye et al., (2004b))

D'autres travaux menés par Morin et al., (2007b), utilisant les techniques de microscopie électronique à transmission, ont visé l'étude des effets des traitements thermiques sur la microstructure des composants du babeurre (figure 10). Les résultats ont montré que lorsqu'un traitement de pasteurisation (85°C, 20 sec) était appliqué, les fragments de MGGL semblaient se disposer de façon à entourer les micelles de caséine. Cette disposition pourrait favoriser les interactions entre les deux composantes protéiques.

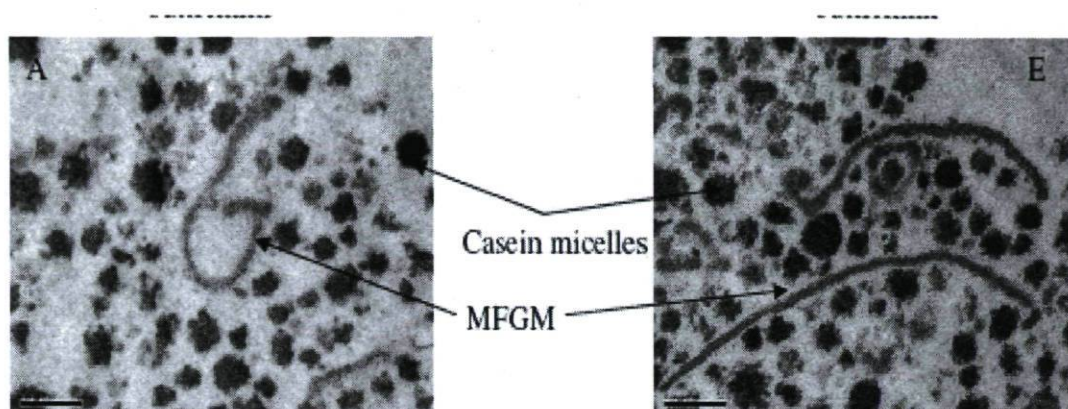


Figure 10 Photographie au microscope électronique à transmission d'un babeurre de crème crue (à gauche) et d'un babeurre de crème pasteurisée (à droite)

(Figure tirée de Morin et al., (2007b))

2.5 Utilisation du babeurre en fromagerie

De nombreux travaux ont visé à évaluer la possibilité d'utiliser les volumes de babeurre disponibles dans les laits de fromagerie en raison du contenu en caséines similaire à celui du lait écrémé.

Il est par ailleurs reconnu que tous changements contribuant à modifier l'environnement stérique des micelles est susceptible d'affecter directement les principaux paramètres de la coagulation fromagère, soit le temps de prise, la fermeté du gel et la friabilité du caillé obtenu. Les liens impliquant les micelles de caséine aux autres protéines du babeurre ont donc par conséquent une importance incontournable dans le comportement du babeurre en fromagerie. Avant d'aborder les particularités technologiques du babeurre en fromagerie et les causes

susceptibles qui s'y rattachent, voici une brève récapitulation des principales notions reliées à la fabrication fromagère.

2.5.1 Principes de la fabrication fromagère

La transformation fromagère comporte essentiellement deux étapes, soit la coagulation, qui permet aux caséines de s'agglomérer suite à une déstabilisation de la structure micellaire, et l'égouttage, qui assure l'expulsion du lactosérum hors du caillé. Une étape supplémentaire d'affinage correspondant à une digestion enzymatique du caillé égoutté peut également être effectuée pour certains fromages lorsqu'une diversification des textures et des arômes est désirée.

2.5.1.1 Coagulation

L'étape de coagulation consiste essentiellement à déstabiliser la structure micellaire des caséines. Elle peut se faire par voie enzymatique par l'entremise de la présure, par voie acide, via l'ajout de ferments lactiques, ou encore parfois par une combinaison des deux traitements.

La coagulation débute par une phase d'hydrolyse, où la caséine κ , logée à la surface des micelles, se scinde au niveau du lien PHE105-MET106 par l'action de la présure. Cette coupure conduit à l'obtention de deux fragments inégaux, le premier, 1-105 restant fixé à la surface de la micelle et le second 106-169, aussi appelé caséinomacropéptidide (CMP), qui est libéré dans le lactosérum. Le départ du CMP lié à l'effet de l'acidification mène à une diminution de la charge portée par les caséines, provoquant ainsi leur rapprochement, caractérisant la phase secondaire de coagulation appelée gélification. La présence d'ions calciques (Ca^{2+}) favorise la création de liens entre les micelles menant à l'agglomération de celles-ci. La figure 11 schématise les deux phases qui caractérisent la coagulation fromagère.

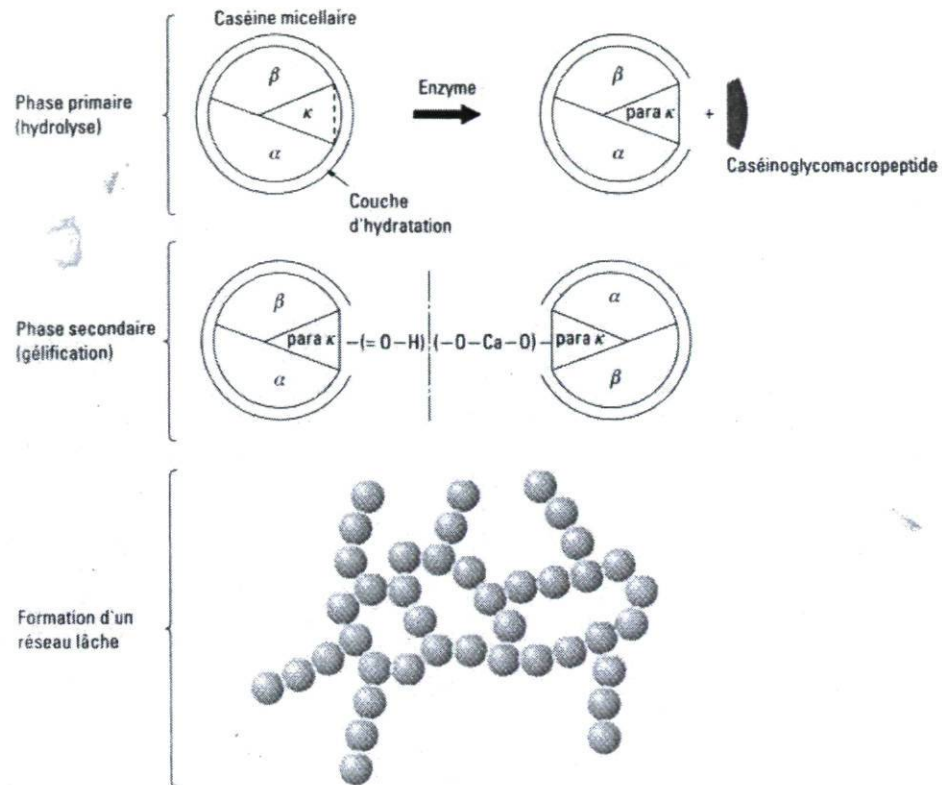


Figure 11 Phases de coagulation enzymatique du lait et formation du réseau

(Figure adaptée de Payens, (1979); Alais, (1984); Mietton, (1995))

Plusieurs facteurs tels que la concentration d'enzyme, la température, le pH, la concentration minérale, la taille des micelles et la teneur en caséines ont une influence directe sur les paramètres de coagulation des micelles. Tout autre facteur capable de modifier l'environnement physicochimique est également susceptible de modifier ces paramètres. Notamment, les traitements thermiques reconnus pour favoriser les interactions protéiques entre les caséines et les protéines sériques sont susceptibles de diminuer la capacité fromagère de ces dernières en raison de l'encombrement stérique généré, nuisant à l'agglomération des micelles.

2.5.1.2 Égouttage

L'égouttage constitue la seconde étape de la fabrication fromagère et permet la séparation du lactosérum du caillé. Lors de cette étape, la plus grande partie des éléments solubles sont éliminés dans le lactosérum. Puisque le degré d'égouttage détermine la quantité d'eau restante dans le caillé, cette étape a une grande influence sur la texture finale du fromage. Le degré d'égouttage varie en fonction de la capacité de contraction du gel qui détermine sa porosité. Ainsi, si le gel se contracte peu en raison d'un manque de cohésion des micelles de caséines, il s'ensuit une forte porosité conduisant à une augmentation de la rétention d'eau menant parfois à l'apparition de certains défauts fromagers tels qu'une plus grande friabilité des caillés.

2.5.2 Performances du babeurre en fromagerie

Plusieurs travaux ont visé à évaluer la possibilité de récupérer les volumes de babeurre disponibles dans les laits de fromagerie (Mistry et al., 1996; Raval & Mistry, 1999; Poduval & Mistry, 1999; Turcot et al., 2001; Govindasamy-Lucey et al., 2006; Govindasamy-Lucey et al., 2007). Les résultats de ces travaux ont montré que l'incorporation d'une quantité supérieure à 5-10% menait à plusieurs défauts de texture tels qu'une friabilité des caillés accrue et une augmentation de leur humidité (Joshi et al., 1994). Ces effets seraient principalement attribuables aux phospholipides présents dans la MGGL qui, par leur polarité accrue, favoriseraient la rétention d'eau nuisant de ce fait à l'égouttage des caillés. De récents travaux effectués par Morin et al., (2008) ont toutefois montré que le comportement fromager du babeurre était d'autant plus affecté lorsqu'un traitement thermique avait été préalablement appliqué à la crème avant le barattage. L'effet des traitements thermiques est tel qu'il provoque une diminution de la fermeté des caillés obtenus et augmente le temps de prise des gels, deux paramètres caractéristiques de la phase de coagulation, plus particulièrement lors de l'agglomération des micelles. Des résultats utilisant la photographie à microscopie électronique ont par ailleurs montré une augmentation considérable de la porosité des gels découlant des babeurres de crème pasteurisée comparativement aux caillés obtenus de babeurre de crème crue ou des gels faits à partir de lait écrémé cru ou pasteurisé.

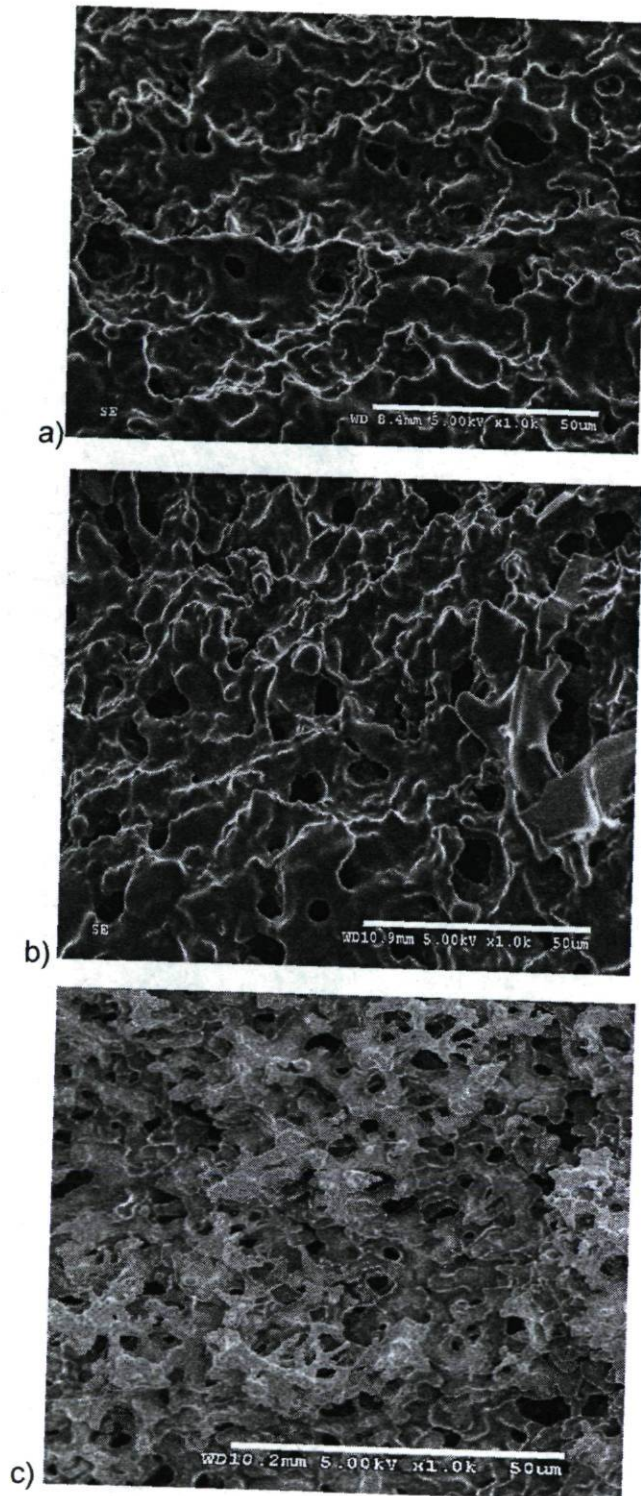


Figure 12 Photographie au microscope électronique de gels présures faits de a) lait cru b) babeurre de crème crue c) babeurre de crème pasteurisée

(Figure tirée de Morin et al., (2008))

Les mécanismes ayant été proposés pour expliquer ces résultats se basent sur la création d'un encombrement stérique autour des micelles de caséine créé par les fragments de MGGL. Les gels électrophorétiques réalisés sur des fractions de lait de fromagerie issues de babeurre de crème crue et de crème pasteurisée montrent d'ailleurs une forte tendance à la précipitation des protéines de MGGL avec les micelles de caséines au point isoélectrique de ces dernières lorsqu'un traitement thermique est appliqué. À l'état cru, ces protéines se retrouvent préférentiellement dans le surnageant.

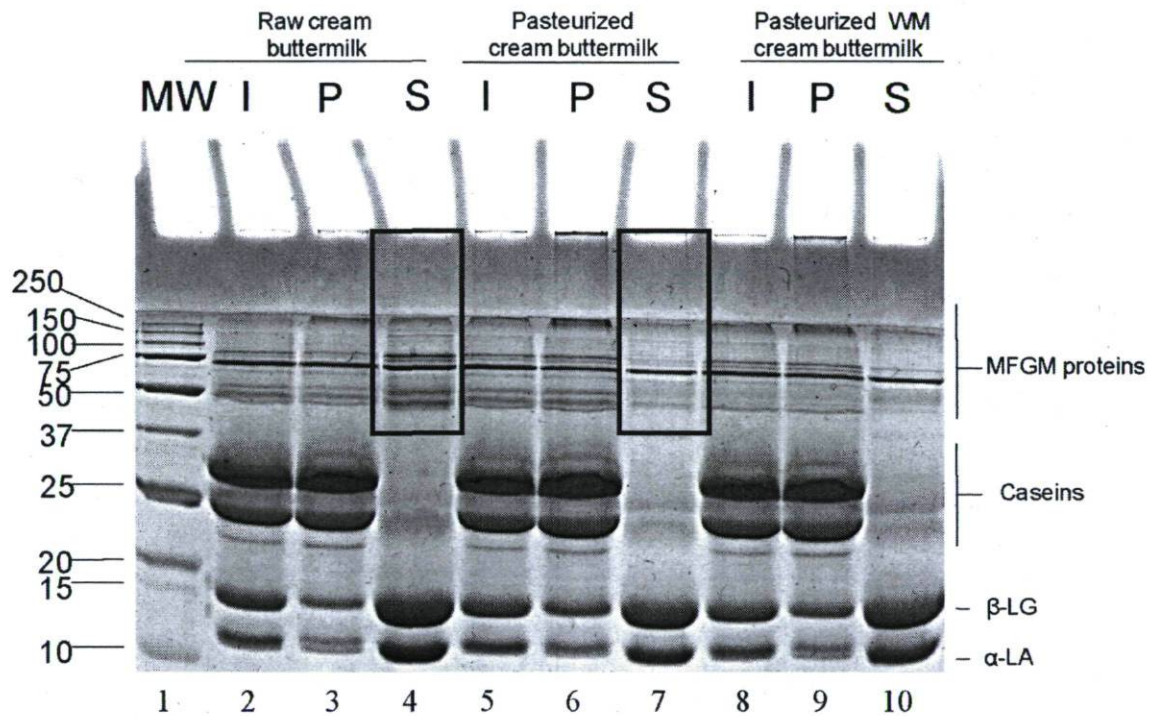


Figure 13 SDS-PAGE (12 % acrylamide) de lait de fromagerie fait à partir de babeurre de crème crue, de babeurre de crème pasteurisée et de babeurre de crème de lait entier pasteurisé.

L'encadré de droite (correspondant au surnageant de babeurre de crème pasteurisée) montre la diminution des protéines de la MGGL dans le surnageant suite à une acidification à 4,6

(Figure tirée de Morin et al., (2008))

Ces résultats suggèrent une précipitation conjointe des micelles de caséine avec les protéines de la MGGL et soulèvent par conséquent une intéressante hypothèse pour expliquer davantage les difficultés coagulantes observées : les traitements

thermiques appliqués à la crème dont est issu le babeurre favorisent des interactions chimiques entre les micelles de caséine et les protéines de la MGGL.

Si de telles interactions sont effectivement présentes, la détermination de leur nature demeure incontournable dans l'investigation des voies d'amélioration du babeurre en système fromager. À ce jour, il est reconnu que les micelles ayant réagi avec d'autres entités protéiques telles que les protéines sériques montrent des propriétés fromagères altérées. Ainsi, la création de liens supplémentaires avec les protéines de la MGGL lorsque des traitements thermiques sont appliqués pourrait rendre les micelles du babeurre d'autant moins efficaces dans leur capacité à coaguler conduisant ainsi aux défauts obtenus. Ceci laisse toutefois peu de latitude à la valorisation du babeurre dans les laits de fromagerie puisque, pour des raisons réglementaires, toutes les crèmes utilisées dans la production commerciale de beurre doivent nécessairement subir un traitement thermique. Or, si des liens chimiques sont effectivement créés par l'application d'un traitement thermique, le gain de connaissances concernant ceux-ci pourrait tout de même permettre d'investiguer des moyens pouvant limiter leurs effets voire même de les empêcher.

Chapitre 3 BUT, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

La valorisation du babeurre dans les laits de fromagerie est limitée par plusieurs défauts technologiques attribuables à sa composition chimique particulière. Ces défauts se retrouvent d'autant plus amplifiés lorsqu'un traitement thermique est appliqué préalablement à la crème.

L'hypothèse à l'origine du présent projet stipule que : « *les traitements thermiques appliqués à la crème dont est issu le babeurre créent des interactions chimiques entre les micelles de caséine et les protéines de la MGGL* ». Ces interactions sont fortement susceptibles de faire intervenir les caséines κ en raison de leur emplacement à la surface des micelles. Or, puisque ces dernières interviennent également dans la fabrication fromagère, les liens les unissant aux autres protéines les rendent plus difficiles à coaguler une fois emprésurées, en raison de l'encombrement stérique généré, expliquant de ce fait le mauvais comportement fromager observé.

Les interactions entre les micelles de caséine et les protéines de la MGGL demeurent encore hypothétiques. Le but du projet est donc de pouvoir élucider leur présence en définissant plus précisément leur mode d'interactions, les forces impliquées et les mécanismes réactionnels qui s'y rapportent. Pour ce faire, deux objectifs ont été fixés :

- 1- Déterminer l'effet de la pasteurisation de la crème sur la taille et la mobilité électrophorétique des micelles de caséine du babeurre;
- 2- Identifier l'effet de la pasteurisation sur la distribution des protéines de la MGGL au sein de la fraction caséique et définir le type d'interactions entre les deux constituants.

Les deux prochains chapitres rapportent respectivement les résultats relatifs à ces deux objectifs.

Chapitre 4 Effet de la pasteurisation de la crème sur la taille et la mobilité électrophorétique des micelles de caséine du babeurre

Résumé

Lorsqu'il est utilisé en production fromagère, le babeurre de crème pasteurisée montre plusieurs défauts technologiques comparativement à son homologue de composition, le lait écrémé. Ces défauts technologiques pourraient être attribuables à des complexes formés entre les protéines de la MGGL et les micelles de caséine qui affecteraient les propriétés physicochimiques de ces dernières et perturberaient leur capacité à coaguler sous l'action de la présure. Le but de ces travaux était d'identifier l'effet de la pasteurisation sur les propriétés physicochimiques des micelles de caséine du babeurre, plus spécifiquement en ce qui concerne leur taille et leur mobilité électrophorétique.

L'application d'une pasteurisation à 90°C pendant 20 secondes à la crème utilisée pour la fabrication de babeurre n'a pas permis de montrer de différences significatives entre le diamètre et la mobilité électrophorétique des micelles de caséine crues et des micelles de caséine pasteurisées. La méthode d'isolement des micelles de caséines, la polydispersité des tailles du mélange caséine-MGGL et le pH de pasteurisation appliqué pourraient en être les principales causes.

4.1 Introduction

Le babeurre se distingue des autres systèmes laitiers par la présence de fragments de MGGL libérés sous l'action du barattage. Cette composition particulière attribue au babeurre certains défauts technologiques et organoleptiques. Notamment, le babeurre est facilement oxydable et possède une faible capacité à maintenir les émulsions et les mousses formées (Wong & Kitts, 2003). Pour pallier à cette situation peu favorable pour l'industrie du beurre et valoriser l'unique co-produit généré, plusieurs travaux ont visé à exploiter les volumes de babeurre disponibles en les incorporant aux laits destinés à la fromagerie (Mistry et al., 1996; Poduval & Mistry, 1999; Raval & Mistry, 1999; Turcot et al., 2002; Govindasamy-Lucey et al., 2006; Govindasamy-Lucey et al., 2007). Les résultats ont toutefois montré à cet effet que l'incorporation de babeurre aux laits de fromagerie tendait à prolonger le temps de coagulation et diminuait la fermeté des caillés obtenus en les rendant davantage friables et humides. Ces observations se sont montrées d'autant plus évidentes lorsqu'un traitement de pasteurisation avait été appliqué préalablement au barattage de la crème (Morin et al., 2008).

Le manque de connaissances de la composition fine des constituants du babeurre laisse peu d'indices quant la réactivité de ceux-ci suite à l'application de traitements thermiques. Des analyses électrophorétiques menées sur des fractions de laits de fromagerie enrichies en babeurre de crème pasteurisée réalisées au cours des travaux de Morin et al., (2008) procurent toutefois une piste intéressante pour expliquer le comportement fromager particulier du babeurre. À cet effet, des échantillons de micelles de caséine de babeurre isolées par précipitation à leur point isolélectrique montrent une augmentation du contenu en protéines de la MGGL lorsqu'un traitement de pasteurisation est appliqué à la crème préalablement au barattage. Bien que la pasteurisation ait pu modifier la solubilité des protéines de la MGGL, ceci peut de même suggérer que les protéines de la MGGL aient interagi avec les micelles de caséine lors du traitement thermique. Les liens existant entre les micelles et les protéines de la MGGL pourraient alors inhiber la coagulation lors de la transformation fromagère, en raison d'une forte interférence créée au sein de l'environnement stérique des micelles de caséine.

La principale documentation portant sur les interactions impliquant les micelles concerne les liens qui les unissent aux protéines sériques. Le potentiel de réaction des micelles est principalement attribuable à sa fraction κ ; en plus d'occuper une position clé à la surface externe de la micelle, cette fraction présente plusieurs liens disulfures la rendant capable d'interagir de façon covalente avec d'autres entités protéiques (Considine et al., 2007). Ces liens ont comme conséquence de modifier les propriétés physicochimiques des micelles; en général, ils amènent une augmentation du diamètre de la micelle et diminuent la charge portée par celle-ci (Smith & Browersheva, 1980; Noh et al., 1989; Anema & Klostermeyer, 1997; Anema & Li, 2000; Anema & Li, 2003; Anema, 2007). Ces liens peuvent également modifier la capacité des micelles à coaguler sous l'effet de la présure: lorsque les caséines κ sont liées à la β -lg, celles-ci s'agglomèrent plus difficilement en raison de l'encombrement stérique créé par les liens présents. De plus, la présence des protéines sériques sur les micelles de caséine mène généralement à une forte rétention d'eau dans les caillés nuisant ainsi à leur égouttage et rendant par conséquent les caillés poreux (Eck & Gillis, 2000). Finalement, l'augmentation de la taille des micelles suite aux interactions générées est reconnue pour augmenter le temps de prise des gels et pour diminuer leur fermeté (Eck & Gillis, 2000).

La nature des liens impliqués et les forces en jeu entre les micelles de caséine du babeurre et les protéines de la MGGL demeurent à ce jour encore inconnues. En considérant la capacité des micelles de caséine à réagir avec d'autres espèces protéiques sous l'action de traitements thermiques, il est logique de croire que si les propriétés fromagères des micelles provenant de babeurre pasteurisé sont davantage affectées que celles provenant de lait pasteurisé, il se peut que des interactions supplémentaires entre les micelles et les protéines de la MGGL soient présentes. En supposant que les traitements de pasteurisation appliqués à la crème du babeurre créent effectivement des interactions supplémentaires entre les micelles de caséine et les protéines de la MGGL, des changements physicochimiques devraient être observés entre les micelles de caséine provenant d'un babeurre de crème crue et celles provenant d'un babeurre de crème pasteurisée. Entre autre, une augmentation de la taille des micelles devrait être attendue en raison des complexes

généérés par la pasteurisation. Ces complexes devraient en conséquence provoquer une variation dans la mesure du potentiel zéeta. En effet, lorsqu'elles sont liées, les micelles présentent une charge différente de celle initiale due au recouvrement de leur surface par d'autres protéines elles-mêmes chargées. Le but des expérimentations était donc de caractériser la variation des propriétés physicochimiques des micelles de caséine du babeurre, suite à l'application d'une pasteurisation.

4.2 Matériel et méthodes

La figure 14 schématise l'ensemble des étapes effectuées pour ce bloc expérimental pour la fabrication des lots de babeurre, l'isolation des micelles de caséine, et la préparation des échantillons de ces micelles en vue de leur caractérisation.

4.2.1 Fabrication des babeurres de crème crue (BCC) et des babeurres de crème pasteurisée (BCP)

Des babeurres de crème crue et des babeurres de crème pasteurisée ont été préparés à partir de crème crue achetée chez un détaillant local (Natrell, Limoilou, Québec, Canada). La crème a dans un premier temps été standardisée à 35% de matière grasse à l'aide de lait cru, écrémé par centrifugation (Écrèmeuse DeLaval Company Limited 614-618-619, Chicago Illinois, USA) à des températures variant entre 40° - 43°C. Une fois la standardisation complétée, une partie de cette crème a été pasteurisée à 90°C durant 20 secondes à l'aide d'un pasteurisateur en continu (Actini, Évian-Les-Bains, France). Le pH de chacune des fractions laitières lors du chauffage se situait près de 6,8. La crème crue et la crème pasteurisée ont par la suite été mûrées à 10°C pendant une période variant entre 10 et 12 heures. Chacune des fractions de crème mûrée a par la suite été barattée à l'aide d'une baratte de type conventionnel (Qualtech Equipement, Québec, Canada) jusqu'à l'obtention d'une inversion de phase. Pour chaque production, des temps variant entre 90 et 110 minutes ont été nécessaires pour l'obtention de l'inversion de phase. Les babeurres soutirés ont été conservés à 4°C pendant un maximum de 24 heures. Afin d'éviter la contamination microbienne, 0,02% d'azoture de sodium a été ajouté dans chacun des babeurres dès leur obtention.

4.2.2 Isolation des micelles de caséine

Les micelles de caséine de babeurre de crème pasteurisée et de crème crue ont été concentrées par deux traitements consécutifs de centrifugation de 60 minutes effectués à 25 000 x g à 20°C (Sorvall RC-5B, Dupont Instruments) tels que décrits par Parker et al., (2005) et Rodriguez del Angel & Dalgleish, (2006). Pour des fins de comparaison, des micelles de caséine crues et pasteurisées (pasteurisation effectuée à des barèmes de 90°C, 20 sec) provenant de lait écrémé et de crème ont

également été isolées selon la même méthode de centrifugation. Il est à noter que pour la crème, un traitement préalable de centrifugation réalisé à 10 000 x g pendant 15 minutes à 4°C a été effectué pour enlever le collet de crème. Afin de standardiser la concentration protéique des culots obtenus, chaque fraction de babeurre, de crème et de lait écrémé a été diluée avec du perméat de lait écrémé obtenu avec un seuil de filtration de 10 KDa (Filtration Engineering, Co. Inc, New Hope, USA) avec un coefficient de dilution de 1 :2,53 pour le babeurre et le lait écrémé, et de 1 :2 pour la crème à 35% de matières grasses. Entre les deux traitements de centrifugation, un lavage des culots obtenus a été effectué avec 100 mL de perméat de lait écrémé afin de purifier au maximum les micelles de caséine. Chacun des culots obtenus a par la suite été resuspendu dans les milieux de dilution appropriés pour les analyses de taille et de mobilité électrophorétique (section 4.2.4 et 4.2.5).

4.2.3 Analyse de composition

Des analyses de composition (solides totaux, protéines, lipides) ont été effectuées sur chacun des babeurres ainsi que sur les fractions contrôles de lait et de crème. Les solides totaux ont été déterminés par méthode de séchage par micro-ondes, (Smart system 5 CEM, North Carolina, USA), telle que décrite par Morin et al., (2004). Le contenu protéique a été déterminé par la méthode Dumas (Analyseur d'azote Leco® FP-528, Michigan, USA) avec un facteur de conversion protéique de 6,38 (FIL 185-2000). Le contenu en lipides a quant-à lui été obtenu par la méthode d'extraction Mojonier (IDF 9C :1987). Chacune des analyses a été répétée 3 fois.

4.2.4 Détermination de la taille des micelles de caséine

La distribution moyenne de la taille des micelles a été déterminée par spectroscopie photonique avec l'analyseur de particules PCS Nicomp (Submicron Particle-Sizer Autodilute®, Model 370, Nicomp Instr. Corp., Santa Barbara, CA, USA) qui permet de mesurer la taille de particules sphériques variant entre 3 nm et 5 µm. Toutes les analyses ont été effectuées à 23°C avec un angle de 90°. La viscosité et l'indice de réfraction de la phase dispersante ont été établis à 0,933 cP et 1,333 respectivement. La préparation des échantillons s'est faite en suspendant chaque

gramme de culot caséique, obtenu à partir des différentes fractions laitières centrifugées, avec 10 mL d'ultrafiltrat de lait écrémé pasteurisé obtenu avec un seuil de filtration de 10 kDa (Filtration Engineering, Co. Inc, New Hope, USA). Suite à une agitation magnétique effectuée à 4°C pendant 20 heures, une quantité de 0,5 mL de cette dilution a été resuspendue dans 15 mL d'ultrafiltrat de lait écrémé pasteurisé. Un ajustement de pH par ajout de NaOH et de HCl à deux valeurs d'intérêt, soit à 6,83 et à 6,00, a été effectué afin de mettre en évidence la présence d'interactions protéiques dans les échantillons, qui sont sensibles à l'effet de l'acidification. Chacune des suspensions a été par la suite filtrée à un seuil limite de 0,45 µm. Cette filtration fut nécessaire pour minimiser la présence d'agrégats et stabiliser les lectures. Une dernière dilution dans du perméat de lait écrémé a été effectuée de façon à obtenir pour chacune des mesures, une valeur d'intensité moyenne (valeur d'obscuration) correspondant à 300 kHz, assurant ainsi une lecture optimale. Trois lectures ont été effectuées pour chaque échantillon.

4.2.5 Détermination de la mobilité électrophorétique

Le potentiel zêta des micelles de caséine du babeurre ainsi que des micelles provenant des fractions contrôles de lait écrémé et de crème a été déterminé par l'appareil Zetasizer 2000 (laser doppler electrophoresis) (Malvern Instruments Ltd, Worcs, UK), contenant un laser de 5 mW HE-NE (638 nm). L'appareil calcule la mobilité électrophorétique par la mesure de la vitesse de déplacement des particules chargées suite à l'application d'un courant électrique. Le potentiel zêta est alors évalué à partir de la mobilité électrophorétique par l'équation d'Henry :

$$\zeta = (3 \mu_E \eta) / (2 \varepsilon f(\kappa\alpha))$$

Où

ζ = potentiel zêta

μ_E = mobilité électrophorétique

η = viscosité de la solution

ε = constante diélectrique

$f(\kappa\alpha)$ = fonction d'Henry

Pour de larges particules telles que les micelles de caséine, la fonction d'Henry peut être évaluée à 1,5, ce qui réduit l'équation à celle de Smoluchowski :

$$Z = \mu_E \eta / \epsilon$$

Les expérimentations ont été effectuées en utilisant la viscosité et la constante diélectrique de l'eau, soit 0,89 cP et 79 respectivement.

La préparation des échantillons s'est faite comme suit : chaque gramme de culot caséique a été suspendu dans 10 mL d'eau HPLC, le tout était laissé sous agitation magnétique pour une durée totale de 40 heures à 4°C. Une fois l'agitation complétée, 0,5 mL du mélange a été resuspendu dans 15 mL d'eau HPLC. Le pH a par la suite été ajusté aux valeurs de 6,83 et 6,00 par ajout de NaOH et de HCl pour encore une fois déterminer les effets des interactions protéiques. Pour favoriser la stabilité de la lecture, le mélange a finalement été filtré à un seuil limite de 0,45 µm. Chacune des mesures de mobilité électrophorétique a été réalisée à 25°C. Un essai préalablement réalisé sur l'eau HPLC a montré que ce milieu n'interférait pas avec les valeurs observées. Trois lectures ont été effectuées pour chaque échantillon.

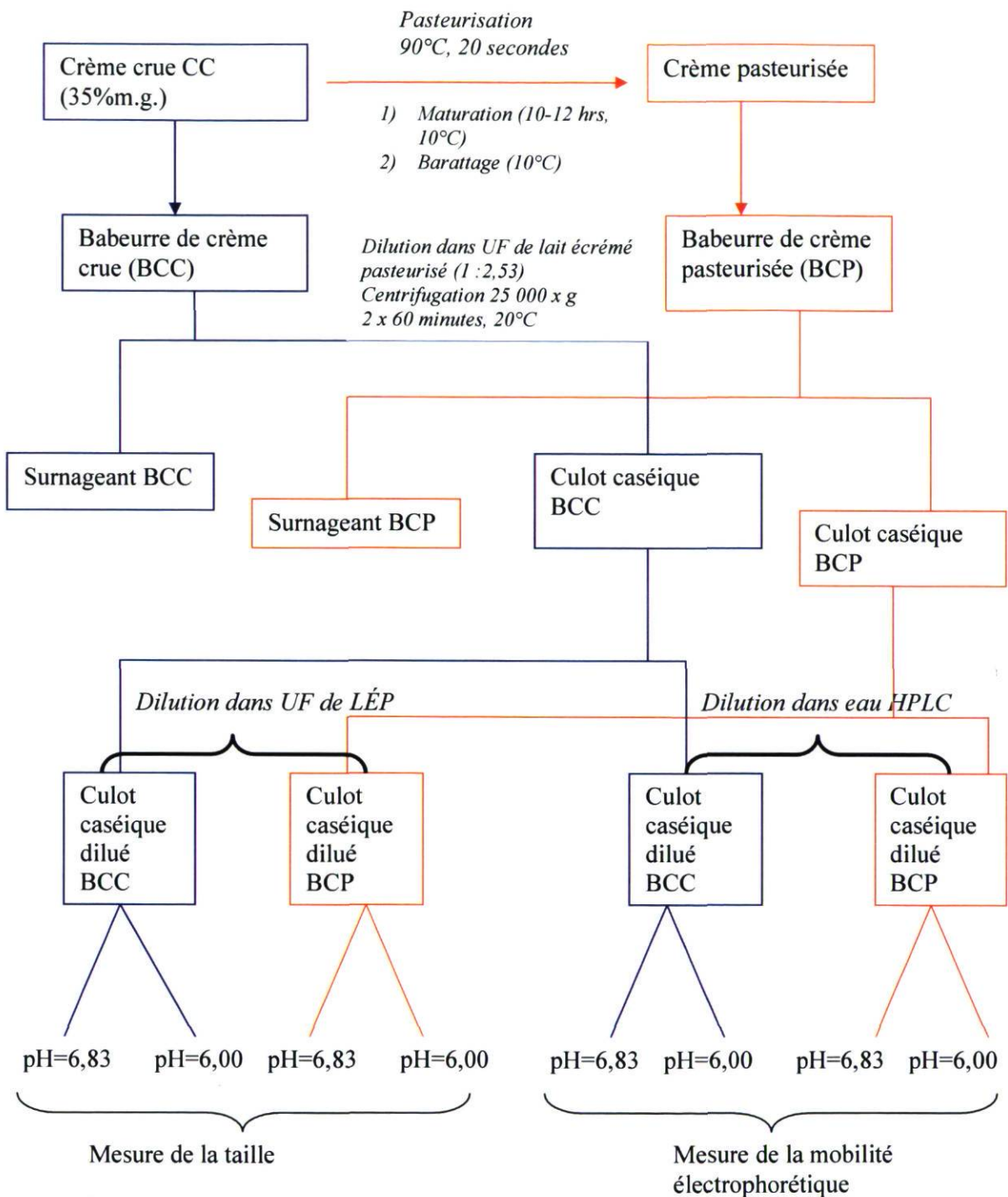


Figure 14 Représentation schématisée de l'ensemble des étapes effectuées pour la fabrication des lots de babeurre, l'isolation des micelles de caséine et la préparation des échantillons de ces micelles en vue de leur caractérisation

4.2.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) avec une procédure GLM. Un test de comparaison multiple de la plus petite différence significative a été effectué pour déterminer les différences entre les traitements. Pour chacun des traitements, 3 répétitions ont été effectuées. Les résultats ont été jugés significatifs à $\alpha < 0,05$.

4.3 Résultats

4.3.1 Données de composition

Le tableau 8 présente les données de composition obtenues pour le babeurre, le lait écrémé et la crème. Les résultats obtenus pour les solides totaux montrent des valeurs semblables entre le babeurre et le lait écrémé, tel qu'attendu. Pour la crème, la composition en solides totaux est nettement plus élevée due à l'important contenu lipidique de cette fraction laitière.

En raison de la présence des fragments de MGGL libérés lors du barattage, une plus grande quantité de lipides est contenue dans la matière sèche du babeurre comparativement au lait écrémé qui contient inversement une plus grande proportion de protéines (Ramachandra Rao et al., 1995 ; Walstra et al., 2006). En effet, dans le babeurre, la proportion de lipides occupe entre 8,42% et 8,49% des solides totaux comparativement à une proportion variant entre 2,20% et 2,28% dans le cas du lait écrémé. Cet écart d'environ 6% est toutefois supérieur à ce qu'avait obtenu Morin et al., (2008). Cette différence pourrait être attribuable à la méthode de soutirage du babeurre utilisée. La proportion occupée par les protéines sur base sèche du lait écrémé se situe entre 35,33% à 35,94% comparativement à 29,12% à 29,16% dans le cas du babeurre.

Les fractions de babeurre et de lait écrémé ne montrent aucune différence de composition attribuable à l'effet de la pasteurisation. Ceci est en accord avec les résultats des travaux de Morin et al., (2008). Seul dans le cas de la crème une diminution de 5,31% du contenu en solides totaux est observée suite à l'application d'une pasteurisation, pouvant être expliquée par un effet de contamination de la crème avec l'eau de rinçage du pasteurisateur.

Tableau 8 Composition en solides totaux, lipides et protéines des fractions laitières de babeurre, de lait écrémé et de crème, pour les fractions crues et pasteurisées (n=3)

	Babeurre		Lait écrémé		Crème	
	Fraction crue	Fraction pasteurisée	Fraction crue	Fraction pasteurisée	Fraction crue	Fraction pasteurisée
Solides Totaux (%)	12,15 ^a	11,32 ^a	11,49 ^a	11,07 ^a	49,02 ^b	43,71 ^c
Lipides (% sur base sèche)	8,42 ^a	8,49 ^a	2,28 ^b	2,20 ^b	71,78 ^c	71,76 ^c
Protéines (% sur base sèche)	29,16 ^a	29,12 ^a	35,94 ^b	35,33 ^b	3,61 ^c	3,14 ^c

Les moyennes avec le même indice sur la même ligne ne sont pas significativement différentes à $\alpha=0,05$.

4.3.2 Effet de la pasteurisation sur la taille et la mobilité électrophorétique des micelles de caséine

Le tableau 9 et les figures 15 et 16 présentent les variations de taille et de mobilité électrophorétique obtenues suite à l'application d'un traitement de pasteurisation pour les échantillons de babeurre, de lait écrémé et de crème, aux deux valeurs de pH testées.

a) Variation de la taille

L'ensemble des valeurs de taille obtenues pour les micelles de caséine isolées à partir des fractions de babeurre, de lait écrémé et de crème se situe entre 232 et 296 nm (tableau 9 et figure 15), ce qui correspond aux échelles de grandeur déjà publiées, soit entre 60 et 500 nm (Phadungath, 2005; Fox & Brodkorb, 2008). Ces valeurs sont dans l'ensemble toutefois supérieures à la moyenne généralement établie à 120 nm (Phadungath, 2005; Fox & Brodkorb, 2008).

Bien qu'une tendance à l'augmentation de la taille des micelles peut être constatée chez les fractions pasteurisées de babeurre et de lait écrémé (figure 15), aucun effet significatif de la pasteurisation sur l'élévation de taille n'a pu être observé contrairement aux travaux effectués précédemment (Smith & Brouwershaven, 1980; Noh et al., 1989; Ono et al., 1999; Anema & Li, 2003). De même, l'analyse statistique ne montre aucune différence significative amenée par la baisse de pH pour chacune des trois fractions laitières. Une légère diminution de la taille suite à une baisse de pH semble tout de même se produire (figure 15).

b) Variation de la mobilité électrophorétique

Les valeurs de la mobilité électrophorétique obtenues pour chacune des fractions laitières varient entre -1,13 et -1,38 $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ (tableau 9, figure 16), ce qui rejoint les valeurs rapportées par Mc Mahon & Brown, (1984).

Dans les expériences effectuées, la pasteurisation n'a pas montré d'effets significatifs sur la variation de la mobilité électrophorétique pour aucune des fractions

étudiées. Une diminution de la mobilité électrophorétique est toutefois constatée pour le babeurre de crème crue et le lait écrémé cru suite à une diminution du pH. Chez les fractions pasteurisées cette variation demeure toutefois négligeable et non-significative au seuil d'acceptation admis ($\alpha=0,05$).

Tableau 9 Diamètre (nm) et mobilité électrophorétique ($\mu\text{m.cm/V.s}$) des micelles des caséines du babeurre et des fractions laitières contrôles, en fonction de la pasteurisation et du pH (n=3)

	Babeurre		Lait écrémé		Crème	
	Fraction crue	Fraction pasteurisée	Fraction crue	Fraction pasteurisée	Fraction crue	Fraction pasteurisée
Taille (nm)	263 ^{abcd} 6,83	265 ^{abcd} 6,00	278 ^{abc} 6,83	258 ^{abcd} 6,00	279 ^{abcd} 6,00	262 ^{abcd} 6,83
Mobilité électrophorétique ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	-1.38 ^a	-1.19 ^{bcde}	-1.37 ^{ab}	-1.22 ^{abcde}	-1.31 ^{abcd}	-1.13 ^e
	254 ^{abcd}	296 ^a	248 ^{cd}	254 ^{bcd}	248 ^{cd}	232 ^d
	-1.35 ^{abc}	-1.23 ^{abcde}	-1.19 ^{cde}	-1.24 ^{abcde}	-1.34 ^{abcd}	-1.17 ^{de}

Les moyennes avec le même indice sur la même ligne ne sont pas significativement différentes à $\alpha=0,05$.

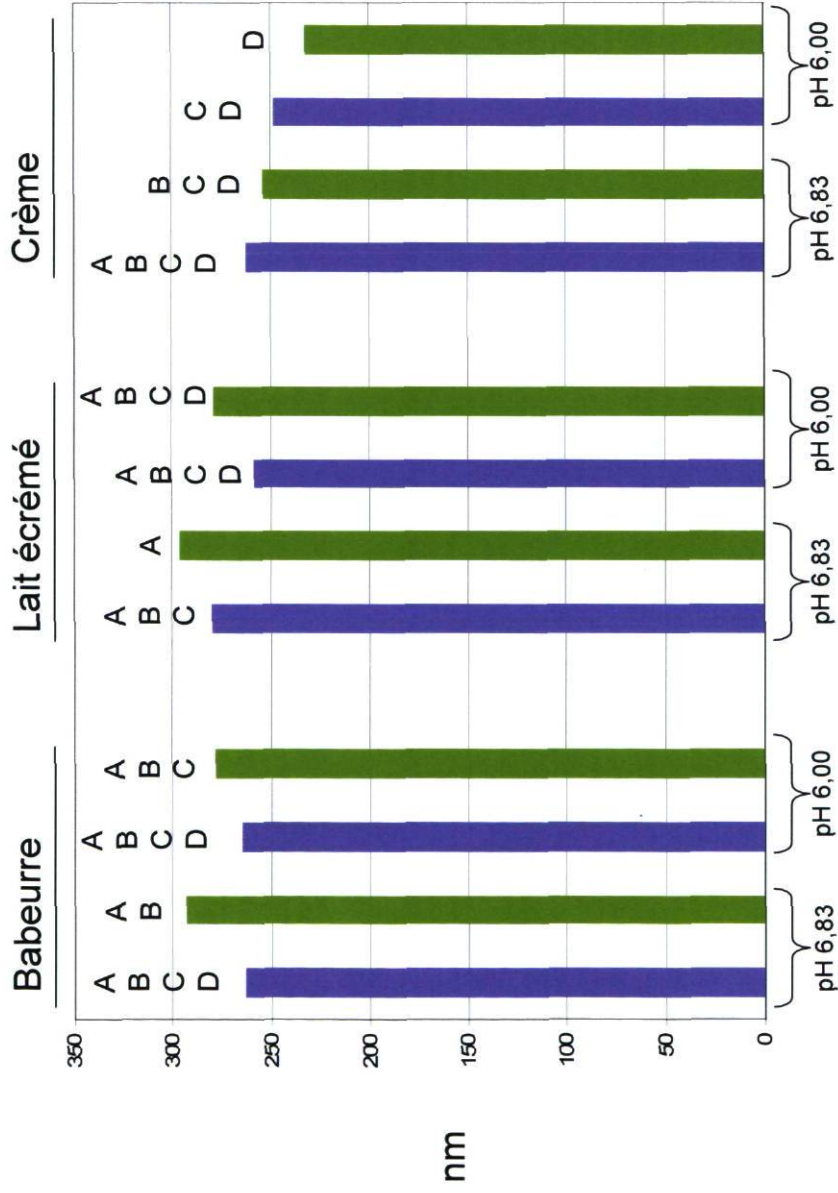


Figure 15 Diamètre des micelles (nm) des caséines du babeurre et des fractions laitières contrôles de lait écrémé et de crème en fonction de la pasteurisation et du pH
 (Les bandes bleues sont les échantillons provenant des fractions crues et les bandes vertes sont les échantillons provenant des fractions pasteurisées). Les moyennes avec le même indice ne sont pas significativement différentes à $\alpha=0,05$.

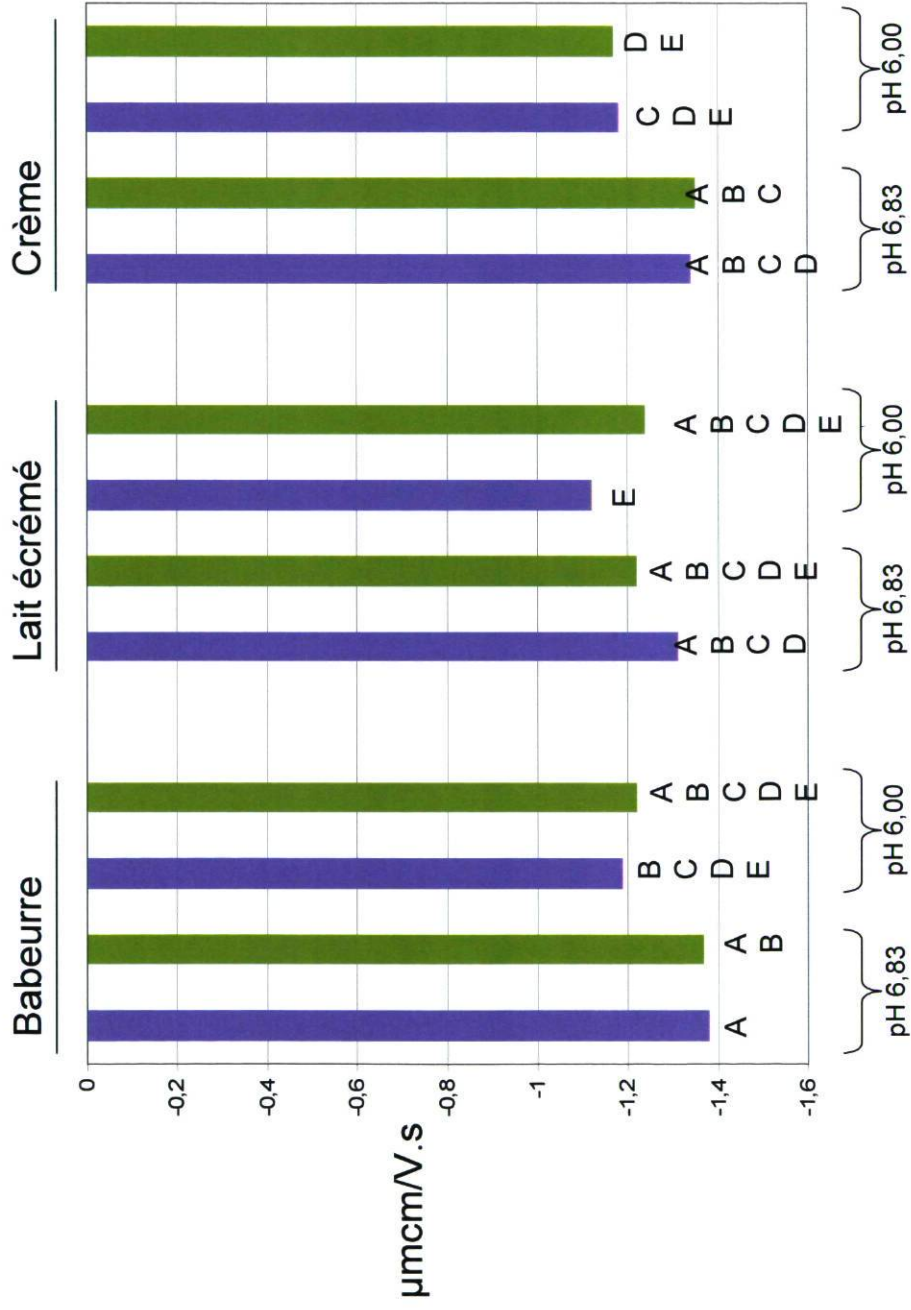


Figure 16 Mobilité électrophorétique ($\mu\text{m.cm/V.s}$) des caséines du babeurre et des fractions laitières contrôles de lait écrémé et de crème en fonction de la pasteurisation et du pH
 (Les bandes bleues sont les échantillons provenant des fractions crues et les bandes vertes sont les échantillons provenant des fractions pasteurisées). Les moyennes avec le même indice ne sont pas significativement différentes à $\alpha=0,05$.

4.4 Discussion

Aucune élévation significative de la taille micellaire n'a pu être observée dans chacune des trois fractions laitières (babeurre, lait écrémé et crème) suite à l'application d'un traitement de pasteurisation. Ces résultats s'écartent donc de ceux retrouvés dans la littérature qui font normalement état d'une augmentation de la taille des micelles avec l'augmentation de l'intensité des traitements thermiques appliqués, en raison des complexes protéiques formés (Smith & Brouwershaven, 1980; Noh et al., 1989; Ono et al., 1999; Anema & Li, 2003).

Une première hypothèse pour expliquer l'absence de différences significatives entre le diamètre des micelles de caséine des fractions crues et pasteurisées concerne la préparation des échantillons de caséine. Premièrement, la force de centrifugation utilisée pour isoler les micelles a pu créer une forte compaction des culots caséiques, nuisant à la réhydratation subséquente des micelles. La présence d'agglomérats en suspension a pu par conséquent contribuer à augmenter les valeurs moyennes observées en plus de créer une variation considérable dans la prise des données (polydispersité des tailles), empêchant l'observation de différences significatives entre les traitements. Aussi, si les complexes protéiques générés par la pasteurisation ont atteint des tailles supérieures au seuil de filtration de 0,45 μm effectué, ces derniers ont été éliminés par filtration et leur observation n'a pu être possible.

Bien que la haute variabilité des résultats soit le facteur principal de l'absence d'effets significatifs de la pasteurisation sur les propriétés physicochimiques des micelles des différentes fractions laitières étudiées, le pH de la crème et du lait au moment où s'est effectuée la pasteurisation pourrait être un autre point à considérer dans l'explication des résultats. Dans le cas présent, tous les traitements de pasteurisation ont été effectués à un pH de 6,8. Cependant, les études ayant pu démontrer des élévations significatives de la taille micellaire par l'action d'une pasteurisation avaient soumis leurs échantillons à un ajustement de pH entre 6,5 et 6,7, préalable au traitement thermique. Or, à ce pH, la caséine κ reste accrochée à la

micelle, et les liens créés avec la β -Ig (dans le cas du lait) augmentent par conséquent le diamètre de l'entité protéique. À pH 6,8, certains travaux ont par ailleurs pu montrer que seulement 30% de la caséine κ résidait sur la micelle (Anema, 2007). À 7,1, ces mêmes travaux ont également démontré que plutôt d'augmenter, la pasteurisation favorisait encore plus le départ de la caséine κ à un point tel que le diamètre s'en trouvait diminué. L'absence de différence significative dans le diamètre des micelles des trois fractions laitières étudiées suite à l'application de traitements de pasteurisation pourrait donc être attribuable en partie au pH utilisé lors de la pasteurisation, favorisant ainsi le départ de la caséine κ , diminuant par conséquent la variation de la taille des micelles.

Cette dernière explication soulève toutefois une constatation incontournable: si le pH de pasteurisation de la crème utilisée pour fabriquer le babeurre a effectivement conduit au départ de la caséine κ , un changement de la charge portée par les micelles de caséine entre la fraction crue et celle pasteurisée aurait alors dû être observé et traduit par une diminution de la mobilité électrophorétique et par conséquent du potentiel zêta, tel qu'observé dans le cas de micelles isolées à partir de lait (Nollet, 2004). Or, les analyses statistiques n'ont pas démontré un effet significatif de la pasteurisation sur la baisse de la charge portée par les micelles. Bien que ceci aille à l'encontre des travaux de Anema et Klostermeyer, (1997) ayant montré que la perte de la caséine κ résultant de la pasteurisation du lait à une valeur de pH de 7,1 réduit considérablement le potentiel zêta comparativement à une pasteurisation effectuée à 6,6, ces résultats rejoignent tout de même les travaux de Darling et Dickson, (1979) montrant que le potentiel zêta est difficilement perturbé par l'effet seul d'une pasteurisation. En effet, ces travaux maintiennent que malgré les changements susceptibles de modifier le potentiel zêta (hydrolyse de la caséine κ , déphosphorylation de la caséine α_1 , α_2 , β , et la précipitation du phosphate de calcium), les traitements thermiques (pour leur part, réalisés à 135°C) n'induisent pas de changements significatifs dans le potentiel zêta mesuré. Il en est de même avec les travaux de Famelart et al., (2003) ayant montré que l'effet d'une pasteurisation de 90°C durant 24 secondes, sur le potentiel zêta des micelles de caséine isolées à partir de lait, est négligeable.

Les résultats concernant la mobilité électrophorétique laissent tout de même une constatation intéressante : une baisse significative de la mobilité électrophorétique amenée par une acidification à pH 6,00 est observable chez les fractions crues des micelles de caséine provenant du lait écrémé et du babeurre. Cette baisse n'est pas observée chez les fractions pasteurisées. Ces résultats suggèrent donc que la pasteurisation pourrait avoir comme effet d'inhiber la neutralisation des charges portées par les micelles lorsqu'une acidification est effectuée. La présence d'interactions liant les micelles de caséine à d'autres protéines demeure une explication possible pour expliquer le phénomène : le recouvrement des micelles par d'autres espèces protéiques sous l'action du chauffage pourrait modifier le comportement électrique des micelles et ralentir leur neutralisation sous l'effet d'une acidification. Il semble toutefois étrange qu'un comportement semblable ne soit pas observé chez les micelles provenant de crème crue.

4.5 Conclusion

L'analyse de la distribution de la taille et de la mobilité électrophorétique des micelles de caséine de babeurre n'a pas pu permettre de mettre en évidence des différences significatives entre les fractions crues et celles pasteurisées. Les résultats concernant ces propriétés physicochimiques ne permettent donc pas de conclure de façon non-équivoque à la formation de complexes par interactions entre les protéines de la MGGL et les micelles de caséine. Des essais menés à différents pH de pasteurisation pourraient possiblement amener davantage d'indices en raison du rôle joué par le pH sur les interactions protéiques. Par ailleurs, aucune baisse significative de la mobilité électrophorétique n'a pu être observée chez les fractions pasteurisées de lait écrémé et de babeurre suite à l'application d'une acidification contrairement aux fractions crues. Ceci montre donc que la pasteurisation mène tout de même à un comportement physicochimique différent chez les micelles de caséine provenant de ces fractions. Une analyse de la composition protéique des fractions de babeurre de crème crue et de babeurre de crème pasteurisée sera donc réalisée au prochain objectif afin d'apporter des informations complémentaires sur la façon dont les deux entités protéiques interagissent entre elles.

Chapitre 5 Effet de la pasteurisation de la crème sur la distribution des protéines de la MGGL au sein de la fraction caséique

Résumé

Le babeurre présente un fort potentiel de valorisation en production fromagère en raison de sa composition riche en caséines. Toutefois, son utilisation en fromagerie est limitée par plusieurs défauts technologiques qui seraient attribuables à des complexes formés par la pasteurisation entre les micelles de caséine et les protéines de la MGGL. Ces interactions n'ont pas pu être observées au cours du chapitre précédent par l'analyse de la taille et de la mobilité électrophorétique des micelles. Le but de ces travaux était de mettre en évidence la formation de complexes par l'analyse de la distribution des protéines de la MGGL au sein de fractions caséiques suite à l'application d'une pasteurisation, en utilisant les techniques d'électrophorèse en une et deux dimensions.

Les résultats des expérimentations ont montré que la pasteurisation (90°C, 20 secondes) favorise les interactions entre les protéines de la MGGL et les micelles de caséine du babeurre. Ces interactions se feraient directement entre les deux espèces protéiques par voie de liens disulfures. La principale caséine impliquée serait la caséine κ , également reconnue pour son rôle dans la coagulation fromagère. La PAS 6/7 et la BTN pourraient également intervenir dans la création de ces liens.

5.1 Introduction

L'utilisation du babeurre dans les laits de fromagerie est responsable de plusieurs défauts technologiques lorsqu'une quantité supérieure à 5-10% est incorporée (Joshi et al., 1994 ; Govindasamy-Lucey et al., 2006; Govindasamy-Lucey et al., 2007 ; Turcot et al., 2002). C'est principalement le fort contenu en phospholipides du babeurre et la présence des fragments de MGGL qui en seraient la cause et qui conduiraient à l'obtention de caillés plus friables, plus humides et longs à coaguler. De récents travaux ont par ailleurs montré que la pasteurisation de la crème utilisée dans la fabrication du babeurre jouerait également un rôle majeur dans l'aptitude fromagère de celui-ci (Morin et al., 2008). L'effet de la pasteurisation sur les défauts du babeurre en fromagerie serait dû à la création de complexes entre les micelles et les autres espèces protéiques présentes, plus particulièrement les protéines contenues dans les fragments de MGGL. Lorsqu'une pasteurisation est appliquée, les protéines de la MGGL interagiraient avec les micelles en créant un effet d'interférence dans l'environnement physicochimique de ces dernières, ce qui nuirait par conséquent à leur coagulation (Morin et al., 2008).

La façon dont les micelles de caséine et les protéines de la MGGL interagissent ensemble reste très peu documentée. Aucun signe d'interactions n'a d'ailleurs pu être observé au cours du bloc expérimental précédent par l'analyse des propriétés physicochimiques des micelles de caséine ayant subi un traitement de pasteurisation. Certains travaux, utilisant principalement les techniques d'électrophorèse SDS-PAGE en une dimension sur des échantillons de MGGL isolés à partir de fractions pasteurisées, tendent tout de même à suggérer que des liens covalents pourraient être impliqués dans ces interactions (Houlihan et al., 1992 ; Ye et al., 2004a; Ye et al., 2004b). La méthodologie utilisée limite cependant ces auteurs à déterminer le mécanisme exact de réaction. Les résultats mènent donc à la possibilité de deux mécanismes : dans un premier temps, les micelles de caséine, plus particulièrement la fraction κ , pourraient réagir directement avec les protéines de la MGGL par le biais de liens disulfures. Le niveau d'interaction entre les deux entités protéiques serait proportionnel à l'intensité du traitement thermique. Une seconde alternative serait que la présence de la caséine κ au sein de la MGGL pasteurisée découle des liens qui l'unissent à la β -lg, dont cette dernière peut également interagir

avec les protéines de la MGGL. Selon cette dernière alternative, les liens entre les protéines de la MGGL et les micelles de caséine seraient créés de façon indirecte et seraient dépendants de la présence des protéines sériques.

Les travaux de cet objectif visent à générer davantage d'informations quant à l'effet de la pasteurisation sur la création des liens entre les protéines de la MGGL et les micelles de caséine, ainsi que sur la définition de leur nature, en mettant à profit l'utilisation des techniques d'électrophorèse en une et deux dimensions sur des échantillons de micelles de caséine isolées à partir de babeurre de crème crue et de babeurre de crème pasteurisée. Les profils électrophorétiques obtenus des fractions laitières permettront de conclure quant à l'importance qu'occupent les liaisons disulfures parmi ces liens et permettront d'amener des pistes nouvelles quant aux mécanismes réactionnels qui se rattachent à leur formation.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Obtention des fractions de babeurre de crème crue et babeurre de crème pasteurisée

Du babeurre de crème crue (BCCfi) et du babeurre de crème pasteurisée (BCPfi) ont été fabriqués à partir de deux types de crème, soit une crème crue (CCfi) et une crème pasteurisée (CPfi), tel que décrit au chapitre 4. Les micelles de caséine du babeurre de crème crue et celles du babeurre de crème pasteurisée ont été isolées par centrifugation, selon les mêmes barèmes précédemment décrits. Des fractions contrôles de micelles de caséine de lait écrémé et de crème ont également été concentrées de façon similaire, tel que décrit au chapitre 4. Au total, 18 fractions ont été lyophilisées puis, analysées. Les différentes abréviations pour chacune des fractions d'intérêt sont données au tableau 10.

Tableau 10 Abréviations des différentes fractions laitières analysées

	Abréviations
Fractions initiales (fi)	
Babeurre de crème crue	BCCfi
Babeurre de crème pasteurisée	BCPfi
Lait écrémé cru	LÉCfi
Lait écrémé pasteurisé	LÉPfi
Crème crue	CCfi
Crème pasteurisée	CPfi
Surnageants (s)	
Surnageant de babeurre de crème crue	BCCs
Surnageant de babeurre de crème pasteurisée	BCPs
Surnageant de lait écrémé cru	LÉCs
Surnageant de lait écrémé pasteurisé	LÉPs
Surnageant de crème crue	CCs
Surnageant de crème pasteurisée	CPs
Culots caséiques (cc)	
Culot caséique de babeurre de crème crue	BCCcc
Culot caséique de babeurre de crème pasteurisée	BCPcc
Culot caséique de lait écrémé cru	LÉCcc
Culot caséique de lait écrémé pasteurisé	LÉPcc
Culot caséique de crème crue	CCcc
Culot caséique de crème pasteurisée	CPcc

5.2.2 Analyse de composition

Le contenu protéique des surnageants et des culots caséiques du babeurre, du lait écrémé et de la crème a été déterminé par la méthode Dumas (FIL 185-2000) à l'aide d'un analyseur d'azote Leco® FP-528 (Michigan, USA) en utilisant un facteur de conversion protéique de 6,38.

5.2.3 Électrophorèse sur gels de polyacrylamide (SDS-PAGE)

La composition protéique des fractions initiales de babeurre, de lait écrémé et de crème (BCCfi, BCPfi, LÉCfi, LÉPfi, CCfi, CPfi) ainsi que des culots caséiques (BCCcc, BCPcc, LÉCcc, LÉPcc, CCcc, CPcc) et des surnageants (BCCs, BCPs, LÉCs, LÉPs, CCs, CPs) a été analysée dans un premier temps par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices (R-SDS-PAGE) et non-réductrices (NR-SDS-PAGE) puis en électrophorèse 2D NR-R-SDS-PAGE tel que décrit par Havea et al., (1998), Maderson, (1998) et Considine et al., (2007).

5.2.3.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions réductrices R-SDS-PAGE

Pour chacune des 18 fractions laitières, 2 mg de protéines ont été dilués dans 1 mL d'eau déionisée. De cette solution protéique, 25 µL ont été mélangés à 25 µL de tampon de charge (200 µL bromophénol bleu 0,5%, 2,5 mL de glycérol, 1,25 mL de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 3,55 mL d'eau d'ionisée, 500 µL de β-mercaptoéthanol). Les échantillons ont par la suite été bouillis 5 minutes dans un bain-marie, puis 10 µL du mélange ont été déposés dans les puits. La séparation des protéines des échantillons analysés s'est effectuée sur un gel concentré à 12,5% d'acrylamide (4,17 mL d'acrylamide Bis, 2,5 mL de Tris 1,5 M (pH 8,8), 100 µL de SDS 10%, 3,18 mL d'eau déionisée, 50 µL d'APS, 5 µL de TEMED). Après une migration effectuée à 30 mV, les gels ont été colorés avec une solution de bleu de Coomassie (1 g/L). Un standard a été utilisé pour déterminer les poids moléculaires de chacune des bandes obtenues (Bio Rad, 161-0318, Californie, USA).

5.2.3.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non-réductrices NR-SDS-PAGE

Les gels NR-SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide effectués pour chacune des 18 fractions laitières ont été préparés de la même façon que ceux décrits précédemment à l'exception du tampon de charge qui ne contenait aucun agent réducteur (β - mercaptoéthanol). Le mélange tampon de charge/échantillon a tout de même été

bouilli 5 minutes tel que décrit. Les mêmes conditions de migration ont été appliquées.

5.2.3.3 Mise en évidence des liaisons disulfures par 2D-NR-R-SDS-PAGE

Des gels électrophorétiques à deux dimensions ont été effectués pour les échantillons BCCcc, BCPcc, tels que décrit par Havea et al., (1998), Maderson, (1998) et Considine et al., (2007). La figure 17 schématise cette technique. L'échantillon est dans un premier temps traité tel que décrit en 5.2.3.2. Une concentration protéique de 5 mg/mL a dans ce cas-ci été utilisée pour une meilleure visibilité des bandes en deuxième dimension. L'échantillon a par la suite été déposé dans deux puits différents d'un montage sur gel de polyacrylamide (PAGE) concentré à 12,5% d'acrylamide de façon à obtenir deux gels 1D-NR-SDS-PAGE par échantillon. Après une migration à 30 mV, un des gels a été coloré au bleu de Coomassie (1 g/L) et l'autre a été traité à 94°C durant 4 minutes avec une solution de β -mercaptoéthanol (2,5 mL de glycérol, 1,25 mL de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 3,55 mL d'eau d'ionisée, 500 μ L de β -mercaptoéthanol) afin de réduire tous les ponts disulfures présents. Après un lavage à l'eau déionisée, cette bande a par la suite été placée perpendiculairement à un second montage, au dessus d'un gel de séparation (12,5% acrylamide), puis un gel de concentration a été déposé tout autour. Une seconde migration effectuée à 30 mV a été complétée puis le gel bidimensionnel obtenu a été coloré au Bleu de Coomassie (1 g/L). La position où se dédoublent les bandes obtenues à partir de la première dimension permet d'identifier les protéines liées par des liens disulfures.

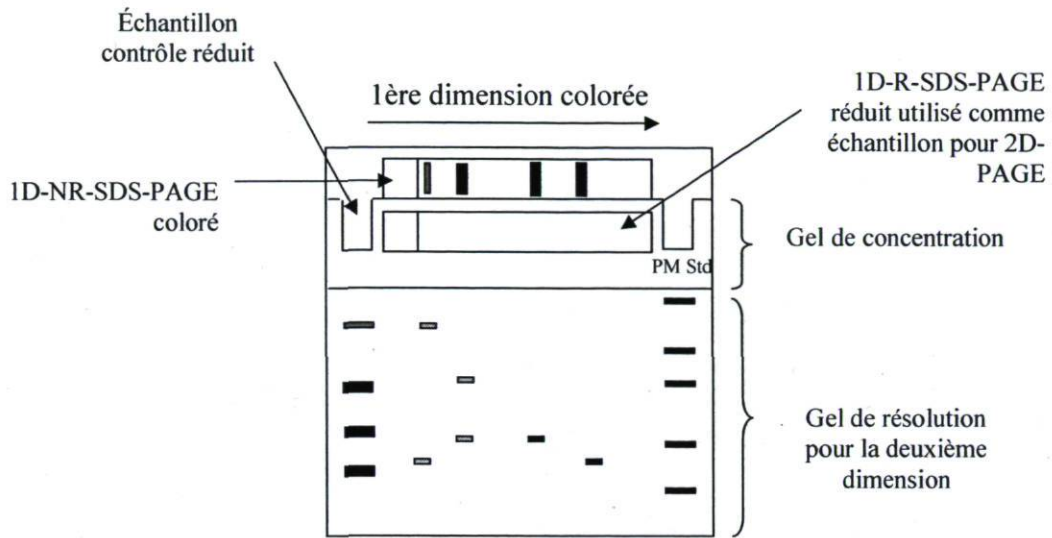


Figure 17 Schéma du 2D-PAGE (première dimension NR-SDS-PAGE; seconde dimension R-SDS-PAGE)

(Havea et al., 1998; Considine et al., 2007)

5.2.4 Analyse de la densité colorimétrique

L'intensité des bandes des gels électrophorétiques R-SDS-PAGE des échantillons de babeurre a été analysée à l'aide d'un logiciel mesurant la densité colorimétrique (BioRad Quantité One version 4.5.2, Californie, USA) à partir d'un appareil d'analyse d'images (ChemiDoc XRS, 170-8070). Pour permettre une détermination semi-quantitative du profil protéique de chaque fraction, l'intensité relative de chacune des bandes d'intérêt (MUC1, XO, CD 36, BTN, PAS 6/7, caséines α , β , κ et protéines sériques β -Ig et l' α -la) a été évaluée en fonction de l'intensité totale occupée par ces bandes. L'attribution des bandes s'est faite par comparaison de nos gels avec ceux publiés par Singh, (2006) (figure 18) ainsi que par l'utilisation d'un standard (Bio Rad, 161-0318, Californie, USA).

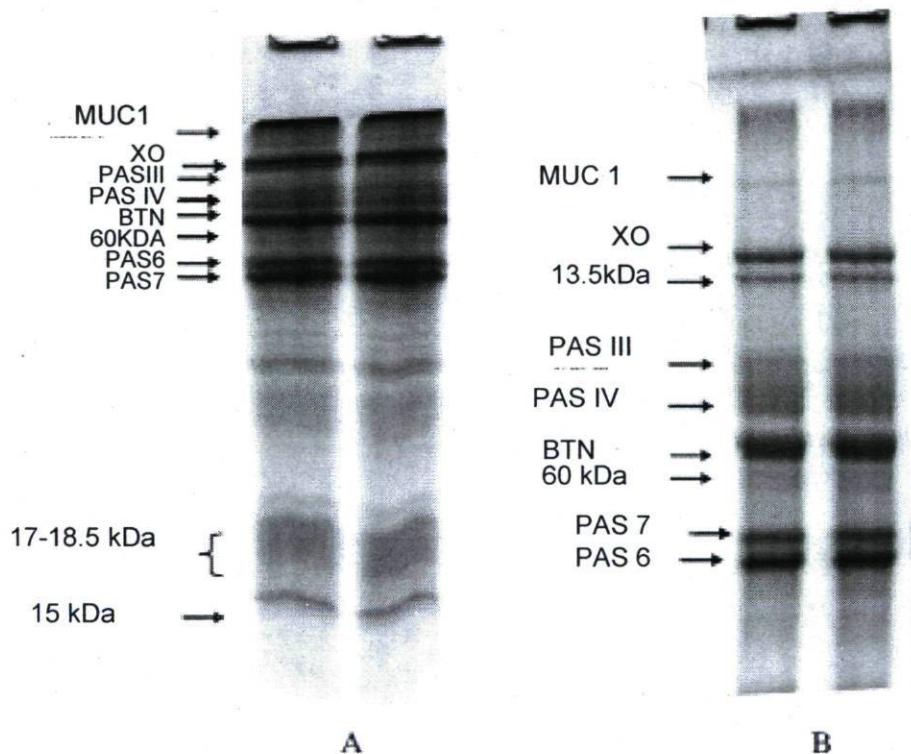


Figure 18 Séparation des principales protéines de la MGGL par l'utilisation de gels de polyacrylamide colorés au Bleu de Coomassie A) 15% et B) 8% de polyacrylamide

(Figure tirée de Singh, (2006))

5.2.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques de l'analyse de composition ont été effectuées avec le logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) avec une procédure GLM. Pour chaque traitement, 3 répétitions ont été effectuées. Les résultats ont été jugés significatifs à $\alpha < 0,05$.

5.3 Résultats

5.3.1 Analyse de composition

Les compositions en protéines des surnageants et des culots caséiques lyophilisés obtenus par centrifugation des fractions laitières de babeurre, de lait écrémé et de crème, avant et après pasteurisation, sont présentées au tableau 11.

Les valeurs obtenues pour les culots caséiques ne montrent pas de différence significative suite à l'application d'un traitement de pasteurisation pour aucune des fractions laitières en raison des écart-types obtenus. Une légère augmentation du contenu protéique chez les culots caséiques pasteurisés des fractions de babeurre et de lait écrémé peut tout de même être observée.

Le plus faible pourcentage de protéines retrouvé dans les échantillons de babeurre et de crème comparativement à ceux de lait écrémé suggère que les culots caséiques de ces fractions, isolés par centrifugation, étaient initialement plus hydratés. En effet, puisque le pourcentage protéique a été établi sur poids sec, le plus faible pourcentage de protéines obtenu pour les échantillons de babeurre et de crème indique une plus grande proportion occupée par le lactose, signifiant ainsi qu'une plus grande quantité d'eau était présente dans les culots originaux. Cette plus forte hydratation des culots des micelles de babeurre et de crème comparativement aux culots de lait écrémé suggère donc une plus forte rétention d'eau pouvant être attribuable aux fragments de MGGL fixés aux micelles de caséine. La fixation des fragments membranaires aux micelles de caséine a pu avoir comme effet de réduire la densité des agrégats et la compaction des culots obtenus.

Par ailleurs, les résultats obtenus pour les surnageants montrent une diminution significative du contenu protéique chez les échantillons de babeurre et de crème lorsqu'une pasteurisation est appliquée. Ces résultats peuvent suggérer que dans ces fractions, la pasteurisation ait diminué la solubilité des protéines et que celles-ci aient précipité davantage que celles contenues dans le lait écrémé. Ce comportement différent du lait écrémé pourrait donc être attribuable aux protéines des fragments de MGGL qui, sous l'action de la pasteurisation, possèdent une forte

réactivité qui leur permet de créer des liens avec les autres protéines, et ainsi, modifient leur solubilité. Dans le cas du babeurre, un bilan massique aurait tout de même dû être effectué afin de déterminer si la diminution des protéines dans le surnageant suite à la pasteurisation aurait également pu être due à leur rétention dans la phase aqueuse du beurre suite au barattage.

Tableau 11 Composition en protéines (% sur base sèche) des culots et des surnageants des différentes fractions laitières de babeurre, de lait écrémé et de crème obtenues par centrifugation, pour les fractions crues et pasteurisées (n=3)

Les moyennes avec le même indice dans la même colonne ne sont pas significativement différentes à $\alpha=0,05$.

Surnageants (s)					
	(%)		(%)		(%)
BCCs	10,51 ^a	LÉCs	8,88 ^a	CCs	8,32 ^a
BCPs	9,68 ^b	LÉPs	8,55 ^a	CPs	7,30 ^b
Culots caséiques (cc)					
	(%)		(%)		(%)
BCCcc	30,00 ^c	LÉCcc	44,86 ^b	CCcc	35,13 ^c
BCPcc	30,91 ^c	LÉPcc	45,13 ^b	CPcc	31,38 ^c

5.3.2 Composition protéique

Les gels électrophorétiques NR-SDS-PAGE et R-SDS-PAGE des échantillons de babeurre, de lait écrémé et de crème sont présentés à la figure 19.

Les profils électrophorétiques obtenus pour chacune des fractions laitières correspondent à ceux retrouvés dans la littérature (Ye et al., 2004b; Singh, 2006). Chez les échantillons de babeurre et de crème, on peut remarquer la formation de complexes à hauts poids moléculaires dans le haut des gels NR-SDS-PAGE (encadrés rouges). Ces bandes sont particulièrement intenses dans le haut des gels des échantillons ayant subi un traitement de pasteurisation. L'analyse de ces échantillons en R-SDS-PAGE montre que lorsque des conditions réductrices sont appliquées, ces bandes disparaissent. Ces complexes générés par la pasteurisation seraient donc maintenus par des liens disulfures.

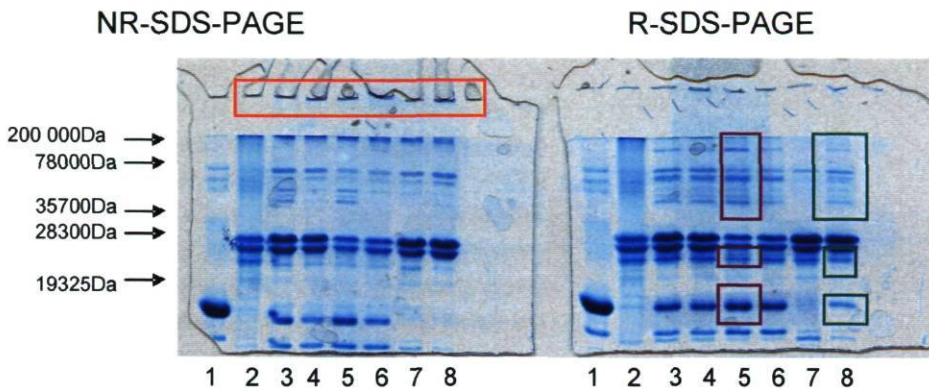
En R-SDS-PAGE, la réduction amène de façon générale la présence de la caséine κ , montrant que cette fraction caséique peut interagir par des liens disulfures avec et sans traitement thermique. Chez les culots caséiques pasteurisés des fractions laitières de crème et de babeurre, des profils électrophorétiques identiques sont obtenus lorsqu'un agent réducteur est ajouté: de nouvelles bandes correspondant aux protéines de la MGGL et à la β -Ig deviennent visibles en plus des bandes correspondantes à la caséine κ (encadrés verts). Ainsi, les complexes maintenus par des liens disulfures observés en NR-SDS-PAGE pourraient faire intervenir ces différentes protéines. Ce même dédoublement de bandes a d'ailleurs déjà été observé par Ye et al., (2004b) et par Kim & Jiménez-Flores, (1995) lors de travaux portés sur des échantillons pasteurisés de MGGL isolée. Dans ces travaux, une diminution de la PAS 6/7 avait toutefois été mise en évidence contrairement aux résultats présentés, qui montrent une nette augmentation de ces protéines de la MGGL. Parmi les autres protéines de la MGGL observées, la BTN présente également une bande plus visible dans les culots caséiques lorsqu'une pasteurisation est appliquée.

Chez les culots caséiques crus des gels R-SDS-PAGE, les bandes correspondant à la MGGL et à la β -Ig sont de plus faible intensité. On peut effectivement constater

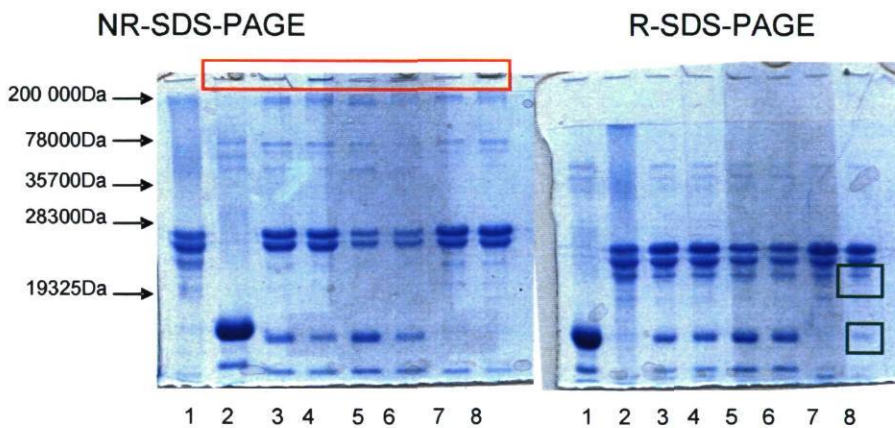
que ces protéines se retrouvent préférentiellement dans le surnageant lorsque aucun traitement de pasteurisation n'est appliqué (encadrés mauves). Ceci concorde avec les analyses de composition montrant un contenu protéique plus élevé dans les surnageants crus que ceux pasteurisés.

Dans le cas du gel NR-SDS-PAGE du lait écrémé, seule une bande au haut de l'échantillon correspondant au LÉPcc présente une intensité notable (encadrés rouges). En conditions réductrices, cette bande disparaît et une intensification des bandes correspondant à la caséine κ et à la β -lg met en évidence les liens disulfures qui unissent ces deux protéines (Sawyer et al., 1963). Tel qu'attendu, aucune bande correspondant aux protéines de la MGGL n'est observée.

a) Babeurre



b) Lait écrémé



c) Crème

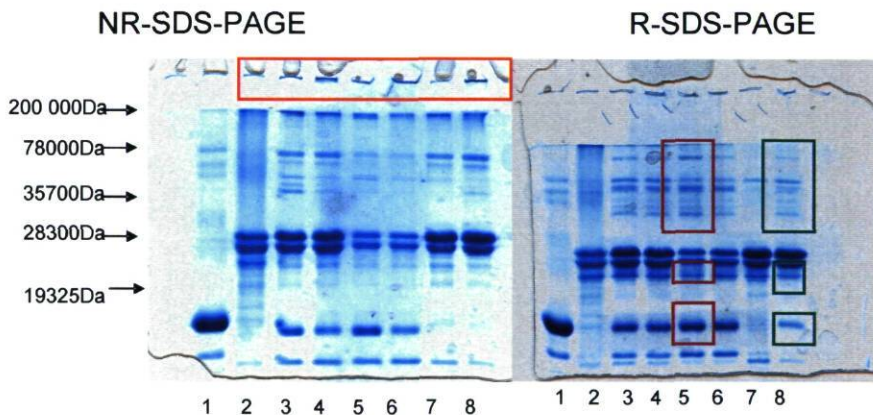


Figure 19 Gels NR-SDS-PAGE et R-SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide des fractions de babeurre, de lait écrémé et de crème.

Ordre des puits : 1) standard d'isolat de protéines de lactosérum 2) standard de caséinate de sodium 3) Fraction initiale crue (Cfi) 4) Fraction initiale pasteurisée (Pfi) 5) Surnageant cru (Cs) 6) Surnageant pasteurisé (Ps) 7) Culot caséique cru (Ccc) 8) Culot caséique pasteurisé (Pcc) (pour les échantillons de lait écrémé NR-SDS-PAGE, l'ordre des puits 1 et 2 est inversé).

5.3.3 Gels électrophorétiques 2D-NR-R-SDS-PAGE

Des gels électrophorétiques 2D-NR-R-SDS-PAGE ont été effectués sur les échantillons BCCcc, BCPcc, afin d'identifier les protéines liées par des liens disulfures. Dans le gel correspondant au BCCcc, une bande correspondant à un PM de 75 000 Da obtenue à partir de la première dimension (NR-SDS-PAGE) se dédouble dans la deuxième dimension en deux bandes : l'une correspond à une protéine de la MGGL avec un PM un peu plus bas que 75 000Da et l'autre à une protéine de caséine d'environ 28 300 Da. Dans le gel correspondant au BCPcc, un dédoublement se produit à partir d'une bande correspondant à un PM d'environ 200 000 Da, de façon beaucoup plus intense que dans le BCCcc. Toujours dans le BCPcc, une autre bande se dédouble aux environs de 75 000 Da à partir de la première dimension, aux mêmes hauteurs que dans le BCCcc, soit vers 75 000 Da et 28 300 Da. Ces résultats pourraient signifier que des liens covalents de type disulfure seraient donc formés entre les protéines de la MGGL et les caséines. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus dans les gels 1D-NR-SDS-PAGE et 1D-R-SDS-PAGE.

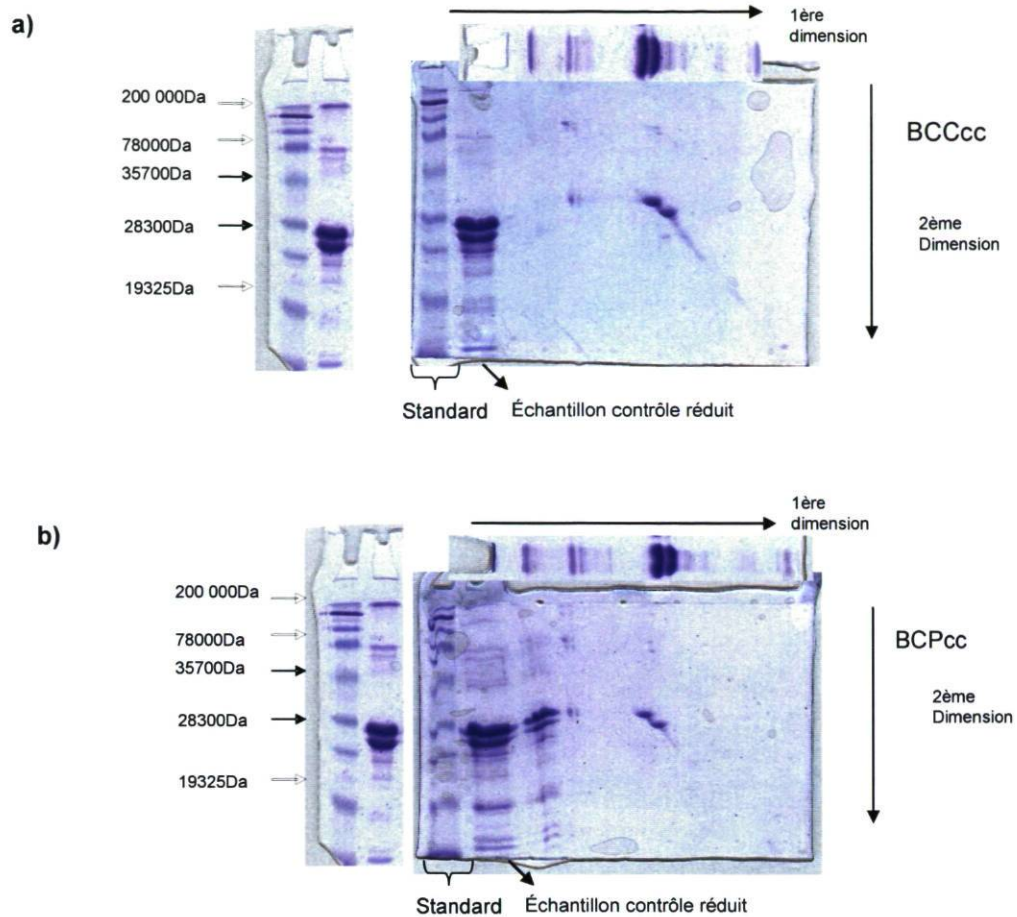


Figure 20 Gels 2D-NR-R-SDS-PAGE 12,5% acrylamide sur les échantillons BCCcc (a) et BCPcc (b).

La détermination des bandes a été effectuée à l'aide d'un standard de poids moléculaires (Bio Rad, 161-0318, Californie, USA)

5.3.4 Densité colorimétrique

Le tableau 12 présente les données obtenues à partir des analyses de densité colorimétrique des échantillons de babeurre réalisées sur les gels R-SDS-PAGE. Pour faciliter l'analyse des résultats, les différentes protéines ont été divisées en cinq régions d'intérêt tel que schématisé à la figure 21.

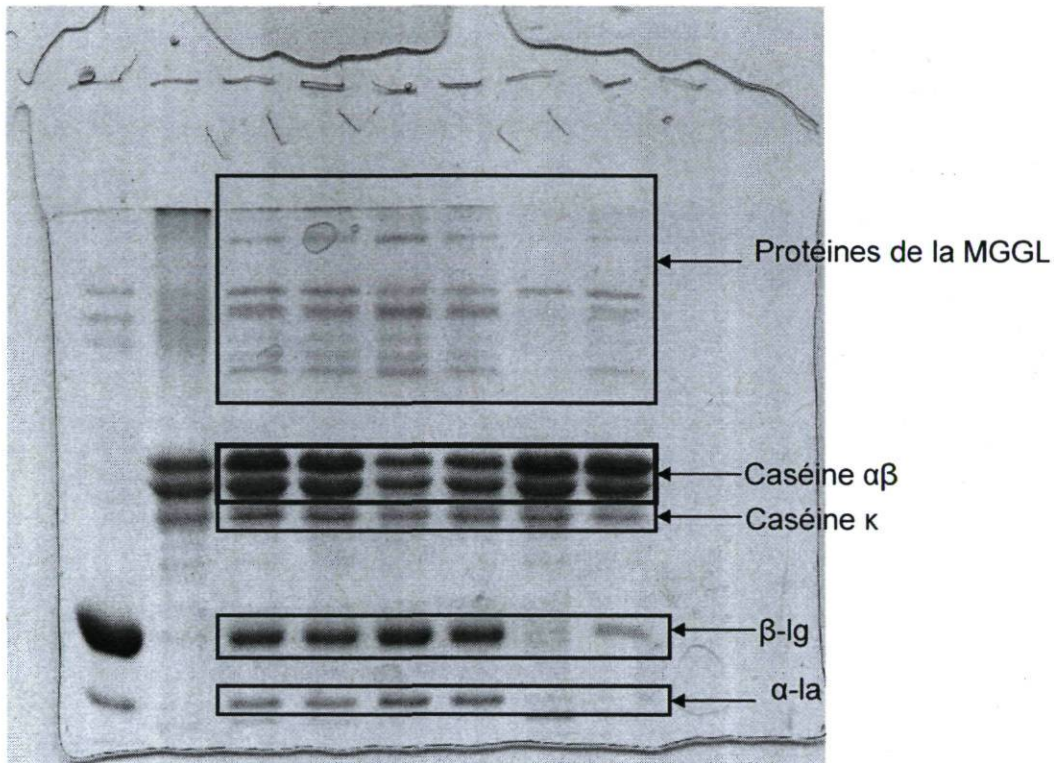


Figure 21 *Délimitation des régions d'intérêt pour l'analyse de la densité colorimétrique des gels 1D-R-SDS-PAGE des échantillons de babeurre*

L'analyse statistique de la densité colorimétrique présentée au tableau 12 montre un effet significatif de la pasteurisation sur l'augmentation du contenu en protéines de la MGGL et en β -Ig dans le BCPcc comparativement au BCCcc. En ce qui concerne les surnageants, la pasteurisation amène à l'inverse une diminution de ces mêmes protéines.

Tableau 12 Proportion relative (%) des différentes régions d'intérêt dans les surnageants et les culots de babeurre de crème crue et de crème pasteurisée (n=3)

Les moyennes avec le même indice sur la même ligne ne sont pas significativement différentes à $\alpha=0,05$.

	BCCs	BCPs	BCCcc	BCPcc
MGGL	22,97 ^a	14,14 ^b	2,73 ^c	11,27 ^b
Caséine α - β	34,10 ^d	41,96 ^c	76,53 ^a	67,20 ^b
Caséine κ	9,35 ^a	14,43 ^a	14,81 ^a	13,24 ^a
β -lg	25,23 ^a	20,88 ^b	1,05 ^d	7,13 ^c
α -la	8,35 ^a	8,61 ^a	1,75 ^b	1,16 ^b

La figure 22 présente les proportions relatives occupées spécifiquement par les protéines de la MGGL dans les culots caséiques des babeurres de crème crue et des babeurres de crème pasteurisée. Ces résultats mettent en évidence une plus forte proportion occupée par les protéines PAS 6/7, la BTN et la CD36 lorsqu'une pasteurisation est appliquée. À l'inverse, la proportion occupée par la XO et la MUC1 diminue par l'application d'une pasteurisation.

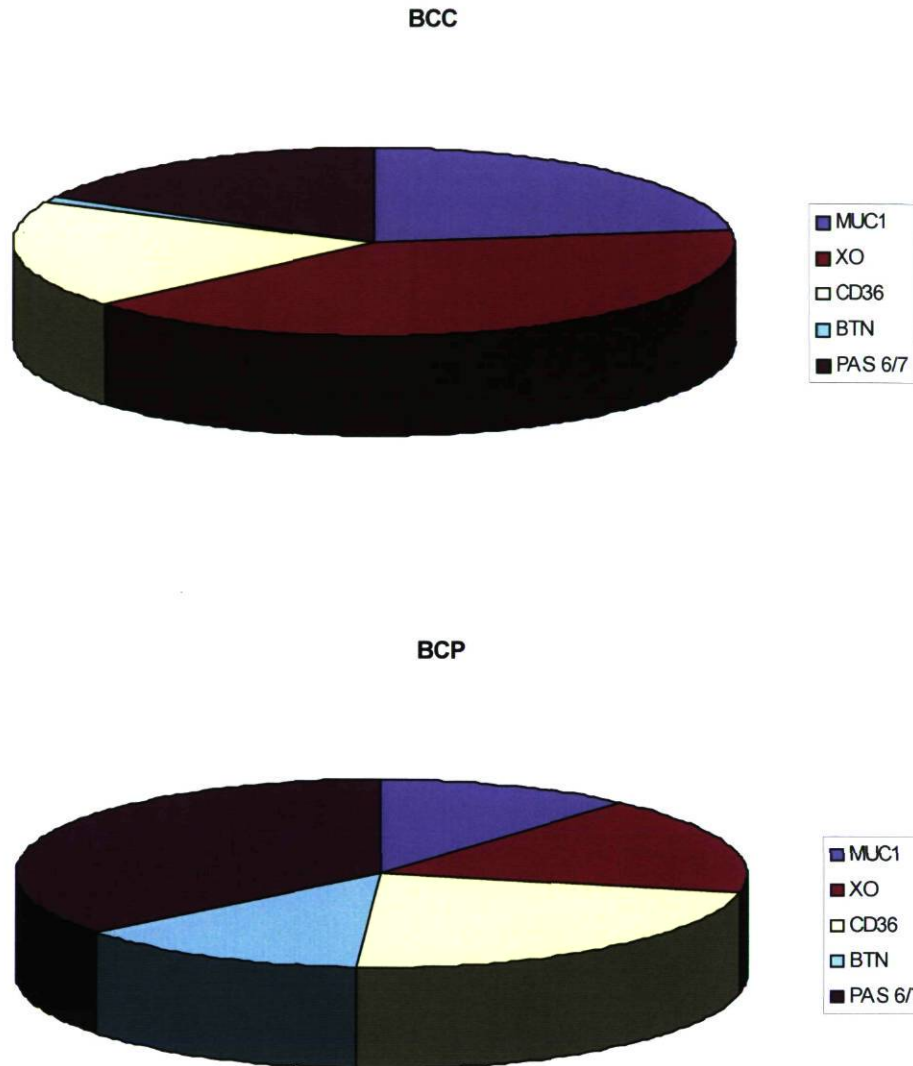


Figure 22 Proportion relative occupée par les protéines de la MGGL dans les culots caséiques des fractions de BCC et BCP en fonction de l'application d'une pasteurisation

Les valeurs ont été analysées par densité colorimétrique

5.4 Discussion

Les résultats obtenus à partir des gels électrophorétiques 1D-SDS-PAGE et 2D-NR-R-SDS-PAGE, ainsi que des analyses de densité colorimétrique soutiennent l'hypothèse de départ avancée par les travaux de Morin et al., (2008) stipulant que des interactions entre les protéines de la MGGL et les micelles de caséine sont créées lors de la pasteurisation de la crème servant à fabriquer le babeurre.

Les gels 1D-NR-SDS-PAGE et 1D-R-SDS-PAGE montrent premièrement que ces liens permettraient la formation de complexes volumineux, maintenus par le biais de liaisons disulfures. L'ajout d'un agent réducteur montre que ces complexes impliqueraient la caséine κ , la β -lg et les protéines de la MGGL, plus particulièrement la BTN, la PAS 6/7. On ne peut toutefois exclure la possibilité que la pasteurisation ait pu mener à une insolubilisation des protéines de la MGGL qui sédimenteraient alors avec les caséines sans forcément s'y fixer. Une analyse de densité colorimétrique sur les gels NR-SDS-PAGE des échantillons de babeurre en complémentarité avec celle effectuée sur les gels R-SDS-PAGE serait ici pertinente à réaliser pour clarifier le phénomène.

La caséine κ est déjà reconnue pour sa capacité à créer des liens avec les protéines sériques, plus particulièrement avec la β -lg. Ces liens sont d'ailleurs mis en évidence dans les échantillons pasteurisés des culots caséiques de lait écrémé (LÉPcc) des gels 1D-R-SDS-PAGE. Sa position à la surface externe des micelles explique sa facilité à interagir avec les autres protéines du milieu. De plus, elle possède deux résidus cystéines lui permettant de créer des liens disulfures (Fox, 1992). Par ailleurs, on reconnaît à la caséine κ un rôle majeur dans la coagulation fromagère (Eck & Gillis, 2000). Les liens covalents la liant avec les protéines de la MGGL, en plus de ceux l'unissant à la β -lg, pourraient donc contribuer à expliquer le mauvais comportement fromager du babeurre.

La BTN contient également des groupements disulfures qui lui permettent d'interagir par le biais de ponts disulfures avec d'autres protéines. Cette protéine, de pI situé entre 5,0 et 5,4, est toutefois reconnue pour être fermement accrochée à la

membrane de globule de gras (Mather, 2000). En raison de son caractère liposoluble, il est donc surprenant que cette protéine située originellement à la surface interne de la MGGL interagisse avec les caséines. Or, dans le babeurre, la MGGL se retrouve sous forme de fragments, ce qui peut par conséquent faciliter sa capacité à interagir avec le milieu environnant. Il faut toutefois noter qu'aucune différence entre les profils des gels électrophorétiques 1D-R-SDS-PAGE des babeurres et ceux des crèmes n'a été observée. Ainsi, selon nos résultats, les interactions protéiques impliquant les protéines de la MGGL ne montrent pas de réactivité différente selon que la MGGL soit dispersée en fragments comme dans le cas du babeurre, ou à la périphérie des GGL, comme dans le cas de la crème. Une autre hypothèse pour expliquer alors le potentiel de réaction de la BTN avec les micelles de caséine seraient donc possiblement que les groupements disulfures de cette protéine, qui sont reconnus pour stabiliser la structure de la protéine, aient modifié sa réactivité, favorisant par conséquent les interactions interprotéiques (Mather, 2000).

La PAS 6/7 est quant-à elle logée à la surface externe du GGL et est caractérisée par une forte thermolabilité, expliquant sa participation aux mécanismes qui sont reliés à des réactions thermiques. Sa structure comprend pour sa part 6 groupements disulfures, la rendant potentiellement capable d'interagir avec les micelles de caséine (Mather, 2000).

Ces résultats, soutenant la présence d'interactions entre les protéines de la MGGL, les micelles de caséine et les protéines sériques, s'apparentent donc à ceux de Ye et al., (2004b), ayant étudié pour leur part le profil électrophorétique 1D-NR-SDS-PAGE et 1D-R-SDS-PAGE d'échantillons de MGGL isolées à partir de lait entier pasteurisé ($\geq 65^{\circ}$ C pendant 10 min). Dans ces travaux, la possibilité de liens directs entre les micelles de caséine et les protéines de la MGGL n'avait toutefois pu être confirmée puisque la présence conjointe des micelles et des protéines de la MGGL pouvait être également due à leur capacité commune à se lier par des liens disulfures à la β -lg également retrouvée.

Les résultats du profil électrophorétique des gels 2D-NR-R-SDS-PAGE tendent par ailleurs à préciser ces mécanismes. Ces gels semblent en effet montrer que des

interactions covalentes impliquant directement des protéines de PM variant autour de 75 000 Da et de 28 300 Da seraient créées par le biais de liaisons disulfures. Ces PM correspondent le plus vraisemblablement aux PM des micelles de caséine (19 à 25 KDa) et à ceux des protéines de la MGGL, plus particulièrement à la BTN et la CD 36. Les mécanismes d'interaction entre les protéines de la MGGL et les micelles de caséine pourraient donc faire intervenir des liens directs covalents. Il est à noter que puisque l'intensité des bandes obtenues est proportionnelle à la quantité de protéines présentes, il se peut que d'autres protéines soient également impliquées dans la formation de ces liens mais que leur concentration soit trop faible pour les rendre détectables en deuxième dimension. Ceci pourrait ainsi expliquer pourquoi les bandes qui correspondent à la PAS 6/7 sont absentes dans la deuxième dimension au contraire de la première dimension.

Cette implication de la PAS 6/7 dans les interactions entre les caséines et les protéines de la MGGL mise de l'avant par nos travaux est toutefois divergente des travaux de Ye et al., (2004b) et de ceux de Kim & Jiménez-Flores, (1995). En effet, ces travaux ont pour leur part montré une diminution du contenu de ces protéines dans des échantillons de MGGL pasteurisés. Cette diminution a été attribuée à l'action de la β -lg, qui relarguerait ces protéines dans le surnageant. Ce départ de la PAS 6/7 faciliterait ainsi la β -lg à interagir avec les protéines de la MGGL. Dans notre cas, la présence de ces protéines dans les surnageants pasteurisés n'est pas particulièrement évidente. Ces protéines sont toutefois thermolabiles, signifiant donc que des liens avec la β -lg ont tout de même pu se former par des liens disulfures en libérant ces protéines (PAS 6/7) qui auraient pu par la suite être clivées en petits fragments non détectables. Toutefois, la nette augmentation de ces protéines en R-SDS-PAGE dans les culots caséiques isolés à partir de babeurre de crème pasteurisée suggère que d'autres liens indépendants à la présence de la β -lg pourraient également être générés. Ces mécanismes pourraient donc être vraisemblablement ceux propres aux micelles de caséine et aux protéines de la MGGL.

5.5 Conclusion

Des interactions entre les micelles de caséine et les protéines de la MGGL semblent être favorisés par la pasteurisation. Les résultats obtenus montrent que ces interactions pourraient faire intervenir des liens covalents en impliquant des liens disulfures directement créés entre les deux espèces protéiques. Ces liens pourraient donc expliquer le mauvais comportement fromager du babeurre en raison des liens interprotéiques qui unissent la caséine κ , inhibant par conséquent sa capacité fromagère.

Les mécanismes reliés à ces interactions semblent faire intervenir la caséine κ , la PAS 6/7 et la BTN. Ces protéines sont effectivement dotées de groupement disulfures et/ou thiols libres, possédant un fort potentiel de réactivité lors de la pasteurisation. On ne peut toutefois exclure la possibilité que la présence de ces protéines soit due à une insolubilisation créée par la pasteurisation. D'autres analyses telles que la réalisation de gels 2D-NR-R-SDS-PAGE sur les échantillons CCcc et CPcc ainsi que des analyses de densité colorimétriques réalisées sur les gels de NR-SDS-PAGE des échantillons de babeurre seraient nécessaires.

D'autre part, les analyses effectuées ne permettent pas de montrer une différence dans la réactivité des protéines de la MGGL selon que la MGGL soit sous forme intacte, telle que dans le cas de la crème, ou bien dispersée en fragments comme dans le babeurre. Tant dans la crème que dans le babeurre, la pasteurisation semble permettre un enrichissement de la PAS 6/7 et la BTN dans les culots caséiques.

Chapitre 6 Conclusion générale

Ce projet de recherche visait à mettre en évidence l'occurrence d'interactions entre les micelles de caséine et les protéines de la MGGL résultant de la pasteurisation de la crème. Pour ce faire, nous avons poursuivi deux objectifs soit de (1) Déterminer l'effet de la pasteurisation de la crème sur la taille et la mobilité électrophorétique des micelles de caséine du babeurre; et (2) Identifier l'effet de la pasteurisation sur la distribution des protéines de la MGGL au sein de la fraction caséique et définir le type d'interactions entre les deux constituants.

Pour le premier objectif, les liens entre les micelles et les protéines de la MGGL n'ont pas conduit à des changements physicochimiques mesurables chez les micelles de caséine de babeurre de crème pasteurisée, en ce qui concerne leur taille et leur charge. Des mécanismes particuliers relatifs à ces complexes encore non définis pourraient intervenir pour expliquer le phénomène. Tel que mentionné, la méthodologie peut également avoir contribué à l'obtention de ces résultats. En effet, les agrégats protéiques formés après pasteurisation révélés par NR-SDS-PAGE auraient été retenus par filtration, ne permettant pas leur présence dans le filtrat, et par conséquent, ne permettant pas d'observer des variations de taille moyenne ainsi que de potentiel zéta.

Les travaux relatifs au second objectif, notamment les analyses en électrophorèse, suggèrent que les micelles de caséine réagiraient avec les protéines de la MGGL. Ces interactions feraient intervenir plus spécifiquement la caséine κ , PAS 6/7 et la BTN. Ces interactions génèreraient donc des complexes maintenus par des liaisons covalentes de type disulfures établies directement entre les deux protéines.

Les observations rapportées dans ce mémoire de maîtrise soutiennent donc l'hypothèse que la pasteurisation appliquée à la crème lors de la fabrication du babeurre modifie l'environnement physicochimique des micelles de caséine en favorisant la création d'interactions entre ces dernières et les protéines de la MGGL.

La principale conséquence de ces interactions demeure sans doute de nature technologique. La caséine κ étant ainsi liée, sa capacité fromagère devient diminuée, pouvant expliquer par conséquent le mauvais comportement fromager du babeurre de crème pasteurisée. Du point de vue des protéines de la MGGL (PAS 6/7 et BTN), l'impact de ces interactions pourrait se situer au niveau de leurs effets physiologiques potentiels, en ce qui a trait à leur enrichissement. Cependant aucune étude n'a abordé ces aspects jusqu'à présent.

En termes de perspectives, les liaisons étant maintenant davantage définies, des moyens pouvant minimiser leur occurrence ou leurs effets restent à être identifiés. Il est clair que, pour des raisons innocuitaires, la pasteurisation de la crème demeure une étape incontournable pour l'utilisation du babeurre en fromagerie. Toutefois, des composants (CLA, rétinol) déjà reconnus pour diminuer l'émergence de ces liens entre les micelles de caséine et les protéines sériques seraient un champ d'investigation intéressant à envisager. De même, le pH de pasteurisation étant reconnu comme ayant un impact majeur sur les interactions protéiques sous l'action de traitements de chaleur (Considine et al., 2007), il pourrait être prometteur de mener une étude systématique de l'effet de l'ajustement du pH de la crème avant pasteurisation sur les interactions induites entre les protéines de la MGGL et les micelles de caséine.

Enfin, même des défis économiques importants seraient posés, et que cela définirait une toute nouvelle problématique de recherche, l'enlèvement des caséines de la crème crue par lavage permettrait de maximiser l'utilisation des caséines pour la fromagerie, tout en réservant les composés mineurs de la MGGL pour le babeurre.

Chapitre 7 Bibliographie

Adamson A.W., *Physical chemistry of surfaces*, 6ème édition, New-York, Wiley (1997).

Alais C., *Science du lait : principes des techniques laitières*, 4^{ème} édition, Paris, Société d'éditions et de promotion agro-alimentaire (1984).

Anema S.G., *Role of kappa-casein in the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55,9: 3635-3642 (2007).

Anema S.G., Klostermeyer H., *Heat-induced, pH-dependent dissociation of casein micelles on heating reconstituted skim milk at temperature below 100°C*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45,4: 1108-1115 (1997).

Anema S.G., Li Y., *Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size*, Journal of Dairy Research, 70,1: 71-83 (2003).

Anema S.G., Li Y., *Further studies on the heat-induced, pH-dependent dissociation of casein from the micelles in reconstituted skim milk*, Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 33,5: 335-343 (2000).

Astaire J.C., Ward R., German J.B., Jiménez-Flores R., *Concentration of polar MFGM lipids from buttermilk by microfiltration and supercritical fluid extraction*, Journal of Dairy Science, 86,7: 2297-2307 (2003).

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*, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8,1: 1-23 (2007).

Dalgleish D.G., Banks J.M., *The formation of complexes between serum proteins and fat globules during heating of whole milk*, Milchwissenschaft, 46,2: 75-78 (1991).

Dalgleish D.G., Horne D.S., Law A.J.R., *Size-related differences in bovine casein micelles*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 991; 383-387, (1989).

Danthine S., Blecker C., Paquot M., Innocente N., Deroanne C., *Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait :synthèse bibliographique*, *Lait*, 80,2 : 209-222 (2000).

Darling D.F., Dickson J., *The determination of zeta-potential of casein micelles*, *Journal of Dairy Research*, 46:329-332 (1979).

Dewettinck K., Rombaut R., Thienpont N., Le T.T., Messens K., Camp J.V., *Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material*, *International Dairy Journal*, 18,5: 436-457 (2007).

De Wit J.N., Klarenbeek G., *Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins*, *Journal of Dairy Science*, 67,11: 2701-2710 (1984).

Eck A., Gillis J.C., *Cheesemaking from science to quality assurance*, 2ème édition, Paris, Éditions techniques & documentation (2000).

Famelart M.H., Tomazewski J., Piot M., Pezennec S., *Comparaison of rheological properties of acid gels made from heated casein combined with β -lactoglobulin or egg ovalbumin*, *International Dairy Journal*, 13; 123-134, (2003).

Fédération internationale de laiterie FIL 9C :1987, *Lait sec, lactosérum sec babeurre sec et sérum de babeurre sec, Détermination de la teneur en matière grasse (méthode Röse Gottlieb)*, Bruxelles, FIL (1987).

Fédération internationale de laiterie FIL 185-2000, *Lait entier : détermination de la teneur en azote. Méthode pratique par combustion selon le principe Dumas*, Bruxelles, FIL (2000).

Fox P.F., *Advanced Dairy Chemistry, vol 1:Proteins*, Londres, P.F. Fox (1992).

Fox P.F., *Heat-induced changes in milk*, 2ème édition, Bruxelles, International Dairy Federation (1995).

Fox P. F., Brodkorb A., *The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance*, International Dairy Journal, 18,7: 677-684 (2008).

Gassi J.Y, Famelart M.H., Lopez C., *Heat treatment of cream affects the physicochemical properties of sweet buttermilk*, Dairy Science and Technology, 88,3: 369-385 (2008).

Govindasamy-Lucey S., Lin T., Jaeggi J.J., Johnson M. E., Lucey J.A., *Influence of condensed sweet cream buttermilk on the manufacture, yield, and functionality of pizza cheese*, Journal of Dairy Science, 89,2: 454–467 (2006).

Govindasamy-Lucey S., Lin T., Jaeggi J.J., Martinelli C.J., Johnson M. E., Lucey J. A., *Effect of type of concentrated sweet cream buttermilk on the manufacture, yield, and functionality of pizza cheese*, Journal of Dairy Science, 90,6: 2675–2688 (2007).

Groupe Agéco, Production annuelle des produits et sous-produits du lait, Québec 1986 à 2007, [En ligne], <http://www.groupeageco.ca/fr/pdf/stat/TC3.pdf>, page consultée le 12 février 2009.

Havea P., Singh H., Creamer L.K., Campanella O.H., *Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions*, Journal of Dairy Research, 65: 79-91 (1998).

Horne D.S., *Casein micelle structure : Models and muddles*, Current Opinion in Colloid and Interface Science, 11,2,3: 148-153 (2006).

Houlihan A.V., Goddard P.A., Nottingham S.M., Kitchen B.J., Masters C.J., *Interactions between the bovine milk fat globule membrane and skim milk components on heating hole milk*, Journal of Dairy Research, 59,2:187-195 (1992).

- Hui Y.H., *Food biochemistry & Food processing*, USA, Blackwell Publishing (2006).
- Huott M.L., Josephson R.V., Hens J.R., Rogers G.W., Patton S., *Polymorphic forms of epithelial mucin, PAS I (MUC1) in milk of Holstein cows*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Partie B, Biochemistry and Molecular Biology*, 65, 4: 559-565 (1995).
- Jensen G.R., *The composition of bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000*, *Journal of Dairy Science*, 85,2: 295-300 (2002).
- Jiménez-Flores R., Brisson G., *The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how, when?*, *Dairy Science and Technology*, 88,1: 5-18 (2008).
- Joshi N.S., Thakar P.N., Jana A.H., *Utilization of buttermilk in cheese making—A review*, *Indian Food Packer*, 48,2: 59–65 (1994).
- Kim H.H.Y., Jiménez-Flores R., *Heat-induced interactions between the proteins of milk fat globule membrane and skim milk*, *Journal of Dairy Science*, 78,1: 24-35 (1995).
- Kinsella J.E., Whitehead D.M., *Proteins in whey : chemical, physical and functional properties*, *Advances in Food and Nutrition Research*, 33, 343-438 (1989).
- Kuwajima K., Ikegushi M., Sugawara T., Hiraoka Y., Sugai S., *Kinetics of disulfide bonds reduction in alpha-lactalbumin by dithiothreitol and molecular basis of superreactivity of the Cys 6-Cys120 disulfide bond*, *Biochemistry*, 29, 36: 8240-8249 (1990).
- Maderson G., *The effects of heat on the structure and aggregation behaviour of bovine b-lactoglobulins A,B, and C*, thèse Massey University, Palmerston North, New Zealand (1998).
- Malvern Instruments SA, *Zeta-Potentiel*, [En ligne], http://www.malverninstruments.fr/LabFre/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm, page consultée le 4 juin 2009.

Mather I.H., *A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk fat globule membrane*, Journal of Dairy Science, 83,2: 203-247 (2000).

McMahon D. J., Brown R. J., *Composition, structure, and integrity of casein micelles: A review*, Journal of Dairy Science, 67,3: 499–512 (1984).

Mc Mahon D.J., Mc Manus W.R., *Rethinking casein micelle structure using electron microscopy*, Journal of Dairy Science, 81:2985-2993 (1998).

Mietton B., *La typologie des fromages*, Symposium organise par la Fondation des Gouverneurs et le Centre de recherche et de développement sur les aliments d'Agriculture et d'Agroalimentaire Canada (1995).

Mistry V. V., Metzger L. E. , Maubois J. L., *Use of ultrafiltered sweet buttermilk in the manufacture of reduced fat Cheddar cheese*, Journal of Dairy Science, 79,7: 1137–1145 (1996).

Morin P., Britten M., Jiménez-Flores R., Pouliot Y., *Microfiltration of buttermilk and washed cream buttermilk for concentration of milk fat globule membrane components*, Journal of Dairy Science, 90,5: 2132-2140 (2007). (a)

Morin P. Jiménez-Flores R., Pouliot Y., *Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes*, International Dairy Journal, 17,10: 1179-1187 (2007). (b)

Morin P., Jiménez-Flores R., Pouliot Y., *Effect of temperature and pore size on the fractionation of fresh and reconstituted buttermilk by microfiltration*, Journal of Dairy Science, 87,2: 267-273 (2004).

Morin P. ,Pouliot M., Britten Y., *Effect of Buttermilk Made from Creams with Different Heat Treatment Histories on Properties of Rennet Gels and Model Cheeses*, Journal of Dairy Science, 91,3: 871-882 (2008).

Noh B., Richardson T., Creamer L.K., *Radiolabelling study of the heat induced interactions between α -lactalbumine, β -lactoglobuline and J-casein in milk and in buffer solution*, Journal of Food Science, 54,4: 889-893 (1989).

Noh K., Koo S.I., *Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats*, Journal of Nutrition, 134,10: 2611-2616 (2004).

Nollet L.M., *Handbook of food analysis*, 2ème édition, New-York, Marcel Dekker (2004).

O'Connell J. E., Fox P. F., *Heat stability of buttermilk*, Journal of Dairy Science, 83,8: 1728-1732 (2000).

Ono T., Yoshida M., Tanaami H., Ohkosi H., *Changes in casein micelle size induced by heating*, International Dairy Journal, 9,3,4,5,6: 405-406 (1999).

Parker A. E., Donato L., Dalgleish D. G., *Effects of added sodium caseinate on the formation of particles in heated milk*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53,21: 8265-8272 (2005).

Payens T.A.J., *Casein micelles: the colloid-chemical approach*, Journal of Dairy Research, 46,2: 291-306 (1979).

Phadungath C., *Casein micelle structure: a concise review*, Songklanakarin Journal Science Technology, 27,1: 201-212 (2005).

Poduval V. S., Mistry V. V., *Manufacture of reduced fat Mozzarella cheese using ultrafiltered sweet buttermilk and homogenized cream*, Journal of Dairy Science, 82,1: 1-9 (1999).

Qi P.X., *Studies of casein micelle structure: the past and the present*, Lait, 87,4,5: 263-383 (2007).

Ramachandra Rao H., Lewis M.J., Grandison A.S., *Effect of pH on flux during ultrafiltration of sweet whey and buttermilk*, Journal of Dairy Research, 62,3: 441-449 (1995).

Raval D. M., Mistry V. V., *Application of ultrafiltered sweet buttermilk in the manufacture of reduced fat process cheese*, Journal of Dairy Science, 82,11: 2334-2343 (1999).

Riccio P., *The proteins of the milk fat globule membrane in the balance*, Trends in Food Science and Technology, 15,9: 458-461 (2004).

Rodriguez del Angel C., Dalgleish D. G., *Structures and some properties of soluble protein complexes formed by the heating of reconstituted skim milk powder*, Food Research International, 39,4: 472-479 (2006).

Rombaut R., Dewettinck K., *Properties, analysis and purification of milk polar lipids*, International Dairy Journal, 16,11: 1362-1373 (2006).

Sawyer W.H., Coulter S.T., Jenness R., *Role of sulfhydryl groups in the interaction of κ -casein and β -lactoglobulin*, Journal of Dairy Science, 46:564-565 (1963).

Sharma S.K., Dalgleish D.G., *Effect of heat treatments on the incorporation of milk serum proteins into the fat globule membrane of homogenized milk*, Journal of Dairy Research, 61,3: 375-384 (1993).

Singh H., *The milk fat globule membrane, A biophysical system for food applications*, Colloid and Interface Science, 11,2,3: 154-163 (2006).

Slattery C.W., Evard R., *A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition*, Biochemistry Biophysics Acta, 317: 529-538 (1973).

Smith P., Van Brouwershaven J.H., *Heat-induced association of β -lactoglobulin and casein micelles*, Journal of Dairy Research, 47,3: 313-325 (1980).

Spitsberg V.L., *Invited Review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical*, Journal of Dairy Science, 88,7: 2289-2294 (2005).

Surel O., *Lipides et microfiltration: contribution à la compréhension des mécanismes de transfert*, Ph.D. Diss, ENSA, Rennes , France (1993).

Surel O., Famelart M.H., *Ability of ceramic membranes to reject lipids of dairy products*, Australian Journal of Dairy Technology, 50 ,2: 36-40 (1995).

Turcot S., St-Gelais D., Turgeon S.L., *Ripening of low fat cheddar cheeses made from milks enriched with phospholipids*, Lait, 82,2: 209-223 (2002).

Turcot S., Turgeon S.L., St-Gelais D., *Effet de la concentration en phospholipides de babeurre dans le lait de fromagerie sur la production et la composition de fromages allégés de type cheddar*, Lait, 81,3 : 429-442 (2001).

Vignola C.L. et collaborateurs, *Science et technologie du lait*, Montréal, Presses Internationales Polytechnique (2002).

Vuillemard J.-C., *Produits laitiers* (notes de cours), Département des sciences des aliments et de nutrition, automne 2005.

Walstra P., Jenness R., *Dairy Chemistry and Physics*, New York, John Wiley (1984).

Walstra P., Wouters T.J.M., Geurts T.J., *Dairy Science and technology handbook 2ème édition*, CRC , Taylor & Francis, 2006.

Wong P. Y. Y., Kitts D. D., *Chemistry of buttermilk solid antioxidant activity*, Journal of Dairy Science, 86,5: 1541-1547 (2003).

Ye A., Singh H., Oldfield D.J., Anema S., *Kinetics of heat-induced association of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with milk fat globule membrane in whole milk*, International Dairy Journal, 14:389-398 (2004). (a)

Ye A., Singh H., Taylor M.W., Anema S., *Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk*, Lait, 84,3: 269-283 (2004). (b)