

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid  
IbnBadis Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :  
MAZZOUZI OUSSAMA

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES**  
**Spécialité: Production et transformation laitières**

THÈME

**Caractéristiques des Caséines du Lait de Vache,  
Effet de la Température**

Devant les membres du jury

<b>Président</b>	Dahou Abdelkader Amine	<b>MCB</b>	U. Mostaganem
<b>Examineur</b>	Homrani Monia	<b>MAB</b>	U. Mostaganem
<b>Encadreur</b>	Hachemi Sassi	<b>MCB</b>	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales

Année universitaire 2020-2021

## **Remerciements**

Remerciez **Dieu** pour sa miséricorde et sa générosité envers nous

Certes, Santé, il pourra mener à bien ce travail.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements à tous

Ceux qui m'ont aidé dans ce travail.

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement :

Mon superviseur, **M. Sassi Hachemi.** , pour son acceptation de la direction compétente de mon travail. Pour sa disponibilité, son aide, sa patience, sa gentillesse et ses précieux conseils. J'adresse également mes sincères remerciements à : tous nos professeurs pour leur aide et leurs encouragements et enfin ces

Thanksgiving ne serait pas complet sans remercier **nos familles** pour leur aide et leur soutien. A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

**Merci beaucoup.**

## Dédicace

Je dédie cet humble travail

A ceux qui m'ont tant donné, que **Dieu** les préserve.

A mes chers **parents** : Vous m'avez toujours entouré d'affection,  
soutenu,

Rassurant et serviable, merci pour beaucoup de patience et de force.

À ma petite **famille** : pour l'aide, le soutien et les encouragements.

Pour toute ma **famille**

Pour toute la **promotion** de la production et de la transformation  
laitière.

Sans oublier tous les **professeurs** qui m'ont formé du primaire à  
l'université.

À tous ceux que j'aime.

Je le dédie également à tous les **employés** de la ferme **Hassi**

**Mamèche**, en particulier l'ingénieur de laboratoire,

**Nouredine Ben Harat**

## Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux et des figures

**Introduction Générale**

1

### **PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **Chapitre I : Composition du lait**

I-Définition du lait	3
II-Composition du lait	3
1. Les lipides	4
2. Les glucides	9
3. Les matières azotées totales (MAT)	10
3.1. Composition chimique et origine des matières azotées totales du lait	11
3.1.1. Caséines	13
3.1.2. Protéines solubles ou protéines du lactosérum	13
3.1.3. Azote non protéique	14
3.2. Variation de la teneur en matière protéique (TP)	14
3.3. Intérêt nutritionnel	15
4. Les minéraux	16
5. Les oligo-éléments	17
6. Les vitamines	19

#### **Chapitre II : Les caséines**

I. Les caséines	20
II. Description et composition physico-chimique de la micelle	21
1. Aspects et propriétés	21
1.1. La micelle	21
1.2. Propriétés des caséines	24

2. Les caséines $\alpha$ S	24
2.1. La caséine $\alpha$ S1	24
2.2. La caséine $\alpha$ S2	25
2.3. Les caséines $\beta$ et $\gamma$	25
2.4. La caséine k	26

### **Chapitre III : Effet de Température**

Introduction Générale	28
I- Traitement thermique du lait	31
1. Potentiel redox	31
2. Dégradation des protéines	33
3. Dégradation du lactose	35
4. Modification de l'équilibre minéral	39
5. Modification du pH	40
6. Stabilité thermique	40
7. Coagulation à la chaleur	44

### **PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE**

#### **Article I : MODIFICATIONS PHYSICOCHIMIQUES DE LA CASEINE MICELLAIRE APRES INTERACTION AVEC LE PEPTIDE F1-8 GENERE APRES HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA BETA-LACTOGLOBULINE.**

I. Résumé	45
II. Introduction	46
III. Matériels et méthodes	48
1. Production, isolement et purification de peptide	48
2. Production de micelles CN	49
3. Conception expérimentale	50
4. Une analyse	51
5. Analyses statistiques	52

IV. Résultat	54
V. Discussion	63
VI. Conclusion	64

## **Article II : Comportement du lait traité à 140 °C**

I. Résumé	65
II. Introduction	65
III. Matériel et méthode	66
1. Temps de coagulation à la chaleur	66
2. Traitement thermique à 140 °C	69
IV. Résultat	75
V. Discussion	82

<b>Conclusion Générale</b>	<b>84</b>
----------------------------	-----------

## Résumé

Le lait bovin est très pris en Algérie, afin de répondre aux besoins de la population qui ne cesse d'augmenter et qui consomme le lait à l'état frais ou transformé nombreuses sont les industriels qui transforme le lait en produit dérivés surtout le fromage. Pour ce dernier cas, il est établi que seuls les laits possédant la caséine  $\alpha_1$  exprimée avec fort pourcentages  $\alpha_1$  exprimée avec fort pourcentage pourraient donner lieu à la fabrication de fromages.

La tendance forte des caséines principales (as" aS2, f3 et K) de s'associer en solution aqueuse est bien connue et s'explique en' grande partie par la teneur élevée en ami no-acides apolaires. Néanmoins, la façon dont elles forment ces structures « quaternaires » est bien divergente : l'association des caséines as, et aS2 conduisant à des oligomères consécutifs, tandis que f3 et K forment des micelles d'un degré d'association assez élevé.

La capacité du lait à résister à de hautes températures est une propriété technologique importante. L'augmentation de la stabilité thermique du lait est désirable dans plusieurs applications alimentaires dans le but d'assurer la vie de tablette des laits stérilisés en évitant la gélification à l'entreposage (Singh, 2004).

**Mots clés** : lait cru, caséines, traitement thermique.

## Abstract

The cattle milk is very busy in Algeria, in order to meet the needs of the population which is constantly increasing and who consumes the milk in the fresh state or transformed many are the manufacturers who transforms the milk products derived mainly cheese. For the latter case, it established that only milks possessing  $\alpha_1$  exprimée avec fort pourcentages<sup>1</sup> casein expressed with a high percentage could give rise to the manufacture of cheeses.

The strong tendency of the main caseins (as "a<sub>2</sub>, f<sub>3</sub> and K) to associate in aqueous solution is well known and is largely explained by the high content of non-polar amino acids. form these "quaternary" structures is quite divergent: the association of the as, and a<sub>2</sub> caseins leading to consecutive oligomers, while f<sub>3</sub> and K form micelles with a fairly high degree of association.

The ability of milk to withstand high temperatures is an important technological property. Increasing the thermal stability of milk is desirable in several food applications in order to ensure the shelf life of sterilized milks by preventing gelation in storage (**Singh**, 2004).

**Key words:** raw milk, caseins, , heat treatment,



## التلخيص

إن حليب الأبقار كثر الاستهلاك في الجزائر، وذلك من أجل تلبية احتياجات السكان التي تتزايد باستمرار والذين يستهلكون الحليب في حالة طازجة أو محول. العديد من الشركات المصنعة التي تحول الحليب الى منتجات المشتقة منه بنسبة هو الأفضل  $1\% \text{ fort avec exprimée } \alpha_1$  ثبت أن الحليب الذي يمتلك الكازين خاصة الجبن في حالة تصنيع الجبن.

للارتباط في محلول مائي معروف جيداً ويمكن تفسيره في جزء (K و f3 و aS2" إن الميل القوي للكازين الرئيسي (مثل كبير منه بالمحتوى العالي من الأحماض الأمينية غير القطبية. تكوين هذه الهياكل "الرباعية" متباينة تماماً : اتحاد المذيلات بدرجة عالية نسبياً من الارتباط K و f3 يؤدي إلى أوليغومرات متتالية ، بينما يشكل aS2 و as الكازينين

تعتبر قدرة الحليب على تحمل درجات الحرارة المرتفعة خاصة تكنولوجية مهمة. زيادة الثبات الحراري للحليب أمر مرغوب فيه في العديد من التطبيقات الغذائية من أجل ضمان العمر الافتراضي للحليب المعقم عن طريق منع تكون الهلام في التخزين (سينغ ، 2004)

**الكلمات المفتاحية:** الحليب طازج ، الكازين ، المعالجة الحرارية

## Liste des figures

**Figure 01** : Modèle schématique supposé d'une section de micelle de caséines.

**Figure 02** : Structure primaire de la caséine  $\kappa$ -CN B-1P (**Eigel et al**, 1984) (Masse moléculaire : 19 007 Da).

**Figure 03** : Formation d'un intermédiaire énediol

**Figure 04** : Aperçu du stade initial de la réaction de Maillard (gal = galactose, R = chaîne protéique) (**van Boekel**, 1998).

**Figure 05** : Dégradation du composé d'Amadori au stade avancé de la réaction de Maillard sous conditions acides, neutres et alcalines (gal = galactose, R = chaîne protéique) (**van Boekel**, 1998).

**Figure 06** : Profil de stabilité à la chaleur en fonction du pH (**Adapté de Singh**, 2004).

**Figure 07** : Interactions induites par la chaleur selon le pH (**Singh**, 2004).

**Figure 08** : Chromatogrammes HPLC de l'hydrolysate tryptique complet, CTH (a) et étapes de lavage suivantes, premier (b) deuxième (c), troisième (d), quatrième (e) et cinquième (f).

**Figure 09** : Aspect visuel de la solubilité du CN micellaire en fonction du pH et de la concentration en Pf1-8 (a : CN pur, b : Pf1-8 pur, ce : CN-Pf1-8 au ratio 10:1, 5:1 et 1 : 1, respectivement).

**Figure 10** : Effets de la concentration de Pf1-8 (rapports 1:1 à 10:1) sur la distribution granulométrique du CN. Les distributions granulométriques de Pf1-8 et CN purs ont également été données. Chaque barre représentait la moyenne des lectures en triple. Les valeurs dans les lignes avec des lettres différentes sont significativement différentes dans le test LSD ( $P < 0,05$ ) pour un paramètre donné.

**Figure 11** : Effets de la concentration de peptide sur le potentiel zêta de CN. Chaque point représentait la moyenne des lectures en triple. Les valeurs dans les lignes avec des lettres différentes sont significativement différentes dans le test LSD ( $P < 0,05$ ) pour un paramètre donné.

**Figure 12 :** Profils de poids moléculaire de CN : solutions Pf1-8 obtenues par SEC-HPLC en fonction de pH et concentration Pf1-8.

**Figure 13 :** Page SDS des surnageants des différents CN: Pf1-8 et CN seul à pH 6,6 à 3,6 et Pf1-8 seule solution à pH 6,6 et marqueurs de poids moléculaire (MM).

**Figure 14 :** Effet de la durée du traitement d'électroréduction (min) sur le potentiel redox apparent (mV) et la concentration en oxygène dissous (ppm) du lait.

**Figure 15 :** Effet du pH initial et du temps de chauffage à 140 °C (0, 5 et 10 min) sur le pH du lait.

**Figure 16 :** Effet du pH (6,70 et 7,05) et du temps de chauffage à 140 °C (0, 5 et 10 min) sur la lysine disponible (%) des laits.

**Figure 17 :** Effet du pH (6,70 et 7,05) et du temps de chauffage à 140 °C (0, 5 et 10 min) sur la concentration protéique (%) du surnageant d'ultracentrifugation des laits.

**Figure 18 :** Effet du pH (6,70 et 7,05) et du temps de chauffage à 140 °C (0, 5 et 10 min) sur la concentration protéique de la zone de  $\kappa$ -caséine (%) du surnageant d'ultracentrifugation.

**Figure 19 :** Effet du pH (6,70 et 7,05) et du temps de chauffage à 140 °C (0, 5 et 10 min) sur la concentration et le profil protéique du surnageant d'ultracentrifugation des laits témoin, dégazé et électroréduit déterminé par SDS-PAGE.

## Liste des tableaux

**Tableau 01** : Constituants lipidiques du lait de vache et localisation dans les fractions physicochimiques, (g/100 g de matière grasse), source **FAO**, 1998.

**Tableau 02** : Distribution des principaux acides gras de la graisse du lait de vache (%) (**FAO**, 1998).

**Tableau 03** : Composition moyenne et distribution des protéines du lait (**FAO**, 1998).

**Tableau 04** : Constituants majeurs des matières salines du lait de vache (g/L) (**FAO**, 1998).

**Tableau 05** : Teneurs en oligo-éléments du lait de vache ( $\mu\text{g/L}$ ) (**FAO**, 1998).

**Tableau 06** : Concentrations en vitamines du lait de vache (mg/L) (**FAO**, 1998).

**Tableau 07** : Composition moyenne d'une micelle de caséine.

**Tableau 08** : Rapport et concentration des solutions de protéines.

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

# Introduction générale

---

## Introduction

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec près de à 120 L/an /habitant (Kacimi El Hassani, 2013). Cet aliment occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens et apporte la plus grande part de protéines d'origine animale (Senoussi, 2008). Le lait, de par sa composition, est un aliment très riche. Sa place dans les us et coutumes algériens est très forte puisqu'il constitue l'un des plus forts symboles de la pureté. Il est également proposé avec les dattes pour montrer l'hospitalité. Sur le plan alimentaire, il est à la base de nombreuses préparations culinaires traditionnelles très ancrées dans l'histoire (jben, klila, d'hen, l'ben, raïb,...).

Le lait est un produit indispensable à l'équilibre de l'alimentation humaine. Il contient de nombreux nutriments qui fortifient notre organisme : protéines, glucides, lipides, sels minéraux, vitamines et oligo-éléments. Le lait fut de tous temps, un symbole de fertilité, de richesse et d'abondance. Il représente un milieu biologique fortement altérable par voie microbienne en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin de la neutralité et de sa richesse en composants biodégradables (lactose, protéines et lipides) (Huyghebaert, 2006).

Les protéines du lait se divisent en 2 grandes catégories, d'une part les caséines précipitables à pH 4,6 formant la trame protéique du fromage et d'autre part, les protéines sériques solubles que l'on retrouve dans le lactosérum.

Le rendement de transformation du lait en fromage dépend du taux protéique et de la part des caséines dans la fraction protéique du lait. Le taux protéique varie selon trois grandes catégories de facteurs : génétique, physiologique et alimentaire.

## **Introduction générale**

---

En Algérie le rendement fromager n'est pas stable et change d'une époque à une autre et, même d'une région à une autre. Pour cela, l'objectif de notre travail est double, d'une part, l'extraction des caséines à partir de lait de vache de la région Ouest de l'Algérien et d'autre part, la caractérisation électrophorétique des caséines dans le but de comparer le profil de ces caséines durant les saisons de l'été et de l'automne.

**PARTIE I**  
**ETUDE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**



**I. Définition du lait :**

C'est en 1909 que le congrès international de la répression des fraudes a défini ainsi le lait : « le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (**Larpent et al.**1997).

Le lait sans indication de l'espèce animale de provenance correspond au lait de vache (**Larpent et al**, 1997).

Le lait apparaît comme un liquide opaque, blanc mat, plus au moins jaunâtre selon sa teneur en B-carotènes et en matière grasse. Il a une odeur peu marquée mais reconnaissable (**Cniel**, 2006).

**II. Composition du lait :**

Lait est un mélange complexe constitué à 90% d'eau et qui comprend :

- une solution vraie contenant les sucres, les protéines solubles, les minéraux et les vitamines hydrosolubles.
- une solution colloïdale contenant les protéines, en particulier les caséines.
- une émulsion de matières grasses dans l'eau.

La densité du lait est de 1,030 à 1,034 g/ml.

Le pH du lait est proche de la neutralité : 6,6 à 6,8. (**Courtet**, 2010)

**1. Les lipides :**

Les matières grasses sont présentes dans le lait sous forme d'une émulsion de globules gras. La teneur en matières grasses du lait est appelée taux butyreux (TB).

Les termes «matières grasses» et «lipides» ne sont pas synonymes. En effet, la matière grasse obtenue par des moyens mécaniques (produit de l'écrémage obtenu par centrifugation) représente le contenu du globule gras. De ce fait, elle ne contient pas les lipides polaires ou complexes (phospholipides, etc.), mais contient par contre des composés liposolubles qui ne sont pas des lipides au sens strict et que l'on nomme «substance lipéide». Il s'agit essentiellement d' « hydrocarbures » (dont le carotène), d'alcools (dont le cholestérol et la vitamine E) et de vitamines liposolubles (A, D, K).

Cette fraction encore appelée insaponifiable regroupe donc des composés variés et nombreux qui, en raison de leur importance et de leur rôle, seront étudiés séparément, même s'ils représentent moins de 1% de la matière grasse totale du lait. (FAO, 1998).

Les lipides (fraction saponifiable) constituent donc l'essentiel de la matière grasse (>98%). (Tableau N°1) ci-contre détaille à la fois la teneur (par 100 g de matière grasse) et la (ou les) localisation(s) principale(s) des lipides du lait. (Fredot, 2006).

De tous les composants du lait de vache, les lipides sont ceux qui, quantitativement et qualitativement, varient le plus. Les taux moyens précisés dans la littérature (35 g/litre) peuvent être retenus en pratique industrielle lorsque le lait est un mélange provenant de plusieurs animaux. (Mittaine, 1980).

L'origine des acides gras du lait est double :

- les acides gras dont la chaîne carbonée contient de 4 à 12 atomes de carbone sont synthétisés par la mamelle à partir de précurseurs sanguins : l'acétate et le butyrate d'origine ruminale. Ces acides gras sont nettement plus abondants dans le lait des ruminants que dans le lait des monogastriques
- les acides gras dont la chaîne carbonée contient 18 (et plus) atomes de carbone sont directement prélevés dans le plasma sanguin. Ils proviennent de l'alimentation, des réserves adipeuses ou d'une synthèse dans d'autres tissus que la mamelle.
- les acides gras à 14 et 16 atomes de carbone proviennent soit d'une synthèse de novo par la mamelle soit d'un prélèvement dans le flux sanguin. (FAO, 1998)

**Tableau 1** : Constituants lipidiques du lait de vache et localisation dans les fractions physicochimiques, (g/100 g de matière grasse), source **FAO**, 1998.

<b>Constituants lipidiques</b>	<b>Proportions</b>	<b>Localisation</b>
<b>Triglycérides</b>	96-98	Globule gras
<b>Diglycérides</b>	0,3-1,6	Globule gras
<b>Monoglycérides</b>	0,0-0,1	Globule gras
<b>Phospholipides</b>	0,2-1,0	Membrane du globule gras et lactosérum
<b>Cérébrosides</b>	0,0-0,08	Membrane du globule gras
<b>Stéroïdes</b>	0,2-0,4	Globule gras
<b>Acides gras libres</b>	0,1-0,4	Membrane du globule gras et lactosérum
<b>Esters du cholestérol</b>	Traces	Membrane du globule gras
<b>Vitamines</b>	0,1-0,2	Globule gras

Hormis quelques rares phospholipides, stérols et acides gras présents dans le lactosérum, les graisses sont dispersées dans le lait sous forme de globules gras. Ces globules sont limités par une membrane formée de polypeptides (à raison de 40 %), de triglycérides (à raison de 35%) et de lipides complexes (phospholipides, stérols, cérébrosides, à raison de 15% environ). La membrane lipoprotéique confère au globule gras sa stabilité. De fait, elle est fragile et sa rupture (agitation, réfrigérations répétées, acidification) déstabilise l'émulsion avec libération de matière grasse. Celle-ci peut alors subir une lipolyse due à l'action des lipases membranaires ou microbiennes. (**Pougheon et Goursaud, 2001**)

Lors de l'homogénéisation du lait, le nombre de globules gras augmente et leur diamètre diminue très sensiblement (moins de 1 micron). De ce fait, la surface de contact augmente de 20 fois environ. Cette modification prévient la remontée de la matière grasse (dans les laits de longue conservation) et favorise sa digestion.

La composition lipidique du lait comprend deux grands groupes :

- les lipides simples (les glycérides)
- les lipides complexes (les phospholipides). (**Courtet, 2010**)

**Tableau 2** : Distribution des principaux acides gras de la graisse du lait de vache (%) (FAO, 1998).

Acides gras	Nomenclature	Moyennes
<b>Saturés</b>		
Butyrique	C4 :0	3,6
Caproïque	C6 :0	2,3
Caprylique	C8 :0	1,3
Caprique	C10 :0	2,7
Laurique	C12 :0	3,3
Myristique	C14 :0	10,7
Pentadécanoïque	C15 :0	1,2
Palmitique	C16 :0	27,6
Stéarique	C18 :0	10,1
Arachidique	C20 :0	0,2
<b>Monoinsaturés</b>		
Myristoléique	C14 :1	1,4
Palmitoléique	C16 :1	2,6
Oléique	C18 :1	26
<b>Polyinsaturés</b>		
Non conjugués:		
Linoléique	C18 :2	2,5
Linolénique	C18 :3	1,4
Arachidonique	C20 :4	0,3
Conjugués:		
Diène	C18 :2	0,8

**1.2. Variation de la teneur en matière grasse (variation du TB) :**

Pour le lait de vache, le taux butyreux se situe en moyenne, entre 35 à 45 g/L. Le TB varie :

- en fonction de la race et de la génétique de la vache. Par exemple, le lait des vaches Normandes est plus riche que le lait des Prim'Holstein. Le lait des vaches de race Jersiaise est très riche en matières grasses.
- en fonction du stade de lactation. Au cours d'une lactation, le taux butyreux varie en sens inverse de la quantité journalière de lait produit, et c'est au pic de lactation que le taux butyreux est le plus faible.
- au cours de la traite, c'est pourquoi la définition légale du lait précise que le lait est le produit de la traite intégrale.
- en fonction de la photopériode. Le taux butyreux est plus faible en été lors des jours les plus longs.
- Et enfin en fonction de l'alimentation :
  - tous les facteurs alimentaires qui peuvent conduire à une acidose ruminale (excès d'amidon, déficit en cellulose brute (<17%), défaut de fibrosité, défaut de transition alimentaire) peuvent provoquer une chute du taux butyreux.
  - les aliments riches en sucres simples (betteraves, mélasse, lactosérum, et dans une moindre mesure l'ensilage de maïs), s'ils ne sont pas distribués en excès (ce qui provoquerait une acidose) augmentent la production ruminale de butyrate, ce qui est très favorable à de bons TB.
  - les suppléments lipidiques de la ration des vaches laitières ont un effet variable dont nous parlerons en troisième partie. (**Coulon**, 1994).

**2. Les glucides :**

Le lactose, disaccharide composé de glucose et de galactose, est le seul glucide libre du lait présent en quantités importantes, sa teneur est très stable entre 48 et 50 g/L. Cette teneur présente de faibles variations à la différence du taux butyreux.

Il est synthétisé par la glande mammaire à partir du glucose prélevé dans le sang. Sa faible contribution à l'apport énergétique du lait (30%), ne fait pas de ce dernier un aliment équilibré en termes de répartition calorique (les recommandations théoriques prônent un apport de 50 à 60% de calories glucidiques). (**Mathieu, 1999**).

Le lactose joue un rôle nutritionnel particulier et intervient également comme élément de fermentescibilité. Il peut être hydrolysé par les acides forts, mais surtout par la lactase. La saveur sucrée du lactose est faible; lorsqu'on impute au saccharose une valeur arbitraire de 100%, celle du lactose atteint environ le tiers (de 27 à 39%).

Le lactose est le seul sucre qui puisse être utilisé correctement par le jeune animal car son tube digestif possède une lactase mais ne possède ni saccharase, ni maltase, ni amylase. Les capacités lactasiques diminuent avec l'âge et certaines personnes peuvent présenter des difficultés à digérer le lactose par défaut d'activité enzymatique, c'est l'intolérance au lactose, que nous détaillerons plus tard. (**Hoden et Coulon, 1991**).

Le lait contient en quantités souvent négligeables (0,1g/L) d'oligosaccharides notamment du glucose et du galactose issus de la dégradation du lactose. Certains industriels ont récemment mis sur le marché un lait allégé en lactose qui contient 90% de lactose en moins qu'un lait classique, ce qui permet à ces patients de continuer à boire du lait de vache sans subir les désagréments de cette intolérance. (**Lactel**, 2008).

### **3. Les matières azotées totales (MAT) :**

La dénomination « matières azotées totales » regroupe les protéines (Taux Protéique), ainsi que l'azote non protéique (dont l'urée). Le TP est une caractéristique importante du lait. Comme le taux butyreux, le TP conditionne la valeur marchande du lait, plus le TP sera élevé par rapport à une référence et plus le lait sera payé cher au producteur (paiement du point de TP). En effet plus le taux protéique (TP) est élevé et plus le rendement de transformation fromagère sera bon. La teneur totale avoisine 34 à 35 g/L. (**Fredot**, 2006).

#### **3.1. Composition chimique et origine des matières azotées totales du lait :**

Les protéines du lait représentent 95% des matières azotées totales.

Les 5% restants sont constitués :

- d'acides aminés libres et de petits peptides
- d'azote non protéique, essentiellement de l'urée (0,3 à 0,4 g/L) mais aussi de la créatinine, de l'acide urique,...



Les protéines sont constituées soit d'acides aminés seulement ( $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine), soit d'acides aminés et d'acide phosphorique (caséines  $\alpha$  et  $\beta$ ) avec parfois encore une partie glucidique (caséine  $\kappa$ ). Une vingtaine d'acides aminés interviennent dans la composition de ces protéines, leur séquence conférant à chaque protéine des propriétés propres. C'est sur la base de la précipitation à pH 4,6 (à 20°C) ou sous l'action de la présure qu'on sépare deux constituants : la ou plutôt les caséines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\kappa$ ) et les protéines solubles ou protéines du lactosérum (composition protéique : **Tableau N°3**).

Les protéines du lait forment un ensemble assez complexe constitué de :

- 80% de caséines,
- 20% de protéines solubles : lactalbumines, lactoglobulines, sérum albumines, Immunoglobulines...

Ces protéines ont des origines différentes :

- 90% des protéines du lait sont synthétisées par la mamelle (et sont spécifiques du lait), les caséines sont entièrement synthétisées par la mamelle, les lactoglobulines sont des protéines sanguines modifiées par la mamelle.
- 10% des protéines du lait (sérum albumines, immunoglobulines) proviennent directement du sang. (**Courtet, 2010**).

**Tableau 3** : Composition moyenne et distribution des protéines du lait (FAO, 1998).

	Moyennes absolues (g/L)	Moyennes relatives (%)
Matières azotées totales	34	100
Protéines	32	94
Protéines non solubles ou caséine entière	26	82
Protéines solubles 6 18	6	18
a -lactoglobuline	2,7	45
b -lactalbumine	1,5	25
Sérum-albumine	0,3	5
Globulines immunes	0,7	12
Protéoses peptones	0,8	13
Substances azotées non protéiques	2	6

**3.1.1. Caséines :**

Les caséines sont des polypeptides phosphorés associés à des constituants minéraux, en particulier le calcium, mais aussi le phosphore, le magnésium et le citrate, de manière à former des micelles de phosphocaséinate de calcium. En présence de calcium, elles forment des unités qui agrègent plusieurs milliers de molécules, constituant les micelles de caséine dispersés dans la phase hydrique du lait (diamètre variant de 100 à 250  $\mu\text{m}$ ). Cette configuration spatiale permet aux enzymes hydrolytiques (carboxypeptidases) une digestion plus aisée. (Jean et Dijon, 1993).

**3.1.2. Protéines solubles ou protéines du lactosérum :**

Les protéines solubles représentent environ 20% des protéines totales du lait de vache. Elles flocculent difficilement en présence d'acide ou de présure. Par contre, à l'exception des protéoses peptones, elles sont dénaturées par la chaleur et sont entraînées lors de la coagulation de la caséine sous l'action de la présure. Un chauffage à 80°C pendant une minute en dénature environ 20%, mais, lors de la pasteurisation UHT (72°C pendant 15 à 20 secondes), la dénaturation est négligeable.

Son constituant essentiel (50-55%) est la  $\beta$ -lactoglobuline bovine, totalement absente du lait humain. Son rôle n'est pas connu. La deuxième protéine soluble (20-25%) du lait bovin est, par ordre d'importance, l' $\alpha$ -lactalbumine. Elle est présente dans le lait de tous les mammifères qui sécrètent du lactose puisque cette protéine est partie intégrante de l'enzyme de synthèse du lactose. (Debry, 2001).

Parmi les protéines solubles restantes certaines, comme la sérum-albumine, ont une faible valeur nutritionnelle. D'autres comme les immunoglobulines et la lactoferrine n'en ont pas du tout.

Le taux de lactoferrine est très bas dans le lait de vache (0,2 g/litre). La lactoferrine bovine est nettement plus saturée en fer que la lactoferrine humaine (environ 30% contre 5%) et ce fer lié est peu biodisponible pour l'absorption digestive tant chez l'enfant que chez l'adulte. (**Thapon**, 2005).

Les protéines du lactosérum ont une valeur nutritive majeure en nutrition humaine, car elles sont riches en acides aminés essentiels. Les protéines des laits de vache et de femme ont un profil en acides aminés différent. En conséquence, lorsqu'une formule lactée adaptée au lait maternel (laits infantiles dits «à prédominance ou enrichis en lactalbumines») est choisie pour alimenter un enfant, les protéines du lactosérum induisent dans le plasma du nourrisson un profil en acides aminés tout différent de celui obtenu par l'administration d'un lait de vache non modifié. (**Vignola**, 2002).

### **3.1.3. Azote non protéique :**

Le taux d'urée du lait de vache est bas et ceux de taurine et de carnitine sont faibles.

### **3.2. Variation de la teneur en matière protéique (TP) :**

Le taux protéique (TP) varie essentiellement :

- en fonction de la race. Par exemple, le lait des vaches Normandes est plus riche que le lait des Prim'Holstein.
- en fonction de la génétique,
- en fonction de la photopériode, le TP est plus faible en été lors des jours longs.

- en fonction de l'alimentation :

- le principal facteur alimentaire est l'apport d'énergie. Si les besoins énergétiques de l'animal ne sont pas couverts, il y a une diminution du taux protéique. Une sous alimentation totale ou protéique provoque une chute du taux protéique (TP) en plus d'une chute de la production laitière dans toutes les espèces.

- chez la vache laitière, si la ration est riche en énergie, la synthèse protéique est stimulée. Par contre, un excès de protéines alimentaires n'augmente pas le taux protéique (TP) mais augmente le taux d'azote non protéique en particulier le taux d'urée. Le taux d'urée du lait est identique à celui du sang de la vache et peut être utilisé comme un indicateur d'une surnutrition ou sous-nutrition protéique.

- chez les vaches laitières très hautes productrices, l'apport d'acides aminés limitant (lysine, méthionine le plus souvent) protégés des dégradations ruminales (tourteaux tannés, acides aminés de synthèse protégés) peut permettre une augmentation modérée du taux protéique (environ 1 g/kg). (Courtet, 2010)

### **3.3. Intérêt nutritionnel :**

Qualitativement, les protéines de lait ont une efficacité nutritionnelle élevée, elles ont:

- une bonne valeur biologique c'est-à-dire un bon équilibre en acides aminés indispensables.
- une digestibilité très élevée (90 à 96% pour leur coefficient de digestibilité apparente).

Les protéines du lait sont particulièrement bien adaptées à la croissance rapide, ce qui est le cas des très jeunes animaux. Les caséines sont pauvres en acides aminés soufrés, ce qui est compensé par la richesse en ces acides aminés de la lactoglobuline et de la lactalbumine. Malheureusement ces deux dernières protéines constituent la « peau » du lait que l'on chauffe et sont éliminées quand on filtre le lait. Les acides aminés soufrés deviennent donc le facteur limitant. Comme tous les autres aliments d'origine animale, le lait de vache est riche en lysine. Celle-ci est en revanche rapidement dénaturée par la chaleur et particulièrement lors de l'ébullition. (**Vignola, 2002**)

#### **4. Les minéraux :**

Les minéraux (ou matières salines) sont présents dans le lait à hauteur de 7g/litre environ (**Tableau N°4**). Les plus représentés en quantité sont le calcium, le phosphore, le potassium et le chlore. On retrouve ces matières salines soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble (ou colloïdale). Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont particulièrement biodisponibles. Les autres (calcium, phosphore, magnésium et soufre) existent dans les deux fractions. (**Gaucheron, 2004**).

Dans la fraction soluble, ils existent en partie sous forme libre (calcium et magnésium ionisés), en partie sous forme saline (phosphates et citrates) non dissociée (calcium et magnésium), ou encore sous forme complexe (esters phosphoriques et phospholipides). Dans la fraction colloïdale, les minéraux (calcium, phosphore, soufre et magnésium) sont associés ou liés à la caséine au sein des micelles. (**Jeantet et al, 2007**).

**Tableau 4** : Constituants majeurs des matières salines du lait de vache (g/L) (FAO, 1998).

<b>Minéraux : totaux (g/L)</b>	7
<b>calcium (g)</b>	1,25
<b>phosphore (g)</b>	1
<b>magnésium (g)</b>	0,12
<b>sodium (g)</b>	0,5
<b>potassium (g)</b>	1,25
<b>chlore (g)</b>	1
<b>autres (soufre, citrate...)</b>	1,8

### 5. Les oligo-éléments :

Leurs teneurs en oligo-éléments dans le lait varient fortement mais, au-delà de certaines limites, elles sont l'indice d'une contamination du lait et présentent un caractère toxique pour la santé et/ou nuisible en technologie laitière. Les teneurs en oligo-éléments du lait données dans la littérature (**Tableau N°5**) sont seulement indicatives, dans la mesure où elles subissent Chapitre 01 Composition du lait 29 l'influence de divers facteurs (alimentation, stade de lactation, etc.) et dépendent aussi des méthodes utilisées. (**Amiot et al, 2002**).

D'une manière générale, le lait constitue pour l'homme une mauvaise source d'oligoéléments. Ils s'y trouvent le plus souvent à des taux relativement modestes, et lorsque les taux semblent plus proches des besoins, ils sont présents sous forme inorganique (de moindre biodisponibilité). C'est le cas notamment du cuivre et du manganèse, très liés aux groupements phosphates de la caséine. Dans une certaine mesure le zinc (et le fer) font exception à cette règle. (**Jeantet et al, 2007**).

**Tableau 5 :** Teneurs en oligo-éléments du lait de vache ( $\mu\text{g/L}$ ) (FAO, 1998).

<b>Oligo-éléments</b>	<b>Teneurs</b>
<b>Brome</b>	150
<b>Cobalt</b>	0,5
<b>Cuivre</b>	20-40
<b>Fer</b>	200-500
<b>Fluor</b>	70-200
<b>Iode</b>	10-300
<b>Manganèse</b>	oct-30
<b>Sélénium</b>	oct-30
<b>Zinc</b>	3000-6000



**6. Les vitamines :**

Toutes les vitamines connues sont présentes dans le lait de vache. Les techniques de traitement du lait peuvent modifier sensiblement les taux, surtout pour la vitamine C (**Tableau N°6**). (Vignola, 2002)

**Tableau 6** : Concentrations en vitamines du lait de vache (mg/L) (FAO, 1998).

<b>Teneurs en vitamines</b>	
<b>Vitamines hydrosolubles</b>	
- B1 (thiamine)	0,42
- B2 (riboflavine)	1,72
- B6 (pyridoxine)	0,48
- B12 (cobalamine)	0,0045
- Acide nicotinique (niacine)	0,92
- Acide folique	0,053
- Acide pantothénique	3,6
- Biotine	0,036
- C (acide ascorbique)	8
<b>Vitamines liposolubles</b>	
- A	0,37
- $\beta$ -carotène	0,21
- D (cholécalférol)	0,0008
- E (tocophérol)	1,1
- K	0,03

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes et elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers, l'analyse du lait par minéralisation, permet d'évaluer que 95% de la quantité totale d'azote est présente dans les protéines dont la concentration moyenne est de 3.2%. Les composés azotés non protéiques sont principalement des protéases, des peptones et de l'urée. (**Brule et Lenoir**, 1987).

La matière azotée du lait est divisée en deux parties : la matière azotée protéique (correspond à 95 % de l'azote total) et la matière azotée non protéique (NPN). En fonction de leur solubilité à pH 4,6, les protéines du lait peuvent être réparties en deux catégories : les caséines (insolubles à ce pH) et les protéines du lactosérum (solubles à pH 4,6). (**Alais**, 1984).

La teneur du lait en protéines est une caractéristique essentielle de sa valeur marchande car plus le taux protéique est élevé, meilleur sera le rendement de la transformation technologique.

La matière protéique et les caséines en particulier prennent, ainsi, de plus en plus d'importance. (**Pougheon et Goursaud**, 2001)

### **I. Les caséines :**

Qui sont en suspension colloïdale, qui se regroupent sous forme de micelles et qui précipitent sous l'action de la présure ou lors de l'identification à un pH d'environ 4.6. (**Vignola**, 2002).

Les caséines sont très bien adaptées à la nourriture des nouveaux nés. Leurs structures moléculaires ne leur confèrent pas d'activité enzymatique. Elles constituent aussi la matière première des fromages. (**Soledad**, 2009).

Environ 95% des caséines dans le lait. En base sèche, les micelles de caséines contiennent 94% de protéines, et 6% d'espèces de faible poids moléculaire, et qui consistent en calcium, magnésium, phosphate et citrate. Les micelles sont hautement hydratées, elles contiennent environ 2,0 g d'H<sub>2</sub>O par g de protéine. (**Soledad**, 2009).

On distingue principalement 4 catégories de caséines:

- Les caséines  $\alpha$  ( $\alpha$ S1 et  $\alpha$ S2) (36% et 10% respectivement) ; Les caséines  $\beta$  (34%) ; Les caséines  $\kappa$  (13%) ; Les caséines  $\gamma$  (7%). (Jouan, 2002).

## II. Description et composition physico-chimique de la micelle :

### 1. Aspects et propriétés :

La caséine est un complexe protéique phosphoré à caractère acide qui précipite dans le lait à pH 4,6. Il s'agit d'une substance hétérogène même si elle a été longtemps considérée comme une protéine pure et homogène en raison de la constance de sa composition élémentaire. (Cayot et Lorient, 1998)

#### 1.1. La micelle :

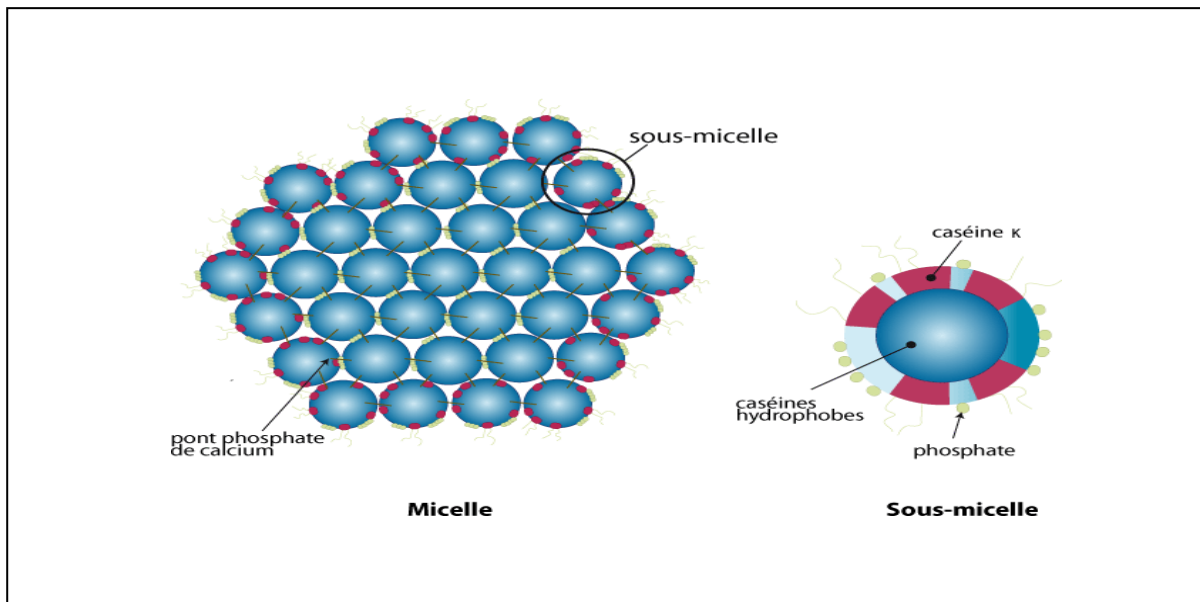
Les caséines se présentent dans le lait sous forme d'un complexe organique et minéral (**figure1**).

Particule sphérique d'environ 180 nm constituée de submicelles de 8 à 20 nm (64), elle est très hydratée (2 à 4 g d'eau par g de protéine) et 7% environ de son extrait sec (**Tableau 7**) est composé de sels (phosphate, calcium, magnésium, citrate dans l'espace inter submicellaire).

Les submicelles pourraient être constituées d'environ 10 molécules des 4 caséines en proportion variable avec une répartition de caséine  $\kappa$  (hydrophile) en surface ; les submicelles les plus riches en caséine  $\kappa$  sont situées en surface de la micelle, ce qui la stabilise. Les portions C-terminales de la caséine  $\kappa$  hérissent la micelle et l'enveloppent d'une chevelure périphérique particulièrement hydrophile. (Cayot et Lorient, 1998).

Cependant, l'organisation exacte intramicellaire (très petites submicelles ou structure interne de caséines individuelles) n'est pas aujourd'hui précisément connue. (Mc Mahon et Mc Manus, 1998).

La coagulation du lait après addition de présure résulte, entre autres phénomènes, d'une action primaire sur la caséine k (protéolyse entre les acides aminés 105 (Phénylalanine) et 106 (Méthionine) situés à l'extérieur de la micelle) laissant des plages hydrophobes de paracaséine k (les acides aminés 1 à 105 restant fixés à la micelle). Sous l'influence de calcium ionique  $Ca^{++}$  dissous, il y a agglomération des micelles dépourvues de caséino glycopeptide (cas k 106-169 qui se solubilise) en un réseau : le caillé. (Lenoir, 1985, Brule et Lenoir, 1987).



**Figure 1 :** Modèle schématique supposé d'une section de micelle de caséines.

**Tableau 7** : Composition moyenne d'une micelle de caséine.

	<b>En g pour 100 g de caséine*</b>	<b>En g/l de lait**</b>
<b>CASEINES :</b>	93,3	29,5 (donnée surévaluée)
$\alpha$ S1	35,6	11,9
$\alpha$ S2	9,9	3,1
$\beta$	33,6	9,8
$\kappa$	11,9	3,5
$\gamma$	2,3	1,2
<b>CONSTITUANTS SALINS :</b>	6,7	1,84 (estimation)
Phosphate		
Ca	2,9	0,89
Citrate	2,9	0,79
Mg	0,4	0,12
Autres (minéraux, sucres)	0,1	0,04
	0,4	

Teneur en eau = 63% ; matières sèches : 37%

D'après Mc Mahon et Brown, (1984)\* et Swaisgood, (1995) \*\*

## 1.2. Propriétés des caséines :

### 1.2.1 PHi et charge électrique :

Les groupements acides libres des résidus glutamyle, aspartyle et phosphoryle en nombre supérieur aux groupements basiques libres  $-NH_2$  des lysines et autres acides aminés diaminés, confèrent à la caséine entière un pHi de 4.65, une charge négative et des propriétés acides (réaction avec les métaux alcalino-terreux). (**Hammarsten et Physiol**, 1885).

### 1.2.2. Propriétés associatives des caséines :

A pH = 7, lorsqu'on élève la température, les caséines b et k donnent des polymères d'une vingtaine à une trentaine d'unités, les différentes molécules étant unies par des liaisons hydrophobes. De plus, les polymères k + aS2 résultent de liaisons disulfures S-S intermoléculaires.

Le  $Ca^{2+}$  complexe les molécules  $\alpha S1$ ,  $\alpha S2$ ,  $\beta$  et diminue ainsi leur charge, leur hydrophilie et les insolubilise. (Ratray et al, 1997).

## 2. Les caséines $\alpha S$ :

### 2.1. La caséine $\alpha S1$ :

C'est la protéine la plus importante en masse, elle possède 199 AA pour 23 614 g/mol.

Cette caséine est très sensible au calcium au pH normal du lait (=6,7) : quelle que soit la température et en présence de calcium, on constate une formation de flocons.

Dans la micelle, la caséine  $\alpha S1$  est peu accessible à la plasmine ; il est donc probable qu'elle se situe au cœur de la micelle masquée par d'autres caséines. (**Grippon**, 1960).

## 2.2. La caséine $\alpha$ 2 :

Elle représente 8 à 11% de la micelle de caséine, possède 207 AA et 13 à 10 phosphates (il s'agit de  $\alpha$ 2 ou  $\alpha$ 3 ou  $\alpha$ 4 ou  $\alpha$ 6 selon le nombre de phosphates) et son poids moléculaire estimé varie de 25150 à 25390 g/mol.

Grâce à la présence des 2 résidus cystéine, les molécules peuvent s'associer en dimères qui s'agrègent entre eux par interactions électrostatiques pour former des polymères ( $\alpha$ 5 dimère de  $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 4).

Par sa richesse en phosphate, elle est très sensible au calcium, et comme pour  $\alpha$ 1, la caséine  $\alpha$ 2 semble ne pas être en surface de la micelle. (**Grippon**, 1960).

## 2.3. Les caséines $\beta$ et $\gamma$ :

### 2.3.1. La caséine $\beta$ :

Représentant 25 à 35% de la micelle, avec ses 209 acides aminés et ses 5 groupements phosphates, elle possède beaucoup d'analogie avec la caséine  $\alpha$ 1.

Elle est sensible au calcium à température ambiante mais après déphosphorylation (expérience de laboratoire), la molécule perd cette sensibilité et devient capable d'empêcher la précipitation de la caséine  $\alpha$ 1 par le calcium.

Elle est sensible au froid et très hydrophobe (ces zones hydrophobes sont à l'origine de l'association des caséines  $\beta$  entre elles pour former des «néomicelles»). (**Grippon**, 1960).

### 2.3.2. La caséine $\gamma$ :

Il s'agit des fragments C-terminaux résultant de la protéolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine (protéase alcaline du lait). (**Grippon**, 1960).

#### 2.4. La caséine k :

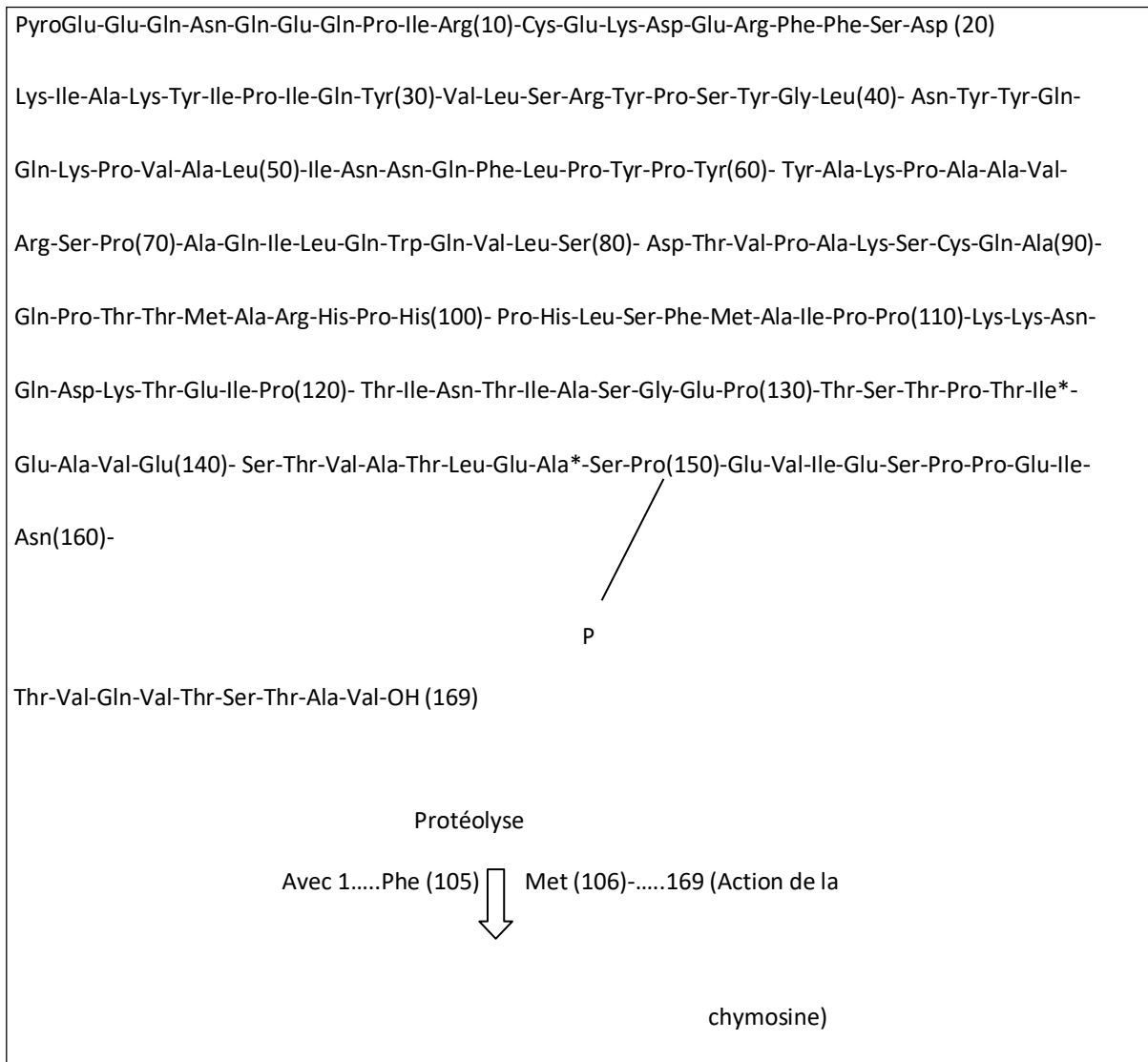
Une grande majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure. (**Grippon**, 1960).

Il s'agit d'une protéine de 169 acides aminés, phosphorylée (Serine 149) comportant 2 variantes génétiques A et B. Elle comporte un constituant majeur non glycosylé (**figure 2**) et des constituants mineurs glycosylés dont la structure précise est élucidée. (**Eigel et al**, 1984).

Cette caséine est insensible au calcium et stabilise les autres caséines phosphorylées vis à vis de ce cation. La coagulation du lait se fait suite à la protéolyse de cette caséine par la présure (ou chymosine : enzyme naturelle de la caillette du jeune bovin pré-ruminant) qui scinde la molécule en deux parties: la partie N-terminale ou paracaséine  $\kappa$  (1-105) et le fragment C-terminal ou caséinomacropéptide (CMP : 106-169) aux propriétés très contrastées: Dans le caillé, seules sont récupérées les caséines  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  et paracaséine k tandis que le CMP se retrouve dans le lactosérum.

Il est à noter que le CMP contient tous les glucides, quand ils existent, sur les Thréonine 131, 133, 135 et 136 (variant A uniquement). (**Sandra et al**, 2001).





**Figure 2 :** Structure primaire de la caséine κ-CN B-1P (Eigel et al, 1984) (Masse moléculaire : 19 007 Da).

**Introduction Générale**

Les traitements thermiques appliqués au lait altèrent ses propriétés coagulantes, ce qui rend le lait chauffé inapte à la fabrication fromagère. La fabrication fromagère est réalisée de préférence sur des laits non chauffés ou ayant subi une thermisation (**Vasbinder et al.**, 2003). Ensuite, les traitements thermiques imposés au lait modifient les cinétiques de coagulation. D'une part, l'entreposage du lait au froid conduit à une augmentation du temps de prise puisque les minéraux de la phase colloïdale sont solubilisés (**Raynal et Remeuf**, 2000). D'autre part, il est connu que le lait surchauffé prend plus de temps à coaguler (**Moir et al.**, 1930, 1931).

La littérature explique la baisse de l'aptitude à la coagulation des laits chauffés par une hydrolyse enzymatique incomplète, une concentration réduite en calcium sérique suite à la précipitation du phosphate de calcium et la stabilisation de la micelle de caséine grâce au recouvrement avec des protéines sériques dénaturées chargées positivement (**Vasbinder et al.**, 2003).

Ensuite, les études démontrent qu'une augmentation de la température de chauffage se traduit par une augmentation du RCT qui augmente de 10 à 15 fois pour les laits chauffés (**Vasbinder et al.**, 2003; **Dagleish**, 1990; **Singh et al.**, 1988). Un traitement thermique plus sévère que la pasteurisation se traduit par une augmentation du temps de coagulation et à des gels plus faibles. Finalement, lors d'un traitement thermique très sévère (>90 °C, 10 min), le lait perd l'aptitude à coaguler sous l'action de la présure (**Singh et al.**, 1988).

Un des effets du chauffage est le déplacement des équilibres ioniques vers les formes insolubles. Les modifications de composition de la surface des micelles et la précipitation des phosphates diminuent la stabilité de la phase colloïdale. La diminution de calcium soluble rend plus difficile la création de liaisons entre les micelles lors de la formation du gel. Les temps de coagulation allongent alors que la fermeté du caillé et la vitesse d'égouttage diminuent (**St-Gelais et Tirard-Collet, 2002**).

En ce qui a trait à l'augmentation du temps de prise, la formation du complexe  $\beta$ -LG- $\kappa$ -CN serait responsable de la baisse de sensibilité à la chymosine (**Morgan et al., 2000; Lucey, 1995; Singh et al., 1988**). Il a été démontré que le temps de coagulation augmente avec l'augmentation du degré de dénaturation de la  $\beta$ -lactoglobuline et avec le pourcentage de cette protéine associé aux micelles (**Singh et Waungana, 2001**).

La complexation des protéines du lactosérum dénaturées avec la caséine- $\kappa$  modifie la conformation de la  $\kappa$ -CN et rendrait le site d'hydrolyse moins accessible pour l'enzyme. De plus, une bonne partie de la  $\beta$ -lactoglobuline ne s'associe pas et se présente sous forme d'agrégats dans le sérum qui pourraient interférer dans les processus d'agrégation et de formation du réseau, d'où les gels plus faibles (**Waungana et al., 1996; Lucey, 1995; Lucey et al., 1993; McMahon et al., 1993; Dalgleish, 1990**). Toutefois, l'équipe de Vasbinder et coll. (2003) soutient que le début de la coagulation, soit le relâchement du CMP par hydrolyse enzymatique, n'est pas affecté par le chauffage. En effet, l'application d'un traitement thermique à 90 °C pendant 10 minutes au lait s'est traduit par une diminution de 6 % du CMP relâché, diminution insuffisante pour inhiber l'agrégation des micelles (**Vasbinder et al., 2003**).

L'agrégation des micelles a lieu indépendamment du traitement thermique appliqué cependant les micelles perdent la capacité de former un gel. Cette observation correspond à un temps de coagulation plus élevés et une diminution du module d'élasticité (G') tel que rapportés dans la littérature et qui sont attribués à une diminution de l'activité enzymatique, la précipitation du calcium et la dénaturation des protéines sériques (**Vasbinder et al., 2003**). Puisque les travaux ne démontrent aucun effet du traitement thermique sur l'hydrolyse enzymatique, la précipitation du phosphate de calcium par la chaleur comme facteur influençant l'hydrolyse enzymatique est exclue (**Vasbinder et al., 2003**). L'altération des propriétés coagulantes du lait chauffé est entièrement attribuée aux protéines sériques dénaturées qui enrobent les micelles de caséine puisqu'en absence de protéines sériques, les micelles de caséines du lait chauffé s'agrègent (**Vasbinder et al., 2003**).

## I. Traitement thermique

Les divers traitements thermiques appliqués au lait en industrie, tels que la pasteurisation et la stérilisation, peuvent avoir des effets dénaturants sur les protéines du lait. Des réactions de dégradation des protéines, de dégradation du lactose et des modifications de l'équilibre minéral sont observées. En effet, lors du chauffage, des réactions de dénaturation et d'agrégation de protéines se produisent et le phosphate de calcium précipite.

### 1. Potentiel redox

Les impacts des traitements thermiques sur le potentiel redox du lait ont été considérablement étudiés jusqu'au milieu du siècle dernier. Une baisse marquée du potentiel coïncide avec la libération des groupements thiols par dénaturation des protéines, principalement la  $\beta$ -lactoglobuline. (Sherbon, 1999). Tout d'abord, le chauffage du lait en présence d'oxygène accélère l'oxydation des thiols et la destruction du système acide ascorbique-dehydroascorbique. Ensuite, le chauffage favorise la réaction de Maillard entre le lactose et les protéines et la production de réducteurs de type énediol (Figure 3) (Walstra et Jenness, 1984).

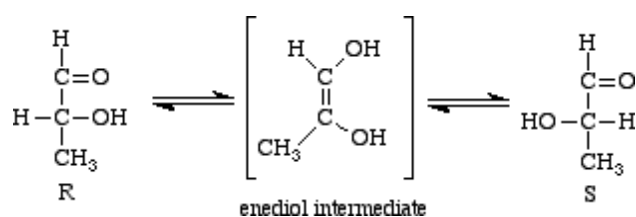


Figure 3 : Formation d'un intermédiaire énediol.

Ces diverses réactions diffèrent d'énergie d'activation. En conséquence, la balance globale du système redox après traitement thermique dépend grandement du temps et de la température utilisés. De plus, le taux de production de réducteurs par réaction de Maillard augmente avec la concentration en réactifs. Il y a donc davantage de ces composés réducteurs résultant du traitement thermique appliqué dans la concentration et le séchage du lait que de ceux utilisés dans les laits non-concentrés (**Walstra et Jenness**, 1984). Cependant, la désaération et traitements thermiques HTST résultent en un potentiel redox minimal et produisent des poudres de lait de qualité supérieure contre la dégradation produisant une saveur oxydée (**Sherbon**, 1999).

Des études, rapportées par **Walstra et Jenness** (1984), sur la capacité réductrice et le potentiel redox du lait sous différentes conditions montrent que le potentiel redox du lait témoin se situe à +315 mV. Lorsque ce lait est chauffé à 85 °C pendant 30 minutes, le potentiel redox diminue à +200 mV. Cependant, lorsque l'atmosphère n'est plus de l'air ambiant mais de l'azote, le potentiel redox chute à 0 mV, mettant en évidence l'importance des gaz dissous sur le potentiel redox des laits chauffés.

## 2. Dégradation des protéines

Alors que les caséines sont très résistantes à la chaleur, les protéines sériques le sont moins. Malgré cette résistance, les caséines peuvent tout de même être affectées et déstabilisées par la chaleur. (**O'Connell et Fox**, 2000).

### 2.1. Dénaturation des protéines sériques

Les différentes protéines sériques n'ont pas la même résistance face aux traitements thermiques. L'ordre de sensibilité à la chaleur est immunoglobulines > sérumalbumines >  $\beta$ -lactoglobuline >  $\alpha$ -lactalbumine (**Corredig et Dalgleish**, 1996). Le chauffage des protéines sériques entraîne l'ouverture des structures secondaire et tertiaire qui permet l'agrégation de ces protéines entre elles ou avec les micelles de caséine.

Le chauffage mène à une perte de la structure native de la protéine. La dénaturation des protéines sériques résulte en le déplissement de leurs polypeptides, exposant ainsi des résidus habituellement cachés à l'intérieur de la structure globulaire (**Singh et Waungana**, 2001; **Calvo**, 1995). Dans le cas de la  $\beta$ -lactoglobuline, ce processus intramoléculaire qui expose le cœur hydrophobe expose en même temps le groupement thiol libre ainsi que des ponts disulfures très réactifs (**Fryer et al.**, 1995). Les protéines dépliées présentent donc une configuration instable qui est ensuite stabilisée par la phase d'agrégation. La dénaturation de la  $\beta$ -lactoglobuline est réversible jusqu'à ce que l'agrégation prenne place tandis que la dénaturation de l' $\alpha$ -lactalbumine est réversible jusqu'à 85 °C (**Kinsella**, 1984).

La disponibilité de nouveaux sites exposés par le déplissement des protéines permet la formation d'agrégats constitués exclusivement de protéines sériques ou d'un mélange avec les caséines. Le fait que la  $\beta$ -lactoglobuline s'associe avec la micelle ou bien forme des agrégats exclusivement composés de protéines sériques dépend de plusieurs facteurs tels que la durée et l'intensité du chauffage, le pH, la force ionique,

La concentration en calcium et en phosphate solubles ainsi que le degré de dissociation de la caséine  $\kappa$  de la micelle (**Devold et al.**, 2000). L' $\alpha$ -lactalbumine, bien qu'elle participe aussi aux interactions, ne se lie pas directement aux caséines, elle le fait plutôt par l'intermédiaire de la  $\beta$ -lactoglobuline (**Dzurec et Zall**, 1985). En effet, il a été démontré que l' $\alpha$ -lactalbumine ne polymérise pas en l'absence des autres protéines sériques, même si des caséines sont présentes (**Calvo**, 1995). De plus, la présence de  $\beta$ -lactoglobuline est nécessaire à l'interaction de l' $\alpha$ -lactalbumine avec les micelles. En effet, en dessous de 90 °C, l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline s'associent pour former des complexes intermédiaires qui eux s'associent ensuite aux micelles (**Corredig et Dalgleish**, 1999). L'attachement de protéines sériques dénaturées à la surface de la micelle, fait l'objet de la prochaine section.

## 2.2 Formation d'un complexe entre la $\beta$ -LG et la caséine $\kappa$

Les groupements thiols libres présents dans la structure native de la  $\beta$ -lactoglobuline sont à l'origine des complexes formés entre les protéines sériques et les micelles de caséine sous l'effet de la chaleur. Durant le traitement thermique, il y a interaction entre la  $\beta$ -lactoglobuline dénaturée et la caséine  $\kappa$  située à la surface de la micelle et formation d'un complexe stabilisé par des interactions mettant principalement en cause les groupements thiols mais aussi des groupements hydrophobes et ioniques (**Devold et al.**, 2000; **Singh**, 1995; **Hill**, 1989). Le chauffage à pH inférieur à 6,7 mène à une plus grande quantité de complexes formés avec les micelles alors qu'à pH supérieur à 6,7, les complexes se dissocient de la micelle à cause de la dissociation de la caséine  $\kappa$  elle-même (**Singh et Waungana**, 2001). L'étendue des interactions augmente avec la durée et l'intensité du traitement thermique appliqué (entre 75 et 90 °C) et l'interaction entre la  $\beta$ -lactoglobuline et la caséine  $\kappa$  atteint un plateau laissant croire qu'une quantité limitée de sites sont disponibles pour l'interaction (**Corredig et Dalgleish**, 1999).



Il est bien connu aussi que la formation du complexe entre la  $\beta$ -LG et la  $\kappa$ -CN est responsable de la baisse de sensibilité à la chymosine (**Morgan et al.**, 2000). Quand la  $\beta$ -LG et la  $\kappa$ -CN sont chauffées ensemble entre 80 et 90 °C, elles interagissent par la formation des liens S-S. **Morrissey** suggérait dès 1969 que les interactions entre la  $\beta$ -LG et les caséines au chauffage affectent de façon marquée la coagulation à la présure du lait (**Morrissey et al.**, 1969; **Ustumol et Brown**, 1985).

### 3. Dégradation du lactose

Le lactose est impliqué dans deux types de réactions de dégradation dans le lait, soit l'isomérisation et la réaction de Maillard. Alors que la première est plus importante d'un point de vue quantitatif à des températures supérieures à 100 °C, c'est la seconde qui prédomine à des températures inférieures (**van Boekel**, 1998 ; **Berg et van Boekel**, 1994).

#### 3.1 Isomérisation du lactose

Le lactose est sujet à des réactions d'isomérisation dans le lait (**Berg et van Boekel**, 1994, **van Boekel**, 1996). La principale dégradation est celle de Lobry-de-Bruin-Alberda-vanEkenstein où les protéines agissent comme catalyseur. Les produits de la réaction sont le lactulose et l'épilactose, des disaccharides formés de galactose et de, respectivement, fructose et mannose. L'énolisation du lactulose mène ensuite à la formation de produits de dégradation tels le galactose, le tagatose, l'acide formique ainsi que différents composés carbonés. L'acide formique formé en grande quantité est largement responsable de la baisse de pH induite par la chaleur, de concert avec l'altération l'équilibre salin.

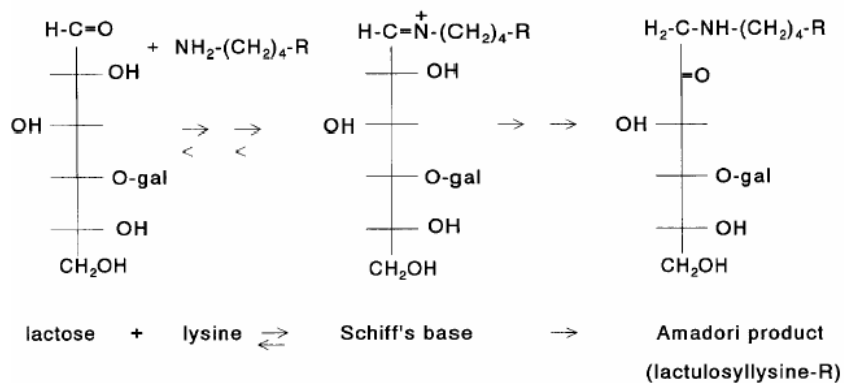
### 3.2. Réaction de Maillard

La réaction de Maillard est une réaction chimique des groupements aminés et des sucres réducteurs qui mène à la formation de composés bruns. Ce brunissement non enzymatique est influencé par la température, le pH, l'activité de l'eau et la présence de certains sels et vitamines. Quoique cette réaction soit désirable dans certains produits, elle est le plus souvent indésirable en transformation laitière (**Walstra et Jenness, 1984**). Dans le cas du lait, les groupements aminés en cause sont principalement des résidus lysine dans les protéines laitières puisque le contenu en acide aminé est très faible (**Walstra et Jenness, 1984**).

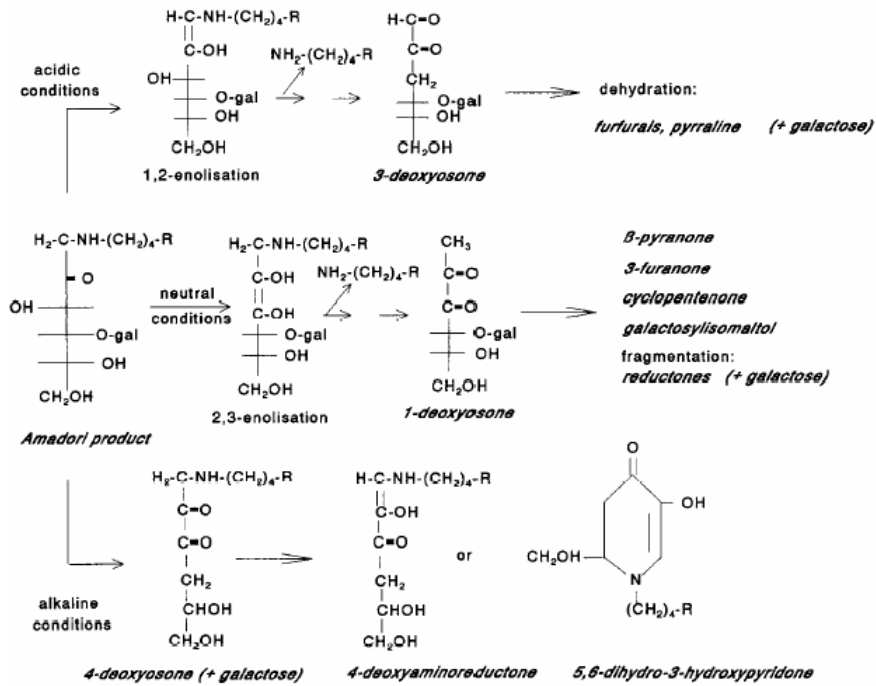
Les résidus lysine des caséines semblent être plus réactifs que les protéines sériques et la  $\kappa$ -CN semble être la caséine la plus réactive (**van Boekel, 1998**). Le sucre réducteur du lait est le lactose (**van Boekel, 1998**).

Dans le but de systématiser l'ensemble des réactions impliquées, une classification en trois stades est généralement utilisée. Récemment toutefois, une classification conceptuelle a été proposée par **Yaylayan (1997)**. La classification usuelle en trois stades est utilisée ici. Le stade initial, illustré à la **Figure 4**, comprend la condensation du sucre réducteur avec le groupement aminé et donne, via la base de Schiff et le réarrangement d'Amadori (transformation d'un aldose en cétose), le composé d'Amadori.

Dans le lait, le composé d'Amadori est la lactulosyllysine, attachée aux protéines. Au stade avancé, illustré à la Figure 1.16, il y a brisure du composé d'Amadori qui, par les voies que sont l'énolisation, la cyclisation et la déshydratation, mènent à des produits de réaction différents. Le stade 38 final, moins bien caractérisé d'un point de vue chimique, comprend la condensation de composés aminés et de fragments de sucre en protéines polymérisées et pigments bruns, appelées mélanoidines (**Van Boekel**, 1998). Les principaux produits de dégradation de la lactulosyllysine liée à des protéines dans le lait sont le galactose et l'acide formique (**Berg et van Boeckel**, 1994).



**Figure 4** : Aperçu du stade initial de la réaction de Maillard (gal = galactose, R = chaîne protéique) (**van Boekel**, 1998).



**Figure 5 :** Dégradation du composé d'Amadori au stade avancé de la réaction de Maillardsous conditions acides, neutres et alcalines (gal = galactose, R = chaîne protéique) (van Boekel, 1998).

L'un des facteurs, nommés ci-avant, intervenant dans le développement de la réaction de Maillard est le pH. L'augmentation du pH de 6,6 à 7,0 se traduit par une augmentation de la formation de lactulose, composée intervenant dans la réaction de Maillard puisque l'isomérisation des sucres réducteurs est favorisée à pH élevé (**Berg**, 1993).

Les conséquences de la réaction de Maillard dans le lait sont importantes et comprennent la perte de valeur nutritive car les résidus lysine sont bloqués et non assimilés, une digestibilité réduite et l'inhibition d'enzymes, la production de saveur, la formation de composés anti-oxydants mais aussi de composés mutagènes, antimutagènes et anticancérigènes, la formation possible de composés antibactériens, la diminution de l'allergénicité, la polymérisation des protéines du lait ainsi que le développement de coloration brune à cause des mélanoïdines (**van Boekel**, 1998).

### 3.3 Acides organiques

L'isomérisation du lactose ainsi que la réaction de Maillard mènent tous deux à la formation d'acide formique, un produit de la dégradation du galactose. Un chauffage intense peut aussi mener à la formation d'acide acétique, lactique, propionique, butyrique et laevulinique (**Berg et van Boekel**, 1994 ; **Walstra et Jenness**, 1984).

### 4. Modification de l'équilibre minéral

Les traitements thermiques appliqués au lait entraînent la réduction du calcium total soluble et du calcium ionique dans le lait. Le phosphore soluble subit des changements similaires (**Ustunol et Brown**, 1985). L'équilibre entre le phosphate de calcium colloïdal et soluble affecte l'équilibre des constituants de caséine et leur degré d'association (**Ustunol et Brown**, 1985).

### 5. Modification du pH

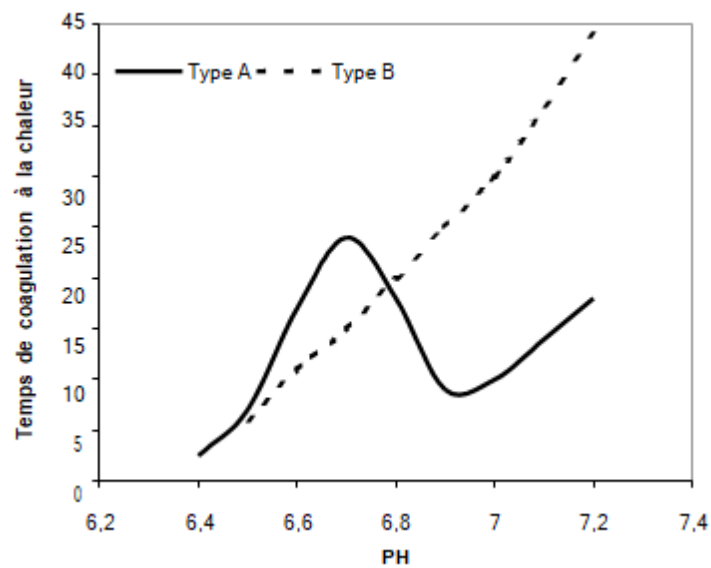
L'application d'un traitement de chaleur cause l'abaissement du pH suite à trois réactions. Ce sont l'oxydation thermique du lactose en acides organiques (50 % de l'abaissement de pH), l'hydrolyse du phosphate organique (phosphosérines) (30 %) et enfin la précipitation du phosphate de calcium tricalcique et le relâchement concomitant d'ion H<sup>+</sup> (20 %) (Singh, 2004).

### 6. Stabilité thermique

L'augmentation de la stabilité thermique du lait est désirable dans plusieurs applications alimentaires dans le but, par exemple, d'assurer la vie de tablette des laits stérilisés en évitant la gélification à l'entreposage (Singh, 2004). La stabilité du lait à chaleur réfère à sa résistance à la coagulation à des températures de stérilisation (Singh et Creamer, 1992) alors que Singh définissait la stabilité thermique comme étant la capacité du lait de résister aux hautes températures des procédés industriels sans coagulation visible ou gélification (Singh, 2004).

Le facteur le plus important vis-à-vis de la stabilité est le pH. Les autres facteurs qui influencent la stabilité thermique sont les sels, les protéines du lait (Morgan et al., 2000; Singh et Creamer, 1992) ainsi que les traitements tels le préchauffage, la concentration et l'homogénéisation, qui peuvent causer la coagulation partielle ou complète pendant la transformation ou l'entreposage (Singh et Creamer, 1992, Singh, 2004).

La façon la plus commune de mesurer la stabilité thermique du lait est d'établir le profil du temps de coagulation à la chaleur en fonction du pH (HCT-pH) tel que présenté à la **Figure 6**. Le lait est classé en deux types selon son profil de stabilité. Le lait de type A, prédominant au Québec, possède un minimum de stabilité à pH 6,9 et un maximum à pH 6,7 alors que la stabilité thermique du lait de type B augmente continuellement en fonction du pH (Singh, 2004; O'Connell et Fox, 2000; Singh et Creamer, 1992).



**Figure 6** : Profil de stabilité à la chaleur en fonction du pH (Adapté de Singh, 2004).

Le minimum de stabilité peut être supprimé en modifiant la composition du lait. Une légère diminution de la concentration totale en ions calcium et magnésium, de l'ordre de 11 à 13 mM, élimine le minimum alors qu'une augmentation diminue la stabilité pour tous les pH. L'addition de phosphates augmente le HCT, et la diminution de phosphate soluble déplace le profil vers les valeurs alcalines. L'addition de citrate a pour effet de déplacer le maximum vers des valeurs plus acides. Le retrait de 40 % du phosphate de calcium colloïdal augmente le HCT entre pH 6,4 et 7,4 alors que le retrait plus prononcé, de l'ordre de 60 à 100 %, n'augmente le HCT qu'entre pH 6,4 et 7,0 et présente un effet déstabilisant à pH plus élevé (Singh, 2004).

L'urée est le seul constituant indigène du lait dont la présence corrèle fortement avec les variations normales de stabilité à la chaleur. L'addition de faibles concentrations n'affecte pas le HCT dans la région du maximum mais à forte concentration elle augmente le HCT (**Singh, 2004**). De plus, il est bien établi que l'urée est apte à stabiliser à la chaleur le lait de type A dans la région du pH de stabilité maximale et du lait de type B à travers les pH de 6,4 à 7,4 (**Holt et al., 1978**).

La relation entre les protéines du lactosérum et la stabilité à la chaleur est bien établie pour le lait de vache : la  $\beta$ -LG et la  $\kappa$ -CN sont les protéines qui ont le plus d'influence sur le profil du temps de coagulation à la chaleur (HCT). De plus, la  $\beta$ -LG est nécessaire au développement d'un profil de type A. En effet, la stabilité des micelles de caséines en absence de protéines sériques augmente continuellement avec le pH alors que l'addition de  $\beta$ -LG à une dispersion de micelles de caséines introduit un minimum et un maximum dans le profil de stabilité. D'autre part, l'enrichissement du lait en  $\kappa$ -CN accroît la stabilité dans la région du minimum et convertit un lait de type A en lait de type B (**Singh, 2004**).



De nombreux additifs peuvent modifier le profil de stabilité à la chaleur en fonction du pH. Les agents bloqueurs de thiols tels le N-éthylmaleimide réduisent le HCT dans la région du max. L'addition d'agents réducteurs, tel le 2-mercaptoéthanol, déstabilise le lait sur toute la gamme de pH. L'addition d'agents oxydants, tel le KBrO<sub>4</sub>, éliminent le minimum dans la courbe HCT-pH. Le KIO<sub>3</sub>, pour sa part, a un effet stabilisant marqué à travers la gamme de pH 6,5 à 7,3. Le formaldéhyde augmente la stabilité, particulièrement dans la région du minimum qui est éliminé. Les détergents anioniques, comme le SDS, augmentent la stabilité dans la région du minimum mais déplacent aussi la courbe vers des pH plus élevés. Les détergents cationiques, tel le cetylméthylammonium, déplacent aussi la courbe dans le même sens mais augmentent au contraire la stabilité dans la région du maximum. Finalement, les extraits riches en polyphénols, comme l'acide caféique, contribuent à augmenter le HCT, surtout dans la région du minimum (**Singh, 2004**).

## 7. Coagulation à la chaleur

La coagulation du lait suite à un chauffage prononcé à des températures entre 120 et 140 °C est une conséquence de la perte de stabilité de la micelle résultant de nombreux changements physiques et chimiques de ses composants.

Les traitements de chaleur modifient à la fois les micelles de caséines et l'environnement de la phase sérique autour d'elles. Les changements qui ont lieu dans les micelles de caséines elles-mêmes sont l'association des protéines sériques, les changements des équilibres minéraux, la déphosphorylation et la dissociation des caséines. Dans la phase sérique, des changements de pH et la concentration des sels solubles sont observés ainsi que l'hydrolyse du lactose. (Singh, 2004).

### 7.1. Changement dans les micelles de caséines

Le pH de chauffage a une grande influence sur l'étendue de l'association des protéines sériques aux micelles de caséine. À des valeurs de pH inférieures à 6,8, une vaste majorité des complexes de protéines sériques demeure associée à la surface de la micelle de caséine. À des valeurs de pH plus élevées, les agrégats de protéines sériques demeurent dans le sérum et la  $\kappa$ -CN se dissocie de la micelle. Singh mentionne que le mécanisme exact n'est pas encore élucidé. Il serait possible que les interactions entre la  $\beta$ -LG et la  $\kappa$ -CN aient lieu dans la micelle et que le complexe se dissocie dans la phase sérique ou encore que le complexe soit formé dans le sérum. Néanmoins, la présence de protéines du lactosérum accroît de façon marquée la dissociation de la  $\kappa$ -CN micellaire à des valeurs de pH > 6,9. D'autres caséines ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  et  $\beta$ ) se dissocient de la micelle lors du chauffage mais de façon beaucoup moins marquée (Singh, 2004).

Selon le pH au chauffage, deux types de particules de caséine sont produites avec une structure et une stabilité différente. L'association des protéines du lactosérum aux micelles à des  $\text{pH} < 6,8$  modifie la surface des particules de caséine. Il a été démontré récemment que l'association de protéines sériques dénaturées avec les micelles de caséine augmente leur taille et que le potentiel zeta des micelles enveloppées de protéines sériques est plus grand que celui des micelles natives, ce qui contribue à la stabilité de ces particules (**Anema et Li**, 2003). En conséquence, les micelles enveloppées de protéines sériques sont plus stables à la chaleur, aux ions calcium, à l'éthanol et à la présure que les micelles de caséines natives (**Singh et Fox**, 1986).

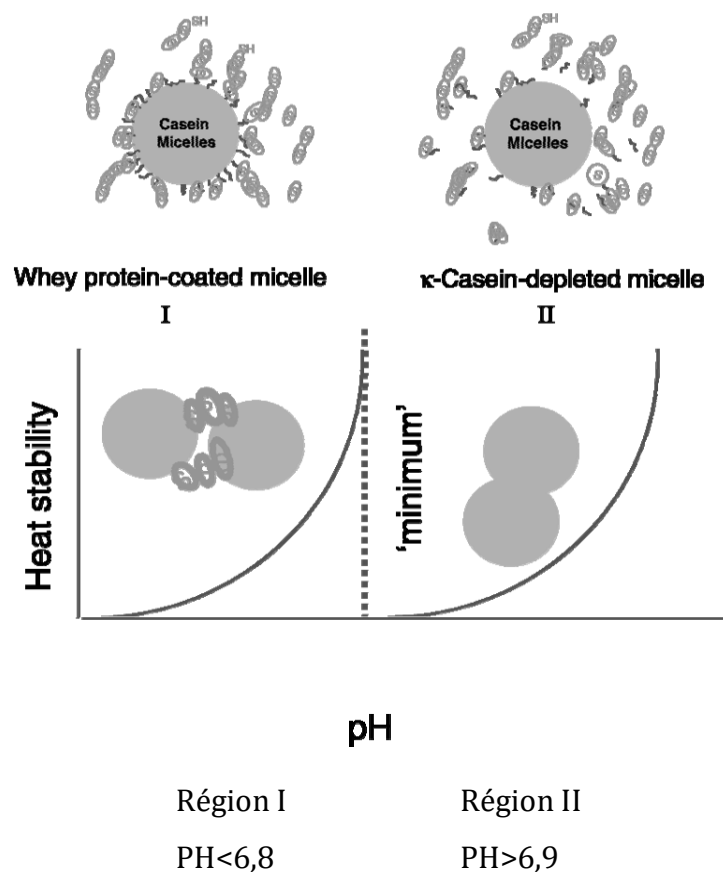
Les micelles de caséine appauvries en  $\kappa$ -CN formées par chauffage du lait à  $\text{pH} > 6,8$  ont un potentiel zeta réduit et présentent une sensibilité accrue aux ions calcium, à l'éthanol et à la chaleur comparativement aux micelles natives. Cependant, la détermination de l'état moléculaire de la  $\kappa$ -CN qui se dissocie de la micelle est compliquée par le fait que, lors du chauffage, les protéines sériques interagissent avec celle-ci via des réactions d'échange thiols-disulphide. L'hypothèse avancée par **Singh** (2004) pour expliquer la dissociation de la  $\kappa$ -CN à pH légèrement alcalin repose sur les interactions hydrophobes qui seraient insuffisantes pour retenir la  $\kappa$ -CN une fois une valeur critique de charge de surface atteinte. Les répulsions électrostatiques entre la  $\kappa$ -CN et les autres composantes de la micelle causeraient alors la dissociation. L'autre hypothèse implique la conversion du phosphate de calcium colloïdal en une forme alternative moins apte à lier les molécules de caséine et de maintenir la structure de la micelle. Cependant, puisque l'attachement de la  $\kappa$ -CN à la micelle n'implique pas de phosphate de calcium colloïdal, un tel changement influencerait la dissociation des autres caséines mais très peu la dissociation de la  $\kappa$ -CN (**Singh**, 2004).

## 7.2. Changements dans la phase sérique

Le chauffage affecte aussi la phase sérique qui entoure les micelles. En effet, le pH du lait décroît graduellement avec l'augmentation du temps de chauffage à 140 °C. De plus, les traitements thermiques diminuent les concentrations de phosphate soluble ainsi que du calcium soluble et ionique. Toutefois, l'activité de l'ion calcium, qui dépend du pH initial du lait, décroît pendant le chauffage malgré que le pH diminue (**Singh, 2004**).

## 7.3 Mécanismes de coagulation du lait à la chaleur

Un mécanisme pour expliquer les profils HCT-pH des laits a été développé. Tout d'abord, la courbe HCT-pH est divisée en deux régions en fonction du pH (**Figure 7**).



**Figure 7** : Interactions induites par la chaleur selon le pH (**Singh, 2004**).

Dans la région I (pH<6,8), la stabilité des micelles est assurée par le recouvrement en protéines sériques, À pH bien en-dessous du maximum de stabilité, le lait coagule rapidement à cause du faible pH et de la diminution des répulsions électrostatiques. De plus, les grandes quantités de protéines sériques associées aux micelles peuvent favoriser l'agrégation des particules de caséine par réticulation des protéines sériques liées à des micelles différentes. La présence d'un maximum (pH=6,7-6,8) dans les profils de stabilité à la chaleur est attribuable à la plus grande stabilité des micelles recouvertes de protéines sériques. La formation du complexe  $\beta$ -LG- $\kappa$ -CN à la surface des micelles de caséine altère les interactions stériques et électrostatiques et prévient la dissociation de la  $\kappa$ -CN micellaire (**Singh**, 2004; **O'Connell et Fox**, 2003).

Dans la région II, la stabilité thermique décroît suite à la dissociation de la  $\kappa$ -CN micellaire qui avait un effet stabilisant. Le minimum de stabilité dans le profil HCT-pH est le résultat de la coagulation induite par les sels des micelles appauvries en  $\kappa$ -CN, plus sensibles à la présence d'ions calcium. À pH supérieur au minimum de stabilité, et ce même si la dissociation de la  $\kappa$ -CN micellaire augmente, il y a accroissement de la stabilité thermique grâce à l'augmentation de la charge protéique et de la faible activité de l'ion calcium (**Singh**, 2004; **O'Connell et Fox**, 2003).

Cependant, **O'Connell et Fox** (2003) ont émis une hypothèse alternative pour expliquer la dépendance au pH de la stabilité thermique du lait qui amplifie le rôle joué par le calcium. Toutefois, cette hypothèse n'explique pas la dissociation de la  $\kappa$ -CN à pH>6,9, telle qu'observée par de nombreux chercheurs (**Singh**, 2004).

**PARTIE II**  
**ETUDE**  
**EXPERIMENTALE**

### **MODIFICATIONS PHYSICOCHIMIQUES DE LA CASEINE MICELLAIRE APRES INTERACTION AVEC LE PEPTIDE F1-8 GENERE APRES HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA BETA-LACTOGLOBULINE.**

Raquel Silveira Porto Oliveira, Alice Marciniak, Shyam Suwal, Alain Doyen and Yves Pouliot\*

Department of Food Sciences, Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Dairy Research Centre (STELA), Université Laval, Québec, Québec, G1V 0A6, Canada

\*Corresponding author.

Tel.: +1 418-656-5988; fax: +1 418-656-3353. E-mail address: [yves.pouliot@fsaa.ulaval.ca](mailto:yves.pouliot@fsaa.ulaval.ca)

#### **I. Résumé**

Le peptide f1-8 (Pf1-8) obtenu par hydrolyse trypsique de la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) a démontré plusieurs caractéristiques d'intérêt. En effet, outre sa capacité d'auto-assemblage et son caractère hydrophobe, il fait partie d'un groupe de peptides (tels que les peptides f9-14, f15-40, f142-148 de la  $\beta$ -lg) ayant la capacité de se lier à certaines protéines de lait (comme la  $\beta$ -lg et l' $\alpha$ -la) et de modifier le profil de dénaturation thermique, probablement par des interactions hydrophobes avec le noyau hydrophobe de la  $\beta$ -lg. Les caséines (CN) représentent à elles seules près de 80% de la totalité des protéines de lait bovin. Leur acidification à pH 4,6 provoque des changements structurels majeurs dans la micelle et induit leur précipitation au voisinage du point isoélectrique. L'objectif de cette recherche était de caractériser les changements dans les propriétés physicochimiques de la CN micellaire en présence du peptide Pf1-8. Ce peptide a été produit par hydrolyse trypsique d'un isolat de protéine de lactosérum, isolé par ultrafiltration (UF), concentré par osmose inverse (OI) et purifié par lavage à l'eau et par centrifugation (pureté de 91%). Différentes solutions modèles (pH 6,6) avec des ratios CN: Pf1-8 de 1: 1, 5: 1 et 10: 1 (concentrations respectives de 2,5: 2,5, 2,5: 0,5 et 2,5: 0,25 mg / mL) ont été testées. Pour chaque solution, la solubilité de la CN, la taille par SEC-HPLC et l'interaction des protéines par SDS-PAGE ont été déterminées à différents pHs allant de 6,6 à 2,6.

## Article I

---

Aucune précipitation de CN n'a été observée dans toute la plage de pHs testée pour la solution à un rapport de 1: 1. Cependant, pour des échantillons à un ratio de 10: 1 et 5: 1 de CN: Pf1-8, la précipitation a été observée à pH 4,6. Les analyses par SDS-PAGE et SEC-HPLC ont démontré la formation d'agrégats impliquant Pf1-8 et un ou plusieurs CN pour tous les pHs testés, et une augmentation de la solubilité et une diminution de la taille. Par conséquent, nos résultats démontrent que le peptide Pf1-8 peut modifier les propriétés physicochimiques de la CN, représentant ainsi un stabilisant potentiel des protéines dans les formulations laitières.

**Mots-clés:** Peptide f1-8; caséines micelles, interactions, taille.

### II. Introduction

Le lait de vache contient environ 3,6 % (p/v) de protéines. Les protéines CN et lactosérum correspondent à 80% et 20 % des protéines totales du lait, respectivement. La fraction de lactosérum de lait bovin contient trois protéines, -lactoglobuline ( $\beta$ -lg), -lactalbumine ( $\alpha$ -la) et albumine de sérum bovin (BSA) à 50, 20 et 10 %, respectivement (**Cayot et Lorient** 1998a ; **Fox et al.** 2015b).

La principale protéine du lactosérum, c'est-à-dire  $\beta$ -lg, se trouve sous forme de dimère au pH du lait (~6,7) (**Sawyer** 2013) dans une conformation globale. Cette protéine a été utilisée pour produire des peptides par hydrolyse enzymatique, principalement par les enzymes digestives humaines (trypsine, chymotrypsine et pepsine) (**Turgeon et al.** 1992 ; **Dufour et al.** 1995 ; **Van Willige et Fitzgerald** 1995; **Stapelfeldt et al.** 1996). Certains peptides de  $\beta$ -lg ont été étudiés pour leurs propriétés fonctionnelles (moussage et émulsification) et certaines pour leurs propriétés bioactives (antihypertensive, antimicrobienne, propriétés anticancéreuses, etc.). Plusieurs études ont également démontré que certains peptides dérivés de l'hydrolyse enzymatique du -lg peut s'auto-assembler sous forme de structures spécifiques appelées nano fibres, nanotubes, hydrogels et nanoparticules sphériques (**Haines-Butterick et al.** 2007 ; **Ulijn et Smith** 2008).



## Article I

---

Plus précisément, le peptide Pf1-8, obtenu par hydrolyse tryptique de -lg (**Pouliot et al.** 2009) A démontré plusieurs caractéristiques d'intérêt, telles que l'auto-assemblage pour former des nano fibres et de l'hydrogel (**Guy et al.** 2011 ; **Guy et Voyer** 2012). Le lait de vache CN comprend généralement quatre protéines à savoir  $\alpha$ 1- (38 %),  $\alpha$ 2- (10 %),  $\beta$ - (40 %) et  $\kappa$ -CN (12 %). Dans le lait, le CN présente un quaternaire structure stabilisée par des liaisons phosphate de calcium également appelées micelles (**Eck et Gillis** 2006 ; **De Kruif et al.** 2012 ; **Mcsweeney et Fox** 2013 ; **Bylund et al.** 2015).

Par conséquent, l'objectif de cet article était d'étudier les changements dans les propriétés physico-chimiques de CN en présence du peptide Pf1-8. L'effet du peptide Pf1-8 sur la solubilité des protéines, peptide-protéine L'interaction et les tailles ont été étudiées à divers pH, allant de 6,6 à 2,6.

## III. Matériels et méthodes

### 1. Production, isolement et purification de peptide

#### 1.1. Hydrolyse de $\beta$ -lg

L'hydrolysats tryptique a été préparé à une échelle pilote comme décrit par **Chay Pak Ting et al.** (2007). La solution de WPI (10 %, p/v) a été préparée en dissolvant 2,73 kg de poudre de WPI dans 22,27 kg de de l'eau contenant 0,01 M de CaCl<sub>2</sub> pour stabiliser l'enzyme. Le pH de la solution a été ajusté à 8,0 avec NaOH 4N et la température est maintenue à 37°C. La réaction d'hydrolyse a été initiée en ajoutant un solution de trypsine (10 % p/v) dissoute dans HCl 0,001 N. Le rapport enzyme/substrat choisi était 1:700 comme expérimenté par **Ratté** (2013). Tout au long de la réaction, le pH de la solution a été maintenu à 8,0 avec NaOH 4 N et la méthode pH-stat a été utilisée pour surveiller et atteindre le degré d'hydrolyse (DH) de 5,6% (**del Toro et García-Carreño** 2002). La réaction enzymatique a été arrêtée en séparant enzymes et protéines non hydrolysées par ultrafiltration (UF) à l'aide du système Engineering Lab Unit 1812 avec une membrane en polysulfone de 10 kDa. La filtration a été réalisée à 37°C sous une pression de 4,5 bar pendant 4,5 heures. Le perméat a ensuite été concentré par osmose inverse (OI) en utilisant l'ingénierie Unité de laboratoire (Osmonics, Vista, CA) équipée d'une membrane en polyamide RO de 300 Da avec une pression de 13,5 bar et à température ambiante (25 °C) pendant 1,3 heure. Après le RO, la fraction peptidique connue sous le nom l'hydrolysats tryptique complet (CTH) a été lyophilisé.

#### 1.2. Isolement de Pf1-8

Le CTH a été réhydraté dans de l'eau Milli-Q à une concentration de 5% (w/v), centrifugé puis lavé quatre fois par centrifugation à 5000 × g pendant 12 min à 20 °C. Le peptide purifié a été lyophilisé et conservé à -18°C.

## 1.3. Profil peptidique par analyse HPLC

Le degré de pureté du peptide f1-8 après chaque étape de lavage a été calculé en fonction de la surface sous la courbe du pic correspondant au peptide par rapport à l'aire totale des chromatogrammes (Éq.1). Il a été déterminé par HPLC à l'aide d'un système HPLC Agilent série 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) Le système était équipé d'un détecteur UV-visible (modèle G1314A) à une longueur d'onde de 214 nm, un dégazeur (modèle G1312A), une pompe binaire (modèle G1379A), un injecteur (modèle G1329A) et un module de chauffage de colonne (modèle G1330B). L'acquisition des données a été analysée à l'aide du Logiciel ChemStation (version A.10.02, Agilent Technologies). La phase stationnaire était Luna C18 colonne (250 × 2 mm, Phenomenex, Torrance, CA). La phase mobile était constituée du solvant A (0,11 % v/v d'acide trifluoroacétique (TFA) dans l'eau) et le solvant B (90 % v/v, acétonitrile (ACN) ; 10 % v/v, eau et 0,10 % v/v de TFA). Un volume de 20 L d'échantillon à une concentration de 2 mg/mL a été injecté dans la colonne à la vitesse d'élution de 0,2 mL/min. L'élution des composants a été réalisée avec un gradient linéaire de solvant B de 3 à 50 % en 85 min, puis à 100 % en 105 min qui a été maintenu pendant 10 minutes.

$$f1 - 8 \text{ purity (\%)} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} A_{f1-8} dt}{\int_{t_1}^{t_2} A_{total} dt}$$

## 2. Production de micelles CN

Des suspensions de micelles de caséine (pureté de 85 %) ont été préparées à l'échelle pilote par microfiltration de lait comme décrit par **Marciniak et al.** (2018).

## 3. Conception expérimentale

Pour la préparation de solutions de protéines de travail, le peptide Pf1-8 a d'abord été solubilisé pendant 1 h avec agitation dans de l'eau Milli-Q à pH 2. Les CN ont été solubilisés dans du tampon Tris-HCl 0,2 M à pH 6,8 pendant 2h. Final la concentration de CN et de peptides était de 2,5 mg/mL de chacun pour le rapport de 1:1 de CN: Pf1-8 et le pH était ajusté à 6,6. La concentration de CN a été maintenue à 2,5 mg/mL et la concentration de peptide a été réduit à 0,5 et 0,25 mg/mL, pour obtenir le rapport CN: Pf1-8 de 5:1 et 10:1 (tableau 3.1). Un tome 30 ml de chaque solution ont été préparés à pH ajusté à 6,6.

**Tableau 08** : Rapport et concentration des solutions de protéines.

Ratio	Composition	Concentration
01:00	CN	2.5 mg/mL
00:01	Pf1-8	2.5 mg/mL
01:01	CN: Pf1-8	2.5:2.5 mg/mL
05:01	CN: Pf1-8	2.5:0.5 mg/mL
10:01	CN: Pf1-8	2.5:0.25 mg/mL

Un volume de 10 ml de chaque solution a été séparé avant le changement de pH pour une analyse plus approfondie: exclusion de taille chromatographie, potentiel zêta et taille des particules. Le pH des échantillons a été réduit à 6,6, 5,6, 4,6, 3,6 et 2,6 en utilisant du HCl 1N. Les échantillons acidifiés ont été centrifugés à 11 000 x g, 20°C pendant 25 min séparer les précipités selon le protocole de **Huppertz et al.** (2004). Le surnageant, contenant des protéines non sédimentables, a été soigneusement récupéré et stocké à 4°C pour des analyses ultérieures.

### 4. Une analyse

#### 4.1. Analyse de la taille des particules

La taille des micelles CN a été déterminée par spectroscopie de corrélation de photons à l'aide d'un Malvern Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcs., UK) et la taille du peptide et des solutions CN:Pf1-8 ont été déterminé par Mastersizer Nano 3000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Royaume-Uni) équipé d'Hydro Unité de dispersion SV. L'indice de réfraction et l'absorption ont été fixés à 1,45 et 0,001 respectivement. Toutes tailles les mesures ( $n = 3$ ) ont été effectuées en utilisant un angle de diffusion de  $90^\circ$  à  $25^\circ\text{C}$  avec 180 s d'enregistrement. Les solutions ont été diluées avec le tampon avec de l'eau à pH 2 (3:1) jusqu'à ce que l'obscurcissement soit maintenu. près de 15 %.

#### 4.2. Potentiel Zeta

Les échantillons (à pH 6,6) ont été analysés par **Zetasizer** 2000 (Malvern Instruments Ltd., UK). Le zêta le potentiel a été mesuré comme décrit par **Narong et James** (2006). Cet instrument mesure la mobilité électrophorétique et potentiel zêta des particules dans la solution en utilisant le laser Doppler vélocimétrie (LDV). Le potentiel zêta a été mesuré à l'aide d'une cellule à immersion aqueuse en mode automatique. Le signal enregistré par l'équipement a été converti en potentiel zêta selon l'équation d'Henry

#### 4.3. Chromatographie d'exclusion stérique

La solution de CN et/ou de peptide à différents ratios a été analysée par SEC-HPLC (Série 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, Californie). Le système était équipé d'un détecteur UV-visible (modèle G1314A) à une longueur d'onde de 214 nm, un dégazeur (modèle G1312A), une pompe binaire (modèle G1379A), un injecteur (modèle G1329A) et un module de chauffage de colonne (modèle G1330B).

Les données ont été acquises à l'aide du logiciel de laboratoire ouvert Agilent (version A.01.08.108, Agilent Technologies). La phase stationnaire était une colonne ENrich SEC 650 (10 x 300 mm, Bio-Rad, Hercules, USA). Le mobile phase était du PBS (solution saline tamponnée au phosphate). Les échantillons ont été analysés selon leur concentration de 2,5-5,0 mg/mL, puis un volume de 75 µL a été injecté dans la colonne et exécuté au débit de 0,2 mL/min pendant 60 min. Les pics ont été détectés à une longueur d'onde de 214 nm. Moléculaire les tailles ont été déterminées par le temps de rétention en utilisant un gel de filtration standard lyophilisé contenant un mélange de thyroglobuline (670 000 Da), de globuline bovine (158 000 Da), d'ovalbumine de poule (44 000 Da) d'équin myoglobine (17 000 Da) et vitamine B12 (1 350 Da) de Bio-rad (Hercules, Californie, USA).

#### **4.4. Analyse du profil protéique par SDS-PAGE**

Les profils protéiques dans des échantillons de peptide-protéine ont été analysés par dodécyl sulfate de sodium-polyacrylamide électrophorèse sur gel (SDS-PAGE). L'électrophorèse a été réalisée en utilisant Bio-Rad mini-protéine TGX gels préfabriqués (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) contenant 12 % d'acrylamide. Vingt microlitres de chaque échantillon ont été ajoutés à 1 L de β-mercaptoéthanol et 19 µL de 2x échantillon Laemmli tampon (préparé avec 65,8 mM de TrisHCl, pH 6,8, 2,1 % de SDS, 26,3 % [p/v] de glycérol, 0,01 % de bromophénol bleu. Les échantillons ont été décongelés, chauffés à 100°C dans de l'eau bouillie, maintenus à 100°C pendant 5 min et immédiatement refroidi sur glace. Les marqueurs de poids moléculaire de Precision Plus Protein All Blue Des standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ont été utilisés. Le tampon de course a été préparé en ajoutant 100 ml de tampon Tris/Glycine/SDS 10x dans 900 ml d'eau déminéralisée. Tous les échantillons ont été chargés dans le gel puits et migré à 15 mA jusqu'à ce que le front de colorant atteigne la ligne de référence.

## Article I

---

Après électrophorèse expériences, les gels ont été colorés pendant 60 min avec une solution de bleu de Coomassie composée de 1 g de Bleu de Coomassie dans 10 % d'acide acétique, 40 % d'éthanol et 50 % d'eau déminéralisée. Enfin, les gels ont été décoloré pendant une nuit dans une solution à 10 % de méthanol, 10 % d'acide acétique et 80 % d'eau déminéralisée. Tous les gels ont été imagés à l'aide de l'imageur sans tache ChemiDoc MP (Bio-Rad) immédiatement après la protéine séparation. Le logiciel ImageLab version 4.1 (Bio-Rad) a été utilisé pour déterminer l'intensité de fond soustraite des bandes dans tous les gels. Pour la soustraction de fond, une valeur de 1 a été utilisée lors de l'imagerie des images de gel et de transfert pour les mesures de protéines totales des pistes, tandis que pour les données du film et de l'imageur acquises à partir des transferts chimiluminescents, un disque roulant entre 10 et 25 a été utilisé pour assurer une coupe de pointe cohérente pour l'analyse densitométrique.

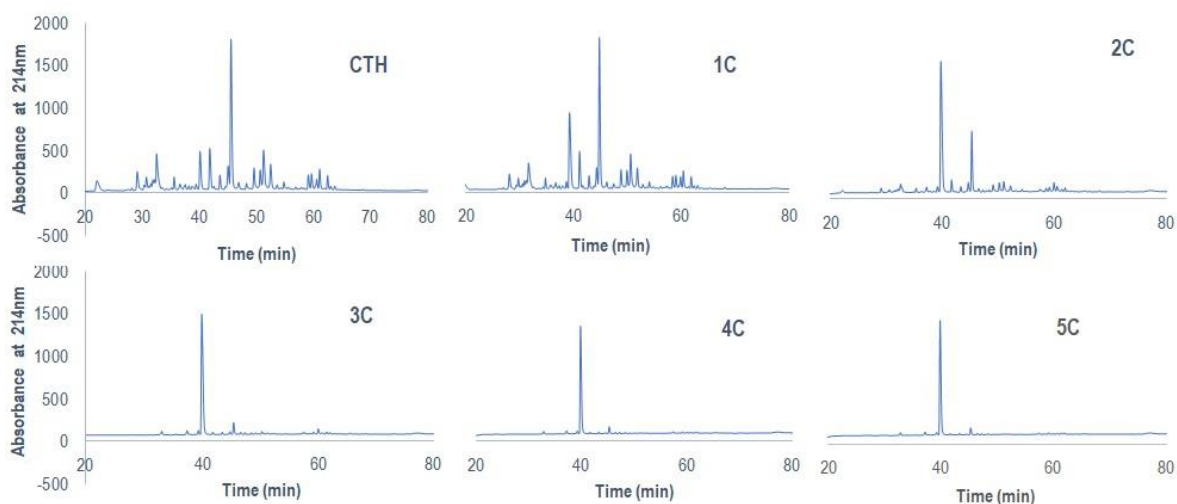
### **5. Analyses statistiques**

Les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance à un facteur (ANOVA) de la version SAS University Edition 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, Caroline du Nord, États-Unis). Et là où le test F était significatif à  $p < 0,05$ , le moins des tests de différence significative (LSD) ont été utilisés pour comparer les moyennes. Tous les échantillons ont été préparés en en triple et ( $n=3$ ) et les analyses ont été effectuées au moins en triple ( $n 3$ ) et les résultats ont été rapportés comme moyenne  $\pm$  écart type (SD).

## IV. Résultat

### 1. Profils peptidiques du précipité lavé

Pour isoler le peptide Pf1-8 de l'hydrolysate tryptique complet (CTH), la méthode était basée sur l'agrégation et l'insolubilité du peptide dans l'eau comme discuté précédemment par Pouliot et al. (Pouliot et al. 2009). La **figure 08** montre les chromatogrammes RP-HPLC du CTH et après différentes étapes de lavage. Le lavage ultérieur avec de l'eau et la centrifugation se sont avérés efficaces pour un seul peptide, le Pf1-8, avec un niveau de pureté élevé. Après le 5<sup>ème</sup> cycle de lavage, la pureté de Pf1-8 s'est avérée >91 %, selon l'équation (Eq1) calculée à partir de l'aire sous la courbe du pic correspondant au peptide par rapport à l'aire totale des chromatogrammes. La pureté du peptide est comparable à celle observée par Pouliot et al. (Pouliot et al. 2009) qui a obtenu environ 94 % de pureté après deux lavages. Compte tenu du degré élevé de pureté du peptide Pf1-8, le protocole a été suivi pour préparer le peptide en plus grande quantité et lyophilisé pour une expérience ultérieure.

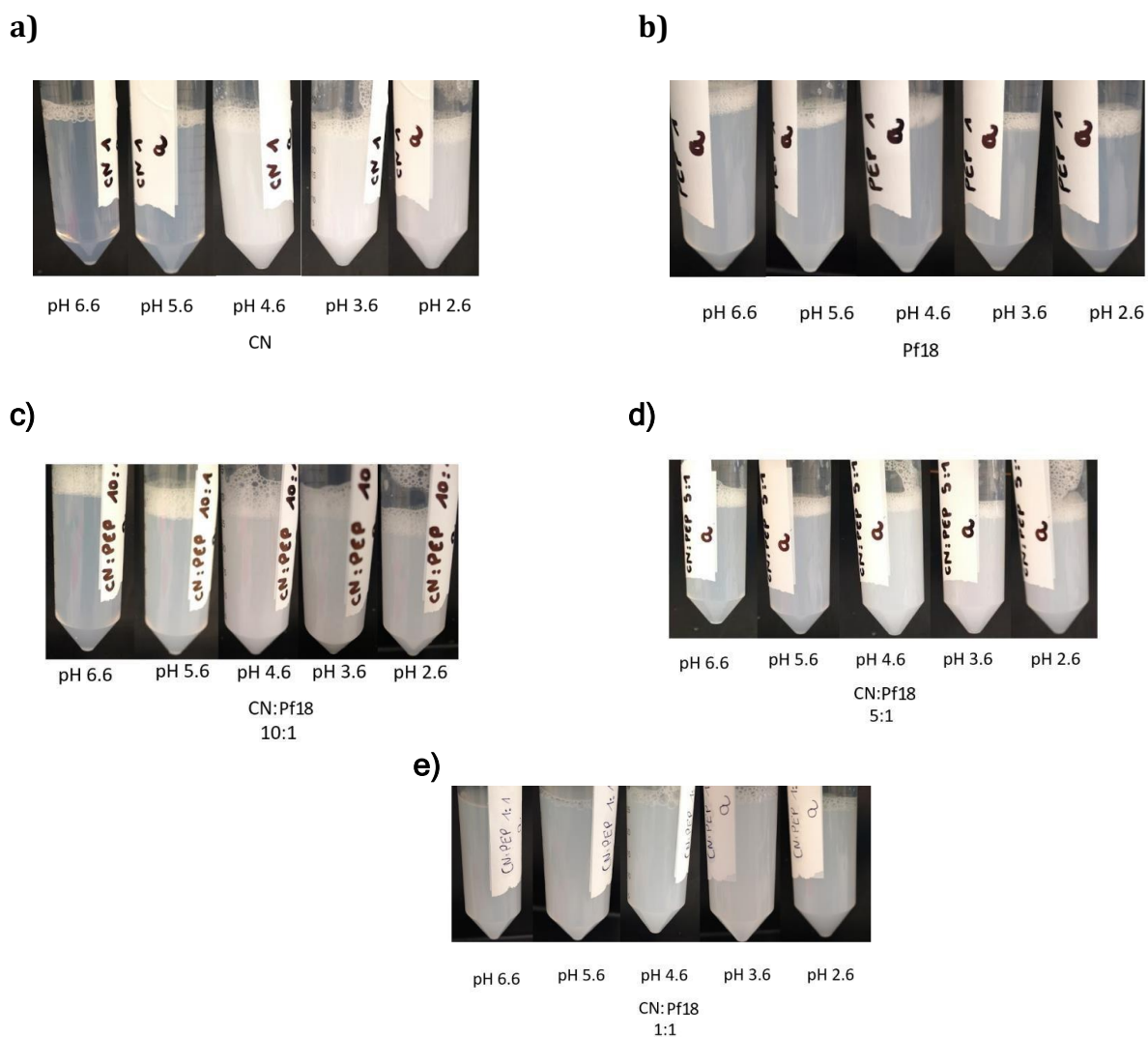


**Figure 08 :** Chromatogrammes HPLC de l'hydrolysate tryptique complet, CTH (a) et étapes de lavage suivantes, premier (b) deuxième (c), troisième (d), quatrième (e) et cinquième (f).



### 2. L'observation visuelle

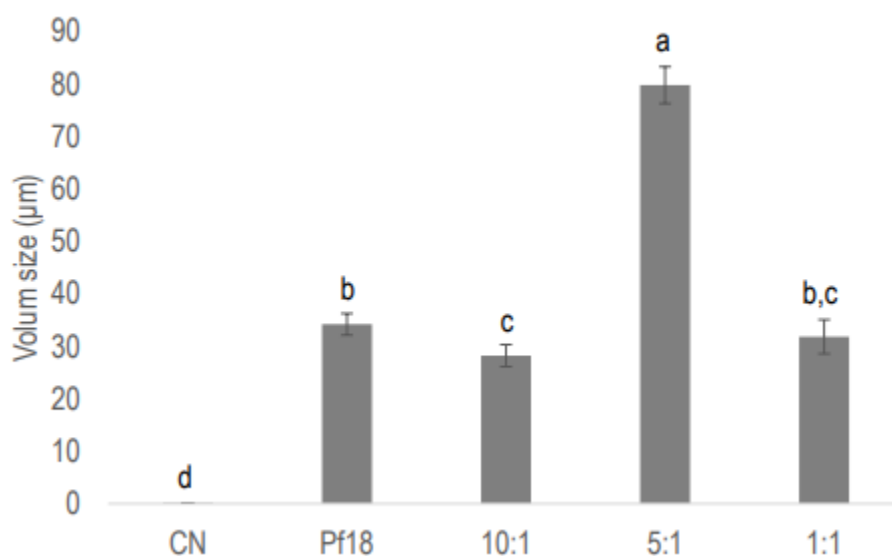
La solubilité de différents mélanges de rapport CN: Pf1-8 à différents pH a été déterminée visuellement (**figure 09**). Comme prévu, les suspensions de CN se sont révélées plus troubles à une valeur de pH de 4,6 et moins. De plus, l'échantillon contenant uniquement les peptides s'est avéré légèrement trouble apparemment le même à tous les pH testés (pH 6,6 à 2,6). Il est connu que la fraction peptidique est insoluble au-dessus du pH de 2 à 12 (**Pouliot et al.** 2009). Il est intéressant de noter qu'un trouble apparent du CN a été observé dans la plage de pH de 4,6 à 2,6 dans l'échantillon contenant CN:Pf1-8 dans un rapport de 1:1 (**figure 09e**). En outre, il a été observé que plus la concentration en peptides des solutions est élevée, plus la solubilité du CN est probable. Cependant, il a été observé que plus le rapport CN:Pf1-8 était élevé, plus la solution ne se comportait comme CN seul. En effet, dans les deux solutions 5:1 (**figure 09d**) et 10:1 (**figure 09c**) on peut observer une turbidité plus élevée pour les solutions à  $\text{pH} < 4,6$  qu'à  $\text{pH} > 4,6$ . De plus, le changement d'apparence était relativement moins intense pour l'échantillon avec un rapport CN:Pf1-8 de 5:1 par rapport à celui d'un rapport plus élevé (10:1). Par conséquent, le Pf1-8 semble affecter la dissociation des micelles CN en fonction de sa concentration.a).



**Figure 09** : Aspect visuel de la solubilité du CN micellaire en fonction du pH et de la concentration en Pf1-8 (a : CN pur, b : Pf1-8 pur, ce : CN-Pf1-8 au ratio 10:1, 5:1 et 1 : 1, respectivement).

### 3. Effet de la concentration de Pf1-8 sur la distribution granulométrique et le potentiel des micelles CN.

Les **figures 10** et **11** montrent respectivement la granulométrie des particules ( $\mu\text{m}$ ) et le potentiel zêta des solutions CN et Pf1-8 seules ainsi que CN : Pf1-8 des mélanges 1 : 1 ; Rapports 5:1 et 10:1 au pH initial de la solution (environ 6,6). Concernant la **figure 3.3**, la plus grande taille des agrégats étant observée au ratio 5:1 ( $79,80 \pm 3,51 \text{ m}$ ) et significativement différente ( $P < 0,05$ ) des autres. La taille de 1:1 ( $31,83 \pm 3,25 \text{ m}$ ) n'était pas significativement différente ( $P > 0,05$ ) de celle de 10:1 ( $28,23 \pm 2,10 \text{ m}$ ) et de Pf1-8 seul ( $34,20 \pm 2,06 \text{ m}$ ), cependant, ces dernières étaient significativement différent ( $P < 0,05$ ) entre eux. Par rapport au CN seul, tous les échantillons ont un diamètre de particule moyen plus grand ( $P < 0,05$ ). Ainsi, on peut mentionner que le peptide a formé des agrégats en raison de ces valeurs plus élevées.

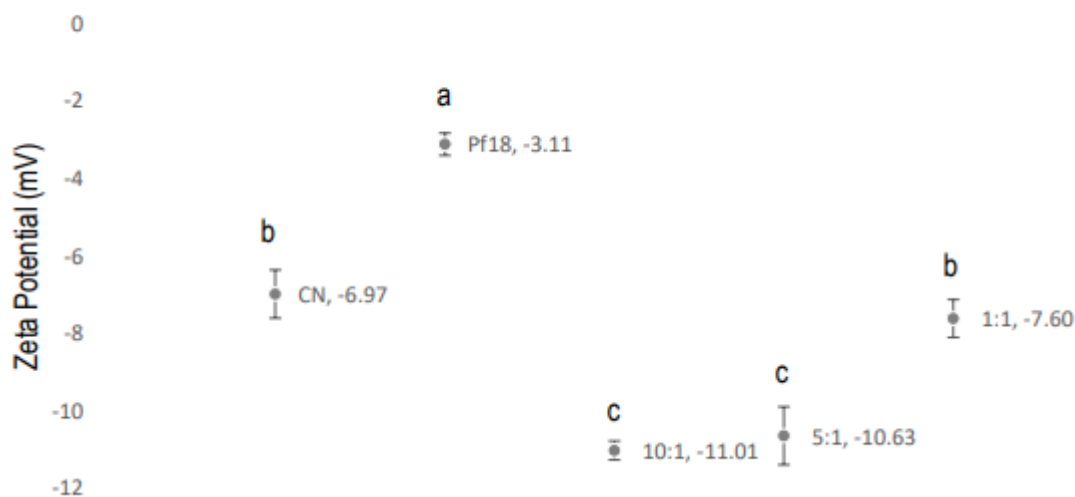


**Figure 10** : Effets de la concentration de Pf1-8 (rapports 1:1 à 10:1) sur la distribution granulométrique du CN. Les distributions granulométriques de Pf1-8 et CN purs ont également été données. Chaque barre représentait la moyenne des lectures en triple. Les valeurs dans les lignes avec des lettres différentes sont significativement différentes dans le test LSD ( $P < 0,05$ ) pour un paramètre donné.

## Article I

Les analyses de potentiel zêta des solutions de peptide/protéine ont montré que tous les échantillons possèdent une charge nette négative sur la surface à pH 6,6 allant pour le peptide seul et tout le mélange CN:peptide (**Fig.11**). La charge surfacique nette de CN (-6,97 mV) a été modifiée en présence de peptides qui sont devenus plus négatifs. Cependant, la valeur du potentiel zêta a diminué de -7,60 mV pour 1:1 à -10,63 et -11,01 mV pour 5:1 et 10:1, respectivement. La valeur du potentiel zêta de la micelle CN était inférieure à celle indiquée dans la littérature (REF).

La charge de surface a diminué progressivement avec la diminution de la concentration de peptide avec  $-10,63 \pm 0,75$  et  $-11,01 \pm 0,24$  mV, respectivement pour un rapport de 5:1 et 10:1 et était significativement plus faible ( $P < 0,05$ ) que 1:1 ( $-7,6 \pm 0,49$  mV) et CN seul ( $-6,97 \pm 0,62$  mV). Cependant, les deux derniers échantillons n'étaient pas significativement différents entre eux. Enfin, tous les échantillons ont montré une charge de surface inférieure ( $p < 0,05$ ) comparativement à Pf1-8 seul ( $-3,11 \pm 0,29$  mV). Globalement, le peptide diminue les valeurs des potentiels du CN à pH 6,6, mais de manière surprenante, cette valeur semble être inversement proportionnelle à la diminution de la concentration de Pf1-8.



**Figure 11** : Effets de la concentration de peptide sur le potentiel zêta de CN. Chaque point représentait la moyenne des lectures en triple. Les valeurs dans les lignes avec des lettres différentes sont significativement différentes dans le test LSD ( $P < 0,05$ ) pour un paramètre donné.

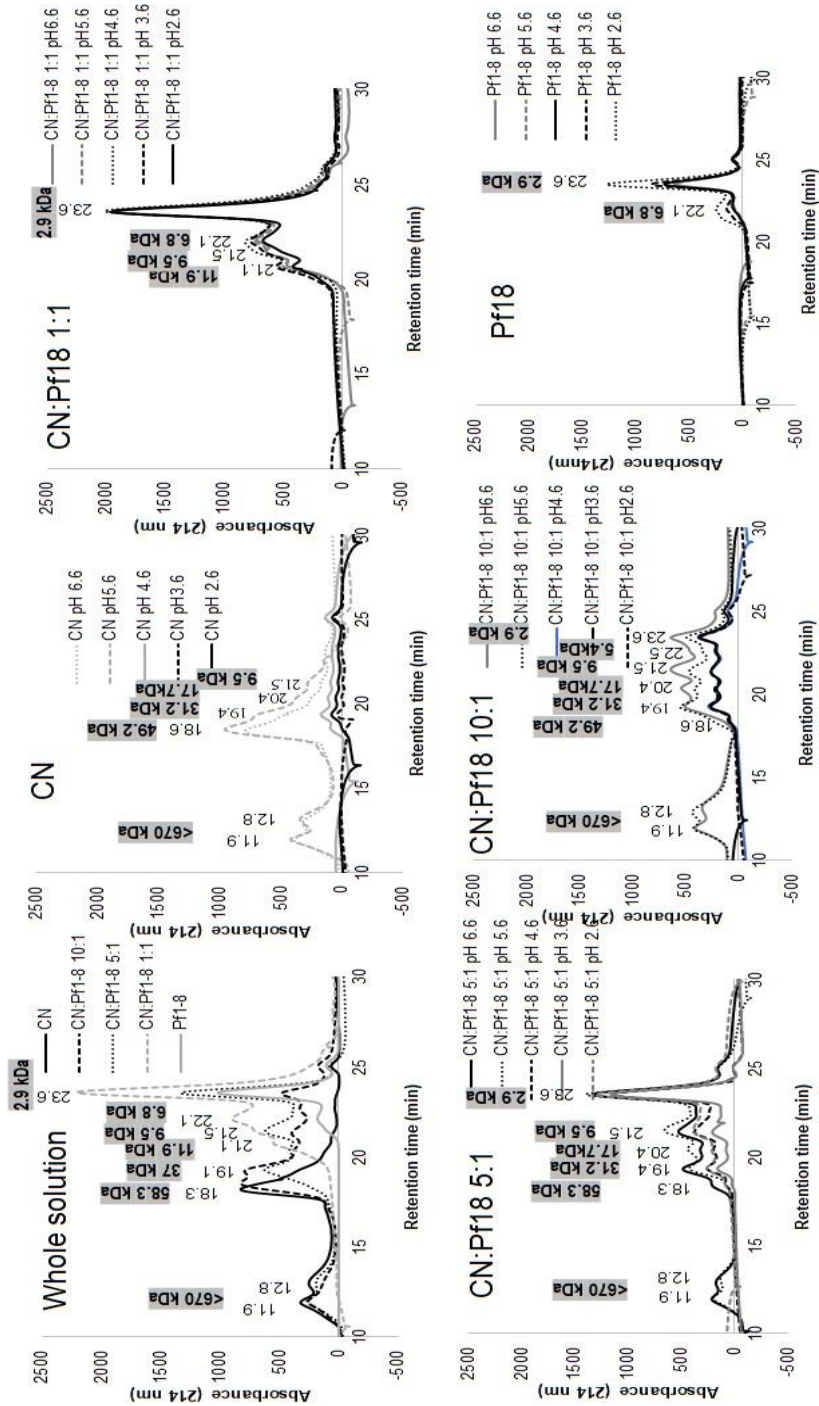
### 4. Effet de la concentration de Pf1-8 et CN sur la taille des agrégats obtenus par SEC-HPLC

Les surnageants Pf1-8 de pH 6,6 à 2,6 présentent des schémas similaires avec un seul pic majeur (faible molécule de poids moléculaire (LMW)) observée indiquant l'absence de perte de peptide liée à la diminution du pH. Ces résultats vont dans le sens de ce qui a été observé sur la **figure 09**. En effet pas de différence de turbidité de la solution a été remarqué pour toute la gamme de pH, ne montrant aucun impact sur les solutions peptidiques. De plus, le pic principal présentent une intensité plus élevée pour le surnageant à pH 2,6 indiquant la meilleure solubilité du peptide pour les faibles pH (Guy et al. 2011). Concernant les solutions de CN seules (**Figure 12**), de grands agrégats de haut poids moléculaire (HMW) étaient présents sur les surnageants à pH > 4,6; néanmoins, aucune protéine n'a été observé dans les surnageants pour les solutions à pH < 4,6 confirmant la précipitation des protéines sous cette PH. Comme prévu et démontré plus tôt dans la **figure 09**, la diminution du pH (< 4,6) entraîne la précipitation de CN.

Fait intéressant, la combinaison de peptide et CN (1:1) conduit à un changement radical du profil du chromatogramme (en comparaison avec le peptide et le CN seuls). Cependant, les chromatogrammes, tant en termes de profil que intensité, n'étaient pratiquement pas modifiées à différentes plages de pH. Pour cet échantillon, un pic correspondant à Une molécule LMW a été observée, qui était également présente dans le peptide seul (temps de rétention : 23,6 min). Néanmoins, aucune trace de molécule HMW observée pour les échantillons contenant CN et peptides même à pH > 4,6. Alors que le peptide et le CN seuls présentaient respectivement des molécules LMW et HMW, la combinaison des deux entraîne un réel changement de profil. Ces résultats suggèrent une dissociation complète de la micelle CN lorsqu'elle est combinée avec un peptide. Pour les échantillons avec un ratio 1: 1, les profils sont globalement superposables pour tous les pH.

Lorsque la concentration de peptides par rapport au CN a diminué pour les deux ratios (5:1 et 10:1), des profils intermédiaires ont été observés. En effet, les molécules HMW de CN sont observées pour les deux échantillons à pH > 4,6

et les molécules LMW du peptide sont détectées dans toute la gamme de pH. Ces résultats sont conformes à l'observation visuelle de la **figure 09**. En effet, pour ces échantillons nous avons observé des profils de chromatogramme montrant à la fois le CN et le peptide seuls.



**Figure 12 :** Profils de poids moléculaire de CN : solutions Pf1-8 obtenues par SEC-HPLC en fonction de pH et concentration Pf1-8.

### 5. Profil protéique

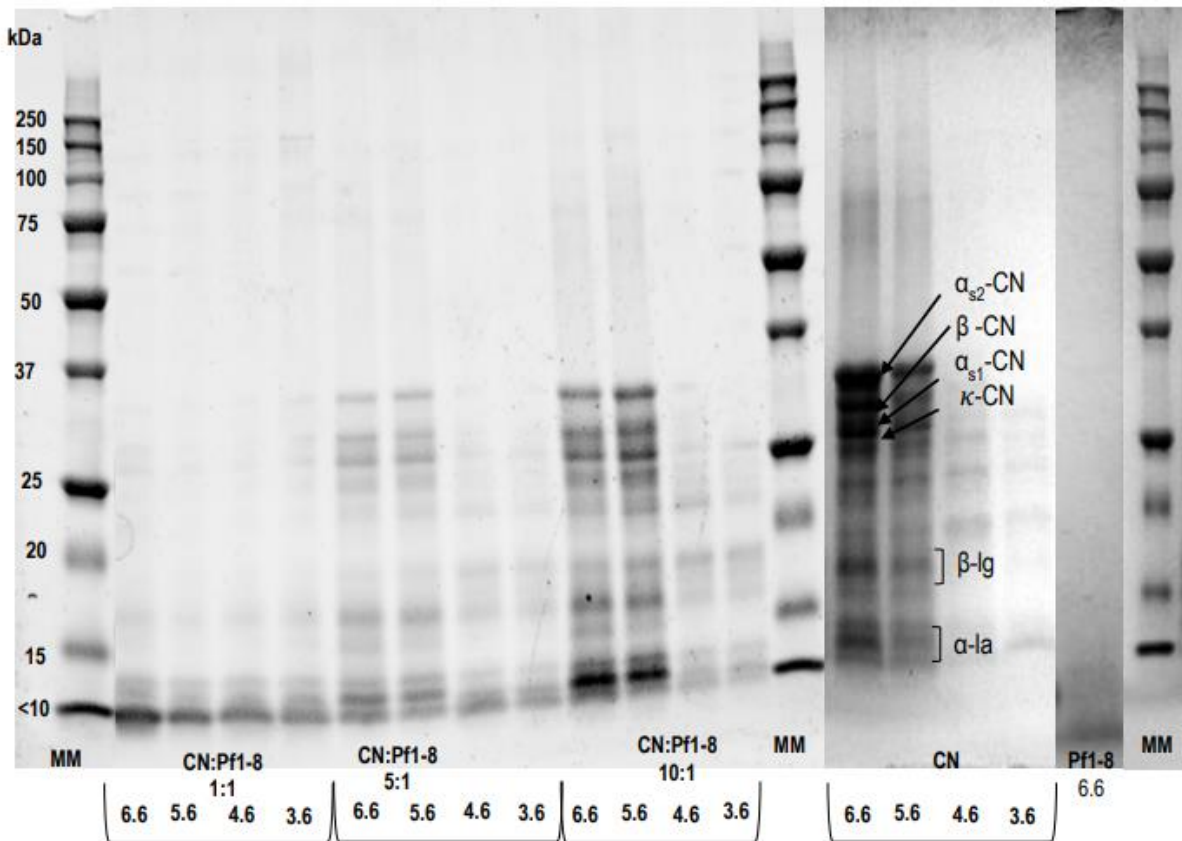
La composition des protéines solubles a été déterminée par le SDS-PAGE et les profils de poids moléculaire des surnageants ont été donnés pour tous les rapports CN:Pf1-8 à pH 6,6 à 3,6 (**figure 13**). Comme attendu et en raison de son très faible poids moléculaire (< 10kDa, la limite de 12% PAGE) contrôle peptidique au pH 6.6 montre une bande à l'extrémité arrière du gel. Le CN à pH 6,6 présente 4 bandes (> 25 kDa) correspondant aux 4 types de CN ( $\alpha$ 2-CN, -CN,  $\alpha$ 1-CN et  $\kappa$ -CN). Comme des CN micellaires ont été utilisées pour cette étude, une très petite quantité de protéines de lactosérum ( $\alpha$ -la et -lg) a également été observée. Comme observé sur l'analyse SEC-HPLC, la diminution du pH de la solution CN conduit à une diminution de l'intensité des bandes (pH 5,6) et plus drastiquement à l'absence de protéine dans le surnageant des solutions pH < 4,6.

Contrairement au CN, et comme le remarque l'aspect visuel (**Figure 09**) et l'analyse SEC-HPLC (**Figure 12**), les solutions CN:peptide (1:1) pour toute la gamme de pH ne présentent aucune différence en termes de profil de migration. Plus intéressant encore, aucune bande correspondant aux CN n'a été observée pour le mélange CN:peptide à un rapport 1:1. Une augmentation de l'intensité des bandes CN avec la diminution de la concentration de peptide pourrait être une forte indication du comportement protéolytique de ce peptide.

Ces résultats semblent démontrer qu'une combinaison égale de CN et de peptide (1:1) n'est pas sensible à une diminution du pH. Néanmoins et comme mentionné précédemment concernant les profils SEC-HPLC, aucune trace de protéine présente dans le contrôle CN n'est détectée car des bandes de 10 à 15 kDa peuvent être identifiées. Enfin, les pistes correspondant à la fois aux ratios 5:1 et 10:1 à pH > 4,6, présentent des profils intermédiaires avec la présence de bandes liées au CN (> 25 kDa) et de bandes plus petites (entre 10 et 15 kDa) comme observé pour 1 : 1 solution. Cependant, pour un pH > 4,6, aucune bande correspondant à CN n'a été observée et une intensité plus faible de bandes de 10 à 15 kDa a été notée. D'une manière générale, la combinaison du peptide et du CN (1:1) conduit à une dissociation complète des micelles et à une solution

## Article I

stable vis-à-vis de la modification du pH. La diminution de la concentration de peptide (5:1 et 10:1) entraîne une interaction plus faible entre le peptide et le CN qui génère des profils intermédiaires à la fois dans l'analyse SEC-HPLC et SDS-PAGE.



**Figure 13** : Page SDS des surnageants des différents CN:Pf1-8 et CN seul à pH 6,6 à 3,6 et Pf1-8 seule solution à pH 6,6 et marqueurs de poids moléculaire (MM).



### V. Discussion

La présente étude a été entreprise afin d'étudier l'impact de l'interaction entre CN et Pf1-8 sur la stabilisation micellaire. Les observations visuelles ont indiqué des découvertes intéressantes car l'absence de précipitation conventionnelle de CN seul dans la solution de mélange CN: Pf1-8 à un rapport 1:1 même après pH 4,6 est surprenante. Même s'il est trop tôt pour conclure sur le type d'interactions peptide-CN impliquées, il est possible que le peptide interagisse spécifiquement avec les CN par l'intermédiaire de ses domaines hydrophobes inhibant la précipitation ou ayant une activité protéolytique. Au fur et à mesure que la concentration relative de CN par rapport au peptide augmente (rapport de 5:1 à 10:1), la turbidité du CN augmente à un pH inférieur. Ce phénomène suggère que moins de peptides sont disponibles pour se lier aux molécules de CN et que l'excès de CN est précipité à un pH inférieur. L'ajout de Pf1-8 à la solution CN semble perturber totalement la micelle CN et elle peut s'agréger pour former une structure grande et complexe avec CN (**Figure 3.3 et 3.4**). De plus, il semble avoir un effet protéolytique sur CN, comme suggéré par la distribution de poids moléculaire du mélange CN: Pf1-8 qui est décalé vers la région des peptides seuls (**Figure 3.5**) Les bandes CNs disparaissent également de la SDS-PAGE dans ces échantillons (**figure 3.6**). Certaines études ont montré que la présence de peptides de -lg pouvait modifier les propriétés fonctionnelles des protéines. En effet, en plus de sa capacité d'auto-assemblage et de sa forte hydrophobie, Pf1-8 a la capacité de se lier aux -lg et  $\alpha$ -la natifs. L'interaction de ce peptide avec  $\beta$ -lg s'est avérée modifier le profil de dénaturation thermique (**Barbeau et al. 1996**) potentiellement par interactions hydrophobes avec le noyau hydrophobe, mais n'a pas modifié les propriétés thermiques de  $\alpha$ -la) (**Ratté 2013**). L'interaction de la lactoferrine avec le CN a montré une diminution de la turbidité de la solution en désintégrant les micelles du CN (**Anema et De Kruif 2011**). Le comportement protéolytique de ce peptide n'est pas encore démontré dans la littérature. Cependant, ce peptide a montré 100 % d'une séquence peptidique de la glycoprotéine de liaison à l'entérotoxine d'*Escherichia coli* pouvant se lier aux protéines du lait, y compris CN (**Shida et al. 1994**). Plus récemment, un

## Article I

---

peptide antifongique du métagénome marin s'est avéré posséder une activité protéolytique non spécifique de plusieurs protéines dont le CN (**Pushpanathan et al.** 2013). Cependant, d'autres études telles que la LC-MS et les tests d'activité enzymatique sont nécessaires pour comprendre le mécanisme entre Pf1-8 et CN conduisant à sa déstabilisation.

### VI. Conclusion

Pour la première fois, aucune précipitation de CN n'a été observée de pH 6,6 à 2,6 pour la solution de rapport 1: 1 avec un peptide. Cependant, pour 10:1 et 5:1, il y a eu une précipitation de CN commençant à pH 4,6. Ces résultats de faible poids moléculaire ont été confirmés par les profils SEC-HPLC pour tous les pH testés. Il semble que Pf1-8 modifie les propriétés physico-chimiques du CN en augmentant leur solubilité. Plus précisément, il ressort de nos résultats que la Pf1-8 pourrait déstabiliser la micelle CN et conduire à leur protéolyse car les bandes de pic et de gel associées à CN ont disparu presque complètement dans les profils SEC-HPLC et SDS-PAGE, respectivement pour le mélange avec des concentrations. De plus, les analyses d'électrophorèse ont démontré la formation de fractions de poids moléculaire (PM) inférieur à 15 kDa qui pourraient être le résultat de la désintégration et de la protéolyse du CN. Cependant, une analyse plus approfondie des complexes protéiques et peptidiques par HPLC pourrait donner un meilleur aperçu.

### Comportement du lait traité à 140 °C

#### I. Résumé

La capacité du lait à résister à de hautes températures est une propriété technologique importante. L'augmentation de la stabilité thermique du lait est désirable dans plusieurs applications alimentaires dans le but d'assurer la vie de tablette des laits stérilisés en évitant la gélification à l'entreposage (Singh, 2004). Le but de cette étude était de déterminer la stabilité thermique du lait traité à 140°C. La cinétique de coagulation à la chaleur (140 °C) en fonction du pH (6,5 à 7,1) a été établie pour les laits témoin, dégazé et électroréduit. L'application d'un traitement d'électroréduction au lait a permis d'augmenter jusqu'à 5 fois la stabilité thermique à des valeurs de pH supérieures à 6,90. Par la suite, les analyses réalisées sur les laits témoin, dégazé et électroréduit, à pH 6,70 ou 7,05 et chauffés à 140°C pour une durée de 5 ou 10 minutes ont révélé une concentration en thiols 2,3 fois plus élevée dans le lait électroréduit que dans le lait témoin après 5 minutes de chauffage. Puisque le dégazage du lait permet d'obtenir des résultats similaires à l'électroréduction, l'application d'un traitement électrolytique apparaît comme une façon simple d'abaisser la concentration en oxygène dissous du lait avant l'application d'un traitement de chaleur.

#### II. Introduction

Les traitements thermiques sévères entraînent de nombreuses modifications au lait, affectant les micelles de caséine et la phase sérique. Ils entraînent des défauts de couleur, de saveur et de qualité nutritionnelle des produits laitiers. L'aptitude du lait à supporter ces hautes températures est donc une caractéristique technologique importante, tout comme l'aptitude à la fabrication fromagère (Robitaille, 1995) étudiée au chapitre précédent. L'augmentation de la stabilité thermique du lait est désirable dans plusieurs applications alimentaires dans le but d'assurer la vie de tablette des laits stérilisés en évitant la gélification à l'entreposage (Singh, 2004).

## Article II

---

Ce travail vise donc à déterminer la stabilité thermique du lait électroréduit chauffé à 140 °C en déterminant tout d'abord le temps de coagulation à la chaleur selon le pH. Ensuite, l'interaction entre la caséine- $\kappa$  et la  $\beta$ -lactoglobuline, l'étendue de la dégradation du lactose, le brunissement non-enzymatique induit par la chaleur et la dégradation de la lysine, un acide aminé essentiel, seront quantifiés.

### III. Matériel et méthode

Deux dispositifs expérimentaux ont été mis en œuvre. Dans un premier temps, l'influence des traitements et du pH sur le temps de coagulation à 140°C a été mesuré. Ensuite, les modifications chimiques induites par le traitement à haute température ont été étudiées.

#### 1. Temps de coagulation à la chaleur

##### 1.1. Plan expérimental

Le protocole expérimental impliquait la mesure du temps de coagulation à la chaleur de trois laits (témoin, dégazé et électroréduit) ajustés à 6 niveaux de pH compris entre 6,5 et 7,1. L'ordre dans lequel les laits étaient testés était aléatoire et le protocole a été réalisé deux fois.

##### 1.2. Préparation des échantillons

###### 1.2.1. Réception et écrémage

Le lait crû de mélange utilisé lors du projet provenait de chez Parmalat (St-Hyacinthe, QC). Suite à sa réception, le lait était écrémé par centrifugation (Sorvall RC-5B, rotor SLA-3000, 25 min, 4 °C, 2700 · g). De l'azoture de sodium était ajouté au taux de 0,02 % comme agent de conservation. Le pH était ajusté à 6,7 avec du HCl ou du NaOH. La composition du lait en gras, protéine, lactose, solides non gras et solides totaux était mesurée par interféromètre à infrarouge à transformée de Fourier (MilkoScan FT120, Foss North America, Eden Prairie, USA). Le lait crû écrémé était conservé dans des bouteilles de polyéthylène à 4 °C jusqu'à son utilisation.

## Article II

---

### 1.2.2. Dégazage

Le lait dégazé était obtenu par agitation sous vide de 250 ml de lait dans un erlenmeyer d'une capacité de 500 ml pendant 30 minutes.

### 1.2.3. Électroréduction

L'électroréduction a été conduite tel qu'indiqué à la section 4.5.3 avec les modifications suivantes. Le volume de lait était de 250 ml. La normalité de l'acide sulfurique était de 0,15 N alors que la différence de potentiel appliquée était de -1,51 V. Les électrodes étaient conditionnées par frottement léger avec une solution saturée d'acide oxalique entre chaque utilisation.

## 1.3. Mise en tubes

Le pH était ajusté à 7 niveaux équidistants de 6,5 à 7,1 par ajout d'un volume déterminé de HCl ou NaOH 1 N en incréments de 35  $\mu$ l aux aliquots de 20 ml de lait dans des tubes à centrifuger coniques d'une capacité de 50 ml. Dans le cas des laits dégazé et électroréduit, les tubes étaient fermés sous jet d'argon pendant 60 sec. Pour vérifier la qualité de l'ajustement du pH, celui de chacun des tubes était mesuré entre les deux mises à l'huile.

Puisque la mesure du temps de coagulation à la chaleur implique l'immersion de tubes de verre dans un bain d'huile à 140 °C, des tubes de verre (8 mm diamètre intérieur x 2 mm épaisseur x 150 mm longueur) avec bouchons vissés, spécialement conçus pour résister à la chaleur et à la pression, ont été utilisés. Un volume de 5 ml de lait était transféré dans ces tubes, fermés sous jet d'argon pendant 30 secondes pour les laits dégazé et électroréduit. Les tubes remplis étaient conservés à 4 °C pour une période minimale de 30 min avant utilisation.

## Article II

---

### 1.4. Temps de coagulation à la chaleur

#### 1.4.1. Appareillage

Les mesures du temps de coagulation à la chaleur étaient réalisées dans un bain d'huile à température contrôlée selon une version modifiée de la méthode de **Davies** et **White** (1966). Une tête chauffante avec serpentín était installée à l'extrémité du bain et permettait la circulation de l'huile. La température de l'huile était maintenue à 140 °C. Les tubes contenant les échantillons de lait aux différents pH étaient fixés aléatoirement sur un support métallique. Le support était immergé et déposé sur une plate-forme, reliée à un moteur, qui se balançait à l'horizontale à un taux d'environ 30 oscillations/minute.

De cette façon, le lait était en mouvement constant et la chaleur était répartie uniformément. Une fenêtre d'observation en verre trempé était déposée à la surface du bain, permettant d'observer les tubes sans interférence des vagues de surface causées par la circulation de l'huile. La coagulation du lait était observée à travers une lampe-loupe placée directement au-dessus du bain d'huile.

#### 1.4.2. Mesure

Au moment où le support était plongé dans l'huile, la plate forme était mise en mouvement et le chronomètre démarré. Dès l'apparition d'agrégats dans le lait, le temps écoulé était enregistré. Les mesures étaient effectuées en duplicata.

## Article II

---

### **2. Traitement thermique à 140 °C**

#### **2.1. Plan expérimental**

Les variables à l'étude dans ce plan expérimental sont au nombre de trois. Il y a d'abord le pH initial du lait (6,70 et 7,05), ensuite le traitement appliqué au lait (témoin, dégazé et électroréduit) et finalement la durée du traitement thermique à 140 °C (0, 5 et 10 minutes). Trois répétitions du plan expérimental ont été réalisées.

#### **2.2. Standardisation**

La standardisation du lait était effectuée telle que décrite à la section 1.2.1.

#### **2.3. Traitements du substrat**

##### **2.3.1. Dégazage**

Le lait dégazé était obtenu de la façon décrite à la section 1.2.2.

##### **2.3.2. Électroréduction**

L'électroréduction a été effectuée de la façon décrite à la section 1.2.3.

#### **2.4. Potentiel redox et oxygène dissous**

Les lectures de potentiel redox et d'oxygène dissous des laits avant chauffage ont été réalisées telles que décrites à la section 4.7.1 avec les modifications suivantes. Le potentiel redox d'échantillons individuels de lait était mesuré après 20 minutes sous très faible agitation. L'oxygène dissous était mesuré avec faible agitation lorsque la valeur semblait se stabiliser. Pour les laits sous atmosphère d'argon, les tubes étaient recouverts de parafilm dans lesquels les électrodes étaient insérées.

### 2.5. Traitement thermique

Tout d'abord, l'ajustement du pH des laits témoin, électroréduit et dégazé à 6,70 ou 7,05 était effectué sur un volume de 220 ml par ajout d'un volume connu de HCl ou NaOH 1 N. L'espace de tête des erlenmeyers de lait dégazé et électroréduit était purgé à l'argon avant et après l'ajout de l'acide/base. Chaque lait était ensuite réparti en 7 tubes de 10 ml de lait. Les tubes de lait dégazé et électroréduit étaient fermés sous jet d'argon. Les 21 tubes obtenus étaient disposés aléatoirement dans un support à éprouvette en plastique puis recouvert d'un léger treillis métallique pour éviter que les tubes ne se dispersent dans le bain. Le support était plongé à l'horizontale dans le bain pour un période de 5 ou 10 minutes. Le temps écoulé, le support était retiré et les tubes refroidis dans un bain d'eau à température pièce pendant 10 minutes. Le contenu des tubes était recombéné dans des pots à échantillon en polyéthylène d'une capacité de 100 ml.

### 2.6. Analyses physico-chimiques

#### 2.6.1. Mesure du pH après traitement thermique

Le pH des échantillons de lait chauffés était mesuré après traitement thermique à l'aide d'un pH-mètre Corning (pH-Meter 340, Corning, USA) et d'une électrode combinée (KCl 3 M, 659-700-02, Corning, USA).

#### 2.6.2. Teneur en minéraux

Les minéraux solubles (Ca, Mg, et P) des surnageants obtenus par ultracentrifugation (section 3.3.5.3) d'échantillons de lait témoin, dégazé et électroréduit soumis à différents temps de chauffage ont été déterminés par spectroscopie de plasma à couplage inductif (ICP Optima 4300DV, Perkin Elmer, USA et nébuliseur Meinhard type C) après précipitation au TCA 20 % et filtration sur 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Billerica, MA, USA). Les échantillons étaient préparés en duplicata.



## Article II

---

### 2.6.3. Détermination de la couleur

La couleur était déterminée par colorimétrie (Labscan2 SN-13593, Hunter Associate Laboratory, Reston, Va, USA) avec 25 ml de lait tempéré à 22 °C dans une cuvette conçue pour l'appareil. Le diamètre du faisceau lumineux était de 4,45 centimètres et l'illuminant de référence était D65. Le mode de lecture était l'échelle Lab de Hunter, où L représente la luminosité (noir =0, blanc =100), a représente les teintes de rouge (+) à vert (-) et b les teintes de jaune (+) à bleu (-). Le DE représente la différence de couleur alors que le DC représente la saturation des couleurs et sont calculés comme suit :

$$DE = \sqrt{(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 + (\Delta L)^2} \quad (1)$$

$$DC = C_{\text{échantillon}} - C_{\text{standard}} \quad (2)$$
$$C = \sqrt{a^2 + b^2}$$

### 3.6.4. Détermination des thiols totaux dans le lait

Les thiols totaux dans le lait étaient mesurés par densité optique après addition du réactif d'Ellman (Beveridge et al., 1974). Un volume de 2 mL d'échantillon était dilué dans 2,95 mL de tampon (8,5 M urée, 0,143 M Tris, 0,03 M EDTA, 0,15 M glycine pH=8,0) puis 50 µl de 5,5'-Dithiobis-(2- acide nitrobenzoïque) (DTNB) était ajouté. Par la suite, 1,00 ± 0,05 g de sulfate d'ammonium était ajouté pour clarification. Après un repos de 5 à 10 minutes, la solution était filtrée sur 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) directement dans les cuvettes visibles jetables et la densité optique à 412 nm était enregistrée (Beckman DU-65, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Les échantillons étaient préparés en duplicata. Une courbe standard construite à partir de L- cystéine a été utilisée pour la détermination du coefficient d'extinction molaire.

## Article II

---

### 3.6.5. Détermination des sucres et acides organiques

La détermination du lactose, glucose, galactose, acide citrique et acide lactique des laits a été effectuée par HPLC (Modèle DX-500, Dionex, Sunnyvale, Ca, USA, pompe modèle GP40, détecteur UV/Vis AD20, détecteur réfractomètre d'index différentiel Shodex RI-101, injecteur automatique AS40, logiciel PeakNet version 4.5) avec une pré-colonne Cation H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) et une colonne Ion 300 (Interaction Chromatography, San Jose, CA, USA) maintenue à 42 °C. La détection en UV pour les acides était effectuée à 210 nm et la phase mobile était du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 N.

Les échantillons étaient dilués d'un facteur 1,6 dans du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 N puis incubés à 85 °C pendant 30 minutes, refroidis dans un bain d'eau glacée et centrifugés (3 000  $\times$  g, 15 min, 4 °C, Centra-GP8R, International Equipment Company, MA, USA), avant d'être filtrés sur 0,45  $\mu$ m (Millipore, Billerica, MA, USA). Une aliquote était prélevée pour effectuer la seconde dilution d'un facteur 16 dans du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 N pour l'analyse du lactose.

La préparation des échantillons pour l'analyse du lactose était ensuite la même, seule la centrifugation était omise. Les échantillons étaient préparés en duplicata. Des courbes-étalons étaient préparées avec du lactose, glucose, galactose, acide citrique et acide lactique purs.

### 3.6.6. Détermination de la lysine disponible

La détermination de la lysine disponible dans le lait était mesurée par fluorescence selon une version adaptée de Morales et coll. (1996). Le lait était dilué 1 : 2 dans une solution de SDS 12 % et réfrigéré pour la nuit. Le lendemain, les échantillons étaient soumis au bain à ultrasons pour 15 minutes à environ 25 °C (Modèle 2200, Branson Ultrasonics Corporation, Dansbury, CT, USA). Ensuite, 100  $\mu$ l d'échantillon était ajouté à 3 mL de solution d'orthophthalaldéhyde (OPA) sous agitation constante et mis à incuber à 25 °C pour 5 minutes.

## Article II

---

La solution OPA était préparée quotidiennement comme suit. Dans une fiole volumétrique de 100 mL, 0,080 gr d'OPA et 2 mL de méthanol 95 % étaient mélangés jusqu'à dissolution complète. Ensuite, 50 mL de tampon borate de sodium 0,1 M pH=10,0, 5 mL de SDS 20 % et 200 µl de β-mercaptoéthanol étaient ajoutés et le volume complété à la marque avec de l'eau déionisée. Après incubation, l'échantillon était transféré dans une cuvette de quartz et la fluorescence lue immédiatement (Turner Quantech Digital Filter Fluorometer model FM 109535, Barnstead International, Dubuque, Iowa, USA) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et d'émission de 455 nm (NB360 et NB460, Barnstead International, Dubuque, Iowa, USA). Les échantillons étaient préparés en duplicata. Une solution de quinine sulfate 20 µg/mL, préparée quotidiennement, était utilisée pour la calibration de l'appareil. La quantité de lysine disponible était calculée comme suit, en considérant que le lait crû contient 100 % de lysine disponible.

(3)

$$\text{Lysine disponible (\%)} = [\text{FRe}/\text{FRc} \times 100]$$

Où

FRe : Fluorescence relative de l'échantillon

FRc : Fluorescence relative du lait crû

### 3.6.7. Teneur en protéines solubles

Les échantillons de lait chauffés étaient ultracentrifugés deux heures après le traitement thermique selon les conditions décrites à la section 3.3.5.3. La teneur en protéines du surnageant a été déterminée par combustion de Dumas (modèle FP-428, LECO Corporation, MI, USA). Les échantillons étaient analysés en duplicata. Un standard de protéine de riz (%N=1,36, Iso-Mass Scientific Inc.) était utilisé pour la calibration de l'appareil.

## Article II

---

### 3.6.8. Composition des protéines solubles

#### Chromatographie

La détermination des protéines du surnageant d'ultracentrifugation a été effectuée par HPLC en phase inverse (System Gold, Beckman, pompe modèle 126, détecteur modèle 166, échantillonneur modèle 507) avec une colonne Vydac C4 (Chromatography Sciences Company Inc., St-Laurent, QC, Canada) à détection UV à 214 nm en appliquant un gradient linéaire eau/acétonitrile (**adapté de Jaubert et Martin, 1992**).

#### Tampons utilisés

- Tampon A : 0,1 % acide trifluoroacétique (TFA) dans de l'eau déionisée;
- Tampon B : 0,096 % TFA dans un mélange acétonitrile 80 %- eau déionisée 20 %.

#### Condition appliquée

- Gradient d'élution 40 % à 60 % de tampon B en 38 minutes.

Les échantillons étaient filtrés sur une colonne de désalage (HiTrap Desalting Column, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) puis dilués 1 : 10 dans du dithiothréitol (DTT) 100 mM. Après incubation à 37 °C pendant 60 minutes, les échantillons étaient ramenés à pH d'environ 2 avec 10 µl de TFA puis filtrés sur 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, USA). Le volume injecté était de 50 µl et le plateau de chargement était maintenu à 5 °C.

## Article II

---

Étant donné les temps d'élution semblables pour les caséines et les protéines sériques, les chromatogrammes obtenus ont été divisés en trois sections. Les sections sont la zone de  $\kappa$ -caséine, la zone d' $\alpha$ -lactalbumine ainsi que la zone  $\beta$ -lactoglobuline et  $\beta$ -caséine pour des temps d'élution respectifs de 10 à 16, 20,5 à 25,5 et 27 à 30 minutes. Le pourcentage de protéine a été calculé comme suit :

(4)

$\% \text{ protéine} = \text{somme des aires de la zone} \times 100 / \text{somme des aires du chromatogramme}$

### Électrophorèse

Les protéines du surnageant d'ultracentrifugation ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) sur un système de minis-gels (PhastSystem Separation and Control Unit, PhastGel Homogeneous 20, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) et révélation au nitrate d'argent (PhastGel Protein Silver Staining Kit, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Un prélèvement de 1 ml d'échantillon était dilué avec 2,6 ml de tampon A (Tris-HCl pH=6,8 0,242 %, SDS 1,538 %, bleu de bromophénol 0,031 %, glycérol 30,77 %) et placé 5 minutes dans un bain d'eau bouillante. Après refroidissement à température pièce, 0,5 ml de tampon B (dithiothréitol 0,8 % dans tampon A, frais du jour) était ajouté et le tube placé 5 minutes dans un bain d'eau bouillante avant d'être refroidi à température pièce. Un peigne à huit puits délivrait 1  $\mu\text{L}$  d'échantillon sur le gel et l'appareil était mis en marche selon les instructions du fabricant jusqu'à ce le voltage atteigne environ 95 volt-h. Les gels étaient ensuite révélés au nitrate d'argent selon les instructions du fabricant. Les bandes étaient comparées à celles obtenues avec de l'isolat de protéine sérique Bipro (Davisco Foods International, Eden Prairie, MN, USA), du caséinate de sodium Alanate 180 (NZMP (North America) Inc., Santa Rosa, CA, USA) et de la  $\kappa$ -caséine de lait bovin (Sigma-Aldrich Company, Milwaukee, WI, USA).

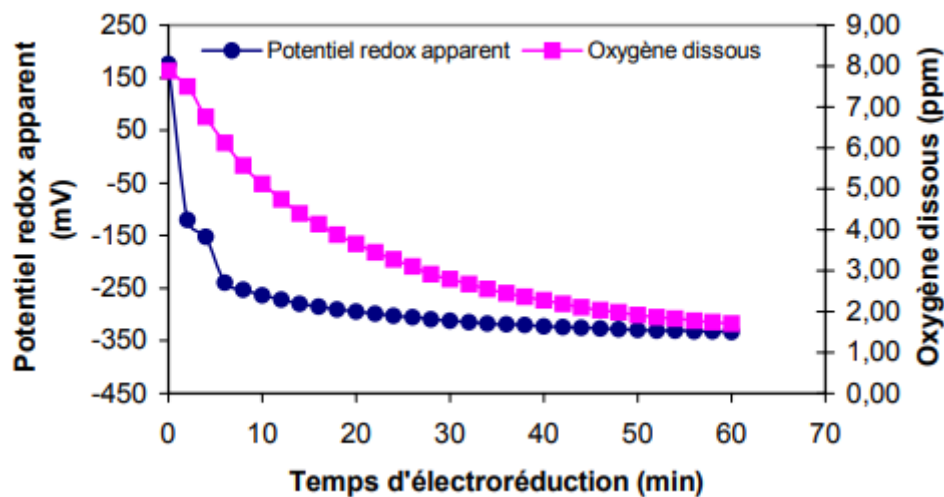
### **3.7. Analyse statistique**

L'analyse statistique a été réalisée selon un dispositif expérimental split-factoriel, avec le pH en parcelle secondaire, à l'aide de la procédure GLM du logiciel SAS v 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

IV. Résultats

1. Traitement d'électroréduction

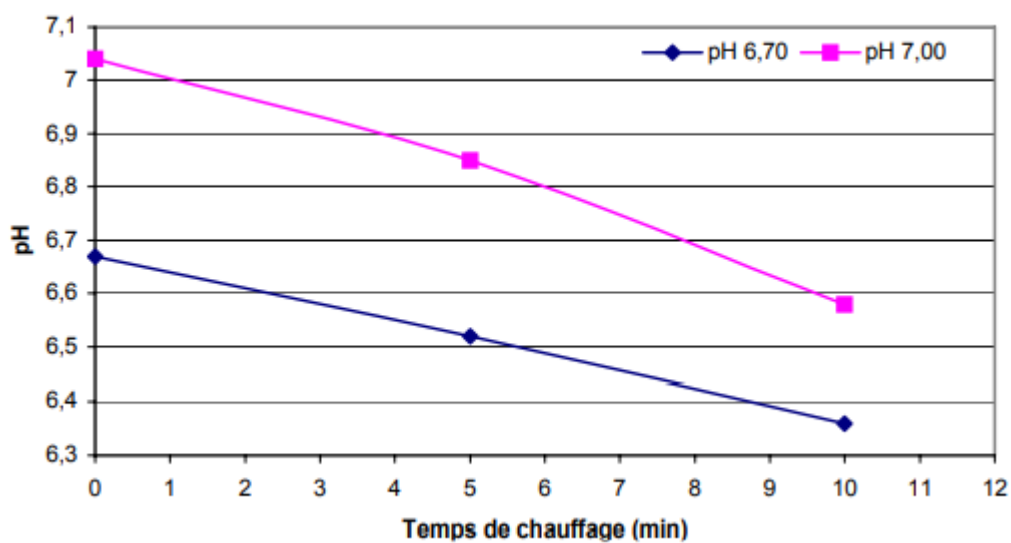
Le potentiel redox apparent du lait diminue très rapidement pendant les 6 premières minutes du traitement à  $-239 \pm 18$  mV, ce qui représente 81 % de la diminution totale obtenue. La diminution est beaucoup moins marquée pour la suite du traitement. En 60 minutes, le potentiel redox chute de  $509 \pm 72$  mV pour s'établir à  $-333 \pm 33$  mV. La concentration en oxygène dissous passe de  $7,88 \pm 0,52$  ppm à  $1,72 \pm 0,51$  ppm en cours de traitement, soit une baisse de 78%. La **Figure 14** illustre les chutes de potentiel redox apparent et d'oxygène dissous dans le lait en cours de traitement d'électroréduction.



**Figure 14** : Effet de la durée du traitement d'électroréduction (min) sur le potentiel redox apparent (mV) et la concentration en oxygène dissous (ppm) du lait.

### 2. pH après traitement thermique

Le pH après traitement thermique à 140 °C des laits témoin, dégazé et électroréduit à pH initial 6,70 ou 7,05 est présenté à la **Figure 15**. Le traitement appliqué au lait n'a eu aucune influence sur la diminution du pH en cours de chauffage. Le lait à pH initial 7,05 connaît la plus forte chute avec une pente de -0,046 unité de pH par minute de chauffage alors qu'elle n'est que de -0,031 unité de pH par minute de chauffage pour le lait à pH initial 6,70.



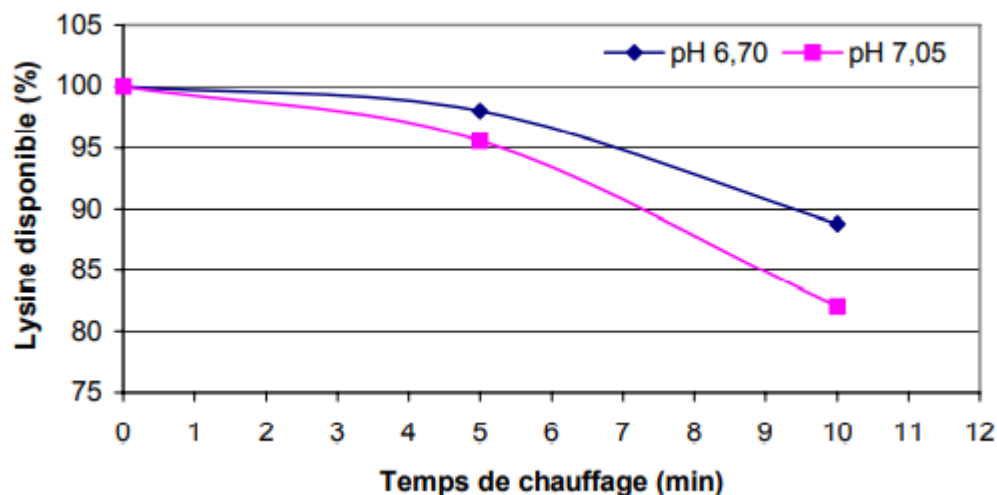
**Figure 15** : Effet du pH initial et du temps de chauffage à 140 °C (0, 5 et 10 min) sur le pH du lait.



### 3. Détermination de la lysine disponible

La quantité de lysine disponible est exprimée en concentration relative par rapport au lait témoin. Les données obtenues pour les laits témoin, dégazé et électroréduit en fonction du temps de chauffage. Un effet combiné du pH initial et du temps de chauffage ( $p=0,0419$ ), illustré à la **Figure 16**, est observé sur la baisse de la concentration en lysine. Après 5 minutes de chauffage, le lait à pH initial 6,70 affiche la moins grande perte puisqu'il reste  $98 \pm 1,8$  % de lysine disponible. Dans le lait à pH initial 7,05, il n'en reste plus que  $96 \pm 1,9$  %. L'écart se creuse davantage après 10 minutes de chauffage. À ce moment,  $89 \pm 0,7$  % de la lysine est toujours disponible dans le lait à pH initial 6,70 mais il n'en reste plus que  $82 \pm 3,8$  % dans le lait à pH initial 7,05.

L'application d'un traitement thermique de 5 minutes n'entraîne la perte que de 2 et 4 % de la lysine disponible pour les laits à pH 6,70 et 7,05 respectivement. La prolongation du traitement thermique pour une durée totale de 10 minutes montre un effet bien plus marqué. En effet, lors d'un tel traitement, 11 et 18 % de la lysine disponible est perdue, pour les laits à pH 6,70 et 7,05 respectivement.



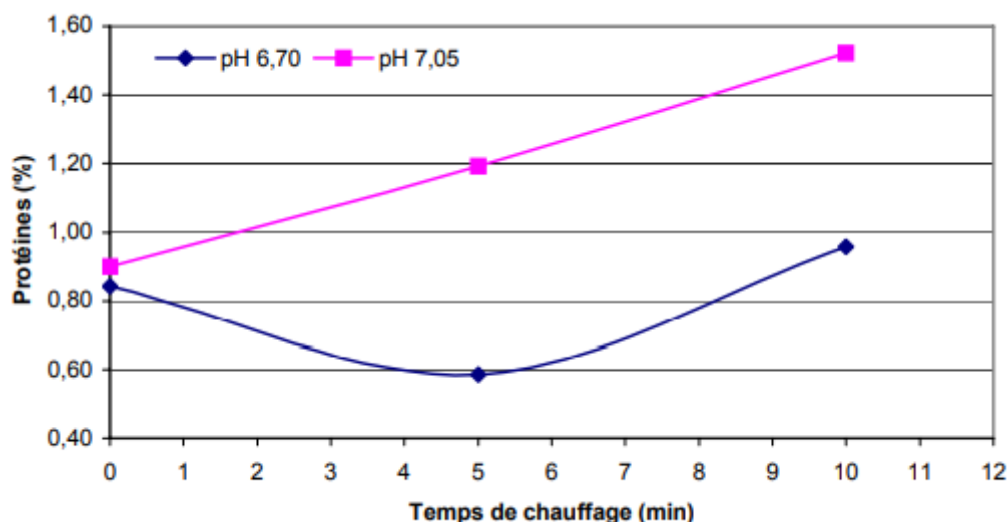
**Figure 16** : Effet du pH (6,70 et 7,05) et du temps de chauffage à 140 °C (0, 5 et 10 min) sur la lysine disponible (%) des laits.

### 4. Détermination de la concentration et du profil protéique du surnageant

La concentration et la composition en protéines du surnageant d'ultracentrifugation des laits témoin, dégazé et électroréduit à pH initial différent ayant subi un traitement thermique pour différentes durées.

Il existe un effet combiné du pH initial et du temps de chauffage ( $p < 0,0001$ ) sur la concentration des surnageants en protéines, tel qu'illustré à la **Figure 17**. Les laits nonchauffés ont une concentration protéique moyenne de  $0,87 \pm 0,15$  %. Par la suite, quand un traitement thermique de 5 minutes est appliqué au lait à pH initial 6,70, la concentration en protéines du surnageant diminue à  $0,69 \pm 0,03$ , alors que celle du lait à pH initial 7,05 augmente à  $1,19 \pm 0,04$  %. Lorsque le chauffage est prolongé davantage, la concentration en protéines dans les surnageants atteint un maximum pour chaque pH initial. Elle s'établit à  $0,96 \pm 0,03$  et  $1,52 \pm 0,01$  % respectivement pour le lait à pH initial 6,70 et 7,05.

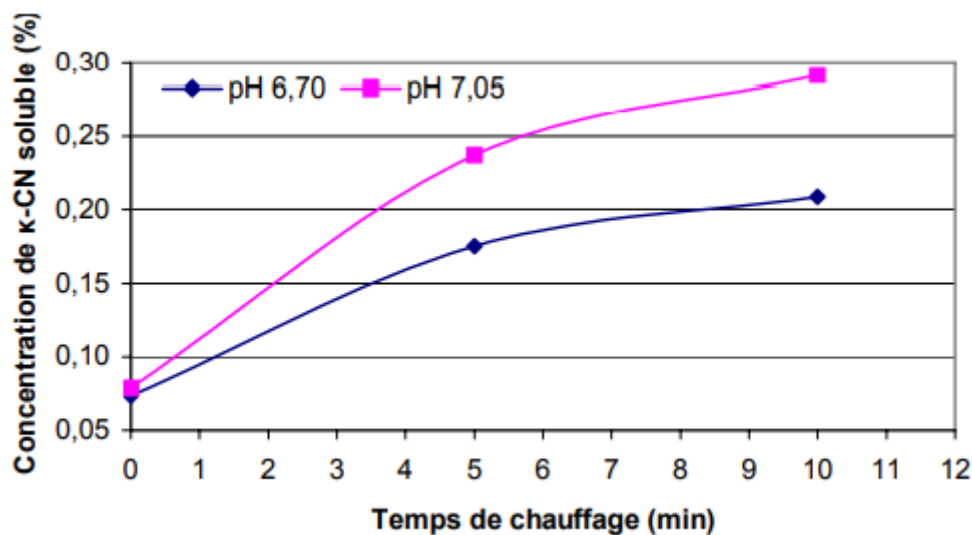
On observe aussi un effet du traitement ( $p = 0,0260$ ) sur la concentration en protéine soluble des laits chauffés. En moyenne, elle est supérieure de  $0,05 \pm 0,03$  % pour le lait électroréduit chauffé par rapport au lait témoin chauffé ( $p = 0,0073$ ).



**Figure 17** : Effet du pH (6,70 et 7,05) et du temps de chauffage à 140 °C (0, 5 et 10 min) sur la concentration protéique (%) du surnageant d'ultracentrifugation des laits.

## Article II

Pour ce qui est de la proportion de  $\kappa$ -caséine soluble dans le surnageant d'ultracentrifugation, une interaction pH initial x temps de chauffage ( $p < 0,0001$ ) est présente. La **Figure 18** illustre la concentration de  $\kappa$ -caséine soluble, exprimée en fonction de la concentration protéique totale du surnageant. La proportion protéique initiale de la zone de  $\kappa$ -caséine est de 8,76 %. À pH 6,70, elle augmente à  $29,92 \pm 2,51$  % après 5 minutes de chauffage puis diminue à  $21,82 \pm 1,68$  % après 10 minutes de chauffage. À pH 7,05, elle augmente d'abord à  $19,91 \pm 1,37$  %, soit un tiers de moins qu'à pH 6,70, et ne diminue ensuite que très légèrement pour atteindre  $19,15 \pm 1,31$  %. En terme de concentration, la  $\kappa$ -caséine soluble représente au départ 0,07 % des protéines présentes dans le surnageant. Cette concentration s'élève pour atteindre, après 5 minutes de chauffage, 0,18 et 0,24 % respectivement pour les pH initiaux de lait de 6,70 et 7,05. L'écart en faveur du lait à pH initial 7,05 se creuse encore davantage après 10 minutes de chauffage. La concentration de la  $\kappa$ -caséine soluble atteint alors 0,21 et 0,29 % de la protéine totale du surnageant, pour les pH initiaux de lait de 6,70 et 7,05.



**Figure 18** : Effet du pH (6,70 et 7,05) et du temps de chauffage à 140 °C (0, 5 et 10 min) sur la concentration protéique de la zone de  $\kappa$ -caséine (%) du surnageant d'ultracentrifugation.

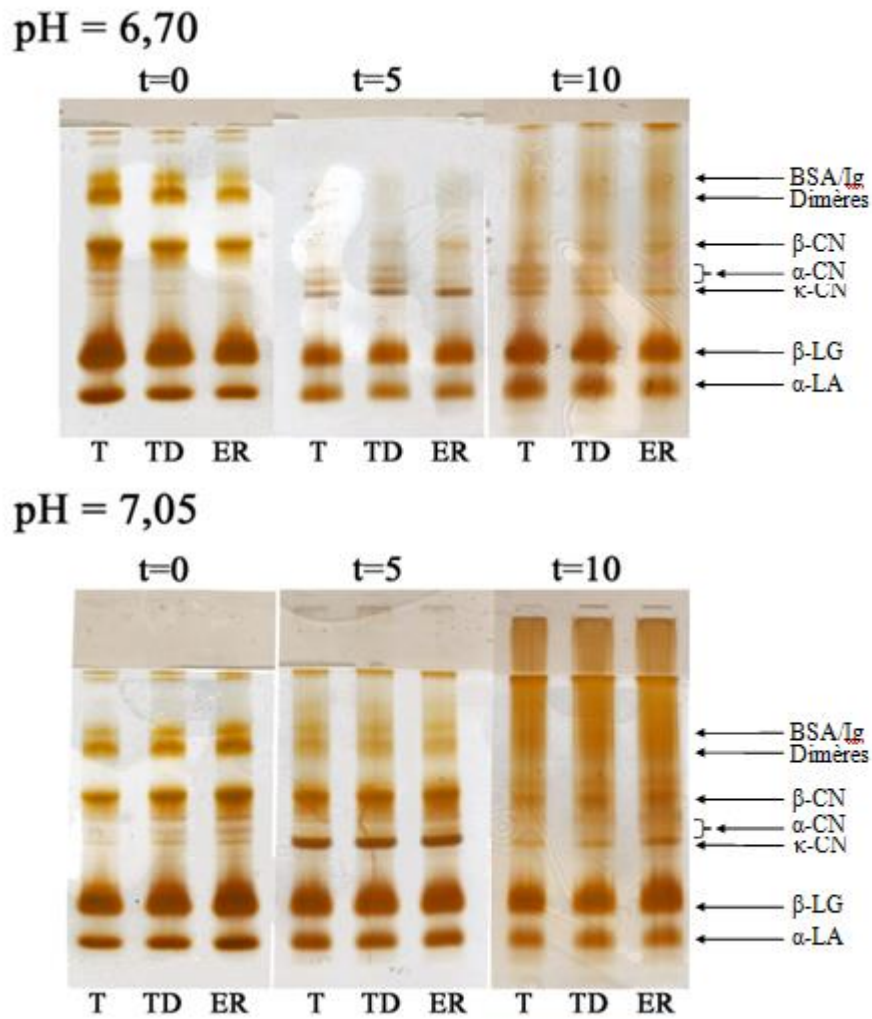
## Article II

---

L'évaluation qualitative des gels d'électrophorèse réalisés sur les surnageants d'ultracentrifugation des laits témoin, dégazé et électroréduit à pH initial 6,70 ou 7,05 et chauffés à 140 °C (0, 5 et 10 min) révèle des bandes de protéines distinctes de poids moléculaire différent (**Figure 19**). Le pH initial influence les bandes présentes sur les gels. En effet, dès que le lait est chauffé, des différences apparaissent. Il y a davantage de protéines au total dans les laits à pH initial 7,05. De plus, ces protéines sont de poids moléculaire plus élevé, correspondant à des agrégats.

Le lait à pH initial 6,70 connaît une diminution de la quantité de protéines dans le surnageant après 5 minutes de chauffage mais une bande élargie et plus foncée de  $\kappa$ -CN apparaît. Après 10 minutes de chauffage, la quantité totale de protéines augmente; on observe une grande quantité de protéines de plus grand poids moléculaire correspondant à des protéines agrégées. Les gels réalisés sur le lait à pH initial 7,05 montrent que la concentration protéique augmente avec le temps de chauffage. L'apparition d'une large bande de  $\kappa$ -CN après 5 minutes de chauffage est observée, bande qui perd de l'importance lorsque le chauffage est prolongé. Après 10 minutes de chauffage, une longue bande quasicontinue d'agrégats protéiques est observée.

Du côté du traitement appliqué au lait, peu de différences sont observées. À pH 6,70, le lait électroréduit chauffé 5 minutes exhibe davantage de  $\kappa$ - et  $\beta$ -CN et moins de  $\alpha$ -CN que les autres laits. Ces différences disparaissent lorsque le lait est chauffé davantage. À pH 7,05, il existe peu de différences entre les traitements appliqués au lait si ce n'est que le lait électroréduit chauffé 10 minutes montre une bande plus foncée de  $\kappa$ -CN que les autres.



**Figure 19** : Effet du pH (6,70 et 7,05) et du temps de chauffage à 140 °C (0, 5 et 10 min) sur la concentration et le profil protéique du surnageant d’ultracentrifugation des laits témoin, dégazé et électroréduit déterminé par SDS-PAGE.

### V. Discussion

#### 1. Effet du pH

Les deux pH choisis pour l'étude des effets du traitement thermique à haute température correspondent au maximum de stabilité des laits (pH 6,70) et à un point où les différences entre le lait témoin et le celui qui est électroréduit sont grandes (pH 7,05), en plus de se situer dans chacune des deux régions définies par **Singh** (2004) pour expliquer la stabilité thermique du lait. Ces pH initiaux ont influencé la plupart des résultats. Tout d'abord, la concentration minérale dans les surnageants d'ultracentrifugation deux heures après le traitement thermique est systématiquement plus faible pour les laits à pH 7,05 puisque l'acidification du lait entraîne la dissociation du phosphate de calcium et qu'à l'inverse, l'augmentation du pH favorise sa précipitation (**Amiot**, 2002).

Ensuite, la couleur du lait après traitement thermique, qui peut jouer un rôle dans l'acceptabilité par le consommateur d'un produit laitier stérilisé, est différente selon le pH initial. En effet, le lait dont le pH initial est supérieur (7,05) brunit davantage et plus rapidement que celui dont le pH initial se situe près du pH naturel du lait. L'isomérisation des sucres réducteurs est favorisée à pH élevé, ce qui accroît la formation de lactulose et par conséquent la formation de pigments bruns (**Berg**, 1993). Ce résultat est appuyé par celui de la concentration en lysine disponible des laits chauffés, inférieure dans les laits à pH initial 7,05, qui est indicatrice de l'intensité de la réaction de Maillard.

Finalement, la quantité et le profil des protéines retrouvées dans le surnageant d'ultracentrifugation sont différents selon le pH initial, en accord avec la classification de la stabilité thermique selon le pH (**O'Connell et Fox**, 2003; **Singh**, 2004). Le lait à pH initial 6,70 se situe dans la région I. La concentration protéique minimale dans le surnageant d'ultracentrifugation s'explique par le recouvrement des micelles de caséines par les protéines sériques (**O'Connell et Fox**, 2003; **Singh**, 2004).

## Article II

---

Lors du chauffage prolongé, l'intégrité de la micelle est détruite ce qui explique la remontée de la concentration protéique du surnageant après 10 minutes de chauffage. Le lait à pH initial 7,05, dont la concentration protéique augmente en fonction du chauffage, se situe dans la région II caractérisée par la dissociation de la  $\kappa$ -CN micellaire mais aussi, de façon moins marquée, d'autres caséines (**O'Connell et Fox, 2003; Singh, 2004**). L'examen des gels d'électrophorèse réalisés sur les surnageants a d'abord permis de mettre en évidence la variation de  $\kappa$ -CN selon le pH et le temps de chauffage en accord avec la littérature (**O'Connell et Fox, 2003; Singh, 2004**). De plus, la polymérisation des protéines chauffées à haute température est très évidente à 10 minutes de chauffage comme en témoignent les bavures, principalement localisées dans les régions de plus haut poids moléculaire.

### **2. Effet du traitement d'électroréduction**

Le lait électroréduit présente des concentrations minérales inférieures à celle des autres laits. Ces écarts peuvent être attribués aux conditions d'électroréduction qui ont causé une perte protéique suite au colmatage de la membrane, entrainant des minéraux. De plus, des minéraux peuvent s'être déposés sur l'électrode qui est recouverte d'un dépôt blanchâtre après traitement.

Pour ce qui est de la prévention de l'oxydation des thiols, les traitements de dégazage et d'électroréduction ont eu le même effet. La mesure des thiols totaux dans le lait montre que l'oxydation des thiols est supérieure dans le lait témoin pour le temps de chauffage le plus court mais similaire pour tous les laits chauffés plus longtemps. L'oxygène étant une molécule oxydante, sa faible concentration dans le lait dégazé peut avoir contribué à prévenir l'oxydation des thiols (**Walstra et Jenness, 1984**). Cependant, puisque l'effet est le même pour le lait électroréduit, il n'est pas possible à la lueur des connaissances actuelles de déterminer si l'effet préventif du traitement d'électroréduction sur l'oxydation des thiols est attribuable au traitement ou à sa conséquence, à savoir la diminution de la quantité d'oxygène dissous.

# **CONCLUSION GÉNÉRALE**



## Conclusion général

---

### Conclusion

Le lait de vache est un produit alimentaire important pour la population, étant donné l'intérêt que suscite ce produit, il nous a semblé nécessaire d'approfondir les connaissances concernant les composés protéiques de ce lait notamment les caséines qui sont la source de peptides d'intérêt nutritionnel et biofonctionnel.

La présente étude a montré que la composition biochimique des échantillons du lait prélevés et analysés varie entre les deux saisons, et présentent des taux de matières grasses plus élevé en automne qu'en été ( $34.07 \pm 0.74$ ,  $32.88 \pm 0.84$ ) respectivement, ces valeurs sont loin des valeurs rapportés dans la littérature, par contre ces laits ont des teneurs appréciables en protéines en comparaison avec ceux d'autres région de l'Algérie surtout en automne ( $33.14 \pm 0.81$ ). La teneur en fraction caséinique était importante en été qu'en automne avec une moyenne de 80.6% contre 78.93%.

L'analyse de la fraction caséinique en conditions de séparation électrophorétiques (PAGE-urée), a donné des profils ayant une grande similitude pour la mobilité électrophorétique entre les différents échantillons des deux saisons et une homogénéité de pourcentage entre les différentes entités de caséines révélés. Toutefois les essais en PAGEurée demeurent perfectibles et des optimisations complémentaire son à réaliser pour avoir des profils discriminants et assez résolutifs.

Bien que le traitement d'électroréduction ne réduise pas la quantité de  $\beta$ -LG fixée à la micelle après le traitement thermique ( $75^\circ$ ), il semble qu'il réduise l'interférence causée par la protéine sérique dénaturée au processus d'agrégation des micelles emprésurées. Des études supplémentaires, qui débordent du cadre de ces travaux, seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

## Conclusion général

---

Les dispositifs expérimentaux mis en œuvre n'ont pas permis de déceler des effets significatifs du traitement d'électroréduction sur le brunissement nonenzymatique ou la lysine disponible dans le lait après un traitement. Néanmoins, les travaux ont mis en évidence l'effet positif du dégazage et de l'électroréduction sur la stabilité thermique du lait à pH supérieur à 6,90 ; l'application d'un traitement d'électroréduction en continu en amont du traitement thermique apparaît comme une façon efficace de dégazer le lait.

Des études supplémentaires, de nature fondamentale, sont toutefois requises pour élucider le mécanisme exact des réactions se produisant dans le lait lors du traitement thermique et traitement d'électroréduction, identifier les substances électrochimiquement actives et préciser le rôle de l'oxygène dissous. De plus, d'autres études portant sur l'optimisation des conditions d'application du procédé d'électroréduction sont requises pour maximiser l'effet du traitement et le maintien des modifications subies.

## Références

### A

**ALAIS, C., 1984.** Science du lait, principes et techniques laitières. 4e édition, Sepale, Paris.

**AMIOT, J., FOURNER, S., LEBEUF, Y., PAQUIN, P., SIMPSON, R., et TURGEON, H., 2002.** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait In VIGNOLA, C.L, Science et technologie du lait-Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN:3- 25-29 (600 pages).

**NEMA S. G., CREAMER L. K., 1993.** Effect of the A and B variants of both  $\alpha$ s1- and  $\kappa$ casein on bovine micelle solvation and  $\kappa$ -casein content. Journal of Dairy Research 60: 505-516.

**ANEMA S. G., LI Y. M., 2003.** Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. Journal of Dairy Research 70: 73-83.

### B

**BERG H. E., 1993.** Reactions of lactose during heat treatment of milk. Thèse de doctorat. Wageningen Agricultural University, Pays-Bas, 180 p.

**BERG H. E., van BOEKEL M. A. J. S., 1994.** Degradation of lactose during heating of milk. 1 Reaction pathways. Netherlands Milk and Dairy Journal 48: 157-175.

**BRULE, G., LENOIR, J., 1987.** La coagulation du lait. In: Eck A, Le fromage. Lavoisier, Paris, 1-21.

### C

**CAYOT, P., LORIENT, D., 1998.** Structures et technofonctions des protéines du lait. Arilait Recherche, Lavoisier, Paris.

**CALVO M. M., 1995.** Heat-Induced Interactions between Serum Albumin, Immunoglobulin, and  $\kappa$ -Casein Inhibit the Primary Phase of Renneting. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43: 2823-2827.

**CORREDIG M., DALGLEISH D. G., 1996.** Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. Food Research International 29(1): 49-55.

**CORREDIG M., DALGLEISH D. G., 1999.** The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *International Dairy Journal* 9: 233-236.

**COURTET LEYAMARIOS, F., 2010.** Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Thèse pour le doctorat vétérinaire, école nationale vétérinaire d'Alfort, 122p.

**COULON, J.B., 1994.** Facteurs de variation du taux protéique du lait de vache en exploitation. *INRA Prod. Anim.*,4 (4) : 303-309 In **POUGHEON S.**, Contribution a l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire ,Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France: 59 (102 pages)

## **D**

**DALGLEISH D. G., 1981.** Milk proteins-Chemistry and Physics. Dans: Food proteins. Fox P. F. et Condon J. J. (Ed.), Applied Science Publisher, 155-178.

**DALGLEISH D. G., 1990.** The effect of denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin on renneting – a quantitative study. *Milchwissenschaft* 45: 491-494.

**DALGLEISH D. G., 1998.** Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *Journal of Dairy Science* 81: 3013-3018.

**DEBRY, G., 2001.** Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 21 (566 pages).

**DEVOLD T. G., BROVOLD M. J., LANGSRUD T., VERAGUG G. E., 2000.** Size of native and heated casein micelles, content of protein and minerals in milk from Norwegian Red Cattle effect of milk protein polymorphism and different feeding regimes. *International Dairy Journal* 10: 313-323.

**DZUREC D. J. JR., ZALL R. R., 1985.** Effect of heating, cooling, and storing milk on casein and whey proteins. *Journal of Dairy Science* 68: 273-280

## **E**

**EIGEL, WN., BUTLER, JE., ERNSTROM et al. 1984.** Nomenclature of proteins of cow's Milk: fifth revision. *J dairy Sci*, 67: 1599-1631.

## **F**

**FREDOT, E., 2006.** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc,Lavoisier: 25 (397 pages).

**FRYER P. J., BELMAR-BEINY M.T., SCHREIER P. J. R., 1995.** Fouling and cleaning in milk processing. Dans: Heat-induced changes in milk, International Dairy Federation (IDF) 364- 395.

## G

**GAUCHERON, F., 2004.** Minéraux et produits laitiers, Tec et Doc, Lavoisier:783 (922 pages).

**GRIPPON. JC, 1960.** La protéolyse, le lait matière première de l'industrie laitière, volume3, 3ème édition, p34

## H

**HAMMARSTEN, Z., Physiol, Chem., 1883.** 7, 227 et 1885, 9, 273.

**HILL A. R., 1989.** The  $\beta$ -lactoglobulin- $\kappa$ -casein complex. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal 22(2): 120-123.

**HILL A. R., 1995.** Chemical species in cheese and their origin in milk components. Dans: Chemistry of structure – Function relationships in cheese. Malin E. L. et Tunick M. H. (Éd.), Plenum Press, 43-58.

**Hoden, A., Coulon, J.B., 1991.** Maîtrise de la composition du lait : influence des facteurs nutritionnels sur la quantité et les taux de matières grasses et protéiques. INRA Prod, Anim., 4(5), 361-367.

**HOLT C., HORNE D. S., 1996.** The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. Netherlands Milk and Dairy Journal 50: 85-111.

**HOLT C., MUIR D.D, SWEE TSUR, A. W. M., 1978.** Seasonal changes in the heat stability of milk from creamery silos in south-west Scotland. Journal of Dairy Research 45(2): 183- 190.

## J

**JEAN, C., et DIJON, C., 1993.** Au fil du lait, ISBN 2-86621-172-3.

**JEANTET, R., CROGUENNEC, T., SCHUCK, P, BRULE, G., (2007).** Science des aliments-technologie des produits alimentaires tec et doc, Lavoisier : 17 (456 pages).

**JOUAN, P., 2002.** Lactoprotéines et lactopeptides: Propriétés biologiques. Ed INRA. Paris.77p

## K

**KINSELLA J. E., 1984.** Milk proteins: physicochemical and fonctionnal properties. CRC Critical Review in Food Science and Nutrition, 21(3): 197-262.

**KINSELLA J. E., WHITEHEAD D. M., BRADY J., BRINGE N. A. 1989.** Milk proteins: possible relationship of structure and functions. Dans: Developments in Dairy Chemistry, vol. 4.

## L

**LENOIR, J., 1985.** Les caséines du lait. Rev lait franç, 440 : 17-23.

**LUCEY J. A., 1995.** Effect of heat treatment on the rennet coagulability of milk. Dans: Heatinduced changes in milk, International Dairy Federation (IDF) 171-187.

**LUCEY J. A., GORRY C., FOX P. F., 1993.** Rennet coagulation properties of heated milk. Agricultural Science Finland 2 : 361-368.

## M

**MATHIEU, J., 1999.** Initiation à la physicochimie du lait, Tec et Doc, Lavoisier, Paris: 3 - 190 (220 pages).

**MC MAHON, DJ., MC MANUS, WR., 1998.** Rethinking casein micelle structure using Electron microscopy. J. dairy Sci., 81: 2985-2993.

**McMAHON D. J., YOUSSEF B. H., KALAB M., 1993.** Effect of whey protein denaturation on structure of casein micelles and their rennetability after ultra-high temperature processing of milk with or without ultrafiltration. International Dairy Journal 3(3): 239-256.

**MITTAINE, J., 1980.** Les laits autres que le lait de vache, [http://whqlibdoc.who.int/monograph/ who mono](http://whqlibdoc.who.int/monograph/who_mono).

**MOIR G. M. 1931.** The effect of heat upon rennin coagulation. II. Journal of Dairy Research 3 : 80-85.

**MOIR G. M., 1930.** The effect of heat upon the rennin coagulation. Journal of Dairy Research 2 : 68-75.

**MORGAN F., JACQUET F., MICAULT S., BONNIN V., JAUBERT A., 2000.** Study on the compositional factors involved in the variable sensitivity of caprine milk to hightemperature processing. International Dairy Journal 10(1/2): 113-117.

**MORRISSEY P. A., 1969.** The heat stability of milk as affected by variations in pH and milk salts. Journal of Dairy Research 36(3): 343-351.

## O

**O'CONNELL J. E., FOX P. F. 2000.** The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: effect of casein micelle size. Journal of Dairy Science 83: 378-386.

**O'CONNELL J. E., FOX P. F. 2003.** Heat-induced coagulation of milk. Dans: Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins. Fox P. F. et McSweeney P. L. H. (Ed.), Kluwer Academic, London, 879-930

## **P**

**POUGHEON, S., GOURSAUD, J., 2001.** Le lait caractéristiques physicochimiques In DEBRY G., Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 6(566 pages)

## **R**

**RAYNAL K., REMEUF F., 2000.** Effect of storage at 4°C on the physicochemical and renneting properties: a comparison of caprine, ovine and bovine milks. Journal of Dairy Research 67: 199-207.

## **S**

**Sandra, Isabelle, Andrée, Simone, POUGHEON., 2001.** Contribution a L'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse Pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, l'Université Paul-Sabatier de Toulouse, 102p.

**SINGH H., 2004.** Heat Stability of milk. International Journal of Dairy Technology 57(2-3): 111-119.

**SINGH H., 1995.** Heat-induced changes in casein, including interactions with whey proteins. In: Heat-induced changes in milk, International Dairy Federation (IDF) 86-104.

**SINGH H., CREAMER L. K., 1992.** Heat stability of milk. Dans: Advanced dairy chemistry-1: Proteins. Fox, P. F. (Ed.), Elsevier Applied Science, London, UK, 621-656

**SINGH H., FOX P. F., 1986.** Heat stability of milk : further studies on the pH-dependant dissociation of micellar k-casein. Journal of Dairy Research, 53: 237-248.

**SINGH H., FOX P.F., 1989.** Heat-induced changes in casein. Bulletin of the International Dairy Federation (IDF) 238: 24-30.

**SINGH H., MCCARTHY O. J., LUCEY J. A., 1997.** Physico-chemical properties of milk. Dans: Advanced Dairy Chemistry. 3. Lactose, water, salts and vitamins. Fox P. F. (Ed.), Chapman and Hall, London, 469-518.

**SINGH H., SHALABI S. I., FOX P. F., FLYNN A., BARRY A., 1988.** Rennet coagulation of heated milk: influence of pH adjustment before or after heating. Journal of Dairy Research 55: 205-215.

**SINGH H., WAUNGANA A., 2001.** Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. International Dairy Journal 11: 543-551.

**SOLEDAD, V., 2009.** Fractionnement de protéines du lait par filtration dynamique. Thèse présentée pour l'obtention du grade de doctorat. L'université de technologie Compiègne.

**ST-GELAIS D., TIRARD-COLLET P., 2002.** Fromage. Dans : Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses internationales Polytechnique, Montréal, 349-415.

## T

**THAPON, J.L., 2005.** Science et technologie du lait, Agrocampus-Rennes, France: 14(77 pages).

## U

**USTUMOL Z., BROWN J., 1985.** Effects of heat treatment and posttreatment holding time on rennet clotting of milk. Journal of Dairy Science 68: 526-530.

## V

**Van BOEKEL M. A. J. S., 1996.** Kinetic modelling of sugar reactions in heated milk-like systems. Neth. Milk Dairy J. 50:245-266.

**Van BOEKEL M. A. J. S., 1998.** Effect of heating on Maillard reactions in milk. Food Chemistry 62(4): 403-414

**VASBINDER A. J., ROLLEMA H. S., de KRUIF C. G., 2003.** Impaired rennetability of heated milks ; study of enzymatic hydrolysis and gelation kinetics. Journal of Dairy Science 86: 1548-1555.

**VIGNOLA, C., 2002.** Science et Technologie du lait: Transformation du lait. Ed POLYTECHNIQUE. Canada. 1-29p.

## W

**WALSTRA P., GEURTS T. J., NOOMEN A., JELLEMA A., van BOEKEL M. A. J. S., 1999.** Composition, structure and properties. Dans: Dairy technology, Marcel Dekker, New-York, 1-26.

**WALSTRA P., JENNESS R., 1984.** Dairy chemistry and physics. John Wiley and sons, NewYork, 467 p.

**WALSTRA P., van VLIET T., 1986.** The physical chemistry of curd making. Netherlands Milk and Dairy Journal 40: 241-259.



**WAUNGAN A., SINGH H., BENNETT R.J., 1996.** Influence of denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin on rennet coagulation properties of skim milk and ultrafiltered milk. Food Research International 29(8): 715-721.

**Y**

**YAYLAYAN, V.A., 1997.** Classification of the Maillard reaction: a conceptual approach. Trends in Food Science and Technology 8(1): 13-18.

**Z**