

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences de l'ingénieur

Département de chimie industrielle

THESE DE DOCTORAT

en Chimie Industrielle

Etude rhéologique et physicochimique des systèmes à
structure complexe à base de caséinate de sodium

PAR

HADJ SADOK Abdelkader

Devant le jury composé de :

M. BEZZINA	Professeur, Université Saad Dahlab de Blida	Président
F. HANNANE	Professeur, Université Saad Dahlab de Blida	Examineur
K. DAOUD	Professeur, Université Houari Boumediene	Examineur
A. HADJ ZIANE	Maitre de Conférences A, Université Saad Dahlab de Blida	Examineur
N. MOULAI-MOSTEFA	Professeur, Université Dr Yahia Fares de Médéa	Rapporteur
L. BENYAHIA	Professeur, Université du Mans, France	Co-rapporteur

Soutenu le 29 Juin 2009, Blida

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à mon Directeur de Thèse Professeur N. MOULAI-MOSTEFA de l'Université Dr Yahia Fares de Médéa. Je le remercie infiniment de m'avoir encadré et guidé tout au long de ce travail ainsi que pour ses précieux conseils et encouragements qui m'ont été d'une grande utilité.

J'adresse mes vifs remerciements à mes deux Co-Directeurs de Thèse, Professeur L. BENYAHIA et Dr T. NICOLAI de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon stage, au laboratoire PCI (Polymères, Colloïdes, Interfaces) à l'Université du Maine en France. Je leur exprime ma profonde reconnaissance pour leur disponibilité, leur patience, leur générosité et leurs critiques qui m'ont été d'un grand apport pour l'accomplissement de ce travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait le Professeur M. BEZZINA, Doyen de la faculté des Sciences, en acceptant de présider le jury.

Je remercie respectueusement le Professeur F. HANNANE de l'Université Saad Dahlab de Blida, d'avoir accepté de faire partie du jury.

Mes remerciements vont vers le Professeur K. DAOUD de l'Université Houari Boumediène d'Alger, d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie Mme A. ZAFOUR HADJ ZIANE, Maître de Conférences A à l'Université Saad Dahlab de Blida, d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je tiens à présenter mes remerciements les plus chaleureux à toute l'équipe du laboratoire PCI, plus particulièrement à Gérard, Jean-Luc, Danielle, Martine et Anita.

RESUME

Le but de ce travail est d'étudier les propriétés physicochimique, rhéologique et de phase de systèmes mixtes en solution, à base de caséinate de sodium et d'un type de polysaccharide. On s'est intéressé, en premier lieu, au système caséinate-xanthane, en analysant les interactions qui conditionnent le comportement du système. On a déterminé, par ailleurs, le diagramme de phases par la méthode des plans d'expériences. En deuxième étape, on s'est focalisé sur les caséinates de sodium en solution, en analysant par diffusion de la lumière en statique et en dynamique, les populations qui constituent le système, en fonction de la force ionique, du pH et de la température. Une fois les populations identifiées et caractérisées, on a étudié dans la dernière partie de ce travail, un autre système mixte, contenant du caséinate et du κ -carraghénane sodique. Le diagramme de phases du système a été déterminé, et une caractérisation par DLS et rhéologique a permis d'analyser l'influence de chacun des deux polymères sur les mécanismes de formation de microdomaines, de gélification et de comportement de phases.

ABSTRACT

The aim of this work is to study the rheological and physicochemical properties, and the phase behaviour of mixtures containing sodium caseinate and polysaccharide in solution. Caseinate-xanthan system was selected as model in the first. Interactions which govern the behaviour of the system were analysed and the phase diagram was determined using an experimental design. In second phase, sodium caseinate in solution were analysed using static and dynamic light scattering and the populations which constitute the system were determined according to the ionic force, pH and temperature. Following the identification and the characterization of sodium caseinate populations, another mixture system containing caseinate and κ -carrageenan was studied. The phase diagram of this system was found. The influence of each of two polymers on the mechanisms of micro-domain formation by aggregation, gelation and phase behaviour was evaluated using DLS and rheology.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة الخصائص الفيزيوكيميائية و الريولوجية و سلوك الاطوار لمزيج زوجي متكون من بروتينات الكازيينات الصوديوم و نوع من متعدد السكريات.

انصب اهتمامنا في أول الامر حول مزيج الكازيينات الصوديوم - الكزانتان، من خلال تحليل التفاعلات التي تتحكم في سلوك الاطوار. من جهة أخرى حددنا مخطط الاطوار باستعمال منهجية **مخطط التجارب**.

في المرحلة الثانية، توجه اهتمامنا نحو محلول كازيينات الصوديوم من خلال تحاليل المبينة على **الانعكاس الضوئي** السكوني و الديناميكي الشرائح المكونة للمحلول.

في المرحلة الاخيرة، قمنا بدراسة مزيج الكازيينات الصوديوم - الكراغينان حيث تحصلنا على :

- مخطط الاطوار
- الخصائص الجزئية و الريولوجية لكل طور.

TABLE DES MATIERES

RESUME

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	10
CHAPITRE 1 : CASEINE, XANTHANE ET CARRAGHENANE : PROPRIETES ET APPLICATIONS:	13
1.1 Présentation générale de la protéine de caséine :	13
1.2 Présentation générale du xanthane :	18
1.3 Présentation générale du k-carraghénane :	24
CHAPITRE2 : MELANGES CASEINES/POLYSACCHARIDES EN SOLUTION	39
2.1 Introduction	39
2.2 Interactions moléculaires	39
2.3 Aspect thermodynamique des solutions de biopolymères	42
2.4 Diagramme des phases pour un mélange protéine/polysaccharide	47
2.5 Phénomènes et mécanismes de floculation par déplétion	49
2.6 Interactions caséine ou caséinate / polysaccharide en solution aqueuse	49
2.7 Conclusion	53
CHAPITRE3 : TECHNIQUES EXPERIMENTALES	54
3.1 Techniques de diffusion du rayonnement	54
3.2 Turbidimétrie	67
3.3 Chromatographie d'exclusion stérique : SEC	69
3.4 Rhéologie	72
3.5 La zétamétrie	74

CHAPITRE4 : RHEOLOGIE, ZETAMETRIE ET COMPORTEMENT DE PHASE D'UN MELANGE AQUEUX A BASE DE CASEINATE DE SODIUM ET DE XANTHANE.	80
4.1 Introduction	80
4.2 Matériels, produits et méthodes	81
4.3 Résultats et discussions	85
4.4 Conclusion	95
CHAPITRE5 : CARACTERISATION DU CASEINATE DE SODIUM EN SOLUTION EN FONCTION DE LA FORCE IONIQUE, DU PH ET DE LA TEMPERATURE PAR UTILISATION DE LA DIFFUSION DE LA LUMIERE STATIQUE ET DYNAMIQUE.	97
5.1 Introduction	97
5.2 Matériels et méthodes	98
5.3 Résultats et discussions	99
5.4 Conclusion	114
CHAPITRE 6 : ETUDE DES SYSTEMES MIXTES : CASEINATE DE SODIUM / κ -CARRAGHENANE	115
6.1 Introduction	115
6.2 Matériels, produits et méthodes	116
6.3 Résultats et discussions	118
6.4 Conclusion	135
CONCLUSION GENERALE	138
Liste des symboles	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	143

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 Modèle micellaire de la caséine proposée par Waught	15
Figure 1.2. Modèle micellaire de la caséine proposé par Morr	16
Figure 1.3: Formule développée du motif du xanthane	19
Figure 1.4 : Structure idéale du κ , ι et λ carraghénane	25
Figure 1.5: Exemple d'irrégularité dans la structure "idéale" du κ -carraghénane.	26
Figure 1.6 : Schéma d'un gel physique	30
Figure 1.7 : Changement de propriétés au cours de la transition sol-gel	31
Figure 1.8 : T_m (obtenue par refroidissement) en fonction de C_T en ions libres.	33
Figure 1.9 : Modèle de gélification selon Rees	34
Figure 1.10 : Modèle de gélification selon Morris	34
Figure 1.11 : Modèle de gélification selon Smidsrod	35
Figure 1.12 : Modèle de gélification selon Rochas	36
Figure 1.13 : Variation de T_m^{-1} en fonction de C_T , la concentration totale en ions K^+	37
Figure 2.1 : Comportement d'un mélange de protéine et de polysaccharide	44
Figure 2.2 : Diagramme des phases d'un système pseudo- Ternaire Protéine / Polysaccharide/Eau	48
Figure 2.3 : Illustration schématique pour un système pseudo ternaire Protéine/polysaccharide/eau	48
Figure 2.4 : Représentation schématique du phénomène de déplétion entre polysaccharide et une protéine	49
Figure 2.5 : Micrographe confocal du mélange de NaCN-k-carraghénane	52
Figure 2.6 : Mécanisme de formation de gel, proposé en deux étapes par Oakenfull	53
Figure 3.1 : Les différents types d'interactions entre le rayonnement et la matière	55

Figure 3.2 : Schéma simple du principe de diffusion de la lumière	56
Figure 3.3 : Principe du calcul du nombre de centres de particules diffusantes ΔN dans une couronne d'épaisseur Δr à une distance r d'un centre d'une particule de référence (en noir). D'après Rottereau	58
Figure 3.4 : Evolution de l'échelle spatiale sondée en fonction du vecteur d'onde q	59
Figure 3.5 : Représentation schématique de l'installation de diffusion de la lumière classique	61
Figure 3.6 : Exemple de distributions obtenues par différents programmes (REPES ou GEX) et différents paramètres d'analyse.	66
Figure 3.7 : Schéma explicatif de phénomène de perte linéaire de photons mesuré par la turbidité du milieu.	67
Figure 3.8 : Représentation schématique de la ligne d'analyse de CES.	71
Figure 3.9 : Représentation schématique d'une mesure rhéométrique en mode oscillatoire	73
Figure 3.10 : Modèle de Gouy-Chapman montrant l'interface entre une surface chargée de potentiel ψ_0 et une solution électrolytique	76
Figure 3.11 : Modèle de Stern, montrant l'existence d'une distance d en deçà de laquelle les ions ne peuvent se loger	76
Figure 3.12: Modèle triple couche. Le plan interne de Helmholtz est localisé à la distance x_i de la surface alors que le plan externe de Helmholtz est localisé à la distance d	77
Figure 4.1 : Variation de G' en fonction de la déformation à $T = 20^\circ\text{C}$.	82
Figure 4.2 : Ajustement d'un rhéogramme type, par le modèle de Casson, $T = 20^\circ\text{C}$	82
Figure 4.3 : Courbes d'influence du xanthane sur le module de conservation, G'_o , à diverses concentrations de Na-CN.	87
Figure 4.4 : Courbes d'influence du Na-CN sur le module de conservation, G'_o , à diverses concentrations de xanthane.	88
Figure 4.5 : Variation de la concentration critique, Na-CN^* en fonction de la concentration du xanthane.	89
Figure 4.6 : Courbes iso- G'_o en fonction de la variation simultanée des concentrations du Na-CN et du xanthane.	90

Figure 4.7 : Courbes d'influence du Na-CN sur la viscosité de Casson, η_c , à diverses concentrations de xanthane	91
Figure 4.8: Stabilité du mélange aqueux en fonction de la viscosité de Casson : Solution homogène stable, $St= 1$, solution instable, $St = 0$	92
Figure 4.9 : Diagramme de phases du mélange NaCN xanthane en solution à T ambiante et à pH neutre	93
Figure 4.10: Courbes d'influence du xanthane sur le potentiel Zêta, ξ . (Solution diluée au 1/10, T = 20 °C)	94
Figure 4.11 : Courbes d'influence du NaCN sur le potentiel Zêta, ξ , à diverses concentrations du xanthane, à T ambiante et à pH neutre. (Solution diluée au 1/10)	95
Figure 5.1 : Courbes (a) de distribution du temps de relaxation et (b) du corrélogramme pour une solution à 40g/l de caséinate de sodium contenant 100mM de NaCl et 3mM d'azidure de sodium à T = 20 °C.	100
Figure 5.2 : Influence de la concentration du sel sur la distribution du temps de relaxation des solutions de caséinate (C= 40g/L, T = 20 °C, pH 6.7 et $q= 2.2 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$).	103
Figure 5.3 : (a) Dépendance du rayon hydrodynamique apparent, R_{na} , et (b) de la masse apparente, M_a , des submicelles en fonction de la variation de la concentration du caséinate à diverses concentrations de NaCl	104
Figure 5.4 : Variation des paramètres moléculaires, M_w et R_h en fonction de la quantité de NaCl mise en jeux.	105
Figure 5.5 : Variation du paramètre A_2 en fonction de la quantité de NaCl mise en jeux.	106
Figure 5.6 : Variation du rayon hydrodynamique, R_{h2} , des gros agrégats en fonction de la concentration de la protéine, à diverses quantités de sel.	107
Figure 5.7 : Evolution de la turbidité à $\lambda = 450 \text{ nm}$ en fonction de la diminution du pH, de solutions de caséinate de sodium à 20g/L , contenant 0mM et 250 mM NaCl	108
Figure 5.8 : Variation des paramètres moléculaires M_w et R_h des submicelles de caséinate en fonction du pH pour une solution de caséinate de sodium contenant 250mM de NaCl	109
Figure 5.9 : Evolution de I_r d'une solution à 2% de NaCN à diverses concentrations en NaCl. T=70 °C.	110

- Figure 5.10 : Evolution de la turbidité d'une solution à 2% de NaCN à diverses concentrations en NaCl. $T=70^{\circ}\text{C}$. 111
- Figure 5.11 : Variation de M_a et de R_h submicelles en fonction de la température pour une solution à 20g/l de caséinate de sodium contenant 500mM de NaCl. 113
- Figure 5.12: Variation de la perte de la concentration du caséinate en fonction du pH, à l'issue du traitement à $T=70^{\circ}\text{C}$. La concentration avant traitement de NaCN est de 20g/l additionnée à 500mM de NaCl. 114
- Figure 6.1 : Photo de quelques échantillons qui ont enregistré une séparation de phase à l'issue de la centrifugation, $T = 20^{\circ}\text{C}$, 100mM NaCl. 119
- Figure 6.2 : Diagramme de phase du système mixte NaCN/k-carraghénane en solution, contenant 100mM NaCl, $T = 20^{\circ}\text{C}$. 119
- Figure 6.3 : Représentation schématique de la floculation par déplétion des micelles de caséine enrobées par des macromolécules de κ -carraghénane. $T=60^{\circ}\text{C}$, 100 mM de NaCl. Ici, les macromolécules de κ -car ont la conformation de pelote aléatoire 120
- Figure 6.4 : Diagramme de phases du système mixte NaCN/k-carraghénane (dans la partie initialement homogène), après 24 heures de repos. $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$ et $T = 60^{\circ}\text{C}$. 121
- Figure 6.5 : (a) Variation de la turbidité des systèmes mixtes, après 24 heures de repos. $C_{\text{NaCN}} = 2\text{g/L}$ et $C_{\text{k-car}} = 3\text{g/L}, 4\text{g/L}, 5\text{g/L}, 6\text{g/L}$ et 7g/L . (b) comportement « gel » de l'essai : $C_{\text{NaCN}} = 2\text{g/L}$, $C_{\text{k-car}} = 7\text{g/L}$. $T = 20^{\circ}\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$. 122
- Figure 6.6 : Après une semaine de repos, apparition de deux phases due à la sédimentation de particules formées. $C_{\text{NaCN}} = 2\text{g/L}$, $C_{\text{k-car}} = 3\text{g/L}$ à 7g/L . $T = 20^{\circ}\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$. 122
- Figure 6.7 : Après une semaine de repos, apparition d'un gel turbide en haut et un sédiment entreposé en bas. $C_{\text{k-car}} = 2\text{g/L}$, $C_{\text{NaCN}} = 29\text{g/L}$ à 44g/L . $T = 20^{\circ}\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$. 123
- Figure 6.8 : Diagramme de phase du système mixte NaCN/k-carraghénane (dans la partie initialement homogène), après 24 heures de repos. $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$ et $T = 20^{\circ}\text{C}$. 124
- Figure 6.9 : Variation du rayon hydrodynamique apparent R_{ha} , en fonction de $C_{\text{k-car}}$. $T= 20^{\circ}\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$, $\text{pH} = 7$. 125
- Figure 6.10 : Dépendance angulaire de l'intensité relative du mode lent associé aux complexes formés dans le mélange de caséinate et du κ -carraghénane. $C_{\text{NaCN}} = 1.5\text{g/L}$, $T = 20^{\circ}\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$ 126

Figure 6.11 : Dépendance angulaire de l'intensité relative du mode lent associé aux complexes formés dans le mélange de caséinate et du κ -carraghénane. $C_{NaCN} = 0.5g/L$, $T = 20^\circ C$, $C_{NaCl} = 100mM$	127
Figure 6.12 : Variation des rayons hydrodynamiques des deux populations en fonction de la variation de la concentration de κ -carraghénane. $C_{NaCN} = 1.5g/L$, $T = 20^\circ C$, $C_{NaCl} = 100mM$.	128
Figure 6.13 : Dépendance angulaire de l'intensité relative du mode lent à diverses concentrations de caséinate. $C_{k-car} = 1.5g/L$, $T = 20^\circ C$, $C_{NaCl} = 100mM$.	129
Figure 6.14 : Variation des rayons hydrodynamiques des deux populations en fonction de la variation de la concentration des caséinates. $C_{k-car} = 1.5g/L$, $T = 20^\circ C$, $C_{NaCl} = 100mM$.	130
Figure 6.15 : Effet du vieillissement sur la dépendance angulaire de l'intensité Relative du mode lent. $C_{k-car} = 1.5g/L$, $C_{NaCN} = 1.5g/L$, $T = 20^\circ$ et $C_{NaCl} = 100 mM$.	131
Figure 6.16 : Effet de la dilution sur la dépendance angulaire de l'intensité Relative du mode lent. $C_{k-car} = 1.5g/L$, $C_{NaCN} = 1.5g/L$, $T = 20^\circ$ et $C_{NaCl} = 100 mM$.	132
Figure 6.17 : Cinétique d'évolution de G' des mélanges à $2^\circ C$ à diverses concentrations de caséinate. $C_{k-car} = 1.5g/L$, $C_{NaCl} = 100mM$	133
Figure 6.18 : Courbes de fonte et de gélation des mélanges à diverses concentrations de caséinate de sodium. $C_{NaCl} = 100mM$.	134
Figure 6.19 : Courbes de fonte et de gélation des solutions κ -carraghénane en fonction de la variation de KCl.	134
Figure 6.20 : Courbes de gélation et de fontes des mélanges en fonction de la variation de la température et à diverses concentrations de κ -carraghénane. $C_{NaCN} = 20g/L$, $C_{NaCl} = 100mM$.	135
Tableau 1.1. Caractère des fractions de la caséine	14
Tableau 1.2 : application industrielle de la gomme xanthane	23
Tableau 4.1 : Matrice d'expériences (11 essais+4 essais au centre du domaine)	84
Tableau 4.2: valeurs expérimentales des cinq caractéristiques	85
Tableau 5.1 : Conditions de préparation et de caractérisation des solutions de NaCN.	101

INTRODUCTION

Les protéines et les polysaccharides sont largement utilisés dans le domaine alimentaire, de part leur excellentes propriétés fonctionnelles, notamment organoleptique et texturale. Cependant, les spécialistes dans l'industrie alimentaire, se trouvent en face d'une nouvelle difficulté, d'ordre financier, qui est inhérente au coût relativement important des protéines d'origine animale.

Les protéines de caséinate qui sont un ingrédient incontournable dans la majorité des produits laitiers, ne dérogent pas à cette règle. En effet, leur prix a fortement augmenté ces dernières années, et les industriels n'arrivent plus à supporter ce fait. En Algérie, les producteurs des produits dérivés du lait, n'ont jamais utilisé cette protéine dans leur formulation, du fait que le produit fini coûte nettement plus cher.

Aussi, l'idée qui s'est dégagée des spécialistes industriels est de lancer des recherches sur cette problématique, en tentant de substituer une partie des caséinates par un polysaccharide dont le prix est nettement moins cher et par le fait qui est de provenance végétale. Suite à cela, le nouveau produit fini doit présenter la même qualité tant sur le plan organoleptique que textural et de stabilité. Néanmoins, les formulateurs se sont heurtés à des difficultés majeures, au vu de la complexité du comportement des systèmes mixtes à base de protéines de caséinate et de polysaccharides.

En effet, ces mélanges sont potentiellement instables, au pH au-dessus du pH isoélectrique des deux substances, auquel cas le caséinate et le polysaccharide ont la même charge. Dans ces conditions, des interactions ségréatives se développent, menant le système à une séparation de phases, l'une riche en protéine et l'autre riche en polysaccharide. Ces interactions sont de type de floculation par déplétion ou d'incompatibilité thermodynamique. Dans le cas où le pH d'un des biopolymères est au-dessous du point isoélectrique, les deux espèces auront des charges opposées, et vont donc s'attirer par interaction d'attraction électrostatique. En conséquence, il y aura formation de complexes macromoléculaires des deux constituants, par un processus d'agrégation, qui vont générer une hétérogénéité du système, et mener

même, à une instabilité, par effet de sédimentation des gros objets formés. Aussi, est-il important d'identifier les différents comportements physicochimique, rhéologique et de phase des systèmes mixtes, en fonction des conditions opératoires (purification, filtration, mode d'incorporation, température, centrifugation, dialyse contre de l'eau purifiée,...) et de formulation (pH, force ionique, rapport des concentrations des deux biopolymères,...).

Pour ce qui est du choix du polysaccharide, on a opté, en premier lieu, pour le xanthane, du fait que celui-ci est très utilisé dans le domaine alimentaire, de part ses propriétés viscosifiantes qui sont relativement intéressantes : les solutions de xanthane supportent une gamme très étendue de pH et de force ionique et présentent un comportement rhéologique thermoréversible. En plus, rares sont les auteurs qui se sont intéressés au mélange de caséinate et du xanthane en solution. D'ailleurs, le diagramme de phase de ce système mixte n'a pas été déterminé et le domaine de variation des concentrations a été très réduit, par souci d'obtenir des solutions de mélange transparentes, sur lesquelles on peut effectuer des analyses par diffusion de la lumière et par microscopie confocale. Ces techniques nécessitent l'utilisation des échantillons transparents.

Notre choix s'est porté également sur le κ -carraghénane, comme agent viscosifiant et gélifiant, vu que ce dernier est d'autant intéressant que le xanthane : les points forts de cet ingrédient est qu'il présente deux états de conformation qui dépendent de la température. Ainsi, au-dessus de la température de transition de conformation pelote-hélice, le κ -carraghénane se présente sous forme de pelote et donc peut, très facilement, se mélanger avec les protéines ; en abaissant la température, il se transforme en hélice pour s'agréger et figer, en conséquence, la structure du mélange final. Evidemment, ces mécanismes de passage de la conformation pelote à l'hélice ainsi que l'agréation et la gélification du polysaccharide dépendent de plusieurs facteurs physicochimiques, notamment, du type des contre-ions présents (K^+ , Na^+ , Ca^{++} ,...) dans la solution. Dans notre cas, on a pensé à éliminer le maximum des contre-ions par dialyse, considérés comme parasites, dans le but de pouvoir contrôler la force ionique du système. D'ailleurs, on a choisi la forme de κ -carraghénane sodique, sur laquelle, les contre-ions de potassium ont été substitués par du sodium. Aussi, au-delà de la température ambiante (20°C), ce type de polysaccharide ne forme pas de gel, et cela quelque soit

sa concentration. Ainsi, dans le cas du mélange avec les caséinates, l'effet de cette protéine sur la température de transition pelote-hélice du κ -carraghénane sodique sera distinctement mis en évidence.

On a structuré la thèse en deux parties, une partie bibliographique, constituée de trois chapitres qui sont dédiés respectivement à :

1. L'état bibliographique des biopolymères utilisés dans ce travail, notamment sur le plan structure, propriétés fonctionnelles, applications,
2. Une synthèse bibliographique sur les systèmes mixtes protéine-polysaccharide : type d'interaction, propriétés physicochimique et rhéologique,...
3. Aux techniques expérimentales qui ont été employées au cours de ce travail.

et une partie expérimentale dans laquelle on a effectué des études d'identification et de caractérisation sur :

1. Les mélanges de caséinate de sodium et du xanthane, par utilisation de la méthode de la planification expérimentale.
2. Les caséinates de sodium en solution, par diffusion de la lumière en statique et dynamique, en fonction de différents facteurs physicochimiques.
3. Sur le comportement de phase, rhéologique et macromoléculaire (par DLS) des systèmes mixtes à base de κ -carraghénane sodique et du caséinate de sodium.

Cette thèse est achevée par une conclusion générale, dans laquelle, on exposera les différents résultats qui se sont dégagés à l'issue de ce travail ainsi que des perspectives pour mettre en avant les points qui méritent d'être approfondis et poursuivis.

CHAPITRE1

CASEINE, XANTHANE ET CARRAGHENANE : PROPRIETES ET APPLICATIONS

1.1 Présentation générale de la protéine de caséine :

Les protéines du lait sont largement évaluées par leurs propriétés émulsifiantes. Le comportement et la stabilité des émulsions huile dans eau ou eau dans huile à base de protéines du lait est lié à la structure et aux propriétés mécaniques des couches adsorbées à la surface des gouttelettes [1]. Indépendamment de leurs propriétés émulsifiantes, les protéines du lait sont des molécules polymériques et se comportent en tant que tels dans les systèmes alimentaires, particulièrement une fois mélangées avec des polysaccharides [2].

1.1.1 La caséine

C'est une phospho-glycoprotéine, constituant environ 75 à 80% de l'azote du lait de vache, présente à l'état micellaire de diamètre de 0.1 μ m. Associée à des phosphates et des citrates de calcium, la caséine native se compose de 94% de protéines; 3% de calcium; 2.2% de phosphore; 0.5% d'acide citrique et de 0.1% de magnésium. L'architecture micellaire de la caséine et son maintien en suspension dans la phase aqueuse du lait sont dus principalement à la fraction kappa hydrophile qui enveloppe les autres substances protéiques [3].

1.1.2 Composition et structure des caséines

Les caséines sont des complexes protéiniques instables largement répandus comme émulsifiants grâce à leur excellente propriété stabilisante. Ce sont des protéines désordonnées qui dans certains cas peuvent être traitées en tant que polymère d'enroulement aléatoire. Toutes les caséines sont de grosses molécules contenant du phosphore et un nombre élevé d'acide aminé. De plus, elles contiennent une forte teneur en acide glutamique, en proline, en leucine et une faible teneur en cystine [4]. La caséine se fractionne en trois parties différentes appelées

alpha, bêta et kappa [5]. Dans le tableau 1.1, on regroupe les principaux caractères des trois fractions caséiniques [6].

Tableau 1.1. Caractère des fractions de la caséine [5]

	Caséine alpha	Caséine bêta	Caséine kappa
Poids moléculaire	24000	24000	19000-23000
Phi	4.1	4.5	3.7
Solubilité en présence de Ca ²⁺ à 4°C	-	+	+
Solubilité en présence de Ca ²⁺ à 25°C	-	-	+

1.1.2.1 Alpha caséine

Elle est hétérogène et comporte aussi au moins deux autres fractions, se distinguant par leur sensibilité aux sels et au calcium qui sont :

- une fraction sensible au calcium constituant de la Alpha-s₁ caséine
- une fraction insensible au calcium constituant de la Kappa caséine.

La caséine Alpha s₁ est une macromolécule fortement chargée avec un caractère amphiphile dont les agrégats forment de longues chaînes par une série d'associations consécutives [7].

1.1.2.2 Bêta caséine

Cette protéine a toutes les caractéristiques moléculaires essentielles d'un excellent agent émulsifiant et d'un stabilisant polymérique. C'est un poly électrolyte linéaire flexible avec une charge nette de (-15 e⁻ à pH=7). La bêta caséine a une structure secondaire ordonnée et ne représente aucune réticulation covalente intramoléculaire. La distribution non uniforme des résidus hydrophiles et hydrophobes dans la bêta caséine, résulte une structure moléculaire distinctement amphiphilique qui ressemble à un agent tensioactif hydrosoluble [7].

1.1.2.3 Kappa caséine

Elle est l'un des constituants de la caséine entière le plus intéressant par sa composition et les propriétés qui en découlent. En présence de calcium (à 0.3M et à 25°C), on remarque qu'il y a une rupture du complexe de caséine. Les caséines Alpha -s et Bêta précipitent, tandis que la fraction Kappa reste en solution. Elle est pauvre en phosphore, en revanche, la teneur en serine et en thréonine est remarquable ainsi qu'en cystéine et les acides aminés soufrés. Une particularité de toutes les caséines, la caséine Kappa contient une fraction glycidique formée d'une

ou plusieurs séquences d'acides sialiques fixées sur une seule chaîne peptidique. De poids moléculaire égale à 19000, elle est formée par 169 résidus d'acide aminés [8].

1.1.3 Structure micellaire des caséines

Les micelles de caséines sont des particules protéiques polydispersées. Elles donnent au lait son aspect spécifique, ce sont de grands agrégats avec un diamètre de 90 à 150 nm. D'autre part, la microscopie électronique suggère que les micelles de caséine se composent aussi d'unités plus petites qu'on appelle « sub-micelles » ayant des diamètres de 10 à 20nm. Ces micelles même lorsqu'elles sont petites de taille, représentent un très grand nombre de molécules de caséine associées dans une structure très compliqué et difficile à expliquer [1].

Plusieurs auteurs ont proposé des modèles de structures différentes. On se limitera dans cette étude aux deux modèles les plus connus qui sont ceux de Morr et de Waught [10,11].

Dans le modèle de Waught, la micelle est constituée d'une couche périphérique de caséine Alpha-s et Kappa et un noyau central constitué de caséine Alpha-s et Bêta. Cette structure est justifiée par le fait que la présure n'attaque que la caséine Kappa qui doit se situer à la surface pour qu'elle soit modifiée par l'enzyme. La structure micellaire proposée par Waught est illustrée sur la figure 1.1.

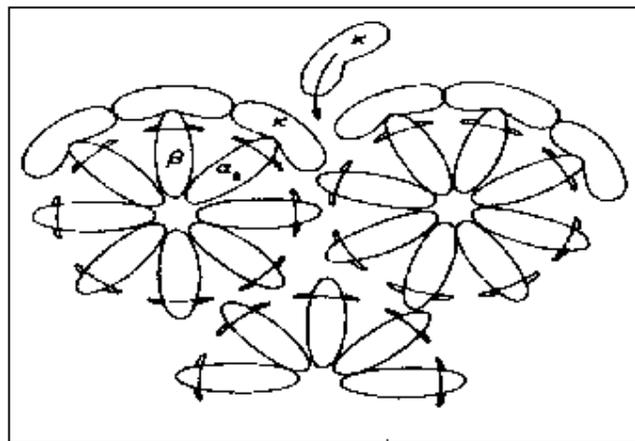


Figure 1.1 : Modèle micellaire de la caséine proposé par Waught [9]

Dans la structure micellaire de Morr, les Alpha et les Bêta caséines hydrophobiques sont représentées avec des cercles pointillés et sont couvertes de

Kappa caséine. Le phosphate colloïdal de calcium qui relie les micelles secondaires est représenté par un « S ». La figure 1.2 donne la structure de micelle proposée par Morr.

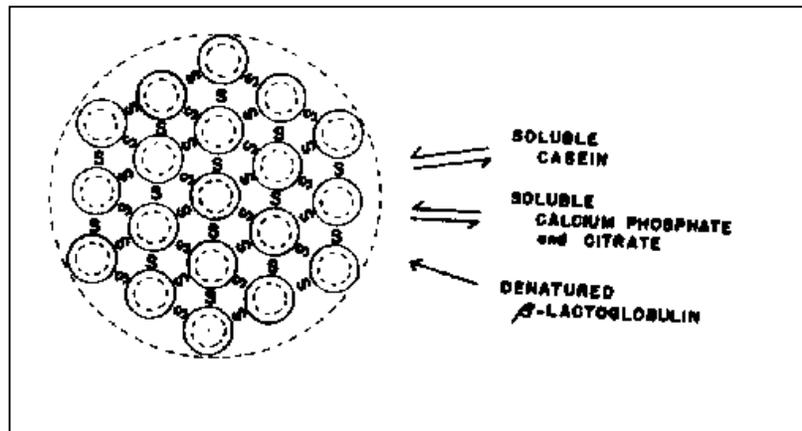


Figure 1.2. Modèle micellaire de la caséine proposé par Morr [10]

1.1.4 Les caséinates

Les caséines sont des produits insolubles dans l'eau dans les conditions normales. A cet effet, les industriels ont cherché à avoir une forme soluble qui facilite leur utilisation. Plusieurs techniques ont été mises en œuvre, dans le but d'avoir des caséinates qui répondent aux exigences industrielles. Ces caséinates peuvent être obtenues à partir de la caillebotte, de la caséine sèche ou de la caséine acide [8, 9].

1.1.5 Les sels de caséinates

C'est en fonction de l'utilisation industrielle, que le fabricant a mis au point différentes caséinates qui répondent au mode de formulation en utilisant différents sels aux alcalis. Les caséinates utilisées couramment en industrie sont [10] :

- Caséinate de sodium (hydroxyde, bicarbonate, phosphate de sodium),
- Caséinate de potassium (hydroxyde, phosphate de potassium),
- Caséinate de calcium (hydroxyde, carbonate, phosphate de calcium),
- Caséinate de magnésium (hydroxyde, carbonate, phosphate de magnésium),
- Caséinate d'ammonium (hydroxyde d'ammonium).

On se limitera dans cette étude au caseinate de sodium qui fera l'objet de notre travail.

Le caséinate de sodium est un mélange de plusieurs fractions, non seulement contenant les monomères principaux de la caséine (Alpha et Bêta), mais également d'autres fractions importantes tels que Kappa –caséine et Alpha s₂ -caséine, aussi bien que de petites quantités de sels minéraux (particulièrement les ions Ca²⁺). Les fractions de caséinates enrichies de la Bêta –caséine montrent une activité de surface et une capacité émulsifiante importante, mais réduisent la stabilité du film. Un comportement opposé est remarqué pour les fractions enrichies en Alpha-s et Kappa caséines [10].

Les solutions de caséinate de sodium contiennent des micelles secondaires ou submicelles avec un rayon hydrodynamique de 8.89 ± 1 nm et un assemblage supra moléculaire de 74 ± 4 nm et cela a été mis en évidence par le biais de la dispersion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering) [11]. En utilisant de la dispersion de la lumière statique, Lucey et al. [12] ont montré que le rayon giration des caséinates de sodium varie entre 20 et 70 nm. Cependant, une étude récente menée par Dickinson et al. [13] a montré que le rayon hydrodynamique était près de 100 nm. La taille ainsi que la forme exacte des molécules de caséinate de sodium restent à nos jours, en grande partie, inconnues [14].

1.1.6 Application des caséines et des caséinates

Par le passé, la principale utilisation de la caséine était la fabrication d'un plastique appelé galalithe, actuellement elle est employée dans les colles, les peintures, l'industrie du papier et des ciments à cause de son pouvoir liant. Dans l'industrie alimentaire, les caséines et caséinates sont utilisés pour leurs qualités nutritionnelles et fonctionnelles. Ainsi, la caséine est un ingrédient important dans les fromages fondus et des préparations diététiques [12].

Actuellement, l'utilisation de la caséine micellaire rentre comme celle de la caséine présure, presque exclusivement dans la fabrication fromagère afin d'augmenter le rendement.

Les caséinates ont une teneur en protéines sur extrait sec élevée (90 à 95%) et de très bonnes propriétés fonctionnelles. Ainsi, le caséinate de sodium est un bon

émulsifiant et a une bonne capacité de rétention d'eau. Pour ces raisons, il est utilisé depuis fort longtemps en tant qu'émulsifiant dans l'industrie de la salaisonnerie. Les mêmes caractéristiques sont exploitées dans la préparation des plats cuisinés, des sauces et potages déshydratés, des crèmes glacées et fouettées. Les caséinates sont aussi utilisés, pour leur teneur élevée en protéines, dans la fabrication de biscuits protéinés, des imitations de fromage pour les pizzas et les plats cuisinés, en diététique, en nutrition clinique sous forme hydrolysée et dans l'industrie pharmaceutique [12].

1.2 Présentation générale du xanthane :

1.2.1 Quelques éléments sur les carbohydrates

Les carbohydrates ont pour formule générale $-C_n (H_2O)_n-$ et sont scindés en trois sous-ensembles .

- Les oses (ou monosaccharides) : ce sont des polyalcools de 4 à 8 atomes de carbone, composés réducteurs, non hydrolysables. Ils comportent une fonction aldéhyde ou une fonction cétone.
- les osides (ou oligosaccharides) : ce sont des enchaînements de 2 à 10 oses. Ces oses sont sous forme cyclique, reliés par des liaisons glycosidiques, c'est-à-dire des liaisons éthers entre deux carbones de deux cycles successifs. Ils donnent par hydrolyse un ou plusieurs oses.
- Les polysaccharides (osides de haut poids moléculaire) : oses reliés en longues chaînes linéaires ou ramifiées, structurés en arrangements spatiaux particuliers (hélice, ruban...).

L'hydrolyse acide des oligosaccharides ou des polysaccharides conduit à la libération d'homologues de masse inférieure et à des monosaccharides [15].

1.2.2 Origine du xanthane

Le xanthane est un polysaccharide exocellulaire produit par une bactérie appelée «Xanthomonas campestris» intervenant dans le métabolisme de certains végétaux. Il a été découvert en 1940 par des scientifiques américains cherchant la cause d'une maladie affectant les végétaux : un produit visqueux (le xanthane), sécrété par ladite bactérie, obstruait les pores respiratoires de ces plantes [15].

De nombreuses industries exploitent les propriétés rhéologiques remarquables du xanthane. Il est utilisé comme épaississant dans l'agroalimentaire sous la

dénomination E 415 (assaisonnements, sauces, crèmes, glaces). En cosmétique, il est présent dans les dentifrices, les crèmes ou les gels. Il sert d'excipient pour le relargage contrôlé de principes actifs pharmaceutiques. L'industrie pétrolière l'utilise pour la récupération assistée du pétrole en tant qu'agent viscosifiant. La liste des applications est encore longue (peintures, vernis, explosifs...) et rend compte de l'importance de ce produit [15].

1.2.3 Structure chimique du motif du xanthane

La composition chimique de référence du motif a été établie par Jansson et al. en 1975 [16] et confirmée par Melton et al. en 1976 [17]. Il existe de multiples travaux antérieurs mais l'ensemble des références plus récentes semble s'accorder sur le motif décrit par Jansson représenté sur la figure 1.3.

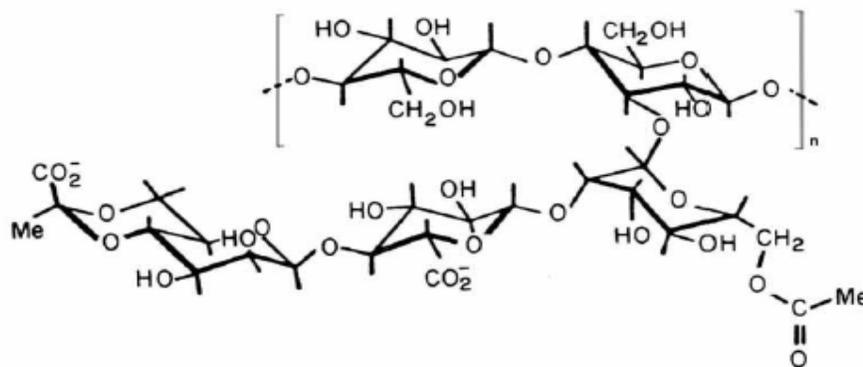


Figure 1.3 : Formule développée du motif du xanthane

Trois fonctions apparaissent sur les cycles de la chaîne latérale du motif :

- un groupement acétate sur le cycle le plus proche du squelette principal
- un acide glucuronique sur le cycle intermédiaire
- un acide pyruvique sur le cycle terminal.

Du fait de la présence des deux charges négatives (les deux acides), le xanthane devrait avoir théoriquement le comportement en solution d'un polyélectrolyte anionique.

1.2.4 Organisation moléculaire du xanthane en solution

Le xanthane est une molécule à haut poids moléculaire. Les masses couramment rencontrées pour ce polymère sont supérieures à 10^6 g/mol [17]. Les rayons de giration (Rg) déterminées par diffusion statique de la lumière pour ces molécules dépassent la centaine de nanomètres. Sato et al. [18] mesurèrent par exemple les Rg suivants dans 0,1 M **NaCl** : 378 nm pour une masse de $7,4 \cdot 10^6$ g/mol, 257 nm pour $3,9 \cdot 10^6$ g/mol, 208 nm pour $2,6 \cdot 10^6$ g/mol, 108 nm pour $1,0 \cdot 10^6$ g/mol.

Par ailleurs, la longueur de persistance des molécules de xanthane est aussi très élevée. Elle est la somme de deux contributions essentielles : une contribution intrinsèque L_0 liée à la chimie du motif (présence de cycles, encombrement stérique, liaisons hydrogène entre squelette principal et chaînons latéraux), et une contribution électrostatique L_e due à la répulsion des charges de la macromolécule.

$$L_p = L_0 + L_e$$

Eq.1.1

L_p est de l'ordre de 100 nm. On conçoit ainsi que les molécules individuelles de xanthane puissent être considérées comme semi-rigides pour les plus hautes masses moléculaires et comme des bâtonnets rigides pour les molécules de faible masse.

1.2.5 Conformations du xanthane à l'état dilué

1.2.5.1 Transition ordre-désordre

Les macromolécules de xanthane en solution aqueuse subissent une transition conformationnelle au-delà d'une certaine température T_m « melting temperature ».

La valeur de T_m est fortement dépendante de la force ionique I de la solution. Milas et Rinaudo [19] obtiennent une variation linéaire de T_m en fonction du logarithme de la force ionique du milieu (somme de la contribution des contre-ions du polymère et de celle des ions d'un éventuel ajout de sel). T_m vaut 45°C pour une solution concentrée de xanthane (10 g/l, $M_w = 3,6 \cdot 10^6$ g/mol) sans addition de sel c'est-à-dire pour $I = 0,01$ M. Elle s'élève à 78°C si $I = 0,05$ M.

Au-dessous de T_m , la molécule est dans un état ordonné. Lorsque la température dépasse T_m , l'ordre conformationnel fond. Ainsi, la température et la salinité des solutions déterminent la conformation des molécules de xanthane dans le solvant. Dans des conditions peu salines et/ou à des températures élevées, la conformation

adoptée par la macromolécule est celle d'une pelote désordonnée, flexible. A l'inverse, si la salinité est forte et/ou si l'on se place à température ambiante, la macromolécule adoptera une conformation ordonnée, semi-rigide ou rigide.

Il a été établi par ailleurs que le degré de substitution des fonctionnalités acétate et pyruvate de la chaîne latérale affecte aussi la température de transition. Le groupement pyruvate, porteur d'une charge, déstabilise la forme ordonnée du fait des répulsions électrostatiques qu'il occasionne (il diminue T_m). Au contraire, le groupement acétate permet d'établir des liaisons hydrogène et participe donc à la stabilisation de la forme ordonnée (il augmente T_m).

De plus, cette transition semble ne pas être réversible [20] : un échantillon « natif » de xanthane transitera vers un état « dénaturé » au-delà de T_m (par abaissement de la force ionique ou par chauffage), puis lors du refroidissement, ne reprendra pas nécessairement sa conformation initiale et se trouvera dans un état dit « renaturé ».

1.2.5.2 Etat natif

L'état natif correspond à la conformation adoptée par la macromolécule après dissolution complète de la poudre de polymère dans l'eau à température ambiante. C'est une structure hélicoïdale (le diamètre de l'hélice est de quelques nanomètres) où les ramifications sont alignées le long du squelette principal et assurent la rigidité de la structure.

De plus, les macromolécules s'associent deux à deux en « double hélice » (à l'instar de l'ADN) pour former un état ordonné plus rigide encore. L'état ordonné peut résulter aussi de structures hybrides où une séquence ordonnée coexiste avec une séquence désordonnée au sein d'une même macromolécule.

1.2.5.3 Etat dénaturé

L'état dénaturé est observé à une température supérieure à T_m . Il résulte du déploiement des chaînes latérales du polymère. A température ambiante, les ramifications du polymère interagissent avec le squelette principal par des liaisons hydrogène qui créent un ordre local. L'agitation thermique (ou une baisse de force ionique) provoque la rupture de ces liaisons, permettant à la macromolécule de s'étendre. Il peut en résulter un découplage du double brin en deux simples brins. Cet état peut aussi être interprété comme une structure hybride où cette fois les

portions ordonnées, rigides seraient largement minoritaires [21], de manière à former globalement des ensembles plus flexibles de type pelote expansée.

1.2.5.4 Etat renaturé

Lors du retour à la température ambiante (ou par l'augmentation de la force ionique), la nature de la structure adoptée n'est pas clairement établie. La molécule est semi-rigide et en double brin même si la conformation diffère de celle de l'état initial : l'éventualité d'un processus d'association intramoléculaire par repliement d'un simple brin type « épingle à cheveux » n'est pas exclue. Il est probable aussi que des agrégats (micro gels) apparaissent (même en solution diluée).

1.2.6 Conformation à l'état concentré

En solution diluée, la dénaturation de la molécule de xanthane se traduit par une dissociation irréversible de la double hélice en deux monofilaments. Et la renaturation s'effectue probablement selon un processus intramoléculaire à masse macromoléculaire constante n'impliquant qu'un seul brin.

En solution plus concentrée, au-delà de 1 % en polymère, la dénaturation a lieu sans dissociation des deux brins de la double hélice ou avec dissociation partielle, limitée aux extrémités de chaînes [21]. La perte de l'ordre local par ouverture des chaînes latérales rend plus flexible l'ensemble, mais la structure de double hélice est globalement conservée.

L'enchevêtrement des chaînes est cependant rendu possible par le gain en flexibilité lors de la montée en température. Parallèlement, des zones de jonctions intermoléculaires apparaissent et créent un réseau tridimensionnel qui renforce le caractère de type « gel faible » (gel physique) de la solution [22]. La salinité favorise la création de ces ponts intermoléculaires lors de la montée en température, et à forte concentration en sel la forme ordonnée peut même être conservée : le sel diminue l'activité des molécules d'eau donc leur potentiel de coordination par liaisons H aux groupements latéraux.

1.2.7 Effet de sel monovalent en milieu dilué

La viscosité des solutions diluées de xanthane varie linéairement avec l'inverse de la force ionique I . Elle décroît si la concentration en sel augmente, comme on l'observe généralement pour les poly électrolytes.

1.2.8 Effet de sels bivalents

L'introduction d'un sel multivalent dans une solution de xanthane aura pour effet d'augmenter considérablement la force ionique I du milieu. Pour une concentration identique à celle d'un sel monovalent, I sera Z^2 fois plus grande si Z représente la valence de l'ion [15].

A cet effet s'ajoute les mécanismes de complexation pouvant impliquer les deux charges des chaînons latéraux du xanthane (portées par les deux dérivés du groupement carboxylique : acide glucoronique et acide pyruvique) et les cations du sel [15].

1.2.9 Application de la gomme xanthane

L'utilité de la gomme Xanthane dans le domaine alimentaire n'a pas de limite, elle est employée intensivement comme additif pour les nourritures et des boissons. La liste des exemples est très longue à citer. Les applications industrielles du xanthane sont résumées dans le tableau 1.1.

Tableau 1.2 : Application industrielle de la gomme xanthane [23]

Secteurs d'applications	Doses d'utilisation	Fonctions du xanthane
-Crème, fromage -Nappages et fourrages	0.05% à 0.3%	-Evite la synérèse -Stabilise les mousses et les émulsions -Confère à la texture des propriétés rhéologiques d'écoulement
- Produits carnés (pâtés, saumures)	0.2% à 0.5%	-Liant de l'eau et des matières grasses - Evite la synérèse -Améliore la texture
- Produits diététique et de régime	0.1% à 0.5%	-Stabilise les émulsions
- Produits de soin : crème et lotions, dentifrices.	0.2% à 1%	-Améliore la texture
		- Contrôle de la

-Agrochimie	0.1% à 0.3%	sédimentation
-Agent de nettoyage	0.1% à 0.7%	- Agent liant -Stabilise le pH

1.3 Présentation générale du κ -carraghénane :

Le terme de "carraghénane" est utilisé pour nommer une classe de polysides sulfatés qui constitue, la matrice cellulaire de nombreuses espèces d'algues de la famille des Rhodophycées.

Même s'il semble qu'il existe un spectre continu de carraghénanes, il est cependant possible de distinguer différents types de carraghénanes caractérisés par des structures de bases différentes.

Les premiers travaux, en 1953, ont montré une relation entre la variation de structure et la solubilité. A partir de cette sélectivité liée à la solubilisation dans des solutions de KCl, une première classification a été établie entre les carraghénanes gélifiants et les non gélifiants. Par la suite et avec la multiplication et l'amélioration des techniques expérimentales, de très nombreux résultats ont été obtenus. Parmi les techniques les plus employées, on peut citer les méthodes chimiques [24] et physico-chimiques [25].

1.3.1 Structure chimique des carraghénanes

Les carraghénanes sont des polysides linéaires, formés de résidus galactose et anhydro-galactose plus ou moins sulfatés, liés alternativement en β -1,3 et α -1,4. Selon la place et le nombre des radicaux sulfuryl sur le cycle carboné on distingue les kappa (κ), iota (ι) ou lambda (λ). Les structures "idéales" des carraghénanes ont été déterminées par Rees et son équipe [26]. Les structures du κ , ι et λ sont représentées sur la figure I.4

Leurs structures peuvent être décrites par un copolymère alterné du type $(AB)_n$ [24]. Dans le cas du κ -carraghénane l'unité A (cycle C_1) est un D-galactose 4 sulfate

lié en 1,3 et l'unité B (cycle 1C) est un 3,6-anhydro- α -galactose lié en 1,4. Le ι possède en plus un groupement sulfate en position 2 de l'unité B.

L'alternance des cycles C_1 et 1C pour le ι - et le κ -carraghénane permet la formation d'hélices qui conduit, dans certaines conditions, à l'obtention d'un gel. Le λ -carraghénane, lui, ne possède pas de résidu anhydro-galactose ce qui amène à une simple succession de cycles C_1 . Pour cette raison, il ne peut pas former de structures hélicoïdales et ne permet pas l'obtention de gels [27].

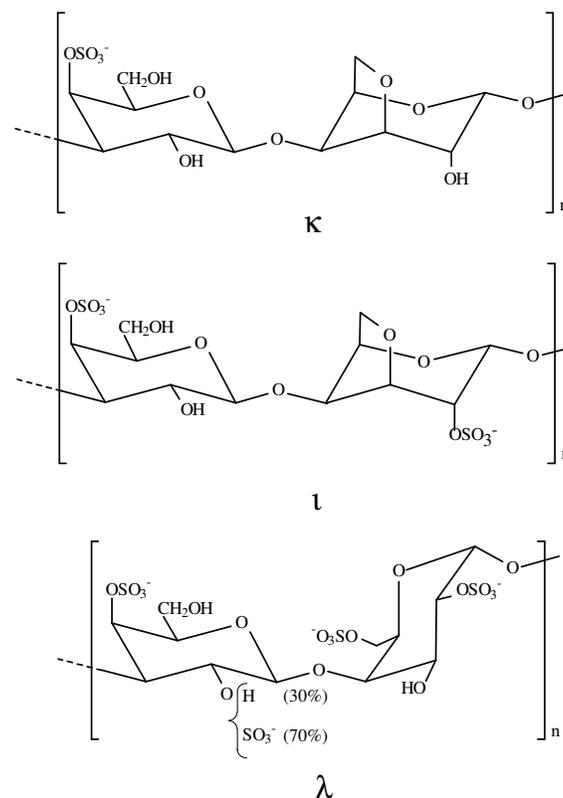


Figure 1.4: Structure idéale du κ , ι et λ carraghénane

Dans l'algue sont présentes deux fractions supplémentaires : μ (μ) et ν (ν). Les structures de ces 2 fractions supplémentaires peuvent laisser penser que ces dernières sont les précurseurs biologiques respectifs des chaînes de κ et ι . D'ailleurs, le cycle anhydro-galactose présent dans le κ et le ι -carraghénane peut être obtenu à partir de ces précurseurs sous l'action d'une enzyme contenue dans l'algue ou au cours du traitement alcalin utilisé dans l'industrie. Cependant, les travaux de Bellion en 1983 ont montré que même dans les algues utilisées pour la

production du κ -carraghénane, le précurseur ν -carraghénane était présent. Ceci permet d'expliquer que la chaîne peut, occasionnellement, présenter des irrégularités de structure et de substitution [24,26]. Ainsi, la structure du κ -carraghénane peut "masquer" la présence d'une petite fraction de résidus liés en 1,4 ayant :

- ❖ Une composition différente avec, par exemple, la présence de groupement sulfate supplémentaire en position 2 du cycle anhydro-galactose (figure 1.5.a).
- ❖ Et/ou une conformation différente dans laquelle certains cycles anhydro-galactose sont remplacés par des groupements α -D-galactose 6-sulfate ou 2,6-disulfates (figure 1.5.b).

Il est important de noter que ce type d'anomalie de conformation entraîne un changement de flexibilité de la chaîne à l'état désordonné en solution [27], mais aussi des interruptions de la structure hélicoïdale appelés "kinks" qui peuvent jouer un rôle dans l'état ordonné et au cours de la gélification [26].

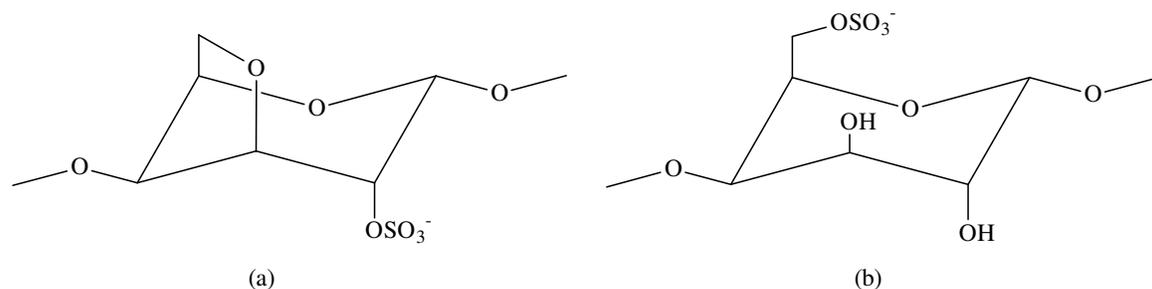


Figure 1.5 : Exemple d'irrégularité rencontrée dans la structure "idéale" du κ -carraghénane.

1.3.2 Production et applications du κ -carraghénane

1.3.2.1 Production

Comme on l'a déjà dit, les carraghénanes sont extraits à partir de Rhodophycées provenant soit de populations naturelles, notamment *Chondrus crispus*, *Gigartina stellata* et *Iridaea laminaroides*, soit de cultures en pleine eau

pratiquées dans le sud-est asiatique avec *Eucheuma spinosum* et *Eucheuma cottonii*.

Le procédé d'extraction des carraghénanes repose sur deux de leurs propriétés: leur solubilité dans l'eau chaude et leur insolubilité dans les solvants organiques polaires comme l'alcool. Les algues sont placées dans l'eau chaude alcaline (90°C) et broyées mécaniquement. Ceci permet d'obtenir une destruction suffisante de la paroi cellulosique, de limiter l'hydrolyse acide des chaînes et de modifier la structure chimique des précurseurs μ et ν -carraghénane éventuellement présents afin d'améliorer les propriétés gélifiantes.

Le "broyât" est ensuite additionné de terre filtrante sous pression qui va retenir toutes les impuretés insolubles. Le "sirop" limpide contenant le carraghénane est versé dans un alcool à haut titre, ce qui le fait coaguler. Le "coagulum" est relavé à l'alcool pour parfaire sa déshydratation, il est ensuite séché par évaporation sous vide et enfin broyé à la granulométrie désirée. Les carraghénanes se présentent sous forme d'une poudre blanchâtre, insipide et inodore et portent le code européen **E407**.

Les carraghénanes commercialisés sont en général vendus sous les noms génériques ι , κ et λ . En pratique, ils ne sont jamais purs et vont contenir des quantités variables des deux autres carraghénanes en fonction des algues dont ils sont extraits. A titre d'exemple, un échantillon de κ -carraghénane contenant 2% en masse de ι -carraghénane est considéré comme extrêmement pur (c'est le cas de l'échantillon Cke que nous avons utilisé), les valeurs usuelles des produits commerciaux étant plutôt de l'ordre de 10 à 15%.

La grande densité de groupements sulfates confère à la chaîne de carraghénane un caractère fortement anionique. La forme acide libre est très instable et conduit à une hydrolyse de la chaîne. Le carraghénane, pour cette raison, est commercialisé sous forme stable de sel de sodium, de potassium et de calcium (en général, l'un est dominant quantitativement). Ces cations associés ont une grande influence sur les propriétés gélifiantes du carraghénane.

1.3.2.2 Applications

Les carraghénanes sont utilisés dans les préparations alimentaires pour leur capacité à lier de grandes quantités d'eau en vue d'en modifier le comportement rhéologique : épaissement, gélification et stabilisation.

Cependant, les carraghénanes ne sont pas seulement utilisés dans le domaine alimentaire, mais aussi dans le domaine médical et dans les cosmétiques. Bien souvent, pour ce type d'applications, les carraghénanes sont volontairement dégradés afin de réduire leur viscosité.

1.3.3 Transition conformationnelle et la gélification

1.3.3.1 Généralité sur les gels

Les états de la matière intermédiaires entre le liquide et le solide, connus sous le nom de gels, sont des systèmes particulièrement attrayants de par la diversité des domaines dans lesquels ils trouvent des applications

Le terme de gel provient du grec *kolla* qui signifie "colle" (dans l'antiquité, on connaissait la gelée de gélatine ou l'empois d'amidon), mais sa première définition scientifique fut donnée par le chimiste britannique Thomas Graham, en 1861, qui recensa les matériaux semblant avoir des propriétés communes : l'amidon, la gélatine, les gommes végétales, ainsi que d'autres substances dont les solutions prenaient en masse [28].

Plus récemment, en 1949, Hermans proposa une définition du mot gel basé sur trois critères [29] :

- 1- Ces systèmes sont peu concentrés, cohérents, composés d'au moins deux constituants dont un liquide largement majoritaire et une substance "solide" dispersée.
- 2- Ils ont des propriétés mécaniques proches de celles des solides, et ils sont le plus souvent transparents du fait du maillage très fin du réseau.

3- La phase dispersée constitue un réseau tridimensionnel continu retenant prisonnière l'eau dans sa structure (notion d'ordre).

La définition moderne des gels se fonde donc sur des descriptions à la fois de la structure microscopique et des propriétés mécaniques de ces systèmes, mais comme le soulignent certains auteurs, les différents types de gels ont des structures souvent bien différentes et sont étudiés par des scientifiques d'horizons très divers : physiciens, chimistes, biologistes ou encore chercheurs du domaine médical.

1.3.3.2 Les différents types de gels

On distingue trois grands types de réseaux de gels selon la nature des interactions mises en jeu :

- ❖ Les gels temporaires qui sont formés, à haute concentration en segments de chaînes, simplement par enchevêtrements topologiques. Ceux-ci se forment par exemple dans un fondu de polymères linéaires dont la masse molaire M est supérieure à la masse critique entre enchevêtrements M_e . Ils peuvent aussi être formés dans une solution de polymères linéaires de masse supérieure à M_e et de concentration plus grande que la concentration de recouvrement C^* .
- ❖ Les gels covalents, formés par la réticulation covalente de chaînes préexistantes (vulcanisation) ou la polymérisation de monomères, dont une fraction au moins à une fonctionnalité supérieure à deux. Ces derniers sont des structures de masse molaire infinie et possèdent ainsi un temps de relaxation infini et donc un module à l'équilibre G_e . Ce sont des solides viscoélastiques, les liens sont formés par réaction chimique de façon irréversible et sont caractérisés par une énergie de liaison très grande devant kT .
- ❖ Les gels physiques qui constituent une catégorie intermédiaire entre les deux précédentes. Ce sont des systèmes constitués de chaînes pontées physiquement. Les pontages ont une énergie finie et petite (de l'ordre de quelques kT) et peuvent avoir des durées de vie finies (réversibilité). Dans

cette catégorie, il y a aussi bien des polymères d'origine biologique (gélatine, pectine, carraghénanes...) que synthétique (polymères isotactiques dans certains solvants, copolymères à blocs B-A-B dans un solvant bon pour le monomère A et mauvais pour le monomère B...).

Dans les gels physiques, nous avons à faire à des pontages spécifiques mais non covalents. Ceux-ci sont dus à des interactions coulombiennes, des interactions dipôle/dipôle, des interactions de Van der Waals, des liaisons hydrogène ou encore des transferts de charge...

Dans ces systèmes, les pontages ne sont généralement pas ponctuels mais sont constitués par des zones de jonction ayant une structure plus ou moins ordonnée (figure 1.6). Ainsi, même si un lien physique élémentaire a une énergie libre qui suit la loi de Boltzmann, dans la plupart des cas, ces pontages présentent un certain degré de coopérativité et l'énergie mise en jeu est beaucoup plus grande que la somme des énergies libres de chaque interaction.

Enfin, il faut noter que les réseaux de biopolymères se distinguent des réseaux physiques du fait qu'ils sont formés presque toujours en présence d'un excès de solvant (ce solvant étant le plus souvent l'eau ou un électrolyte aqueux).

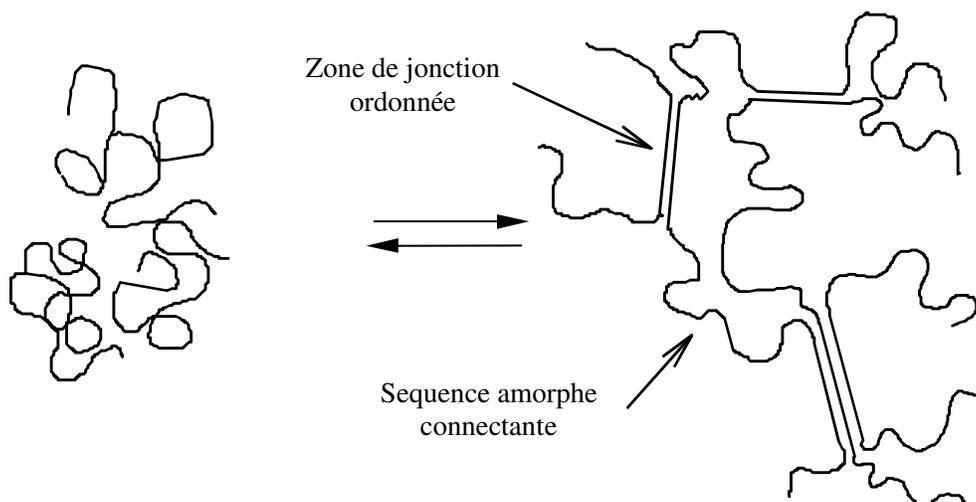


Figure 1.6 : Schéma d'un gel physique

1.3.3.3 Transition sol-gel et sa manifestation

D'un point de vue général, les gels résultent de l'agrégation, au moins partielle, de particules solides dispersées dans un liquide. Ce maillage peut être constitué de molécules très petites ou de macromolécules, mais aussi dans certains

cas de dispersions de particules minérales. D'un point de vue rhéologique, cette transition sol-gel se traduit d'abord par l'apparition d'une très forte viscosité, puis, au delà d'un point critique (P_c), par un module élastique (figure 1.7).

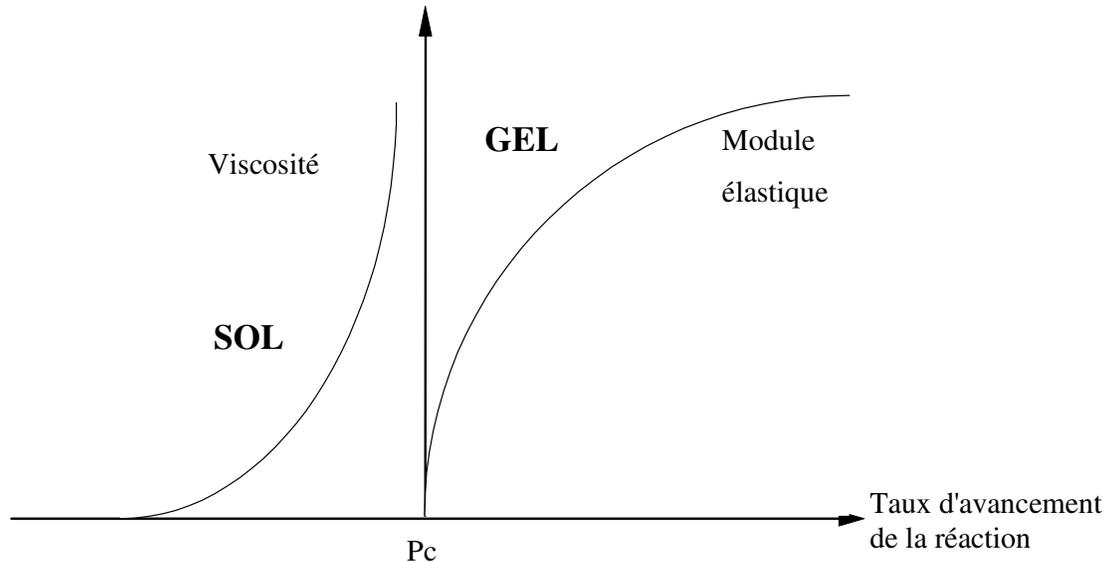


Figure 1.7 : Changement de propriétés au cours de la transition sol-gel

Le taux d'avancement de la réaction p ou taux de liaisons formées est le paramètre qui permet de caractériser l'état d'un système au cours de son évolution. L'apparition d'une fraction gel (de masse et de taille infinie) va se traduire, au dessus de P_c , taux critique d'avancement de la réaction, par la divergence des différents moments de la distribution en masse et en taille des polymères à l'exception de la masse molaire moyenne en nombre qui reste finie.

Les propriétés mécaniques macroscopiques d'un système au cours de la gélification dépendent fortement du degré d'avancement de la réaction.

1.3.4 Le κ -carraghénane à l'état ordonné

La présence de structures hélicoïdales dans les gels de ι et κ -carraghénane a été mise en évidence par des expériences de diffraction des rayons X [30-32].

1.3.4.1 Influence des ions

Les polyosides sont des polyélectrolytes anioniques de par la présence d'ions sulfates dans la chaîne. Contrairement aux électrolytes simples, dont les propriétés

sont bien modélisées à partir de lois idéales lorsque la concentration est faible, la dilution des solutions de polyélectrolytes provoque une forte perturbation des propriétés du système. Le κ -carraghénane est commercialisé la plupart du temps sous forme de sel de potassium. Lorsqu'il est mis en solution, les contre ions se dissocient mais pas dans leur totalité. Rochas a montré que la proportion d'ions libres en solution est de l'ordre de 50% [33].

Les conformations étendues sont favorisées par des densités de charge élevées. Les chaînes chargées peuvent adopter localement une forme de bâtonnets plus ou moins rigides en fonction de leur structure primaire. Une variation du pH, de la température ou de la qualité du solvant peut induire ce changement de conformation.

Les effets de la concentration en poly-ions, de la valence des contre-ions, de la concentration en sel et du pH ont été étudiés par polarimétrie et analysés à l'aide du modèle de la cellule de Poisson-Boltzmann par Nilsson et son équipe [34].

La facilité à solubiliser un carraghénane et la qualité du gel obtenu est fonction du type et de la concentration des ions présents dans la solution. Il semblerait que la taille du cation compensateur influence notablement la stabilité de la conformation de la molécule et la gélification [35].

En présence d'ions potassium, les gels de carraghénanes sont en effet très stables même à température élevée. En revanche, dans les mêmes conditions de température et de concentration en sel et en polymère, si on utilise les ions sodium ou lithium, on n'obtient pas de gel.

En utilisant la polarimétrie, Rochas a déterminé les températures de transition pelote-hélice (T_m) du κ -carraghénane en faisant varier la concentration et la nature des sels [36]. Ceci lui a permis d'établir une classification des ions monovalents rendant compte de la stabilité de la conformation hélicoïdale.

Par ordre de stabilité décroissante il obtient : $Rb^+ \geq Cs^+ \geq K^+ > NH_4^+ > N(CH_3)_4^+$
 $> Na^+ \geq Li^+$

Avec les ions bivalents, cette sélectivité ionique est moins marquée. En plus de leur taille, il faut sans doute aussi tenir compte des pontages ioniques intermoléculaires. Néanmoins, toujours par mesure de T_m , Rochas propose une classification : $Ba^{2+} \geq$

$\text{Ca}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+} \geq \text{Mg}^{2+} \geq \text{Zn}^{2+} \geq \text{Co}^{2+}$. Ainsi, il obtient le diagramme de phase suivant, figure 1.8 :

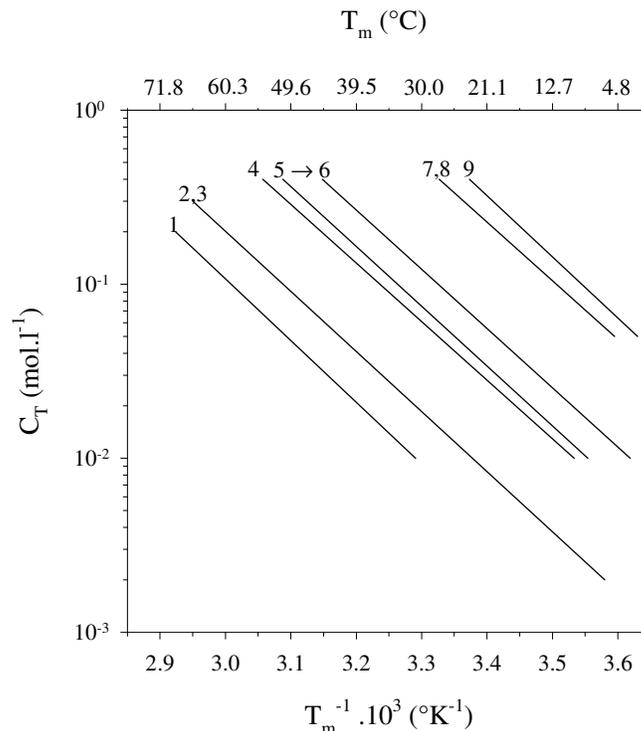


Figure 1.8 : T_m (obtenue par refroidissement) en fonction de la concentration totale C_T en ions libres. 1 → 4 : Rb^+ , K^+ , Cs^+ , NH_4^+ 5 → 6 : Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} 7 → 9 : Na^+ , $\text{N}^+(\text{CH}_3)_4$, Li^+

1.3.4.2 Les mécanismes de gélification

De nombreuses études ont été effectuées sur le mécanisme de gélification des carraghénanes et plusieurs modèles basés sur l'hélicité du polymère ont été proposés dès 1969.

A partir de la mesure du pouvoir rotatoire et de l'analyse de clichés de rayons X, Rees propose un premier modèle basé sur le changement de conformation des carraghénanes [26]. Il montre alors que le polymère, à l'état ordonné, adopte une conformation de double hélice. Les zones de jonction du gel sont formées par l'agrégation de ces doubles hélices et la formation du réseau tridimensionnel est rendu possible grâce à la présence d'irrégularités de la structure primaire. Ceci entraîne l'apparition de "coudes" qui limite la formation des segments hélicoïdaux en plusieurs points de la chaîne. Ainsi, chaque chaîne pourrait former plusieurs doubles

hélices avec différentes chaînes, ce qui permettrait la formation du réseau (figure 1.9).

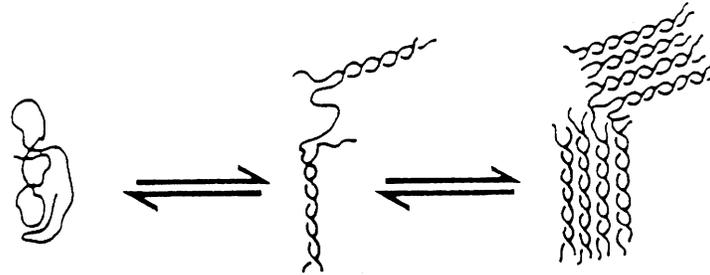


Figure 1.9 : Modèle de gélification selon Rees

Si ces irrégularités sont supprimées, on observe une perte du pouvoir gélifiant et la diffusion de la lumière met en évidence une dimérisation des chaînes au refroidissement. Ainsi, l'absence de défauts de la structure hélicoïdale limite la possibilité pour les chaînes de former des jonctions avec plusieurs partenaires [37].

Plus récemment, pour expliquer l'agrégation des domaines de doubles hélices, Morris a mis en évidence la possibilité de jonctions ioniques avec le potassium [37] (figure 1.10).

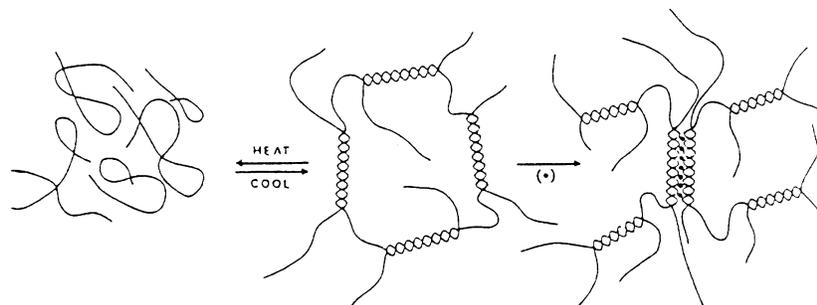


Figure 1.10 : Modèle de gélification selon Morris

Smidsrød propose lui aussi un modèle basé sur une transition en structure ordonnée mais par contre, il suppose des jonctions spécifiques entre monochaines ordonnées (simples hélices) par pont potassium [38] (figure 1.11).

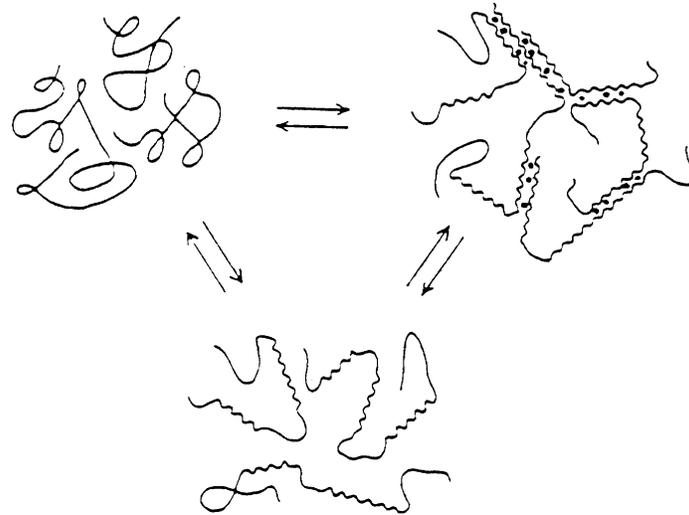


Figure 1.11 : Modèle de gélification selon Smidsrod

A partir de résultats obtenus par mesures conductimétriques, potentiométriques et calorimétriques, Rochas et son équipe proposent un modèle où l'unité de base est un dimère d'hélices [33, 39-40]. Les dimères d'hélices s'associent en agrégats qui sont ensuite pontés par des liaisons faibles inter-agrégats. Ces différentes étapes sont régies par les facteurs temps, température, concentration en polymère et en électrolyte et nature des contre ions (Figure 1.12).

Dans son modèle, C_T est la concentration ionique totale (polymère + sel), T la température et t le temps.

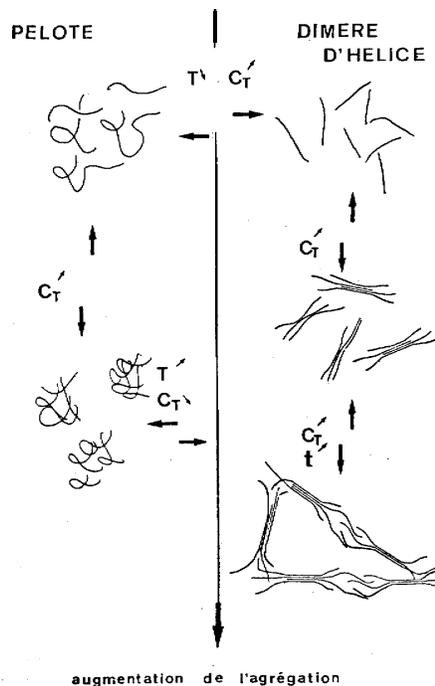


Figure 1.12 : Modèle de gélification selon Rochas

Finalement, quel que soit le modèle proposé, on peut remarquer que les différents auteurs sont d'accord sur la conformation hélicoïdale (simple, double ou dimère d'hélices) adoptée par les macromolécules à l'état ordonné. C'est plus au niveau des mécanismes d'agrégation et de formation du réseau macromoléculaire que les avis divergent.

Rochas a établi un diagramme de phases (figure 1.13) mettant en évidence l'existence de plusieurs domaines dans lesquels le κ -carraghénane va adopter différentes conformations [41]. Ce diagramme, retenu par la plupart des auteurs, est basé sur la détermination des températures de transition pelote-hélice (T_m) par polarimétrie et la caractérisation des échantillons dans les différents domaines.

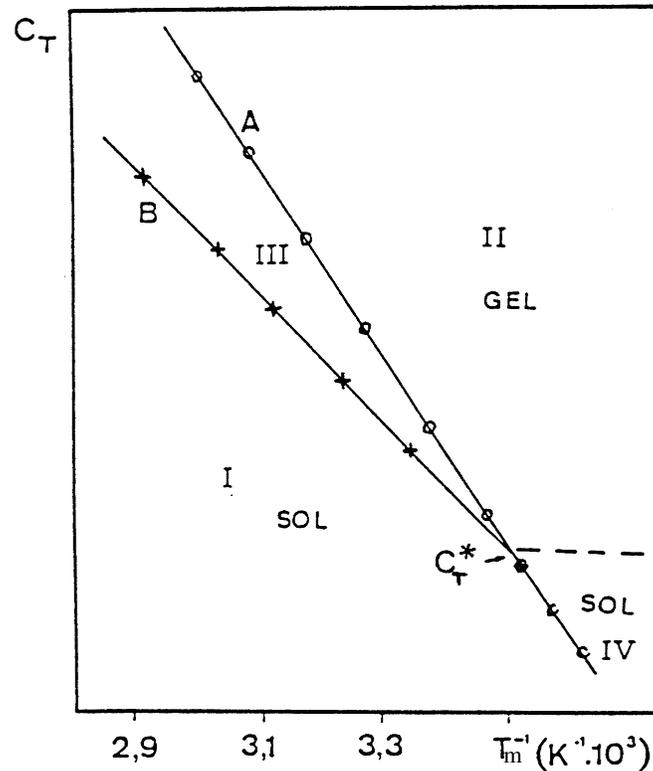


Figure 1.13 : Variation de T_m^{-1} en fonction de C_T , la concentration totale en ions K^+
(+) chauffage et (o) refroidissement

- ❖ Dans la région I, où $T > T_m$, le κ -carraghénane adopte une conformation non ordonnée (pelotes macromoléculaires : état sol).
- ❖ Dans la région II, où $C_T > C_T^*$ et $T < T_m$, le κ -carraghénane a une conformation ordonnée (hélice : état gel). Ces hélices sont agrégées et la transition conformationnelle présente alors une hystérésis.
- ❖ La région III est en réalité l'intersection des domaines I (chauffage) et II (refroidissement). Elle correspond à l'hystérésis (écart entre les températures de transition au chauffage et au refroidissement).
- ❖ Dans la région IV, $C_T < C_T^*$ et $T < T_m$, le κ -carraghénane présente une conformation ordonnée (dimères d'hélices) tout en étant à l'état sol. Dans

cette région il existe des dimères d'hélices non agrégés et la transition conformationnelle se fait sans hystérésis.

1.3.5 Propriétés macroscopiques des gels

La rhéologie permet de mettre en œuvre un ensemble de techniques d'accès direct aux propriétés mécaniques globales des gels. Elle est particulièrement adaptée à l'étude de la transition sol-gel au niveau supramoléculaire, notamment grâce aux techniques dynamiques non destructives à faibles contraintes ou déformations imposées.

Plusieurs auteurs ont essayé de relier leurs résultats de rhéologie à la structure des agrégats formés. Ainsi, par mesure du signal de biréfringence électrique, Ueda a pu mettre en évidence la présence, dans les gels de κ -carraghénane, de segments anisotropiques (bâtonnets rigides) qui s'orientent sous cisaillement [42]. En utilisant des techniques de microscopies, d'autres équipes ont également corrélé leurs mesures mécaniques à la structure locale des agrégats formés [43].

1.3.5.1 Effet du temps et de la température

En se référant aux résultats de Hermansson, on peut voir que le facteur temps important. En effet, en mesurant l'évolution de G' au cours du temps d'une solution de κ -carraghénane à 10g/l dans 0.1M KCl, l'auteur constate que la phase d'augmentation rapide de G' est suivie par une augmentation lente et continue pendant tout le reste de la mesure. De plus, en utilisant des rampes de refroidissement différentes, elle constate que le G' final peut varier de plus d'un facteur de quatre [44].

CHAPITRE2

MELANGES CASEINES/POLYSACCHARIDES EN SOLUTION

2.1 Introduction

Les solutions de biopolymères couvrent un très large spectre d'utilisation. La description de tels systèmes, repose sur trois termes essentiels qui sont la solubilité, la conformation et les interactions qui peuvent leur donner une structure macroscopique.

Les intractions entre biopolymères ont des effets très importants sur la stabilité et sur la texture des produits. Ils peuvent déterminer les propriétés rhéologiques et l'aspect du produit, aussi bien que son instabilité physique. Beaucoup de facteurs, tels que la concentration en protéine, en polysaccharide, la température, la vitesse de cisaillement, la force ionique peuvent induire de grosses interactions entre les particules et affecter la stabilité des systèmes colloïdaux alimentaires.

En effet, la catégorie de biopolymères considérée dans ce chapitre est basée essentiellement sur les protéines, et les polysaccharides qui sous certaines conditions physico-chimiques, vont interagir mutuellement en solution aqueuse [45].

2.2 Intérazions moléculaires

Les interactions impliquées entre les molécules modifient leur comportement en solution. La force, la spécificité ainsi que la nature attractive ou répulsive des interactions sont variables. Les interactions moléculaires peuvent être classées de par leur nature covalente, électrostatique, due à des forces de van der Waals ou encore à des répulsions stériques [46]. Les interactions répulsives sont non spécifiques et proviennent de répulsions stériques ou d'interactions électrostatiques. Les interactions attractives peuvent être faibles ou fortes, spécifiques ou non spécifiques. Les liaisons covalentes sont spécifiques contrairement aux interactions électrostatiques, aux forces de van der Waals et aux interactions hydrophobes. Les interactions entre les molécules sont souvent exprimées sous la forme d'énergie potentielle [47]. L'énergie potentielle entre deux molécules dépend de leur position relative. La force nécessaire pour séparer deux molécules sphériques simples d'une

distance intermoléculaire r vers l'infini peut être exprimée par la différence d'énergie potentielle impliquée en fonction de la distance intermoléculaire .

$$F = - \frac{\partial \Gamma}{\partial r} \quad 2.1$$

Où F est la force (N), Γ est l'énergie potentielle et r la distance intermoléculaire (m).

Ainsi, plus les molécules sont éloignées, plus la force nécessaire à leur séparation est faible. La valeur négative d'énergie potentielle correspond au travail qui doit être effectué pour séparer ces deux molécules.

2.2.1 Liens covalents

Le lien covalent est permanent et spécifique. Il implique le partage d'électrons entre deux ou plusieurs atomes. Le lien covalent est court, entre 0,1 et 0,2 nm, et son énergie potentielle se situe entre 200 et 800 kJ·mol⁻¹ [48].

2.2.2 Interactions électrostatiques intermoleculaires

La connaissance de la polarisabilité et du moment dipolaire permanent d'une molécule, permet d'évaluer les interactions intermoléculaires. Comme ces interactions conditionnent un certain nombre de propriétés physiques couramment utilisées, pour la caractérisation des systèmes protéine- polysaccharides, il est nécessaire de rappeler l'origine de ces interactions.

2.2.3 Interactions d'orientation (Keesom)

Ces interactions sont dues, aux forces d'attraction entre dipôles électriques permanents, et conduisent à une énergie d'attraction (E) donnée par la relation (2.2), où μ_1 et μ_2 représentent les moments dipolaires des deux molécules [49]

$$E = - \frac{2 \mu_1^2 \mu_2^2}{3 L^6 K T} \quad (2.2)$$

Où L représente la distance entre les 2 dipôles, E , l'énergie, K , la constante de Boltzmann et T représente la température absolue.

2.2.4 Interactions d'induction (Debye)

Une molécule polarisable (de polarisabilité α_1), peut acquérir un dipôle induit sous l'influence d'une deuxième molécule de moment dipolaire (μ_2), ce qui conduit à une énergie d'attraction E , décrite par l'équation (2.3)

$$E = - \frac{\alpha_1 \mu_2^2 + \alpha_2 \mu_1^2}{L^6} \quad (2.3)$$

Où α_1 est la polarisabilité de la molécule 1, α_2 , la polarisabilité de la molécule 2, μ_2 , le moment dipolaire induit de la molécule 2, μ_1 , le moment dipolaire de la molécule 1 et L représente la distance entre les deux dipôles.

2.2.5 Répulsions stériques

Lorsque deux atomes sont proches l'un de l'autre, le recouvrement des nuages d'électrons crée une force répulsive les empêchant de s'approcher davantage. Cette force répulsive croît lorsque la distance entre les atomes devient inférieure à leur rayon. Les forces impliquées entre des molécules non sphériques dépendent aussi de leur orientation relative [48]. Par exemple, une molécule linéaire aura un point d'ébullition plus élevé qu'une molécule semblable mais ramifiée. Les ramifications diminuent les interactions intermoléculaires en empêchant l'alignement des molécules. De ce fait, l'énergie cinétique nécessaire à un changement de phases est moindre.

2.2.6 Interactions hydrophobes

Lorsque des molécules non polaires sont introduites dans un milieu aqueux, les molécules d'eau se réarrangent de manière à former des structures tétraédriques maintenues par des ponts hydrogènes polaires. En maximisant le nombre de ponts hydrogène, l'eau isole les molécules non polaires. Les interactions hydrophobes sont en fait des forces indirectes qui favorisent le regroupement des molécules non polaires suite à des interactions entre des molécules polaires. Les différents types d'interactions décrites dans cette section sont impliquées en proportions diverses dans les systèmes ternaires protéine/polysaccharide/eau [50].

2.2.7 Mouvement thermique brownien

Généralement dans les suspensions de macromolécules et de particules, le mouvement brownien a toujours lieu à des températures supérieures à 0 °K, où toutes les particules ou molécules grandes ou petites, sont dotées d'une énergie libre du mouvement brownien.

2.3 Aspect thermodynamique des solutions de biopolymères

2.3.1 Solutions de biopolymères

La thermodynamique statistique est un puissant outil pour la description de telles solutions, et cela en se basant sur le calcul des grandeurs de mélange. La première loi de la thermodynamique démontre que l'énergie d'un système est conservée sous une forme ou une autre et ce peu importe les réactions impliquées. La deuxième loi de la thermodynamique exprime la tendance d'un système vers une augmentation d'entropie. L'énergie libre de Gibbs (G) est une équation d'état qui met en relation les deux premières lois de la thermodynamique lorsqu'une réaction se produit à température et pression constantes. L'énergie molaire libre de Gibbs correspond au potentiel chimique pour les substances pures et les gaz parfaits. Lorsque la température et le volume d'un système sont constants, l'énergie de Gibbs peut être remplacée par l'énergie libre de Helmholtz (A) [50].

L'énergie libre de Gibbs est la propriété thermodynamique la plus utilisée lors de l'étude de la stabilité de solutions composées de solvants et de solutés de nature alimentaire. La loi de Raoult est la première approche empirique développée pour des solutions simplifiées. Ces solutions dites idéales doivent avoir une enthalpie de mélange nulle. Elles doivent être composées d'un solvant et d'un soluté ayant des molécules de même taille. Le volume total des solutions doit être égal à la somme des volumes individuels des composés.

A cet effet, le calcul de ces grandeurs thermodynamique nous permet de classer les solutions de biopolymères qu'on rencontre souvent comme suit :

- Solution idéale : Elle se caractérise par un $\Delta H_m = 0$ et $\Delta S_m = \Delta S_c$, où le terme ΔS_c représente l'entropie conformationnelle du biopolymère. C'est le cas idéal d'une solution de biopolymère où l'entropie de mélange (ΔS_m) est égale à l'entropie conformationnelle (ΔS_c).

- Solution athermique : Dans ce cas, on a l'enthalpie de mélange nulle d'une part, et d'autre part l'entropie de mélange est supérieure à l'entropie conformationnelle. Cet écart est du à l'existence d'un terme d'excès qui traduit les interactions entre les deux biopolymères $\Delta H_m = 0$ et $\Delta S_m > \Delta S_c$.
- Solution régulière : Dans ce cas, l'enthalpie de mélange n'est pas nulle, mais l'entropie de mélange est égale à l'entropie conformationnelle ($\Delta H_m \neq 0$ et $\Delta S_m = \Delta S_c$).
- Solution réelle : Dans ce cas on a $\Delta H_m \neq 0$ et ΔS_m contient un autre terme d'excès qui ne traduit par le terme conformationnel, ce terme d'excès traduit les interactions entre les biopolymères .

2.3.2 Incompatibilité et compatibilité thermodynamique

Lorsqu'une protéine et un polysaccharide anionique sont dans une même solution, trois types de comportement peuvent être observés (Figure 2.1). Premièrement, les deux polymères peuvent être en deux phases distinctes sans interagir, où chacune des phases est enrichie en l'un ou l'autre des polymères. Cet état, appelé incompatibilité thermodynamique ou séparation de phases ségrégative, existe lorsque les interactions entre polymères d'une même nature sont favorisées au détriment de celles entre polymères de natures différentes. L'incompatibilité dépend des charges relatives sur chaque polymère, du pH, de la flexibilité des chaînes du polysaccharide, du poids moléculaire des polymères, de la concentration en sels ainsi que de la concentration en solides totaux [51].

Le deuxième cas, rarement observé, se produit lorsque les macromolécules forment un mélange homogène spontané sans interagir. Cet état de co-solubilité est en constante compétition avec celui d'incompatibilité thermodynamique. Plus l'écart entre les poids moléculaires des macromolécules augmente, plus le déséquilibre entre les forces attractives et répulsives s'accroît, et plus il y a de risques de voir une incompatibilité entre les polymères. Seuls quelques exemples de co-solubilité ont été rapportés dans la littérature, dont le cas de l'albumine de sérum bovin (BSA) et de la pectine [52], ce système est stable de pH 3 à 8 et de 0,1 à 1,0 M de NaCl, et devient instable en présence de 6 M d'urée. Les deux polymères sont maintenus non

seulement par des interactions électrostatiques, mais aussi par des liaisons hydrogène.

Troisièmement, il peut y avoir présence de deux phases où les polymères de charges opposées se retrouvent principalement dans la même phase. Cette compatibilité thermodynamique, ou séparation de phases associative, est caractérisée par la formation d'un complexe protéine/polysaccharide, aussi appelé coacervat, maintenu majoritairement par des interactions électrostatiques. Dans ce cas, les polysaccharides s'adsorbent sur les surfaces des protéines. Si la quantité de polymère n'est pas assez grande pour couvrir complètement la protéine, un polysaccharide peut s'adsorber sur plus d'une protéine extérieure, liant de ce fait deux particules ou plus de protéines. Un tel processus s'appelle également le coacervation complexe [53]. C'est un phénomène qui se produit souvent dans le mélange de biopolymères dans lesquels, ces derniers ont des charges opposées.

En résumé, les polysaccharides adsorbés sur les protéines induisent des attractions efficaces entre les protéines et les particules colloïdales. L'attraction entre les protéines induites par les polysaccharides non-adsorbés conduisent à une séparation de phases. Les interactions entre polysaccharides et protéines ont fait l'objet d'études visant à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la formation de complexes et leurs applications possibles.

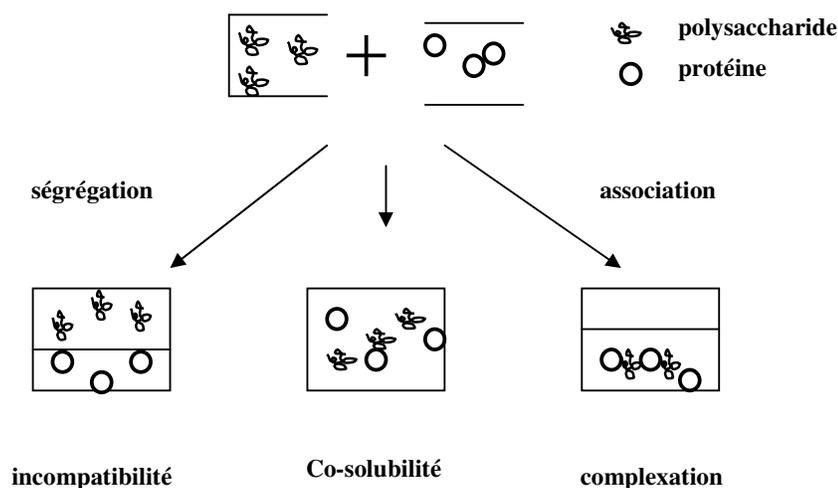


Figure 2.1 : Comportement d'un mélange de protéine et de polysaccharide

2.3.3 Formation de complexes protéines/polysaccharides

La formation de complexes entre une protéine et un polysaccharide est un cas particulier des interactions macromoléculaires en solution. Les interactions impliquées entre ces biopolymères peuvent être répulsives et non spécifiques et provenir de l'effet d'interactions électrostatiques et/ou de volume exclu. Le volume exclu désigne la diminution de l'espace occupé dans la solution par l'un et l'autre des polymères et ce, lorsque les interactions entre les molécules de même nature sont favorisées au dépend des interactions entre des molécules différentes. Il peut y avoir une interaction électrostatique entre des macromolécules d'une charge nette de même signe par l'intermédiaire de zones portant des charges de signe opposé [54].

Bien que les interactions électrostatiques soient majoritaires lors de la formation des complexes [55], des forces d'autres natures sont impliquées dans certains systèmes. Par exemple, la formation de complexes pectine/gélatine à un pH supérieur au pI de la protéine et à une force ionique supérieure 0,2 pouvait s'expliquer uniquement par la présence d'interactions électrostatiques. En fait, la présence d'une température critique de miscibilité (20°C) du système gélatine/pectine a permis de détecter la présence de liens hydrogène, favorisés à basse température [56]. D'autre part, le traitement thermique des complexes protéine/polysaccharide a permis d'améliorer leur stabilité lors de la variation du pH ou de la force ionique, et cette amélioration a été associée à des interactions hydrophobes. Les observations effectuées dans le cadre de telles études restent à confirmer par la caractérisation des interactions protéine/polysaccharide impliquées.

2.3.4 Facteurs influençant la nature des complexes

2.3.4.1 Charge des macromolécules

La formation de complexes est influencée majoritairement par la nature et la densité des charges présentes sur les deux macromolécules. Une faible densité de charges inhibe la formation des complexes, alors qu'une forte densité peut induire une précipitation ou une gélification. La charge résiduelle nette influence la solubilité des complexes obtenus. Les complexes sont solubles lorsque la charge d'une des macromolécules en excès permet d'interagir avec le solvant. Les complexes sont

insolubles lorsque les charges des macromolécules sont égales et opposées; ils peuvent être solubilisés par un titrage acide, effectué à faible force ionique [57].

2.3.4.2 Le pH

Le pH agit sur la charge des complexes en influençant le degré d'ionisation des groupes amines et carboxyliques. Une forte concentration en sels inhibe la formation de complexes en créant un effet d'écran électrostatique. De même, une force ionique insuffisante inhibe la complexation. En effet, la forte charge portée par les macromolécules induit une modification de leur configuration de manière à favoriser la formation d'agrégats et ce, au détriment des complexes. Le ratio protéine/polysaccharide est un troisième facteur influençant la charge nette et les propriétés du complexe obtenu. Ce ratio est le facteur ayant le plus d'influence sur la solubilité des complexes [58].

2.3.4.3 Nature du polysaccharide

Les polysaccharides anioniques n'ont pas tous le même degré de compatibilité avec les protéines. Les polysaccharides sulfatés se lient plus fortement à une protéine au dessus de son point isoélectrique, que les polysaccharides carboxylés. Ceci s'explique par la force de l'interaction entre les groupes OSO_3^- et NH_3^+ qui permet la formation de complexes même lorsque la protéine et le polysaccharide sont tous deux chargés négativement. Les polysaccharides qui possèdent des groupes carboxylés ne complexent pas les protéines globulaires à une force ionique supérieure à 0,2, ou encore à des valeurs de pH largement supérieures au point isoélectrique des protéines. L'action de ces polysaccharides se caractérise principalement par la diminution des interactions protéine/protéine[58].

Poids moléculaire

Lorsque les interactions électrostatiques entre protéine et polysaccharide sont très fortes, l'effet du poids moléculaire du polysaccharide sur la quantité de protéines complexées est négligeable [59]. Lorsque ces interactions sont faibles, un polysaccharide de poids moléculaire élevé complexe une plus grande quantité de protéines; le plus grand espace occupé dans la solution favorise alors le contact avec la protéine. Les protéines d'un grand poids moléculaire ont tendance à former des gels ou des précipités plutôt que des complexes. Les molécules de faible poids

moléculaire interagissent par appariement ionique, plutôt que par complexation, conduisant à la formation d'agrégats moléculaires[60].

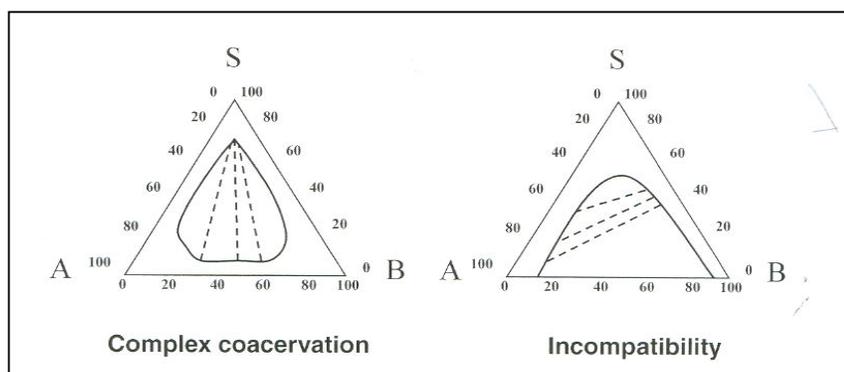
Influence du milieu sur la structure

La température influence la formation de complexes en favorisant les interactions hydrophobes et covalentes à haute température et les liens hydrogène à basse température. L'application d'une pression hydrostatique facilite aussi la formation de complexes. En effet, ce traitement mène à la dénaturation partielle des protéines et permet l'exposition de sites réactifs, initialement enfouis dans la molécule [61]. Dans le cas des hautes pressions dynamiques, elles réduisent la taille des complexes par l'action de forces de turbulence, de cavitation et de cisaillement. La durée d'un traitement de cisaillement influence également la taille des complexes. Plus il est long, plus les probabilités de collisions augmentent et plus les complexes auront une grande taille [61].

2.4 Diagramme des phases pour un mélange protéine/polysaccharide

Le mélange de protéine-polysaccharide dans des conditions physico-chimiques bien déterminées (pH, Force ionique, concentration, pression, température) conduira à deux types de séparation de phases qui peuvent être schématisées par le diagramme de phases pseudo-ternaire décrit par la figure 2.2.

La séparation de phases due à l'incompatibilité thermodynamique est reliée directement à l'entropie du mélange (ΔS_m) qui est elle-même reliée à la minimisation de l'énergie libre de mélange ΔG_m . La mise en évidence d'un telle mélange peut être décrit par un diagramme de phase pseudo- ternaire qui est illustré dans la figure 2.3.



(1)

(2)

Figure 2.2 : Diagramme des phases d'un système pseudo- Ternaire Protéine/Polysaccharide/Eau [62]. A, B: biopolymère A, B: biopolymère B
 (1): séparation de phases associative par complexation.
 (2): séparation de phases due à l'incompatibilité thermodynamique.

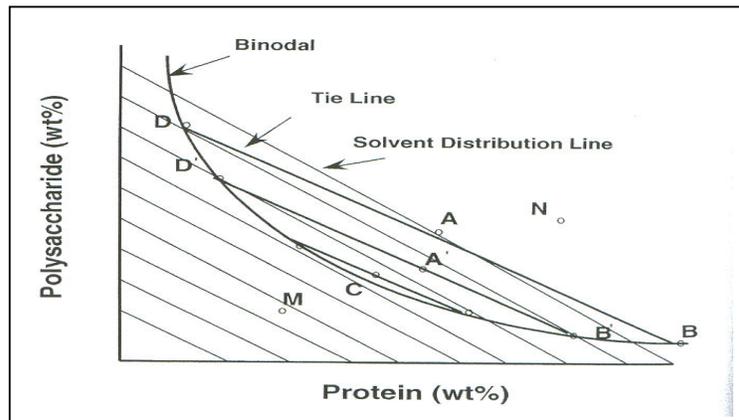


Figure 2.3. Illustration schématique pour un système pseudo ternaire Protéine/polysaccharide/eau [62].

La ligne binodale (co-solubilité) limite les deux phases ; au dessous de cette ligne, on a un système à une seule phase. Un mélange de deux solutions aqueuses de protéine et de polysaccharide peut former une seule phase ou se sépare en deux phases, quand on a une séparation de phases à une certaine composition des deux biopolymères (point A), l'association de la ligne de conjugaison (DB, tie line) donne la composition des deux phases séparées. La composition de chaque phase après l'équilibre correspond au pourcentage massique de la protéine et du polysaccharide au point D et B [62].

2.5 Phénomènes et mécanismes de floculation par déplétion

Pour les mélanges de biopolymères, la séparation de phases ségrégative conduit à une réduction de la concentration d'un biopolymère. Cette réduction de la concentration à l'interface est due à une perte de l'entropie conformation (ΔS_c), dite « la déplétion » [62].

Dans ce cas, l'agrégation des particules est causée par l'exclusion des macromolécules de la protéine entre l'espace des particules du polysaccharide, et

résultant alors à une différence de concentration entre les régions interparticules et les régions extérieures qui les entourent [63] et par conséquent la pression osmotique de la région extérieure devient grande comparée à celle des régions interparticules. A cet effet, une force attractive supplémentaire s'ajoute entre les particules qui favorise d'une manière remarquable la floculation, notons que cette force d'attraction entre les particules dépend nettement de la taille, de la forme et de la concentration du biopolymère et des particules. Une illustration schématique du phénomène est détaillée dans la figure 2.4.

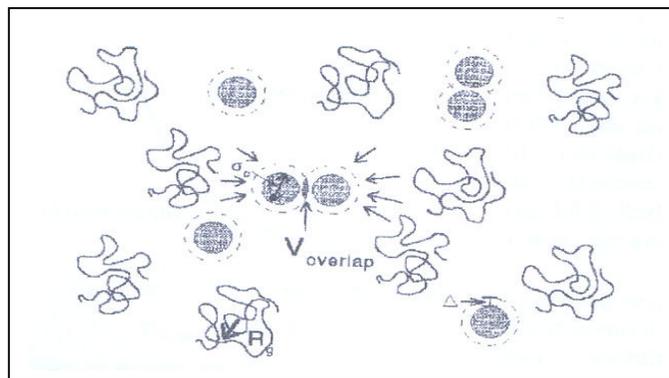


Figure 2.4 : Représentation schématique du phénomène de déplétion entre polysaccharide et une protéine, R_g : rayon de giration du polysaccharide ; σ diamètre de la protéine [63].

2.6 Interactions caséine ou caséinate / polysaccharide en solution aqueuse

Les interactions biopolymère/protéine ont fait l'objet de plusieurs travaux dont certains concluants et d'autres ont postulé des hypothèses qu'il faut toujours développer. Ces études sur les interactions dans les systèmes de biopolymères ont été réalisées avec différentes méthodes physico-chimiques de caractérisation des interactions.

2.6.1 Etat bibliographique sur les solutions contenant les caséinates et le xanthane

Rare sont les auteurs qui ont utilisé le mélange de ces deux biopolymères en solution. Nash et al. [14] ont étudié le mélange de ces deux constituants en solution, par diffusion dynamique de la lumière (DLS). A pH=7 et en présence de 0.1M de NaCl, ils ont montré que la distribution des temps de relaxation est bimodale

et que cette distribution ne dépendait pas de la concentration totale des deux biopolymères, vu que les temps de relaxation trouvés dans le mélange correspondait aux temps de relaxation du caséinate et du xanthane individuellement. En conclusion, les auteurs ont démontré par utilisation de la DLS qu'il n'existe pas d'interactions ségrégatives ou associative entre le caseinate de sodium et le xanthane dans la marge des concentrations considérées.

Hemar et al. [64] ont fait une étude viscosimétrique et microscopique sur plusieurs protéines mélangées avec le xanthane, notamment les caséinates de sodium. Par utilisation de la microscopie confocale et pour visualiser la microstructure et le comportement de phases des mélanges en solution aqueuse, les auteurs ont montré que pour une concentration supérieure 0.5% en xanthane, on obtient une séparation de phase microscopique. Cette microséparation n'a pas été accompagnée d'une augmentation de la viscosité. Aussi, les auteurs ont déduit que le mécanisme de floculation par déplétion n'était pas responsable de la séparation de phase et que l'incompatibilité thermodynamique peut être la cause de cette séparation.

Ainsi, la lumière du manque bibliographique avéré sur l'étude du mélange de caséinate de sodium et du xanthane en solution, nous nous sommes proposés à mettre notre contribution à la détermination du diagramme de phase du mélange, en s'appuyant sur une approche rhéologique et zetamétrique et en utilisant la méthodologie de la planification expérimentale.

2.6.2 Etat bibliographique sur les solutions contenant les caséinates et le κ -carraghénane

Vue l'importance de l'application industrielle du carraghénane dans l'amélioration de la texture du lait (crème dessert, glace, yaourt, fromage, camembert,...), la plupart des auteurs se sont intéressés plutôt à l'étude du mélange de la protéine de caséine ou micelle de caséine avec le κ -carraghénane [65-77].

Ainsi, peu nombreux sont les auteurs qui se sont penchés sur l'étude du mélange NaCN-k-carraghénane en solution.

Hemar et ses collaborateurs [75] se sont intéressés, à l'étude du comportement de phases, par microscopie confocale, et de la rhéologie du système Na-Cn/ κ -carraghénane. Il est à constater que dans ce travail, la protéine n'a pas été purifiée de sa phase lipidique et que le polysaccharide n'a pas été dépourvu de ses gros agrégats après dissolution. Aussi, les auteurs ont remarqué qu'en absence de κ -carraghénane, une solution à 2.5 % massique de Na-CN, paraît, par microscopie confocale, homogène (figure 2.5 A, [75]). Les images, associées à l'addition de 0.5 % (B), 1 % (C) et 2 % (D), montre des régions blanches riches en Na-CN et des régions foncées riches en κ -carraghénane. En parallèle à cette étude, Hemar et al. ont mesuré le module viscoélastique G' des solutions de mélange et ont remarqué que l'augmentation de κ -carraghénane fait croître G' du gel. Ainsi, ils ont suggéré que les deux biopolymères développent des interactions nettes répulsives électrostatiques vue qu'ils sont pourvus d'une charge électrique négative au pH neutre. Aussi, ces auteurs proposent une interaction d'incompatibilité thermodynamique entre les deux espèces de polymère. Par ailleurs, il justifie l'accroissement du module élastique G' , par le fait qu'une quantité d'eau de la phase continue est emprisonnée dans les deux phases dispersées.

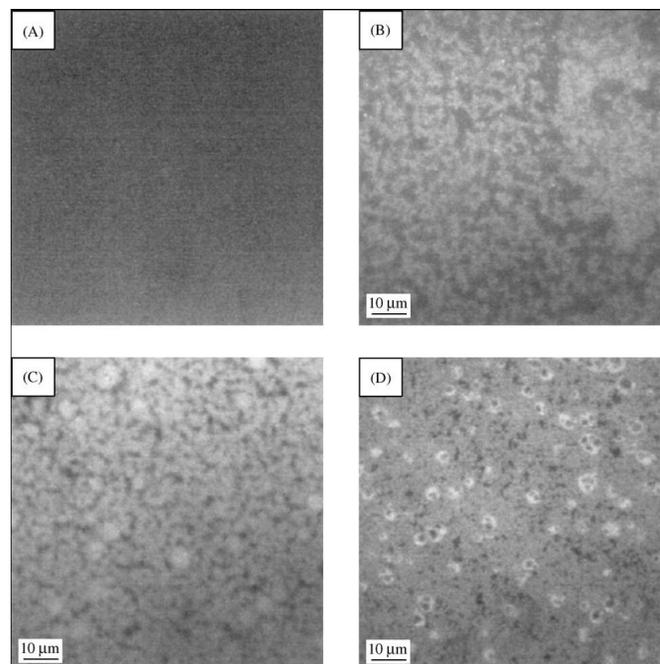


Figure 2.5 : Micrographe confocal du mélange de NaCN-k-carraghénane; (A) pas de k-carraghénane ; (B) 0.5 % k-carraghénane ; (C) 1 % k-carraghénane ; (D) 2 % k-carraghénane. La concentration du NaCn est de 2.5 % [75]

Oakenfull D et al. [76] se sont également intéressés à un gel obtenu à partir du mélange de caséinate de sodium et de κ -carraghénane. Ils ont utilisé la DSC et la rhéométrie pour rendre compte des propriétés physicochimiques du système.

Ces auteurs ont trouvé que durant le processus de gélification par abaissement de la température, NaCN a peu (ou pas) d'effet sur la température de transition pelote-hélice du κ -carraghénane. En revanche, pendant la fonte, l'addition du caséinate de sodium modifie fortement le comportement thermique du mélange. Le mécanisme de formation du gel proposé par les auteurs est le suivant : Lorsque la température de la solution du mélange est au-dessus de la température de transition conformationnelle pelote-hélice (étape A), les molécules du κ -carraghénane ont la conformation d'une pelote statistique. Une partie de ces molécules sont libres, dans la solution, et l'autre partie sont liées aux molécules de caséinate de sodium (figure 2.6) (étape B) par interaction électrostatique entre les sites cationiques du κ -caseine et les site anionique du κ -carraghénane [77]. Au-dessous de la température de transition (étape C), des hélices de κ -carraghénane se forment à partir des molécule libres et liées. Ainsi la gélation aura lieu par interaction attractive des hélices, comme dans le cas du κ -carraghénane seul en solution (étape D).

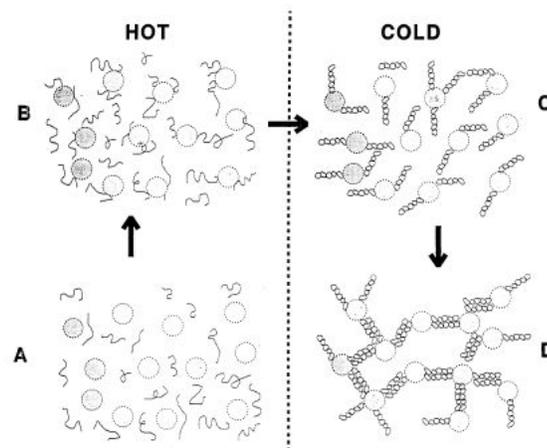


Figure 2.6 : Mécanisme de formation de gel, proposé en deux étapes par Oakenfull D et al. [76].

2.7 Conclusion

Ainsi, au vu de la rareté des travaux entrepris dans le cadre du mélange en solution du NaCN-xanthan et NaCN- κ -carracghénane, nous avons décidé

d'entreprendre une étude systématique sur ces deux mélanges afin de mettre notre contribution pour la compréhension des phénomènes mis en jeu à l'échelle microscopique et macroscopique.

Pour les mélanges NaCN-xanthan, nous avons déterminé le diagramme de phase du mélange, en s'appuyant sur une approche rhéologique et zetamétrique et en utilisant la méthodologie de la planification expérimentale.

En ce qui concerne les systèmes NaCN- κ -carracghénane, nous avons entrepris une étude sur ce mélange, en déterminant d'une part le diagramme de phase et ses modifications dans le temps. Nous avons également tenté de déterminer par diffusion de lumière en dynamique la taille des populations qui prennent naissance à l'issue du mélange et avons mesuré les températures de fonte et de gélation par rhéométrie.

CHAPITRE3 TECHNIQUES EXPERIMENTALES

3.1 Techniques de diffusion du rayonnement

La diffusion de la lumière par un échantillon permet d'accéder à des informations quantitatives tant du point de vue statique que dynamique, telles que la masse molaire, la taille, la structure, les interactions avec le milieu, la polymolécularité, la flexibilité, la mobilité,....

Il existe deux types d'interactions entre rayonnement et matière : l'absorption et la diffusion (figure 3.1). Le phénomène de diffusion peut avoir lieu sous trois formes différentes :

- La diffusion non-élastique où la radiation diffusée n'a pas la même longueur d'onde que la lumière incidente ($\lambda \neq \lambda_0$).
- La diffusion élastique où la lumière diffusée a la même longueur d'onde que la lumière incidente ($\lambda = \lambda_0$).
- La diffusion quasi-élastique où la radiation présente, par effet Doppler, une longueur d'onde différente de la source. L'amplitude de cette variation dépend de la vitesse et de la direction du mouvement de chaque particule individuelle.

Généralement, pour caractériser les polymères, trois types de radiation sont utilisés :

- les photons ou la lumière avec une longueur d'onde comprise entre 400 et 700nm
- les rayons X dont la longueur d'onde est proche de 0.1nm
- les neutrons dont la longueur d'onde est comprise entre 0.1 et 1nm

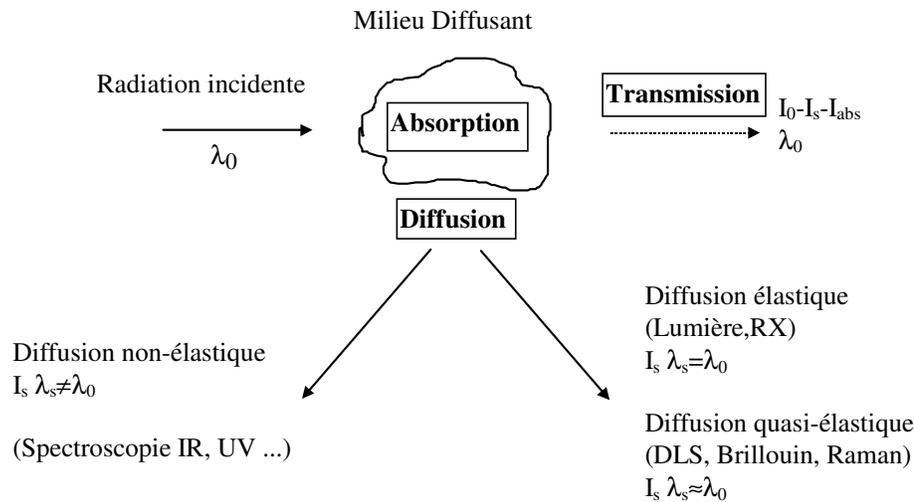


Figure 3.1 : Les différents types d'interactions entre le rayonnement et la matière

3.1.1 Diffusion statique quasi élastique de la lumière :SLS [78,79]

3.1.1.1 Théorie de la diffusion de la lumière statique : SLS

Pour caractériser nos systèmes, en l'occurrence, les solutions de caséinate de sodium et les solutions de mélange de caséinate Na et du κ -carraghénane, nous avons utilisé la diffusion de la lumière. Cette méthode d'analyse, non destructive, est particulièrement adaptée pour l'étude des solutions colloïdales et de leur processus d'agrégation. Elle permet d'accéder à des informations quantitatives sur la structure des systèmes telles que la masse molaire, la taille, la structure, la mobilité, la flexibilité des agrégats,...

La diffusion de lumière exige que les échantillons observés soient transparents pour éviter les phénomènes de diffusion multiple. Dans le cas des échantillons turbides, une autre technique spécifique peut être utilisée : la diffusion de la lumière par cross corrélation dynamique. Cette technique n'a pas été utilisée dans ce travail.

La figure 3.2 est un schéma simple du principe de diffusion de la lumière. L'onde transversale plane monochromatique va sonder un volume diffusant V milieu isotrope non absorbant qui contient un nombre suffisant d'unités de diffusion.

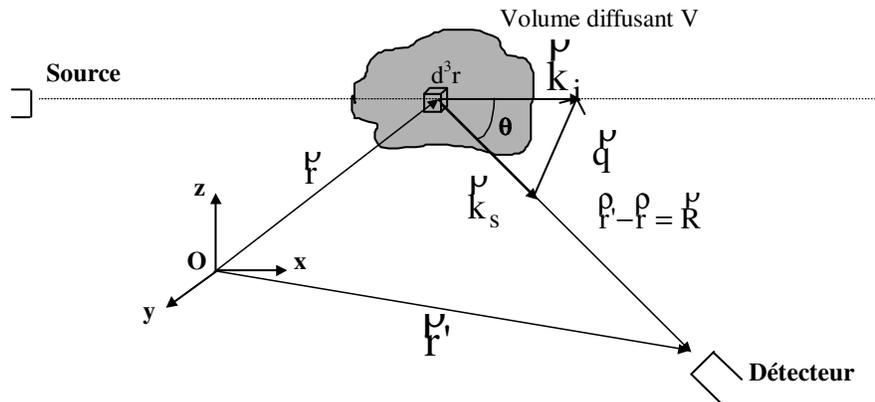


Figure 3.2 : Schéma simple du principe de diffusion de la lumière

Les radiations incidentes et diffusées sont caractérisées respectivement par les vecteurs d'onde \vec{k}_i et \vec{k}_s . On définit le vecteur de diffusion :

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_s, \text{ avec } q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin(\theta/2) \quad \text{avec } k_i = k_s = 2\pi/\lambda \text{ et } \lambda = \lambda_0/n \quad 3.1$$

où θ est l'angle d'observation, λ_0 la longueur d'onde de la source monochromatique dans le vide et n l'indice de réfraction du milieu.

Dans le cas d'un liquide pur, les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée proviennent essentiellement des fluctuations de densité et de température (souvent négligeables). Si on considère maintenant une solution, il faut ajouter des fluctuations de concentration. Pour des concentrations suffisamment faibles, les fluctuations de densité de la solution sont équivalentes à celle du solvant pur, l'excès d'intensité diffusée n'est alors dû qu'aux fluctuations de concentration.

L'intensité relative diffusée (I_r) par la solution est déterminée, en corrigeant l'intensité mesurée ($I_{\text{mesurée}}$) par l'intensité diffusée par le solvant (I_{sol}) et par l'intensité diffusée par une référence ($I_{\text{réf}}$), le ludox et le toluène dans notre étude :

$$I_r = \frac{I_{\text{mesurée}} - I_{\text{sol}}}{I_{\text{réf}}} = K \cdot C \cdot RT \cdot \left(\frac{\partial \pi}{\partial C} \right)^{-1} \cdot S(q) \quad 3.2$$

$$K = \frac{1}{N_a} \cdot \left(\frac{\partial b}{\partial C} \right)_\rho = \frac{4\pi^2 n^2}{\lambda^4 N_a} \cdot \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \cdot \left(\frac{n_{\text{réf}}}{n} \right)^2 \cdot \frac{1}{R_{\text{réf}}} \quad 3.3$$

avec :

- K : constante d'appareil correspond au pouvoir de diffusion ou contraste des particules
- b : longueur de diffusion de la particule
- N_a : nombre d'Avogadro
- C est la concentration de particules
- R est la constante des gaz parfaits
- T est la température absolue (K)
- $\frac{\partial \pi}{\partial C}$ est l'inverse de la compressibilité osmotique
- S(q) est le facteur de structure de la particule, combinaison des facteurs de structure inter (facteur de structure) et intramoléculaires (facteur de forme) des particules considérées
- n est l'indice de réfraction du milieu, proche de celui du solvant pour une solution diluée
- $n_{\text{réf}}$ est l'indice de réfraction de la référence
- $\frac{\partial n}{\partial C}$ est l'incrément d'indice de réfraction
- $R_{\text{réf}}$ est le rapport de Rayleigh de la référence (il est égal à $2.79 \cdot 10^{-5}$ à $\lambda = 532 \text{ nm}$ et à $1.02 \cdot 10^{-5}$ à $\lambda = 685 \text{ nm}$ pour le toluène)

Pour les systèmes dilués ($C \rightarrow 0$), l'inverse de la compressibilité osmotique $\frac{\partial \pi}{\partial C}$ peut être décrite sous la forme d'un développement du viriel :

$$\frac{\partial \pi}{\partial C} = RT \cdot \frac{1}{M_w} \cdot (1 + 2A_2 \cdot M_w \cdot C + K) \quad 3.4$$

où M_w est la masse molaire en poids et A_2 le second coefficient du viriel, significatif de l'écart à l'idéalité de la solution dû aux interactions binaires entre les molécules.

Pour les solutions diluées, il est possible de négliger les interactions entre particules et on obtient alors :

$$I_r = K \cdot C \cdot M_w \cdot S(q) \quad 3.5$$

Le calcul théorique de $S(q)$ est possible mais il nécessite de connaître la fonction de corrélation de paire des centres diffusants des agrégats : $g(r)$.

La fonction de corrélation de paire donne des informations sur l'agencement spatial des particules par rapport à une particule de référence. Elle est reliée à la probabilité de trouver une particule à une distance \vec{r} d'une particule de référence centrée en $\vec{r} = 0$. Dans un milieu isotrope, cette probabilité ne dépend que de r .

Le nombre de particules ΔN à l'intérieur d'une couronne sphérique d'épaisseur Δr (figure 3.3) située à une distance r d'un centre de particule est :

$$\Delta N = 4\pi \cdot r^2 \cdot g(r) \cdot \Delta r \quad 3.6$$

Le $g(r)$ représente donc la concentration locale en particules diffusantes : $C(r)$ à la distance r de n'importe quelle particule de référence.

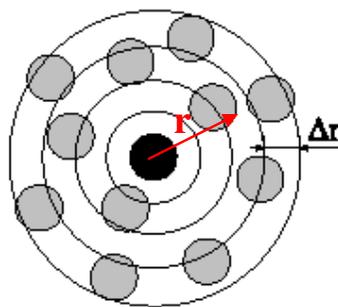


Figure 3.3 : Principe du calcul du nombre de centres de particules diffusantes ΔN dans une couronne d'épaisseur Δr à une distance r d'un centre d'une particule de référence (en noir). D'après Rottereau [80].

Le facteur de structure : $S(q)$, accessible expérimentalement par différentes techniques de diffusion du rayonnement est la transformée de Fourier de la fonction de corrélation de paire :

$$S(q) = 1 + \int_0^{\infty} \frac{\sin(qr)}{qr} \cdot 4\pi r^2 \cdot (g(r) - C) dr \quad 3.7$$

avec C : concentration moyenne en particules diffusantes du milieu

Généralement le calcul de $S(q)$ n'est pas directe car la fonction de corrélation de paire du milieu diffusant : $g(r)$ n'est à priori pas connue. Des simplifications sont cependant envisageables dans deux cas limites en fonction de l'échelle sondée, comme le suggère la figure 3.4 :

- ◆ Lorsque $q \cdot R_{gz} \ll 1$: ce qui correspond à regarder la structure de l'agrégat dans son ensemble. On obtient par des développements limités l'expression de $S(q)$ avec l'approximation de Zimm suivante :

$$S(q) = \left(1 + \frac{q^2 R_{gz}^2}{3} \right)^{-1} \approx 1 - \frac{q^2 R_{gz}^2}{3} \quad 3.8$$

On peut ainsi calculer le rayon de giration en z : R_{gz} des particules avec

$$R_{gz}^2 = \frac{\sum_i R_{gi}^2 M_i C(M_i)}{\sum_i M_i C(M_i)} .$$

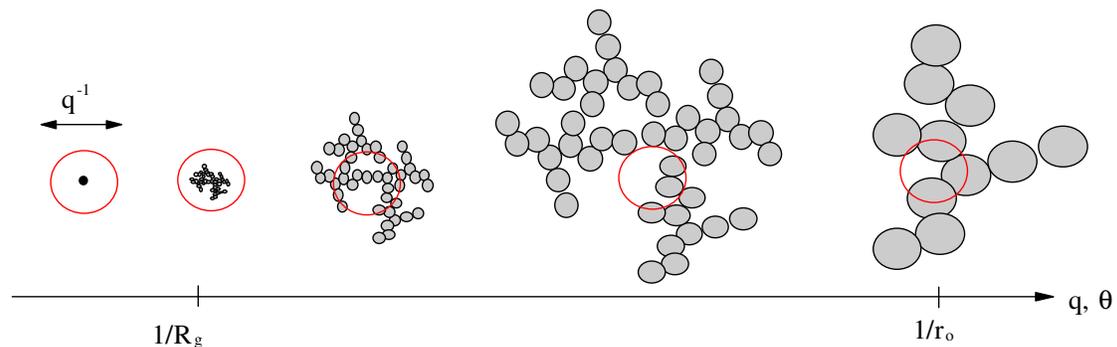


Figure 3.4 : Evolution de l'échelle spatiale sondée en fonction du vecteur d'onde q .

- ◆ Lorsque $q \cdot R_{gz} \gg 1$ et $q \cdot r_0 \ll 1$: c'est à dire pour des échelles sondées correspondant à la structure interne de l'agrégat. Les processus d'agréation en solution conduisent le plus souvent à la formation d'objets ayant à la fois des structures et des distributions autosimilaires. On parle alors d'objet

fractal, caractérisé par une dimension fractale D_f reliant notamment la masse molaire moyenne en poids (M_w) à la taille par la relation :

$$M_w \propto (R_{gz})^{D_f} \quad 3.9$$

$$\text{avec } M_w = \frac{\sum_i M_i C(M_i)}{\sum_i C(M_i)} .$$

Le facteur de structure de tels agrégats suit une loi de puissance de la forme :

$$S(q) \propto q^{-D_f} \quad \text{avec } 1 \leq D_f < 3 \quad 3.10$$

Avec

- pour un bâton rigide, $D_f = 1$
- pour une pelote gonflée, $D_f = 5/3$ (en bon solvant)
- pour une pelote gaussienne, $D_f = 2$ (en masse en solvant θ)
- pour des agrégats DLCA, $D_f = 1.8$
- pour des agrégats RLCA, $D_f = 2.1$
- pour des agrégats de percolation :
 - dans le cas d'un système monodisperse, $D_f = 2.5$ (en masse) et $D_f = 2$ (état gonflé)
 - dans le cas de la diffusion d'interfaces entre solvant et domaines homogènes très larges devant q^{-1} , le facteur de structure est donné par la loi de Porod :

$$S(q) \propto q^{-4} \quad 3.11$$

L'intensité

mesurée est alors proportionnelle à la surface totale des interfaces.

Dans le cas de systèmes concentrés, on peut également utiliser les équations 3.7. et 3.8., mais on détermine alors, de manière analogue à la situation diluée, une masse dite « apparente » : M_a et un rayon dit « apparent » : R_a qui prennent en

compte la présence des interactions répulsives et attractives entre les particules du systèmes.

$$I_r = K \cdot C \cdot M_a \cdot S(q) \quad 3.12$$

$$S(q) = \left(1 + \frac{q^2 \cdot R_a^2}{3} \right)^{-1} \quad 3.13$$

On définit $\xi = \frac{R_a}{\sqrt{3}}$ comme la longueur de corrélation du système. Cette

longueur de corrélation, ξ correspond à l'échelle spatiale, r , au-delà de laquelle le système est homogène avec notamment $C(r \geq \xi) = C$.

Dans le cas des systèmes concentrés, le facteur de structure mesuré : $S(q)$ prend donc en compte les interactions entre les particules et correspond en fait à la multiplication du facteur de « forme » des particules par le facteur de « structure » du système qui caractérise directement les interactions interparticulaires.

3.1.1.2 Appareillage expérimental en SLS

Les expériences ont été réalisées sur un système ALV couplé à un laser solide (Millenia, Spectra Physics) polarisé verticalement avec une longueur d'onde fixe de 532nm. Ce système est schématisé sur la figure 3.5 :

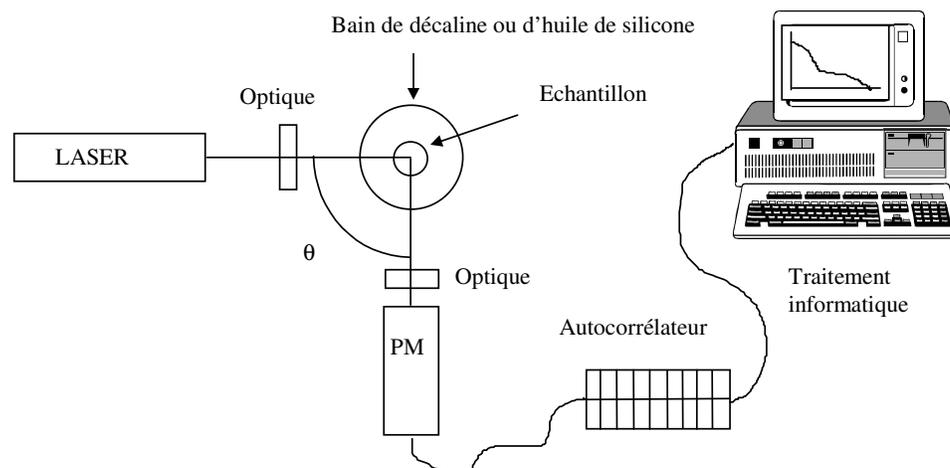


Figure 3.5 : Représentation schématique de l'installation de diffusion de la lumière classique

Le faisceau laser est focalisé sur le centre de la cellule de diffusion grâce à un système optique (lentille + pinhole). La cellule de diffusion cylindrique est placée au centre d'une cuve remplie d'huile de silicone ou de décaline qui sont isoréfractives du verre ce qui évite les problèmes de reflets du faisceau incident, cette cuve est thermostatée par un bain externe au système.

Le photomultiplicateur transforme le faisceau diffusé en impulsions électriques d'amplitude et de durée directement utilisables par l'analyseur.

Les mesures sont effectuées sur une gamme d'angle : θ allant de 10° à 140° ce qui correspond à une échelle spatiale (q^{-1}) comprise entre 30 et 370nm. Un bain thermostaté permet de régler la température entre 10°C et 80°C . Le corrélateur permet de sonder une échelle temporelle comprise entre $0.2\mu\text{s}$ et quelques dizaines de secondes.

Le toluène et le Ludox 50 (Dupont de Nemours, USA) sont utilisés comme référence de calibration de l'appareil.. Dans le cas où les échantillons diffusent trop et risquent soit d'endommager le PM (photomultiplicateur) soit présentent une intensité diffusée au-delà de la zone de saturation du PM, on utilise des filtres d'atténuation placés devant la source laser incidente afin d'en diminuer l'intensité.

3.1.2 Diffusion dynamique quasi élastique de la lumière :DLS [81,82]

3.1.2.1 Théorie de la diffusion de la lumière dynamique : DLS

En diffusion statique de la lumière, on s'intéresse à la moyenne temporelle de l'intensité sur tout le domaine de fréquence tandis qu'en dynamique, on s'intéresse à ces fluctuations de fréquence autour d'une valeur moyenne qui sont liées aux fluctuations de densité et de concentration des particules en solution.

Expérimentalement, on peut mesurer la fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée à un angle donné $G_2(t,q)$ qui correspond au produit de l'intensité à un instant t par l'intensité à un instant plus tard : $t+dt$, moyenné sur une longue période.

$$G_2(q, t) = \langle I(0)I(t) \rangle \quad 3.14$$

Après renormalisation par l'intensité diffusée moyenne, on définit :

$$g_2(q, t) = \frac{G_2(q, t)}{\langle I(q, t) \rangle^2} \quad 3.15$$

On ne peut pas relier les fluctuations de l'intensité directement aux mouvements des unités de diffusion. Celles-ci sont liées aux fluctuations du champ électrique diffusé. Lorsque la distribution des fluctuations de l'intensité est gaussienne autour de sa valeur moyenne la fonction d'autocorrélation de l'intensité : $g_2(q, t)$ est liée à la fonction d'autocorrélation du champ électrique : $g_1(q, t)$, par la relation de Siegert :

$$g_2(q, t) = 1 + a [g_1(q, t)]^2 \quad 3.16$$

où a est une constante comprise entre 0 et 1, selon les caractéristiques internes de l'appareillage utilisé.

Comme pour la diffusion statique, plusieurs types de fluctuations peuvent induire une variation du champ électrique :

- les fluctuations de densité, généralement trop rapides pour être détectées directement par un corrélateur de photons
- les fluctuations de concentration, généralement découplées des fluctuations de densité

La fonction $g_1(t)$ est donc essentiellement une mesure de la relaxation des fluctuations de concentration. Les processus de relaxation sont nombreux : relaxation par réaction chimique, par relaxation viscoélastique, par diffusion et par rotation ou même par la présence de mouvements internes des agrégats quand on sonde les objets à des petites échelles ($q.R_g \gg 1$) ; cependant si on se limite au processus de relaxation liés à la diffusion des molécules, $g_1(t)$ prend une forme très simple pour des solutions d'agrégats monodisperses :

$$g_1(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{avec : } \frac{1}{\tau} = D \cdot q^2 \quad 3.17$$

où D est le coefficient de diffusion apparent des agrégats

C'est la différence de potentiels chimiques qui gouverne la relaxation des fluctuations de concentration à laquelle s'oppose la friction entre les particules (agrégats) et les molécules du solvant. Le coefficient de diffusion mutuelle peut donc s'écrire comme une fonction de l'inverse de la compressibilité osmotique $\frac{\partial\pi}{\partial C}$ et du coefficient de friction (f) :

$$D_c = \frac{(1-C/\rho)^2}{f} \cdot \left(\frac{\partial\pi}{\partial C}\right) \quad \text{avec } \rho, \text{ la densité du polymère} \quad 3.18$$

Pour des solutions diluées, on peut faire un développement du viriel pour le coefficient de friction : $f = f_0 \cdot (1 + k_f C + \dots)$.

$$D \text{ s'écrit alors : } D = D_0 \cdot (1 + k_d C + \dots) \quad \text{avec } D_0 = \frac{k_B T}{f_0} \quad \text{et } k_d = 2A_2M - k_f - 2/\rho \quad 3.19$$

k_d est le second coefficient du viriel dynamique, k_f le second coefficient du viriel de friction. k_d rend aussi bien compte des interactions hydrodynamiques (k_f) que des interactions thermodynamiques (A_2).

Sachant que pour une sphère, le coefficient de friction à dilution infinie par molécule de soluté est $f_0 = 6\pi \cdot \eta_s \cdot R_h$, avec η_s la viscosité du solvant, on définit alors pour une particule de forme quelconque, un rayon hydrodynamique effectif : R_h comme le rayon d'une sphère de même D_0 :

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi \cdot \eta_s \cdot R_h} \quad (\text{relation de Stokes-Einstein}) \quad 3.20$$

La diffusion dynamique va ainsi permettre d'accéder au rayon hydrodynamique des particules au travers de cette dernière équation. Dans le cas où

les particules sont polydisperses ou s'il existe plusieurs populations de particules, les fonctions d'autocorrélation expérimentales peuvent être décrites par une distribution de temps de relaxation :

$$g_1(t) = \int A(\tau) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d\tau \quad 3.21$$

Des programmes d'analyse existent pour traiter ce type de résultat et déterminer $A(\tau)$:

♦ Le programme REPES effectue la transformée de Laplace inverse sur la fonction g_2 , sans présupposer de forme pour $A(\tau)$. Le principe de l'ajustement s'écrit :

$$g_2(q, t) - 1 = \beta \cdot \left[\int A(\tau) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d\tau \right]^2 \quad 3.22$$

avec $A(\tau)$ la distribution des temps de relaxation et τ les différents temps de relaxation permettant de décrire la fonction d'autocorrélation. Cette méthode présente toutefois un inconvénient : des données légèrement bruitées peuvent conduire à une grande incertitude sur la distribution. Pour diminuer les effets du bruit, la distribution peut être lissée par un paramètre de régularisation (« prob ») ; cependant des distributions larges sont généralement représentées par plusieurs pics distincts (figure 3.6).

♦ Le programme GEX permet d'ajuster les distributions : $A(\tau)$ larges et continues de temps de relaxation, τ que REPES a tendance à découper en plusieurs pics. Son expression est la suivante :

$$A(\tau) = \frac{|s| \cdot \tau^{p-1} \cdot \tau_a^{-p} \cdot \exp\left[-\left(\frac{\tau}{\tau_a}\right)^s\right]}{\Gamma(p/s)} \quad 3.23$$

où p , s et τ_a sont des paramètres ajustables, τ_a détermine la position de la distribution sur l'axe des temps de relaxation, p et s déterminent la largeur de la distribution et l'asymétrie de la courbe. Γ représente la fonction gamma (figure 3.6).

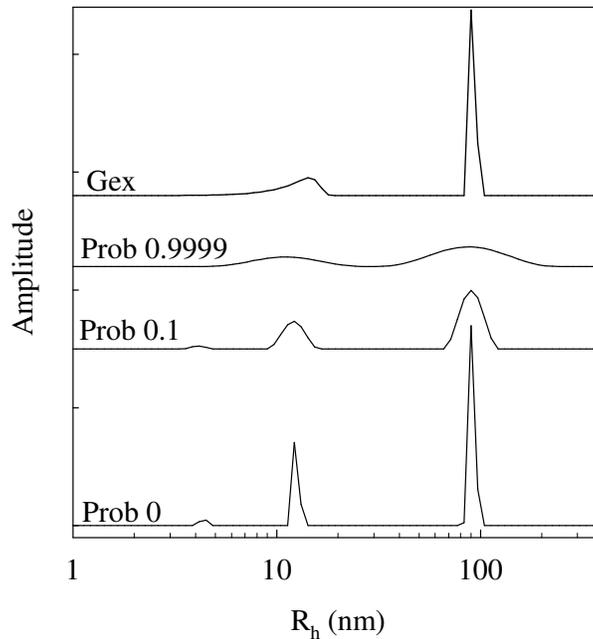


Figure 3.6 : Exemple de distributions obtenues par différents programmes (REPES ou GEX) et différents paramètres d'analyse.

3.1.2.2 Appareillage expérimental en DLS

La diffusion dynamique de la lumière est réalisée sur le même appareil que celui utilisé pour la SLS .

La corrélation de photons est assurée par un corrélateur digital ALV-5000/E multitaup. On obtient alors la fonction d'autocorrélation normalisée de l'intensité, $g_2(t)$ et on déduit, grâce à la relation de Siegert, la fonction d'autocorrélation normalisée du champ électrique, $g_1(t)$.

Les mesures sont effectuées sur une gamme d'angle allant de 10° à 140° ce qui correspond à une échelle spatiale (q^{-1}) comprise entre 30 et 370nm.

Le corrélateur permet de sonder une échelle temporelle comprise entre $0.2\mu\text{s}$ et quelques dizaines de secondes.

3.2 Turbidimétrie

La turbidimétrie est une technique très proche de celles en diffusion du rayonnement décrites plus haut puisqu'elle est fondée sur la quantification de la part des photons incidents subissant une déviation de leur course rectiligne suite à un phénomène de diffusion ou d'absorption au contact de particules.

Cette technique est beaucoup plus simple d'usage que les techniques classiques de diffusion du rayonnement (SLS, SAXS) et permet dans certains cas de relier la valeur de turbidité absolue τ à la structure des systèmes via leur facteur de structure $S(q)$.

Elle est assez couramment utilisée pour la détermination des tailles de particules colloïdales [83-89].

3.2.1 Théorie de la Turbidimétrie

La mesure de la turbidité : $\tau(\text{cm}^{-1})$ du milieu correspond à la détermination de la quantité de photons « perdus » par unité de longueur lors du passage rectiligne de la lumière incidente à travers un échantillon turbide (figure 3.7).

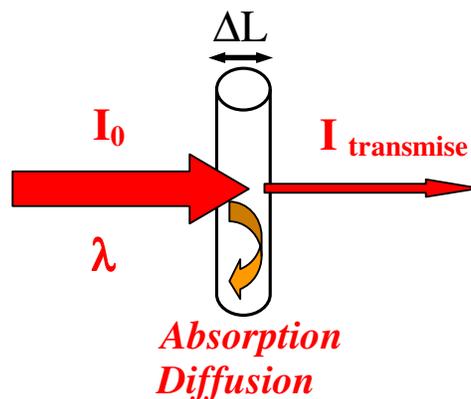


Figure 3.7 : Schéma explicatif de phénomène de perte linéaire de photons mesuré par la turbidité du milieu.

Pour un échantillon isotrope la turbidité est ainsi directement exprimable par :

$$\tau \cdot I(L) = \frac{\partial I(L)}{\partial L} \quad 3.24$$

ce qui donne en intégrant l'éq.3.24 sur toute la longueur de l'échantillon ΔL que traverse la radiation incidente :

$$\tau = \ln\left(\frac{I_0}{I_{tr}}\right) \cdot \frac{1}{\Delta L} \quad 3.25$$

avec I_0 : intensité incidente du laser

I_{tr} : intensité transmise correspondant à l'intensité mesurée par le détecteur spectrophotomètre sur l'angle solide $(0 ; \alpha)$ avec α : angle d'acceptabilité de l'appareil, généralement inférieur à 3° .

ΔL : trajet optique de la radiation incidente dans l'échantillon turbide (cm).

La turbidité est en réalité calculée indirectement à partir des valeurs de transmittance (Tr) ou d'absorbance (Abs) du milieu qui sont les paramètres directement mesurables expérimentalement avec un spectrophotomètre :

$$Tr = \frac{I_{tr}}{I_0} = \frac{1}{\exp(Abs \cdot \ln 10)} \quad 3.26$$

La « perte » linéaire de photons enregistrée dans un échantillon turbide est due :

- soit à l'absorption des photons de l'onde incidente par les molécules présentes dans le milieu se faisant avec transition de leur niveau énergétique et par conséquent se réalisant à des longueurs d'ondes bien spécifiques (ex : pic d'absorption situé à $\lambda=278\text{nm}$ pour le caséinate de Na)
- soit à une déviation de leur direction incidente suite à leur diffusion lors de la rencontre de particules dans le milieu. Cette diffusion de certains photons incidents provoque un écart à leur cheminement rectiligne initial d'un angle θ ce qui fait qu'ils ne seront pas récupérés dans l'intensité transmise mesurée à $\theta = 0$.

Dans notre cas, la détermination de la turbidité pour nos systèmes (submicelles de caséine) a été réalisée dans une gamme de longueurs d'ondes λ éloignées de la zone d'absorption.

Seul le phénomène de diffusion des photons incidents est donc à l'origine de la turbidité du milieu.

3.2.2 Appareillage expérimental et méthode de mesure

Les mesures de turbidité ont été effectuées avec un Spectrophotomètre UV Cary 100, (Varian, France) muni d'une cellule chauffante Peltier (cellule 1×1 Cary, France) pilotée par ordinateur.

Les cuves utilisées sont des cellules rectangulaires en verre et en quartz (type Glass et QS Hellema, France) de différents trajets optiques : $\Delta L = 1, 0.5, 0.2, 0.1$ et 0.05 cm.

Les solutions de caséinate de Na sont placées dans ces cuves, sur lesquelles on met une couche d'huile de silicone pour empêcher l'évaporation de l'eau. Ceci permet d'analyser le développement de la turbidité des systèmes de caséinate dans le temps et cela à diverses forces ioniques.

A l'issue des balayages en λ qui ont été effectués sur la gamme : $230\text{nm} < \lambda < 800\text{nm}$, nous avons noté que les valeurs de τ mesurées dans la zone $230\text{nm} < \lambda < 300\text{nm}$ sont dépendantes de l'absorption des photons par le caséinate (pic d'absorption à $\lambda = 278\text{nm}$). Aussi, la turbidité (τ) des systèmes a été mesurée à une seule longueur d'onde $\lambda = 450$ nm, loin du pic d'absorption.

3.3 Chromatographie d'exclusion stérique : SEC

3.3.1 Principe de la Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC) [90]

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une chromatographie en phase liquide à haute vitesse qui permet de fractionner une population de molécules par leur taille ou plus exactement selon leur volume hydrodynamique en solution.

Le principe de cette méthode est d'éluer une solution de macromolécules (*phase mobile*) de taille différente dans une colonne remplie d'un gel poreux (*phase stationnaire*). En fonction de leur taille, les molécules s'attardent plus ou moins longtemps dans les pores et sont donc éluées par volume hydrodynamique décroissant.

Pour cette méthode, il semble donc nécessaire d'éliminer toutes les interactions possibles entre le soluté et la surface de pores pour ne conserver que l'effet stérique lié à la taille des pores.

Un paramètre important est le volume total de la colonne qui peut être séparé en trois domaines distincts :

- V_0 = volume mort ou volume d'exclusion totale. Il correspond au volume intergranulaire et représente le seul espace accessible aux molécules ne pouvant pénétrer dans les pores en raison de leur taille.
- V_p = volume poreux total du gel. Il constitue la phase stationnaire et correspond au volume de solvant contenu dans le gel.
- V_g = volume granulaire. C'est le volume réellement occupé par le gel lui-même. C'est donc un espace impénétrable à tout soluté.

Le volume offert (V_e) à une macromolécule de taille donnée est le volume mort ou intergranulaire (V_0) auquel s'ajoute une fraction du volume poreux total (V_p). Ce volume d'élution V_e s'écrit donc sous la forme :

$$V_e = V_0 + K \cdot V_p \quad 3.27$$

K est appelé coefficient de partage et décrit le degré de pénétration de la macromolécule dans la phase stationnaire. Il varie entre 0 quand il y a exclusion totale et 1 quand la macromolécule est suffisamment petite pour visiter tous les pores.

Différents types de détecteurs (UV, réfractomètre différentiel, diffusion de la lumière) sont placés en fin de colonne pour quantifier et la distribution de macromolécules.

3.3.2 Appareillage

Un schéma de fonctionnement de l'appareil CES du laboratoire est présenté sur la figure 3.8 :

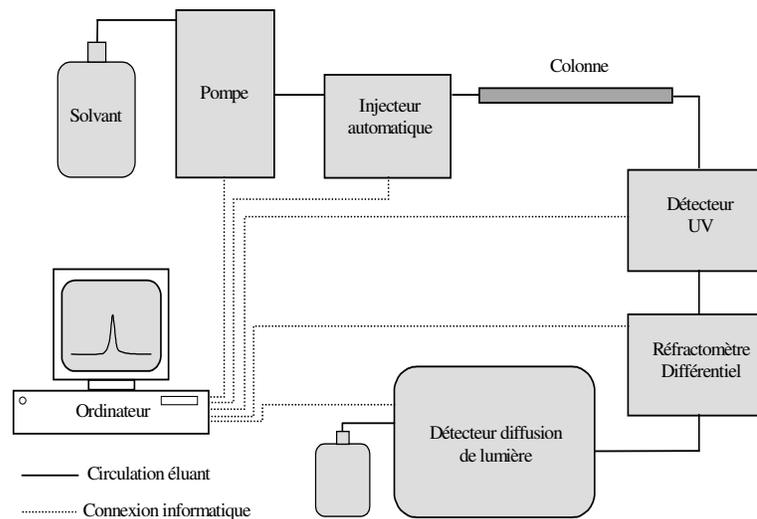


Figure 3.8 : Représentation schématique de la ligne d'analyse de CES.

Les éléments constituant la ligne d'analyse sont :

- Une réserve de solvant, une solution à 0.1M NaNO₃ avec 50ppm de NaN₃, agent antibactérien
- Une pompe TSP Spectra Series P100 (le débit utilisé pour nos analyses est de 1cm³/min pour une durée totale de 45min)
- Un injecteur automatique GILSON 234 (le volume injecté est de 300μL et la concentration des échantillons de 1g/cm⁻³)
- Un jeu de colonne TSK PW 6000 de 60cm dont la limite d'exclusion stérique est de 5.10⁷ g/mole en Dextran). Le gel de remplissage est constitué de polyether hydroxylé avec une faible absorption des polymères hydrosolubles. La gamme de pH autorisée va de 2 à 12.
- Un détecteur UV Spectra Physics UV2000, réglé sur 278nm pour la détection des protéines
- Un détecteur réfractométrique différentiel Shodex RI 71
- Un détecteur diffusion de la lumière multiangles, DLV 111, conçu au laboratoire. Le détecteur le plus utilisé est le réfractomètre différentiel qui mesure en continu la différence d'indice de réfraction, Δn_i , entre la solution éluée et le solvant pur. Pour n_i chaînes de masse M_i à la concentration C_i , on a $\Delta n_i \propto C_i \propto N_i \cdot M_i$. Le chromatogramme obtenu représente la différence d'indice de réfraction en fonction du volume d'élution et donne une idée qualitative sur la polymolécularité de l'échantillon.

L'acquisition des données se fait à l'aide d'une carte d'acquisition National Instrument et le traitement des résultats par « CE11 », logiciel développé au laboratoire sous LabView. Ce logiciel permet la mise en œuvre des détecteurs RD, UV et diffusion de la lumière.

3.4 Rhéologie

Les méthodes rhéométriques ont été utilisées dans la détermination des propriétés mécaniques aux faibles et fortes déformations des solutions de mélange de polysaccharide/protéine à diverses concentrations des deux biopolymères.

3.4.1 Principe des mesures rhéométriques

La caractérisation des propriétés rhéologiques des produits peut se faire de différentes manières, notamment en régime permanent ou en régime dynamique.

3.4.1.1 Régime permanent

Il s'agit d'appliquer un ensemble de forces sur un échantillon. Il en résulte une contrainte de cisaillement σ parallèle à la surface de la couche de produit. La variation de déplacement des couches de matériau les unes sur les autres correspond à la déformation γ . Sa dérivée par rapport au temps $\dot{\gamma}$ est le gradient de vitesse, appelé vitesse de déformation de cisaillement.

3.4.1.2 Régime dynamique oscillatoire et viscoélasticité

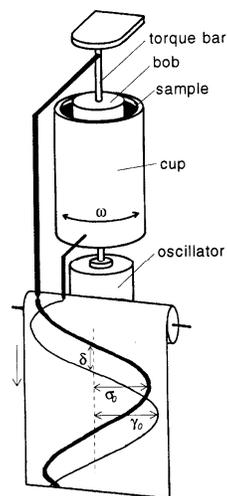


Figure 3.9 : Représentation schématique d'une mesure rhéométrique en mode oscillatoire. D'après Stading [91].

On impose, dans le cas d'un rhéomètre à déformation imposée, une déformation sinusoidale $\gamma(t)$ et on mesure une contrainte sinusoidale $\sigma(t)$ de la forme (figure 3.9) :

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t)$$

3.28

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad 3.29$$

où ω est la pulsation des oscillations. δ représente le déphasage et est appelé angle de perte. δ est égal à 90° dans le cas d'un liquide purement visqueux ou à 0° pour un solide purement élastique. On peut réciproquement imposer, dans le cas d'un rhéomètre à contrainte imposée, une contrainte sinusoïdale et mesurer la déformation sinusoïdale résultante.

On définit les modules de conservation G' et de perte G'' , relatifs respectivement à l'élasticité et au caractère dissipatif de l'échantillon, comme étant :

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad 3.30$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad 3.31$$

La tangente de perte est définie comme le rapport des dissipations sur le stockage d'énergie :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad 3.32$$

3.4.2 Appareil utilisé et méthodes de mesures

Les mesures sont réalisées à l'aide de deux types de rhéomètre rotatif oscillant de marque PHYSICA MCR 300 et TA AR2000.

3.5 La zétamétrie

La détermination du potentiel zêta permet d'appréhender la contribution électrostatique et électrocinétique à la stabilisation des dispersions colloïdales. La répulsion électrostatique inter particulaire peut empêcher l'agrégation des particules dispersées et s'opposer à des phénomènes tels que la coagulation et la floculation.

Les phénomènes électrocinétiques ralentissent la vitesse de sédimentation des particules et sont responsables de l'effet électrovisqueux.

La composante électrostatique de l'interface chargée représentée par le potentiel de surface Ψ_0 ne peut pas être mesurée directement. Il faut donc avoir recours à une mesure indirecte par le biais des phénomènes électrocinétiques (électrophorèse) qui rendent compte partiellement de la contribution électrostatique de la charge des interfaces.

3.5.1 Aspect théorique :

A l'interface entre une surface chargée et une solution électrolytique, il existe une couche de solution, notée "double couche", possédant des propriétés différentes de celles du réservoir. Plusieurs modèles successifs ont été élaborés pour décrire cette double couche.

3.5.1.1 Le modèle de Gouy-Chapman [92]

La théorie de la double couche électrique a été proposée initialement par Gouy et Chapman en 1910. Elle repose sur l'existence, à proximité d'une surface chargée, d'une couche dite diffuse possédant des propriétés différentes de celles du réservoir et qui, au-delà d'une certaine distance (longueur de Debye), récupère les propriétés du réservoir électrolytique (potentiel nul, concentrations en ions identiques à celles du réservoir). Dans cette couche diffuse, la distribution des contre-ions et des co-ions est déterminée à la fois par les interactions électrostatiques avec la surface, et par les mécanismes de diffusion liés à l'agitation thermique, qui tendent à rétablir l'équilibre avec le réservoir (Figure 3.10). L'équation de Poisson-Boltzmann permet d'accéder aux profils du potentiel électrique dans la couche diffuse et des concentrations ioniques au-delà de la surface chargée. Dans ce modèle, les ions sont considérés comme ponctuels et le solvant comme un continuum diélectrique, hypothèses non satisfaisantes surtout lorsqu'on se trouve à proximité de la surface chargée. Il a donc été indispensable de définir un nouveau modèle permettant de rendre compte de la taille finie des ions.

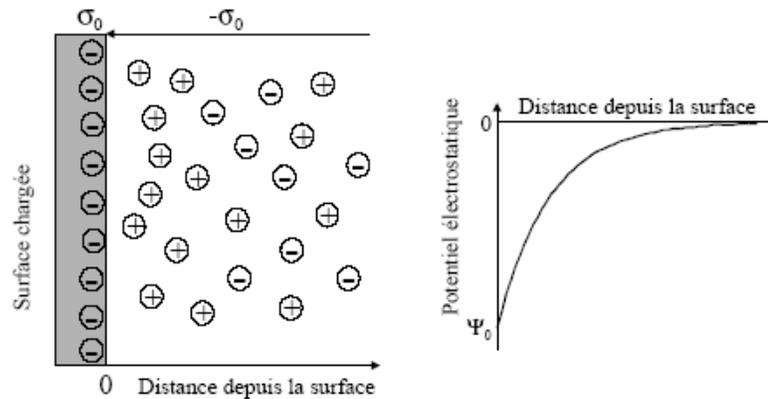


Figure 3.10 : Modèle de Gouy-Chapman montrant l'interface entre une surface chargée de potentiel ψ_0 et une solution électrolytique

3.5.1.2 Le modèle de Stern [92]

Ce modèle a été introduit en 1924. L'interface solide - solution se décompose encore en deux parties (Figure 3.11). La première partie est une couche dite compacte (couche de Stern) d'épaisseur d matérialisant la distance minimum d'approche des ions, hydratés ou non. Cette couche est donc exempte d'ions et peut être identifiée comme un condensateur de capacité C_s . La deuxième partie de l'interface est constituée par la couche diffuse, dont les caractéristiques sont les mêmes que dans le modèle précédent. Le plan séparant la couche compacte de la couche diffuse est noté plan de Stern.

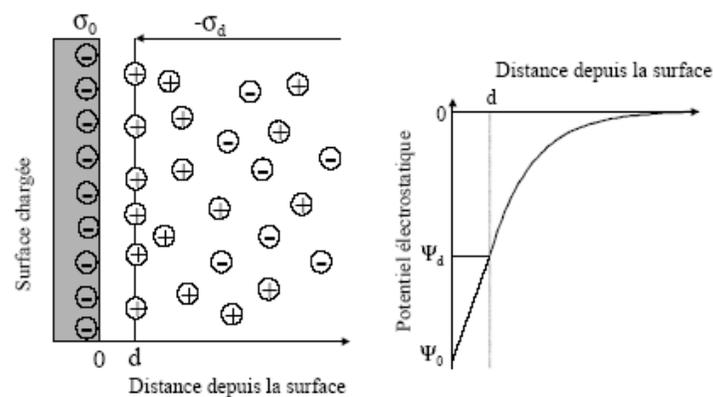


Figure 3.11 : Modèle de Stern, montrant l'existence d'une distance d en deçà de laquelle les ions ne peuvent se loger.

3.5.1.3 Le modèle triple couche [93]

Dans ce modèle, introduit en 1947, la couche de Stern est elle-même subdivisée en deux parties (Figure 3.12). La première est située entre la surface et le plan interne de Helmholtz (PIH). C'est une couche où seuls les ions présentant une interaction forte avec la surface (ions spécifiquement adsorbés) peuvent se loger, en perdant partiellement ou totalement leur sphère d'hydratation (complexes de sphère interne). Le centre de ces ions est localisé au niveau du PIH, et cette couche peut être définie comme un condensateur de capacité C_i . La deuxième partie est comprise entre le PIH et le plan externe de Helmholtz (PEH), confondu avec le plan de Stern. Elle prend en compte, comme la couche de Stern, les ions hydratés retenus par les forces électrostatiques. Du point de vue électrique, cette couche se comporte comme un deuxième condensateur de capacité C_e .

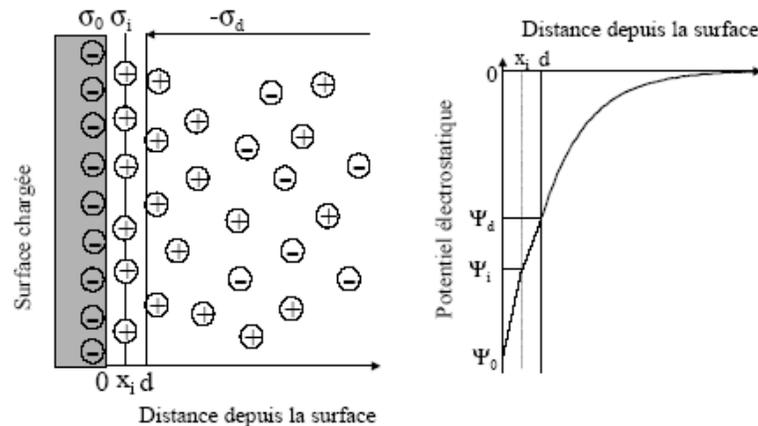


Figure 3.12: Modèle triple couche. Le plan interne de Helmholtz est localisé à la distance x_i de la surface alors que le plan externe de Helmholtz est localisé à la distance d .

Dans ces trois modèles, l'épaisseur de la couche diffuse apparaît comme un paramètre essentiel, permettant de caractériser la décroissance du potentiel. Cette épaisseur, appelée longueur de Debye et notée κ^{-1} , dépend de la force ionique de la solution. Elle diminue lorsque la force ionique augmente.

L'expression de la longueur réciproque de Debye est la suivante :

$$\kappa = \sqrt{\frac{\sum_i \rho_i^\infty e^2 z_i^2}{\epsilon \epsilon_0 kT}} \text{ en m}^{-1} \quad 3.33$$

où ρ_i^∞ est la concentration de l'ion i dans le réservoir ;

z_i est la charge de l'ion i .

Par ailleurs, dans chacun de ces modèles, le plan de la surface accueille lui-même les ions déterminant le potentiel, comme H^+ et OH^- en général, ou des ions participant à la structure du minéral. Pour chacun des ions déterminant le potentiel, peut être défini comme une loi d'action de masse décrivant son association avec un site de surface. La charge de surface est alors calculée en tenant compte de ces équilibres d'association, et dépend par conséquent à la fois des constantes d'équilibre, des concentrations en ions déterminant le potentiel dans la solution, et du nombre total de sites de surface.

3.5.2 Potentiel zêta

Lorsqu'on applique un champ électrique dans une suspension contenant des particules chargées, les particules acquièrent une certaine mobilité dépendant de leur charge et de leur cortège ionique. Il existe alors, au sein de la double couche, un plan délimitant deux comportements d'ions différents. Les ions présentant une affinité spécifique pour la surface accompagnent la particule dans son mouvement, alors que les ions ayant une attirance plus faible se séparent progressivement de la surface. Ce plan, appelé plan de cisaillement, est défini à partir de considérations hydrodynamiques. Cependant, il est possible de le relier à la description chimique de la double couche. En effet, il est généralement très proche du plan délimitant la couche compacte de la couche diffuse, dit plan externe de Helmholtz.

Le potentiel au plan de cisaillement est couramment noté potentiel zêta ou ζ . Il dépend principalement de deux paramètres: le potentiel au plan interne de Helmholtz, qui peut être du signe opposé au potentiel de surface dans le cas d'une adsorption spécifique, et la force ionique de la solution, comprimant plus ou moins la double couche électrique. Le potentiel zêta est accessible expérimentalement par des mesures électrocinétiques.

3.5.2.1 Principe des mesures électrocinétiques

Le principe de mesure repose sur la mobilité électrophorétique des particules chargées en suspension dans un réservoir électrolytique. L'application d'un champ électrique entraîne les particules chargées vers l'électrode de charge opposée. C'est le phénomène d'électrophorèse. Simultanément à l'électrophorèse intervient le phénomène d'électro-osmose. Les parois de la cellule étant chargées, il en résulte, sous l'effet du champ électrique appliqué, un déplacement du fluide dans son ensemble, selon un profil parabolique.

La mobilité u des particules se définit comme le rapport entre la vitesse v de ces particules et le champ électrique E appliqué : $u = v/E$. La mobilité électrophorétique permet d'accéder à la valeur du potentiel zêta, selon la relation de Henry :

$$u = \frac{2\varepsilon\varepsilon_0\zeta}{3\eta} \times f(\kappa a) \quad 3.34$$

où : η : est la viscosité du liquide ; $\varepsilon\varepsilon_0$: la constante diélectrique du liquide ;
 κ^{-1} : la longueur de Debye ; a : le rayon de la particule.

Le facteur $f(\kappa a)$ dépend de la forme de la particule. Dans le cas d'une particule sphérique, et si κa est très supérieur à 1 (double couche mince devant la taille des particules), la relation se simplifie selon l'équation de Smoluchowski où $f(\kappa a) = 3/2$:

$$u = \frac{\varepsilon\varepsilon_0\zeta}{\eta} \quad 3.35$$

Cette relation simple permet, à partir des mobilités électrophorétiques, d'accéder au potentiel zêta lorsque le champ électrique appliqué est connu.

3.5.2.2 Mesure du potentiel zêta :

Le zétamètre utilisé est de marque **ZETASIZER 2000**, il est composé d'une unité de mesure dans laquelle on injecte l'échantillon et munie d'une cellule où on applique un champ électrique pour déplacer les charges électriques contenues dans l'échantillon. Cette unité est pilotée par micro-ordinateur utilisant un logiciel de marque « ZETASIZER ADVANCED » et est connectée à une imprimante pour visualiser et imprimer les résultats.

CHAPITRE4

RHEOLOGIE - ZETAMETRIE ET COMPORTEMENT DE PHASE D'UN MELANGE AQUEUX A BASE DE CASEINATE DE SODIUM ET DE XANTHANE.

4.1 Introduction:

Les protéines et les polysaccharides suscitent de plus en plus l'intérêt des industriels alimentaire et autres, en raison de leur potentialité d'améliorer la texture, la stabilité et l'aspect diététique des produits à structure complexe, notamment les émulsions où les deux biopolymères y sont présents [93]. Les protéines sont utilisées pour leur propriété tensioactive, pour stabiliser les gouttelettes huileuses tandis que les polysaccharides sont utilisés comme agent viscosifiant de la phase continue. Toutefois, la présence de ces deux espèces polymériques dans un même système, peut engendrer des phénomènes de séparation de phases, soit par incompatibilité thermodynamique [94] ou par floculation par déplétion [95].

Dans un milieu aqueux, la séparation de phases due à l'incompatibilité thermodynamique se traduit par des interactions répulsives mutuelles de ségrégation des macromolécules des deux biopolymères, auquel cas, les interactions polysaccharide-polysaccharide ou protéine-protéine sont suffisamment élevées par rapport aux interactions biopolymère-solvant [96]. On observe ainsi, une phase en haut, riche en polysaccharide et une phase en bas, riche en protéine. Ces conditions d'incompatibilité dépendent de plusieurs facteurs, notamment, de la température, du pH, de la force ionique, de la concentration, et de la conformation des biopolymères [97-100]. En revanche, dans le cas de la floculation par déplétion, le polymère non adsorbant s'exclut de l'espace interne de deux particules colloïdales, lorsque leur surface de séparation devient plus petite que la taille de la chaîne de ce polymère [101]. Ceci conduit à la naissance d'une différence de pression osmotique et par la même à la floculation des deux particules. Dans le cas où l'intensité de la force attractive inter-colloïdes est importante, le système peut enregistrer une séparation de phases [102-103].

Des études sur le mélange aqueux à base de Caséinate de sodium (Na-CN) et de xanthane, à pH neutre, ont été réalisées en utilisant la viscosité apparente, la

microscopie confocale [64] et la diffusion de la lumière en dynamique (dynamic light scattering) [14], comme moyens d'investigation, pour rendre compte du comportement de phase et de la microstructure du mélange. Il a été trouvé que les deux biopolymères produisent une séparation de phases, lorsque la concentration du xanthane ≥ 0.5 % avec Na-CN = 5 %. Toutefois, le diagramme de phases de ce mélange n'a pas été déterminé.

Pour notre part, on s'intéresse à l'effet propre que peut engendrer la concentration de chacun des deux biopolymères sur le comportement rhéologique et électrocinétique du mélange aqueux, à pH neutre et particulièrement, on se focalise sur les interactions négatives inter-biopolymère qui peuvent prendre forme, et qui sont génératrices de séparation de phases. Ce faisant, on planifie les essais par utilisation des techniques des plans d'expériences [104 - 106], ce qui permet notamment de déterminer le diagramme de phases du système colloïdal par simulation polynomiale.

4.2 Matériels, produits et méthodes

4.2.1 Produits utilisés :

Les protéines de caséinate de sodium (Na-CN), mélange de quatre caséines (α_{s1-} , α_{s2-} , $\beta-$, $\kappa-$) sont des macromolécules amphiphiles et anioniques qui sont susceptibles de s'agréger dans un milieu aqueux, par interaction d'hydrophobie [107], en sub-micelles qui à leur tour peuvent se rassembler en de supra-molécules [108]. En effet, il a été montré récemment, par utilisation de la static light scattering [12] et la dynamic light scattering [11,14], la co-existence de sub-micelles de rayon hydrodynamique de 10 à 20 nm environ et de gros agrégats de rayon hydrodynamique entre 70 et 80 nm.

Cette protéine se présente sous forme de poudre blanche soluble dans l'eau à pH neutre. Elle a des propriétés émulsifiantes et de liaison. Elle est fournie par ARMOR Protéines, France.

Le xanthane est un polysaccharide anionique et hydrophile [109]. Il se présente sous forme d'une poudre fine de couleur crème. Le produit a été fourni gracieusement par RHODIA (ORKILA, Algérie).

4.2.2 Méthodes d'analyse:

Les tests rhéologiques sont effectués sur les échantillons, après les avoir laissés reposer pendant 24 heures. Le rhéomètre utilisé est de type Couette, de marque PAAR PHYSICA RHEOLAB MCR 300, muni du logiciel US 200, pour la commande et le traitement des données.

On mesure le module de conservation, G'_0 , dans le domaine de viscoélasticité linéaire, en faisant subir aux solutions colloïdales des sollicitations sinusoïdales en rampe de déformation, γ . On enregistre alors la variation du module de conservation, G' en fonction de γ et on déduit la valeur de G'_0 du domaine de viscoélasticité linéaire, auquel G' enregistre un palier, figure 4.1.

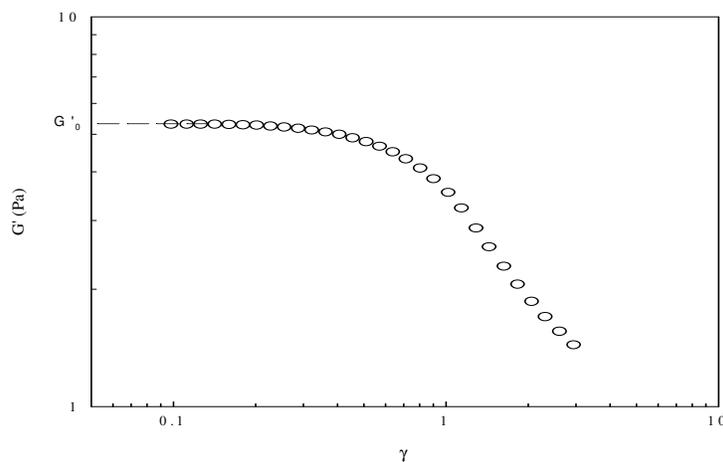


Figure 4.1 : Courbe typique de la variation de G' des solutions de mélange de xanthane/NaCN en fonction de la déformation à $T = 20^\circ$ dans le cas à pH neutre.

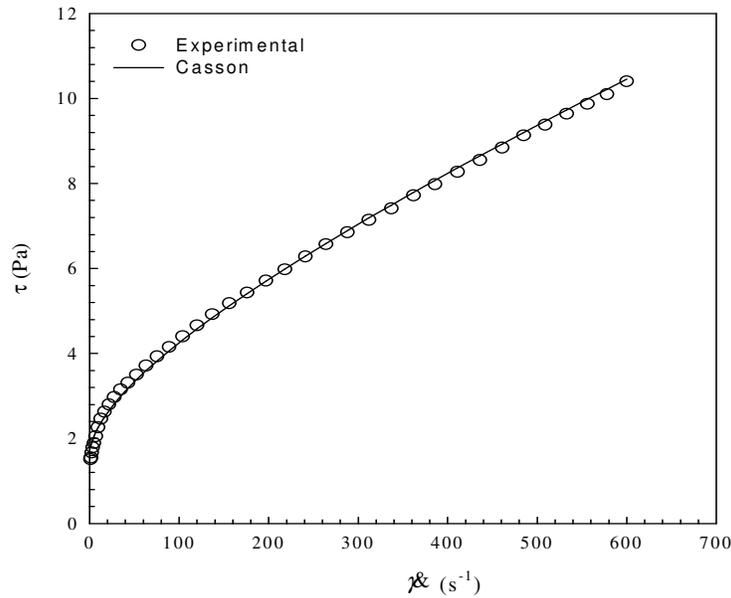


Figure 4.2 : Courbe d'écoulement typique des solutions de mélange de xanthane/NaCN, ajustée par le modèle de Casson, $T = 20^\circ\text{C}$, pH neutre.

Egalement, on fait ressortir du test d'écoulement en rampe de vitesse de cisaillement, $\dot{\gamma}$, les paramètres rhéologiques du modèle de Casson, en l'occurrence, la viscosité plastique, η_c , (Pa.s) et la contrainte seuil, τ_0 , (Pa). C'est en fait, à l'issue d'ajustement des rhéogrammes expérimentaux, exprimés par des courbes liant la contrainte de cisaillement, τ , en fonction de la vitesse de déformation de cisaillement, $\dot{\gamma}$, à l'image de celui présenté sur la figure 4.2, que ce modèle paraît le plus adéquat, au vu de bonnes valeurs affichées du coefficient de corrélation ($R > 95\%$) et cela pour tous les essais. On rappelle que le modèle de Casson s'écrit :

$$\begin{aligned} \tau^{1/2} &= \tau_0^{1/2} + (\eta_c \dot{\gamma})^{1/2} && \text{pour } \tau > \tau_0 \\ \dot{\gamma} &= 0 && \text{pour } \tau \leq \tau_0 \end{aligned} \quad (4.1)$$

La mesure du potentiel zêta, ζ , s'effectue par électrophorèse et est réalisée à l'aide d'un zétamètre de marque Malvern Zetasizer 2000 qui est piloté par le logiciel Zeta Mode v 1.6. A noter, que les échantillons doivent être limpides, ce qui nécessite une dilution au 1/10, à pH neutre. L'appareil effectue l'analyse automatiquement trois fois ce qui permet d'avoir une valeur moyenne.

La séparation de phases du mélange aqueux est obtenue, en mettant les échantillons dans des tubes à essais transparents pendant une durée de trois mois à

température ambiante. La séparation de phases est détectée visuellement, où on peut observer une phase supérieure riche en xanthane et une phase inférieure riche en NaCN. On fait ressortir de cette analyse une réponse caractéristique de l'état de stabilité du système, notée St : St = 1, le mélange est stable et St = 0, il y a une séparation de phases.

4.2.3 Préparation et méthode de planification des essais:

Les solutions du mélange de polymères sont préparées en faisant dissoudre les quantités appropriées de caséinate de sodium, variant dans le domaine (1 % – 6 %), et de xanthane, variant dans le domaine (0% - 0.5 %), dans de l'eau distillée, suivant un plan d'expériences adéquat de type « D'optimal » [104], tableau 1.1. On ajoute au mélange 0.01 % d'azidure de sodium pour protéger le produit contre les contaminations microbiennes, à pH neutre. La dissolution et l'hydratation des constituants sont assurées, en agitant le mélange, à l'aide d'agitateurs magnétiques, pendant 20 heures à température ambiante.

Tableau 4.1 : Matrice d'expériences (11 essais + 4 essais au centre du domaine)

N° Essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
NaCN	1	6	6	1	1	1	6	6	4,33	2,66	4,33	3,5	3,5	3,5	3,5
Xanthane	0	0,5	0	0,5	0,33	0,16	0,16	0,33	0,5	0,5	0	0,25	0,25	0,25	0,25

Le modèle mathématique proposé qui lie les concentrations de NaCN et de xanthane, xant, aux paramètres rhéologiques et zétamétrique, qu'on note Y, est de type polynomial de degré 2, pour tenir compte des effets propres, éventuellement non linéaires, des deux biopolymères et de l'effet de leur interaction :

$$Y = a_0 + a_1\text{Na-CN} + a_2\text{Xant} + a_{11}\text{Na-CN}^2 + a_{22}\text{Xant}^2 + a_{12}\text{Na-CN} \cdot \text{Xant} \quad (4.2)$$

La qualité de ce modèle, par rapport à sa représentativité et sa puissance de prédiction, est liée au coefficient expliquant la variance, R^2 , et au coefficient de prédiction, Q^2 , respectivement. Les expressions mathématiques de ces deux coefficients sont:

$$R^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2 - \sum e_i^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad 0 \leq R^2 \leq 1 \quad (4.3)$$

$$Q^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2 - \sum \left(\frac{y_i - \hat{y}_i}{1 - h_i} \right)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad 0 \leq Q^2 \leq 1 \quad (4.4)$$

Avec :

y_i : Réponse (caractéristique) mesurée au point i ;

\bar{y} : Moyenne de l'ensemble des réponses y_i mesurées ;

e_i : Résidu au point i ;

\hat{y}_i : Réponse prédite par le modèle au point i ;

h_i : La variance de prédiction au point i .

4.3 Résultats et discussions :

On regroupe dans le tableau 4.2, les valeurs des paramètres caractéristiques des essais, obtenues à l'issue de la réalisation et de la caractérisation des différentes préparations des mélanges.

L'examen de ces valeurs expérimentales montre que τ_0 et $G'0$ sont fortement corrélés, et peuvent être liés par une relation linéaire, de type : $\tau_0 = 5,79G'0 - 0,55$, avec $R = 0,94$. En conséquence, ces deux caractéristiques sont très dépendantes et sont gouvernées par les mêmes phénomènes. Aussi, n'est-il pas judicieux de ne garder qu'une d'elles, en l'occurrence $G'0$.

Tableau 4.2: Valeurs expérimentales des cinq caractéristiques

Essai	η_c (Pa.s)	τ_0 (Pa)	$G'0$ (Pa)	ξ (mV)	St : Stabilité
01	0,005	0,00	0,70	- 43,4	1
02	0,151	0,41	1,57	- 45,3	0
03	0,015	0,00	0,70	- 30,8	1
04	0,112	2,29	12,60	- 62,3	1
05	0,041	1,59	6,57	- 53,1	1
06	0,026	0,66	2,27	- 49,8	1
07	0,104	0,36	1,5	- 39,1	0
08	0,133	0,29	1,66	- 43,5	0
09	0,099	2,04	15,00	- 46,2	1
10	0,079	2,25	14,3	- 49,8	1
11	0,011	0,00	0,70	- 32,2	1
12	0,079	1,15	4,80	- 46,4	1
13	0,081	1,24	5,0	- 40,9	1
14	0,080	1,16	5,12	- 45,6	1
15	0,077	1,28	4,50	- 47,7	1

Les paramètres du modèle polynomial associé aux trois caractéristiques ($\text{Log}(G'o)$, η_c et ξ), sont calculés par la méthode de régression multilinéaire (MLR), en utilisant les valeurs expérimentales de $G'o$, de η_c et de ξ , en fonction des concentrations du NaCN et du xanthane:

$$\text{Log}(G'o) = -0,40 + 0,26\text{Na-CN} + 4,23\text{Xant} - 0,04\text{Na-CN}^2 - 0,33\text{Na-CN}\cdot\text{Xant} - 2,45\text{Xant}^2 \quad (\text{Pa}) \quad (4.5)$$

Avec $R^2 = 0,97$ & $Q^2 = 0,87$

$$\eta_c = 0,07 + 0,03\text{Na-CN} + 0,05\text{Xant} + 0,01\text{Na-CN}^2 + 0,001\text{Na-CN}\cdot\text{Xant} - 0,02\text{Xant}^2 \quad (\text{Pa.s}) \quad (4.6)$$

Avec $R^2 = 0,90$ & $Q^2 = 0,77$

$$\xi = -44,45 + 6,22\text{Na-CN} - 7,54\text{Xant} - 3,05\text{Na-CN}^2 + 0,81\text{Na-CN}\cdot\text{Xant} + 2,91\text{Xant}^2 \quad (\text{mV}) \quad (4.7)$$

Avec $R^2 = 0,93$ & $Q^2 = 0,80$

Visiblement, la qualité de ces trois modèles est plus que satisfaisante, tant que sur le plan ajustement que sur le plan prédiction, au vu de bonnes valeurs affichées des deux coefficients R^2 et Q^2 . Ceci nous amène à déterminer dans ce qui suit, l'effet de la concentration de chaque constituant, sur les caractéristiques du mélange aqueux, dans le domaine d'étude.

4.3.1 Influence des concentrations du xanthane et du Na-CN sur $G'o$.

Le modèle 4.5 de la réponse $G'o$, dénote que ce paramètre rhéologique est sensible à la concentration du xanthane et à un degré moins à celle du Na-CN. Par ailleurs, au regard de la valeur du coefficient a_{12} qui est égale à $-0,33$, et qui paraît être relativement importante, on peut suspecter une interaction négative entre les deux espèces polymériques, qui a tendance à affaiblir $G'o$ aux fortes concentrations simultanées des deux biopolymères. Cette interaction signifie que l'effet de l'un est conditionné négativement par l'accroissement du niveau de l'autre. Sur la figure 4.3, sont représentées, par simulation, les courbes d'influence du xanthane sur $G'o$, à divers niveaux de NaCN (de 1% à 6%) et la courbe expérimentale de référence de la solution à base seulement de xanthane. Visiblement, l'effet de ce hydrocolloïde est positif, mais a tendance à s'affaiblir aux fortes concentrations du NaCN. Dans ce cas, le polysaccharide perd quasiment toutes ses aptitudes de stabilisation.

Cette séparation de phases, pourrait-elle être provoquée par des interactions de floculation par déplétion, comme ça été proposé dans le cadre des systèmes

caséine-polysaccharide, à l'instar des mélanges caséine-guar [110], caséine-carrageenane [111], caséine-pectine [112] ou caséine-xanthane [113]. Ceci ne peut être possible, du fait que l'attraction par déplétion des particules protéiniques génère généralement une élévation de la viscosité du système [113]. En effet, dans notre cas, nous avons eu des séparations de phases accompagnées d'une perte drastique de la valeur du paramètre viscoélastique, G'_{0} . Hemar et all. [64] ont montré, en utilisant la microscopie confocale, que le système Na-CN-xanthane n'est pas gouverné par le même mécanisme d'interaction que celui du système caséine-xanthane. Ils ont montré que le mélange paraît non homogène et les agrégats de protéines de NaCN ne sont pas visibles sur le microscope, à l'opposition du cas du système caséine-xanthane, où les agrégats de caséines ont été observés. Aussi, faut-il déduire que le mécanisme d'incompatibilité thermodynamique, soutenu éventuellement par des interactions répulsives électrostatiques, est responsable de la chute de G'_{0} , et par la même de la séparation de phases du mélange, vue que les deux biopolymères portent le même signe de charge [96].

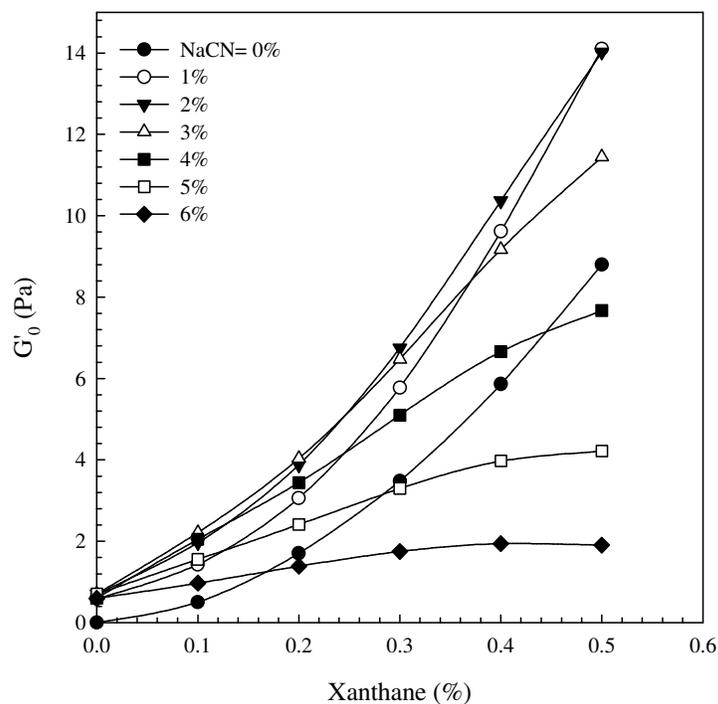


Figure 4.3 : Courbes d'influence du xanthane sur le module de conservation, G'_{0} , à diverses concentrations de Na-CN, à T ambiante et à pH neutre.

Manifestement, il existe une concentration critique de NaCN, à partir de laquelle la rigidité de la structure, par son module de conservation G'_0 , commence à s'affaiblir et auquel cas les interactions de ségrégation xanthane-NaCN prennent naissance. En effet, à la lumière du tracé des courbes d'influence du NaCN sur G'_0 , à diverses concentrations du xanthane, figure 4.4, on constate, à l'exception de la courbe associée à 0 % de xanthane, qu'elles sont toutes non monotones, constituées d'un tronçon croissant (G'_0 augmente) et d'un autre décroissant (G'_0 diminue). La concentration critique de NaCN, qu'on dénote NaCN^* , correspond en fait au début de diminution de G'_0 , et dépend, visiblement, de la concentration en xanthane. Il faut cependant signaler que cette concentration n'est pas synonyme d'une séparation de phase macroscopique du mélange.

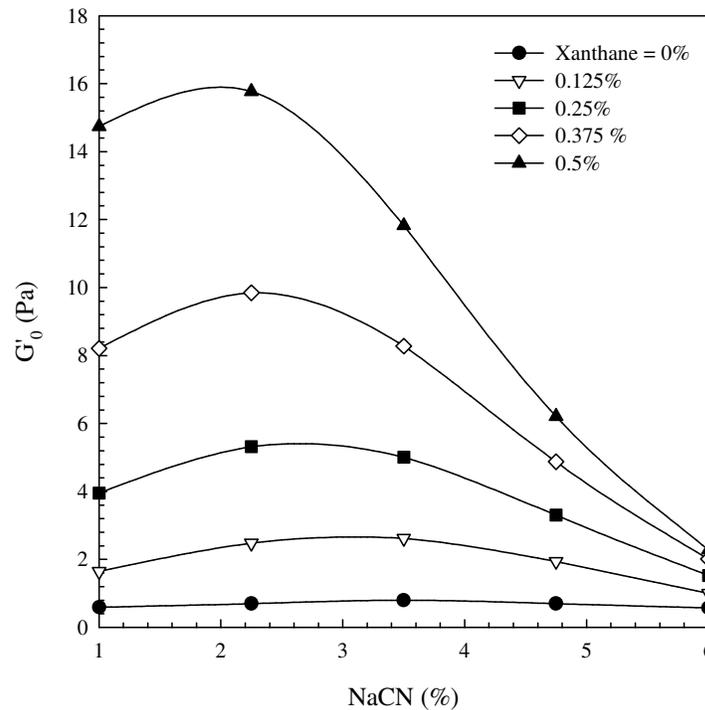


Figure 4.4 : Courbes d'influence du NaCN sur le module de conservation, G'_0 , à diverses concentrations de xanthane, à T ambiante et à pH neutre.

La concentration critique, NaCN^* , est associée, à la valeur optimale du polynôme $\text{Log}(G'_0(\text{NaCN}, \text{Xant}))$, donnée par l'équation (5). Donc :

$$\frac{\partial G'o}{\partial (NaCN)} = 0 \quad \text{Pour NaCN} = NaCN^* \quad (4.8)$$

Un calcul simple montre qu'elle s'exprime comme suit:

$$NaCN^* = - 4,24Xant + 3,39 \quad (4.9)$$

La représentation graphique de cette relation (figure 4.5), montre que $NaCN^*$ est d'autant petite que la quantité de xanthane est élevée. La valeur critique maximale de $NaCN = 3.39\%$, associée à 0% de xanthane, correspond à la valeur, auquel, la moindre quantité de xanthane qu'on y ajoute, donnerait naissance à des interactions négatives. Quant à la concentration minimale critique de $NaCN$ qui est de 1.27% , elle correspond à la quantité nécessaire susceptible de s'interagir avec le maximum de xanthane (0.5%), et en deçà de laquelle, les deux biopolymères seraient co-solubles et ne développeraient pas d'interaction ségrégative.

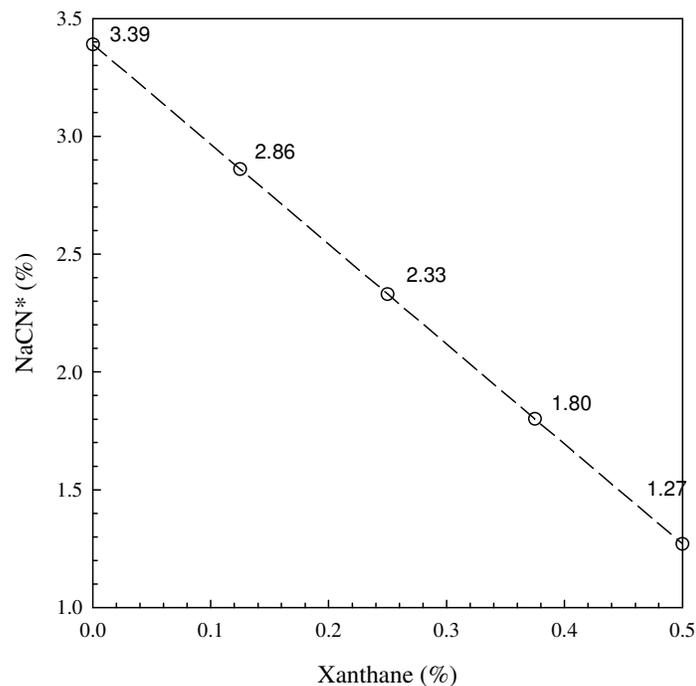


Figure 4.5 : Variation de la concentration critique, $NaCN^*$ en fonction de la concentration du xanthane, à T ambiante et à pH neutre.

La figure 4.6, représente le profil du paramètre $G'o$ en fonction de la variation simultanée du xanthane et du $NaCN$, donné sous forme de courbes iso- $G'o$. La ligne

critique (équation 4.9) constitue alors une frontière entre deux régions. La première, en dessous, on a une co-solubilité des deux espèces macromoléculaires avec absence d'interaction ségrégative. Dans ce domaine, le gradient de $G'o$ est positif et paraît être plus sensible à la concentration du xanthane que celle de NaCN. En revanche, dans la deuxième région, au-dessus de la ligne critique, $G'o$ diminue et sa sensibilité négative à la concentration du NaCN est d'autant importante que cette dernière est plus grande. Aussi, faut-il déduire que c'est cet ingrédient qui provoque les interactions négatives de ségrégation.

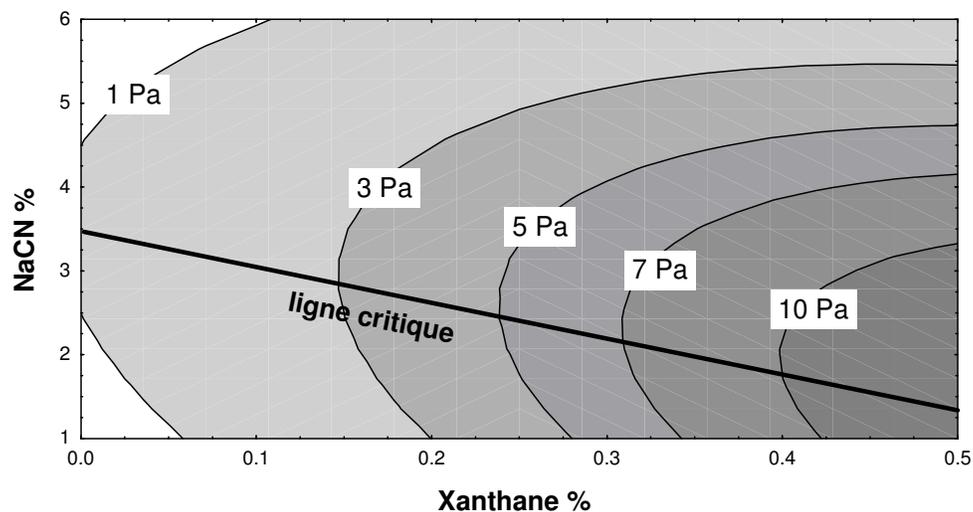


Figure 4.6 : Courbes iso- $G'o$ en fonction de la variation simultanée des concentrations du NaCN et du xanthane.

4.3.2 Influence des concentrations du xanthane et du NaCN sur la viscosité de Casson η_c :

La viscosité limite de Casson, η_c , est un paramètre qui traduit l'état structural de la matière, lorsque celle-ci est en écoulement extrême, associé à une vitesse de déformation infinie. Les macromolécules en suspension, sous l'effet de ce cisaillement maximum, enregistrent une désagrégation totale accompagnée d'un alignement des chaînes selon la direction du cisaillement. Les interactions attractives ou répulsives, au repos, sont sensées être négligeables devant les forces de répulsion de cisaillement. En conséquence, l'effet de l'ajout du xanthane ou du NaCN (figure 4.7) ne peut être que positif sur η_c , car l'augmentation du nombre de chaînes

et donc d'obstacles dans la solution, génère plus de résistance à l'écoulement. Toutefois, Hemar et al. [108], ont remarqué que la viscosité apparente à très fort taux de cisaillement ($\dot{\gamma} > 1000 \text{ s}^{-1}$), du mélange à base de xanthane et de NaCN, est constante, en fonction de l'ajout du NaCN.

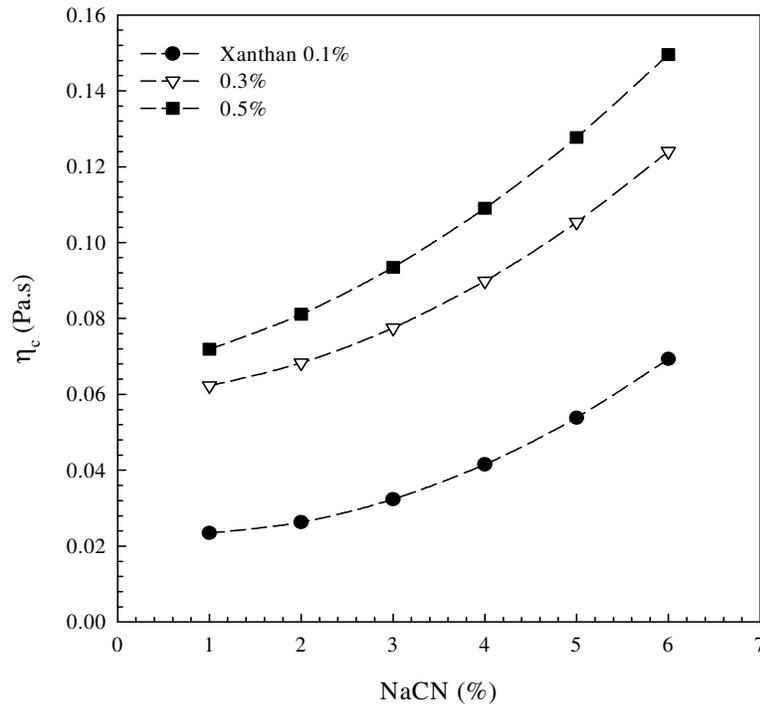


Figure 4.7 : Courbes d'influence du NaCN sur la viscosité de Casson, η_c , à diverses concentrations de xanthane, à T ambiante et à pH neutre

Par ailleurs, à l'examen de la figure 4.8, sur laquelle on présente l'état de la stabilité de la solution polymérique en fonction de η_c , on observe clairement que la séparation en deux phases, l'une riche en polysaccharide et l'autre en protéine, ne peut avoir lieu, que lorsque la viscosité limite de Casson est au-delà d'une valeur critique, $\eta_c = 0.1 \text{ Pa.s}$. Cette viscosité critique correspond en fait, à l'état où le système devient très dense en macromolécules, si bien que les interactions ségréatives qui résultent deviennent intenses et mèneront le système aqueux à une séparation de phase.

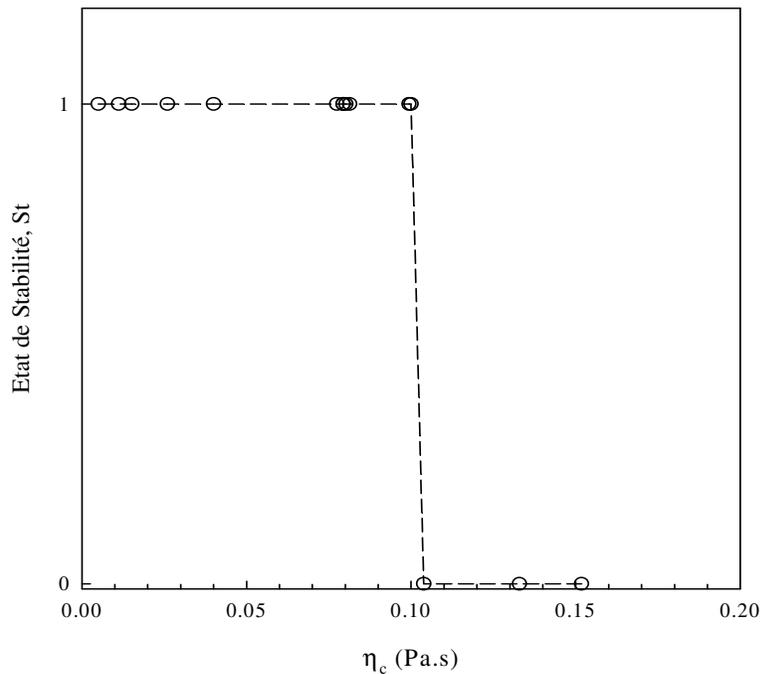


Figure 4.8: Stabilité du mélange aqueux en fonction de la viscosité de Casson : Solution homogène stable, $St = 1$, solution instable, $St = 0$, à T ambiante et à pH neutre.

Ainsi, en remplaçant, dans l'équation 4.6, la viscosité de Casson, η_c , par la valeur critique, notée $\eta_c^* = 0,1$ Pa.s, on obtient l'équation implicite de la ligne binodale (équation 4.10), qui sépare le domaine dans lequel la solution est homogène à celui où le système est biphasique.

$$0.1 - (0,07 + 0,03\text{Na-CN} + 0,05\text{Xant} + 0,01\text{Na-CN}^2 + 0,001\text{Na-CN}\cdot\text{Xant} - 0,02\text{Xant}^2) = 0 \quad (4.10)$$

Le diagramme de phase (figure 4.9), sur lequel on observe les deux domaines séparés par la ligne binodale, est obtenu par le tracé des contours iso- η_c . Il apparaît, au regard de ce graphique, que la variation de la viscosité limite de Casson dépend fortement de la concentration du xanthane, lorsque celle-ci est faible et devient de plus en plus sensible au NaCN lorsque la quantité du xanthane est relativement élevée. Aussi, il n'existe aucune bibliographie qui donne le diagramme de phase du système xanthane-NaCN, pour qu'on puisse comparer ces résultats.

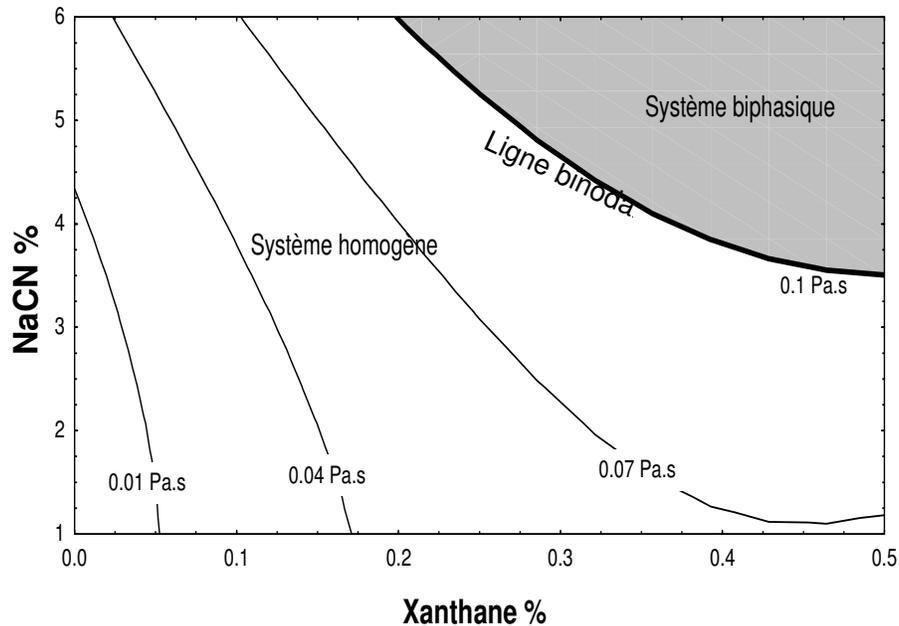


Figure 4.9 : Diagramme de phases du mélange NaCN xanthane en solution à T ambiante et à pH neutre

4.3.3 Influence de la concentration du xanthane et du NaCN sur le potentiel zêta ξ :

Le but de cette étude d'effet, est de voir la part de la contribution des interactions éventuelles électrostatiques répulsives, génératrices de l'affaiblissement de la rigidité de la structure, du fait que les deux polymères sont anioniques et donc sont pourvus des mêmes signes de charges négatives. Le xanthane a un effet positif sur le potentiel zêta, au regard de la figure 4.10, particulièrement pour des concentrations faibles de NaCN. Néanmoins, cet effet s'atténue par la présence en excès du NaCN. En conséquence, les interactions électrostatiques répulsives dans ces conditions ne peuvent que s'affaiblir.

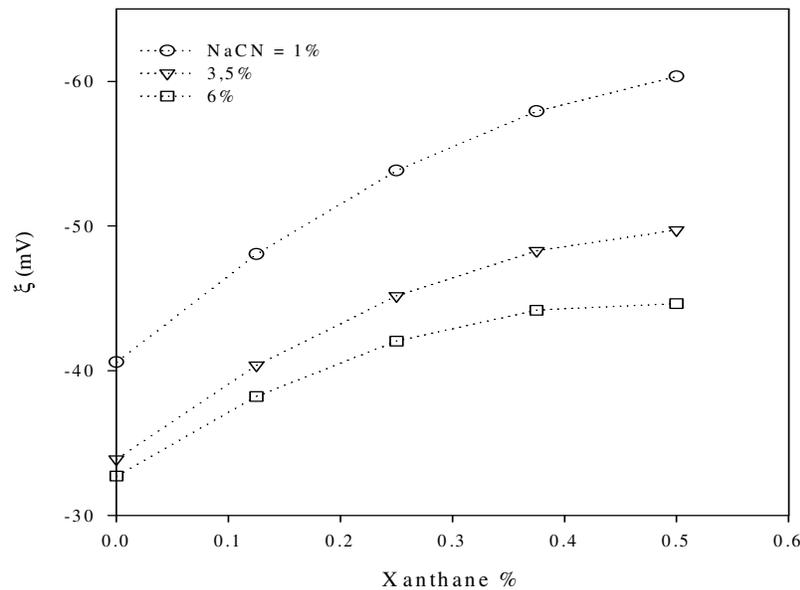


Figure 4.10: Courbes d'influence du xanthane sur le potentiel Zêta, ξ .
(Solution diluée au 1/10, $T = 20^\circ\text{C}$)

Par ailleurs, en dépit du caractère légèrement anionique du NaCN, il apparaît que l'augmentation de la concentration de cet élément fait diminuer le potentiel zêta (figure 4.11), même en absence du xanthane. L'abaissement de ξ avec l'augmentation de la concentration de NaCN, peut être dû à l'augmentation du nombre des submicelles qui auront des difficultés à se déplacer lorsqu'elles sont soumises au champ électrique E . Ainsi, leur vitesse de déplacement, V , sera plus faible et leur mobilité électrophorétique, $\mu = V/E$, sera également plus petite de même par ailleurs leur potentiel zêta ($\xi = (3/2)\eta\mu/\epsilon\epsilon_0 f(\kappa a)$, relation d'Henry [114]). μ est la mobilité électrophorétique, η est la viscosité du milieu suspendant, $\epsilon\epsilon_0$ est la constante diélectrique du liquide, a est le rayon de la particule considérée, κ est l'inverse de la distance de la double couche diffuse et $f(\kappa a)$ est une fonction de forme.

Une autre cause de la diminution du potentiel zêta peut être possible par l'augmentation de la taille des particules de NaCN. En effet, si avec l'augmentation de la concentration de NaCN, on a un assemblage macromoléculaire de la protéine, alors la valeur du facteur de forme $f(\kappa a)$ de la relation d'Henry augmente, faisant chuter par la même la valeur de ξ [114]. En effet :

- Si $\kappa a > 100 \rightarrow$ le rayon de la particule, a , est assez grand. En conséquence le potentiel zêta aura comme expression : relation de Smoluchowski : $\xi = \eta\mu/\epsilon\epsilon_0$.
- Si, en revanche $\kappa a < 1 \rightarrow a$ est très petit, alors $f(\kappa a) = 1$. Dans ce cas le potentiel zêta, donné par l'équation de Hückel, aura comme expression: $\xi = 3/2(\eta\mu/\epsilon\epsilon_0)$.

Visiblement, selon ces deux relations, l'augmentation de la taille des particules fait diminuer le potentiel zêta jusqu'à 1,5 de sa valeur. Dans notre cas d'étude, lorsque la concentration de NaCN passe de 1 % à 6 %, le potentiel chute d'un facteur de 1,24.

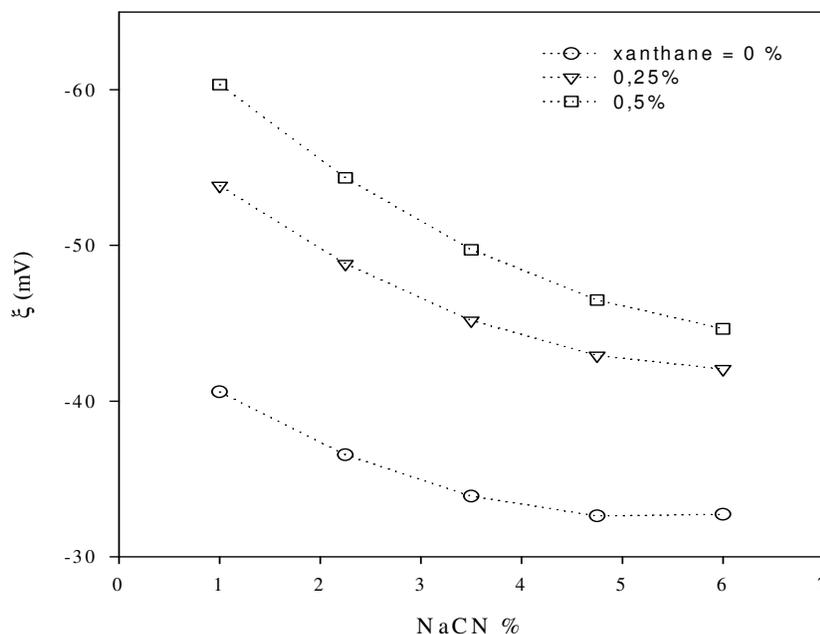


Figure 4.11 : Courbes d'influence du NaCN sur le potentiel Zêta, ξ , à diverses concentrations du xanthane, à T ambiante et à pH neutre. (Solution diluée au 1/10)

4.4 Conclusion

Dans ce travail, il a été question d'étudier l'effet des concentrations du caséinate de sodium et du xanthane ainsi que leurs interactions sur les propriétés rhéologique et zétamétrique du mélange aqueux. Pour ce faire, nous avons préparé

et caractérisé une série d'essais, et avons modélisé les résultats par des fonctions polynomiales, avec l'hypothèse de considérer que les effets sont non linéaires et que les interactions d'ordre 1 peuvent exister.

Il ressort de l'étude d'effet sur les propriétés rhéologiques, qu'au delà d'une certaine concentration critique de NaCN qui dépend de la quantité mise en jeu de xanthane, des interactions répulsives prennent naissance, se traduisant par l'affaiblissement du module de rigidité G' et, causant par la même un relâchement de la structure polymérique. Cet état de fait ne génère pas systématiquement une séparation de phase, ce qui laisse les deux espèces polymériques demeurer au sein de la même phase aqueuse. Cependant, dans le cas où la viscosité de Casson, dépasse la valeur critique 0.1 Pa.s, alors les interactions ségréatives entre le xanthane et le NaCN vont mener le système inéluctablement à une séparation de phase, l'une riche en NaCN et l'autre en xanthane.

L'examen des effets du polysaccharide et de la protéine sur le potentiel zêta du mélange aqueux, a montré que les interactions répulsives électrostatiques sont d'autant faibles que la concentration de NaCN est élevée. Ce phénomène est vraisemblablement dû au grand nombre de micelles formées qui provoquent un affaiblissement du potentiel zêta, à cause de leur faible mobilité électrophorétique, et du facteur de forme, $f(\kappa a)$ qui fait chuter ce potentiel de 1,5 de sa valeur. Ainsi, les seules interactions répulsives mises en jeux, qui sont responsables de la fragilité du réseau polymérique sont de nature thermodynamique, et sont causées probablement par les différences au niveau de la structure chimique de l'hydrocolloïde et du tensioactif polymérique.

CHAPITRE 5

CARACTERISATION DU CASEINATE DE SODIUM EN SOLUTION EN FONCTION DE LA FORCE IONIQUE, DU pH ET DE LA TEMPERATURE PAR UTILISATION DE LA DIFFUSION DE LA LUMIERE STATIQUE ET DYNAMIQUE

5.1 Introduction

La caséine est l'élément protéique principal du lait où elle est présente sous forme de complexes sphériques polydispersés contenant les protéines de caséine et du phosphate de calcium colloïdal (CCP). Quatre protéines principales de caséine peuvent être distinguées [115] : α_1 , α_2 , β et κ -caséine, avec une fraction en poids de 0.4 : 0.08 : 0.4 : 0.1 et approximativement la même masse molaire ($M \approx 2 \times 10^4$ g/mol). Le complexe natif de la caséine dissocié après élimination de CCP (phosphate de calcium colloïdal) donne un mélange de protéines individuelles de caséine appelées « caséinate de sodium ». Les protéines de caséinate de sodium sont couramment employées dans l'industrie pour ses excellentes propriétés fonctionnelles et alimentaires. Elle a été caractérisée en solution aqueuse par utilisation de la diffusion de la lumière statique et dynamique, par un nombre des groupes de chercheur avec des résultats parfois contradictoires [11-14, 116-117].

Il a été trouvé dans les solutions de caséinate de sodium une fraction de particules relativement petite ayant un rayon d'environ 80nm [11-14, 116]. La diffusion de la lumière par ces particules domine celle des particules de caséinate et empêche, par la même, une caractérisation appropriée par la technique de la diffusion de la lumière. La nature des grandes particules est, jusqu'ici, inconnue, mais il est clair qu'elles ne peuvent pas être des caséines natives résiduelles puisque, contrairement à ces dernières, elles ne se sont pas précipitées pendant l'ultracentrifugation. Comme ça a été expliqué par Chu et al. [11], l'intensité relative de la diffusion des grandes particules peut être forte même si la fraction en poids est très petite. Par conséquent, beaucoup de soin doit être donné aux échantillons préparés afin d'éliminer, autant que possible, les grandes particules. Malheureusement, la purification complète n'est pas possible et donc la diffusion de la lumière dynamique est nécessaire pour distinguer la contribution des caséinates de sodium de celle des grandes particules.

Dans le cas où la purification des solutions de NaCN a été tenue en compte, divers auteurs ont observé de petites particules micellaires constituées de différentes molécules de caséine, en plus, des grandes particules [11,14,118]. Ces petites particules micellaires s'appellent parfois des submicelles afin de les distinguer des complexes natifs de caséine qui, pour des raisons historiques, s'appellent abusivement des micelles de caséine. L'emploi du terme submicelle ne devrait pas être pris pour impliquer que les particules micellaires constituées par les caséinates de sodium font partie de la structure interne des complexes natifs des caséines. En présence du sel monovalent, des submicelles se sont avérées avoir un rayon hydrodynamique (R_h) d'environ 10nm et se composent d'environ 15 molécules de caséine [119].

Les submicelles constituées par la caséinate de sodium sont très semblables à celles formées après la dissociation de la caséine native par la chélation du calcium [119]. Egalement, des submicelles formées par des β -caseine est κ -caseine pures en solution, de taille similaire, ont été déterminées [107,120].

Divers auteurs ont étudié l'agrégation de NaCN en solution et ont montré sa dépendance, notamment à la température [11,121-122], au pH [123-125], à la force ionique [117,126-127] et à la concentration en ion de calcium [11, 13].

La présente étude est motivée par le manque d'informations précises sur les caractéristiques des particules de caséinate de sodium. On étudiera alors l'effet de la concentration en protéine, de la concentration en NaCl, de la température et du pH sur les paramètres moléculaires et d'interaction thermodynamique des populations qui s'y trouvent dans la solution.

5.2 Matériels et méthodes :

5.2.1 Préparation des solutions de caséinate de sodium :

De la poudre de NaCN (fournie par DMV International, France) est dissoute avec 200 ppm d'azidure de sodium dans de l'eau Millipore (18M Ω) à pH 7 et à T=20°C. Cette préparation est alors ultracentrifugée à 59,000g pendant 2heures. A l'issue de cette opération, il apparaît un sédiment au fond du tube qui représente de la matière insoluble, un voile surnageant riche en matière grasse et une phase intermédiaire riche en protéine. On prélève alors délicatement cette dernière, avec une seringue et on la fait passer par un filtre dont le diamètre des pores est de

0.22 μ m. Le pH de la préparation est de 6.7. Enfin on détermine la concentration en protéine de la préparation par absorption UV à 280 nm, auquel le coefficient d'extinction moléculaire, ϵ , est égal à 0.81 mL.mg⁻¹.cm⁻¹. Cette valeur concorde avec les données trouvées dans la littérature [127-129]. La quantité de protéine qui a été éliminée par cette méthode n'excède pas 5%.

Quelques expériences ont été répétées avec un échantillon de caséinate de sodium préparé à partir de la caséine native [123-124] par précipitation à pH 4.7 et par plusieurs lavages dans de l'eau desionisée.

5.2.2 Mesure de la diffusion de lumière :

La mesure de la diffusion de lumière en dynamique et en statique a été effectuée sur un système ALV- 5000 multibit multi- τ corrélateur, couplé à un goniomètre de type Malvern et à un laser solide (Millina, Spectra Physics), polarisé verticalement à une longueur d'onde $\lambda = 532$ nm. Les données expérimentales sont collectées à des angles de diffusion entre 10° et 140°, ce qui correspond en vecteur d'onde de diffusion à $2.710^{-3} < q < 3.010^{-2}$ nm⁻¹. La cuve, dans laquelle se trouve la cellule de diffusion, est thermostatée par un bain externe au système. On a utilisé, par ailleurs, le toluène comme standard avec un nombre du rapport de Rayleigh, $R(\lambda_0) = 2.79 \cdot 10^{-5}$ cm⁻¹ et on a pris 0.189 comme valeur pour l'incrément d'indice de réfraction des caséinates [118]. Les données expérimentales d'intensité dynamique, sont traitées par un programme, GENDIST, à partir duquel on obtient la distribution des temps de relaxation des populations.

5.2.3 Mesure de la turbidité :

La turbidité, τ , des solutions de caséinate de sodium, est obtenue par détermination de leur absorbance, Abs, à 450 nm, en utilisant l'équation suivante : $\tau = \text{Abs} \times \ln 10 / \Delta l$. Δl est la longueur parcourue du faisceau lumineux dans la cellule.

5.3 Résultats et discussions :

Sur la figure 5.1, sont représentées les courbes de distribution des temps de relaxation (a) et de la fonction inverse d'auto-corrélation de l'intensité, $G_2(q,t)^{-1}$ (b), pour une solution à 40g/l de caséinate de sodium et à 100mM de NaCl. La figure 1a

montre qu'il y a deux modes. Un mode lent et un mode rapide qui relaxent à des temps de 117 μs et de 720 μs respectivement.

Ces deux pics distincts sont associés à la diffusion rapide des caséinates et à la diffusion lente des grosses particules respectivement. L'amplitude relative du pic lent dépend fortement de la méthode de préparation de l'échantillon. Nous avons trouvé que l'amplitude du pic rapide, associé aux caséinate de sodium, était comparable à celle rapportée par Chu et al. [11] (écart de 30%) aux conditions de pH et de force ionique similaires. Nash et al. [14], qui ont filtré les solutions mais ne les ont pas centrifugées, ont trouvé une amplitude plus faible (< 10%).

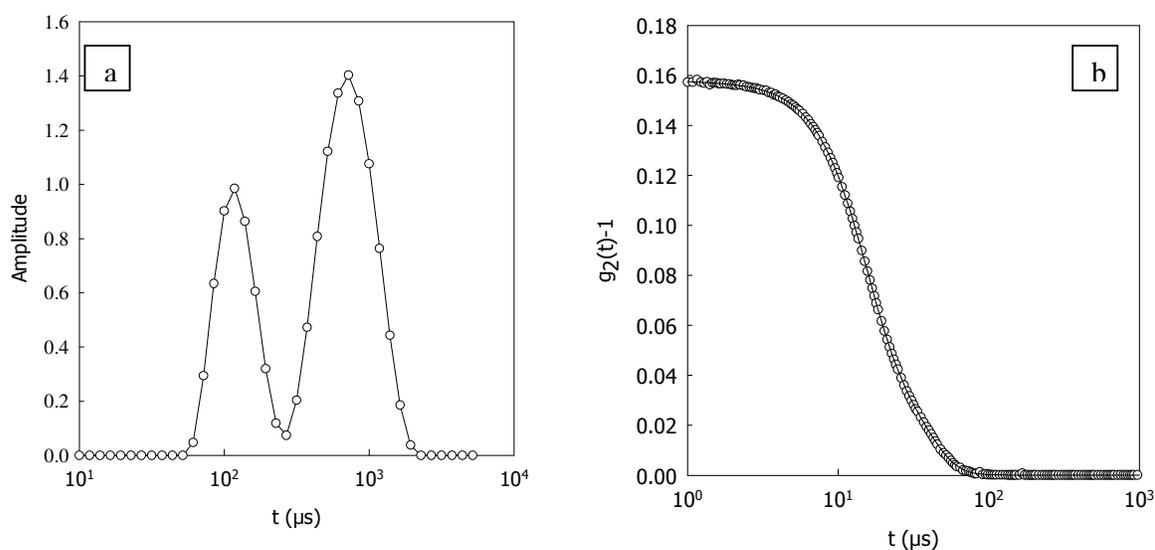


Figure 5.1 : Courbes (a) de distribution du temps de relaxation et (b) du corrélogramme pour une solution à 40g/l de caséinate de sodium contenant 100mM de NaCl et 3mM d'azidure de sodium à $T = 20^\circ\text{C}$.

Les grosses particules ont été également observées dans les solutions de caséinate, suite à la chélation de Ca^{2+} des complexes natifs de caséine et des solutions contenant des β -caseines pures [119]. De Kruif et al. [130] ont également observé, par DLS, un mode de relaxation lent pour des solutions de β -caseine pure, mais n'ont pas discuté l'origine de la provenance de ce mode lent. Lorsque la solution n'est pas centrifugée, l'intensité diffusée serait dominée par les gros objets. Cependant, R_h reste approximativement le même avant ou après la centrifugation,

impliquant que la centrifugation ne permet pas d'éliminer les grosses particules qui ont une taille importante, mais une densité probablement proche à celle de l'eau.

La présence concomitante de deux populations ne fait pas l'unanimité des auteurs. Il y a ceux qui n'ont trouvé qu'une seule population [13, 14, 117]. En effet, en utilisant la granulométrie à laser, O'Kennedy a mesuré un rayon moyen de 80 nm et en appliquant la diffusion de lumière en dynamique, Dickinson a trouvé 100nm. Ces deux auteurs considèrent que ces gros objets sont des particules de caséinate de sodium. Quant à Lucey, en utilisant la SLS, a remarqué que le rayon de giration est aux alentours de 123 nm et a justifié cette grande valeur par le fait de la présence de la matière grasse dans la solution. Ce rayon diminue à 22 nm lorsque la préparation est centrifugée et donc dépourvue significativement de cette matière lipidique. A l'inverse, Chu et Nash [11,14] ont observé plutôt deux populations distinctes. En utilisant la DLS, ces deux auteurs ont trouvé un rayon hydrodynamique du mode rapide de 8.8 ± 1 nm et de 10 nm respectivement. Ces auteurs ont identifié cette population comme étant de submicelles de caséine. Quant aux gros objets, ils ont trouvé quasiment la même taille : 74 ± 4 nm et 80 nm respectivement. Nash les a considérés comme une espèce d'assemblage macromoléculaire et Chu a montré que leur concentration est négligeable devant la concentration des submicelles. Sur le tableau 5.1, sont résumés les résultats des auteurs en fonction des conditions de préparation des solutions de caséinate et de techniques de caractérisation.

Tableau 5.1 : Nombre et taille des populations en fonction des conditions de préparation et de purification des solutions de NaCN.

	Ultracentrifugation	Filtration	Force ionique	pH	T	Mesure	Nombre population	Rayons nm
Dickinson 1998 [13]	4000rpm	0.65 μ m	0mM	7.00	20°C	DLS	01	100
O'Kennedy 2005[117]	-	-	0mM	5.24	60°C	Zetamaster	01	80
Lucey 2000[131]	90,000g	0.22 μ m	50mM NaCl	7.00	22°C	SLS	01	22
Chu 1995 [11]	100,000g	0.22 μ m	110 mM KCl	6.75	20°C	DLS	02	8.8/74.4
Nash 2002 [14]	-	0.22 μ m	100mM NaCl	-	20°C	DLS	02	8/70
Notre travail	59,000g	0.22 μ m	100mM NaCl	6.70	20°C	DLS	02	11/64

5.3.1 Dépendance à la force ionique

Des mesures statique et dynamique de diffusion de la lumière ont été réalisées sur une série de solutions de caséinate avec des concentrations en protéine variant entre 5g/L et 50g/L, à diverses concentrations de NaCl rajoutées (de 0mM à 500mM). On note que toutes les solutions contiennent 3mM d'azidure de sodium laquelle on a tenu compte dans la concentration en sel (C_s). Le pH a été ajusté à 6.7 et la température a été maintenue à 20°C.

De prime abord, on s'intéresse à l'effet que peut produire le sel sur la polydispersité du système. Ceci peut se voir à partir des courbes de distributions du temps de relaxation, figure 5.2. Il est clair que la réduction de la concentration ionique a fait diminuer l'amplitude relative des pics du mode rapide et a fait déplacer le temps de relaxation à des valeurs plus petites. Ce comportement est accompagné d'un élargissement de la distribution. Quand à la distribution lente, associée aux grosses particules, celle-ci paraît ne pas subir de décalage, mais semble également s'élargir. Cependant, on s'abstient quand à l'interprétation de la largeur des distributions, du fait que les résultats sont obtenus à partir d'un calcul numérique se basant sur la transformation de l'Inverse de Laplace.

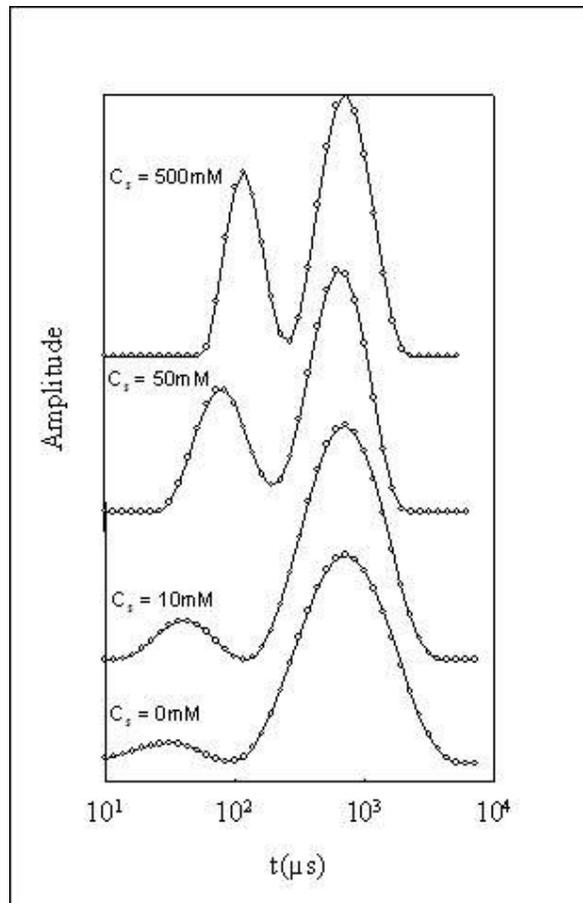


Figure 5.2 : Influence de la concentration du sel sur la distribution du temps de relaxation des solutions de caséinate ($C = 40\text{g/L}$, $T = 20^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6.7$ et $q = 2.2 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$).

Les figures 5.3-a et 5.3-b montrent la dépendance de la masse apparente, M_a , et du rayon hydrodynamique apparent, R_{ha} des submicelles, de la concentration de NaCN et cela à diverses concentrations de NaCl. A noter que ces deux grandeurs ne présentent pas de dépendance angulaire.

Ainsi, on remarque qu'aux fortes valeurs de force ionique ($\geq 100 \text{ mM}$), R_{ha} est pratiquement insensible à la concentration de la protéine, essentiellement dans le domaine où la concentration de NaCN est inférieure à 20g/l . Le même phénomène est observé pour la masse apparente, M_a .

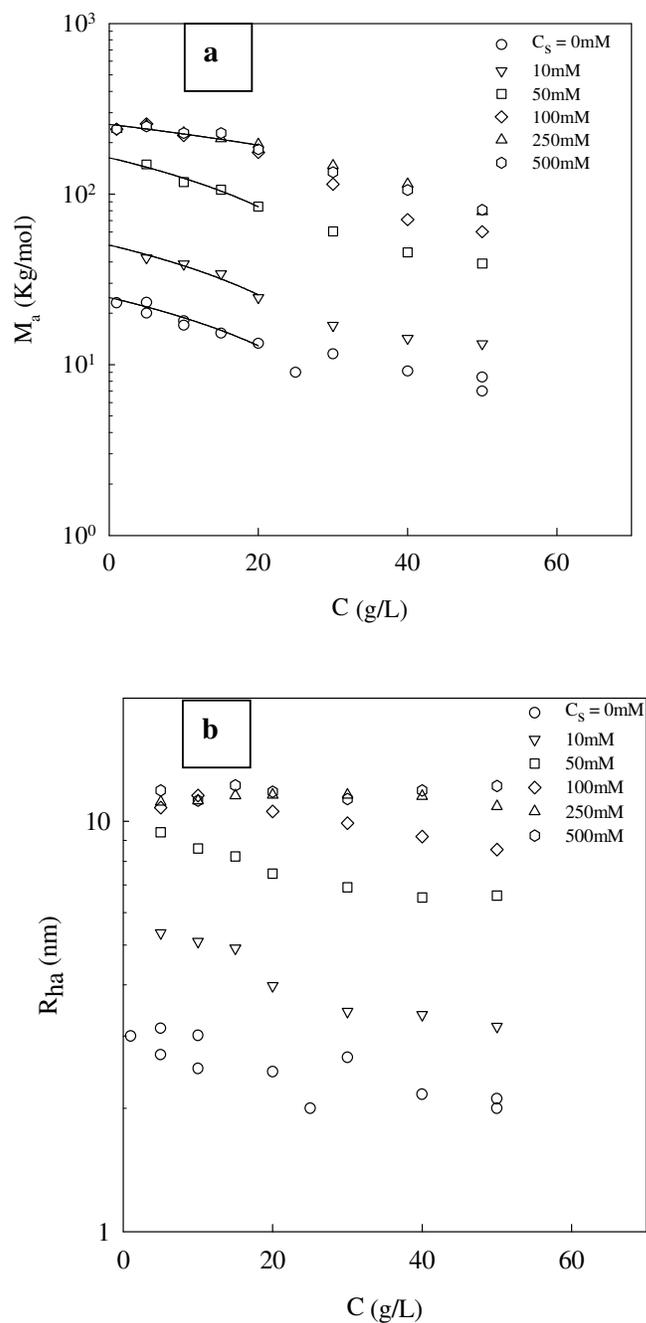


Figure 5.3 : (a) Dépendance de la masse apparente, M_a et (b) du rayon hydrodynamique apparent, R_{ha} , des submicelles en fonction de la variation de la concentration du caséinate à diverses concentrations de NaCl. pH = 6.7 et T = 20 °C.

De la figure 5.3b, on mesure l'intercepte ($C_{NaCN} = 0$ g/l) qui représente, en fait, le rayon hydrodynamique R_h , pour lequel le système est dilué à l'infini (pour éliminer les interactions interparticulaires). Egalement, on déduit des données expérimentales,

représentées sur la figure 3a, les valeurs de la masse moléculaire, $M_w = M_a$ ($C_{NaCN} \rightarrow 0$ g/l) ainsi que la valeur du second coefficient de viriel, A_2 , en s'appuyant sur l'expression au limite : $C_{NaCN} \rightarrow 0$, $1/M_a = 1/M_w (1+2M_w A_2 C)$ [78].

La variation de deux paramètres moléculaires des submicelles de caséine, à savoir, M_w et R_h ainsi que le paramètre thermodynamique d'interaction, A_2 , en fonction de la concentration en NaCl, est montrée sur les figures 5.4 et 5.5 respectivement. Au vu de ces résultats, il apparaît que M_w et R_h , augmentent sensiblement en fonction de l'ajout de NaCl et se stabilisent autour de 300 Kg/mole et 10 nm, pour des quantités de sel ≥ 100 mM. Ces résultats concordent avec ceux de Panouillé ($M_w = 400$ Kg/mole, $R_h = 12$ nm) [150]. Manifestement, le sel favorise les interactions d'attraction au détriment des interactions de répulsion électrostatique qui s'affaiblissent par effet écran. Quant au paramètre d'interaction, A_2 , sa valeur chute avec l'augmentation du sel et se stabilise à une valeur de l'ordre de $0.5 \cdot 10^{-8}$ mole.l/g².

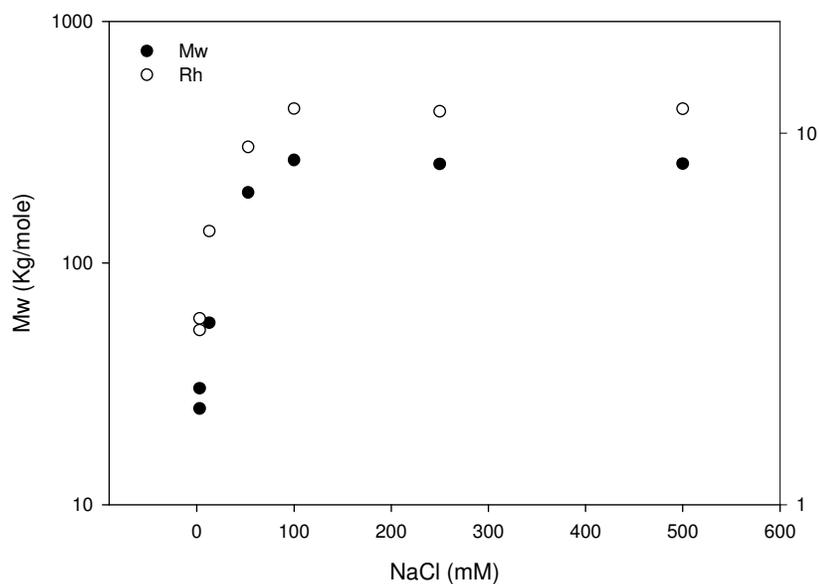


Figure 5.4 : Variation du poids paramètre moléculaire M_w et du rayon hydrodynamique R_h en fonction de la quantité de NaCl mise en jeu. pH = 6.7 et T=20 °C.

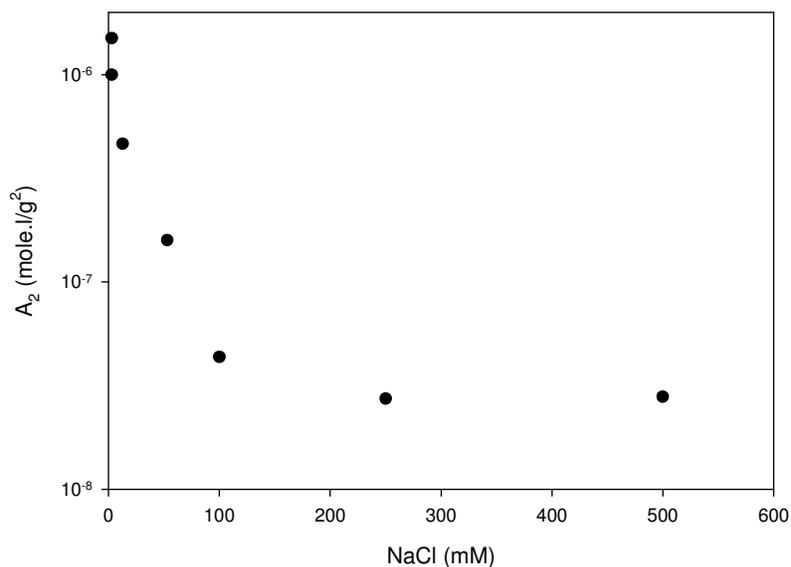


Figure 5.5 : Variation du paramètre d'interaction A_2 en fonction de la quantité de NaCl mise en jeux. pH = 6.7 et T=20 °C.

Pour ce qui est de la deuxième population, associée au mode lent, il a été constaté que leur masse apparente, Ma_2 présentait une dépendance angulaire significative. En revanche leur rayon hydrodynamique apparent, Rh_{a2} reste insensible. Ainsi, on s'est intéressé au calcul de la valeur moyenne de Rh_{a2} sur les angles afin de déterminer sa variation en fonction de la concentration de la protéine et de la force ionique (figure 5.6). On remarque, que la taille de cette deuxième population ne dépend ni de la concentration de la protéine, dans le domaine de variation, ni de la concentration de NaCl. Ceci peut conforter l'idée qu'il s'agit d'un complexe qui contient, notamment, de la matière grasse et que c'est cette dernière qui conditionne la taille de cet assemblage. La valeur moyenne du rayon hydrodynamique est de 60 ± 10 nm et est proche des valeurs trouvées par Chu et Nash [11 ,14]. Toutefois, nous considérons que cette matière n'est pas constituée exclusivement de protéine.

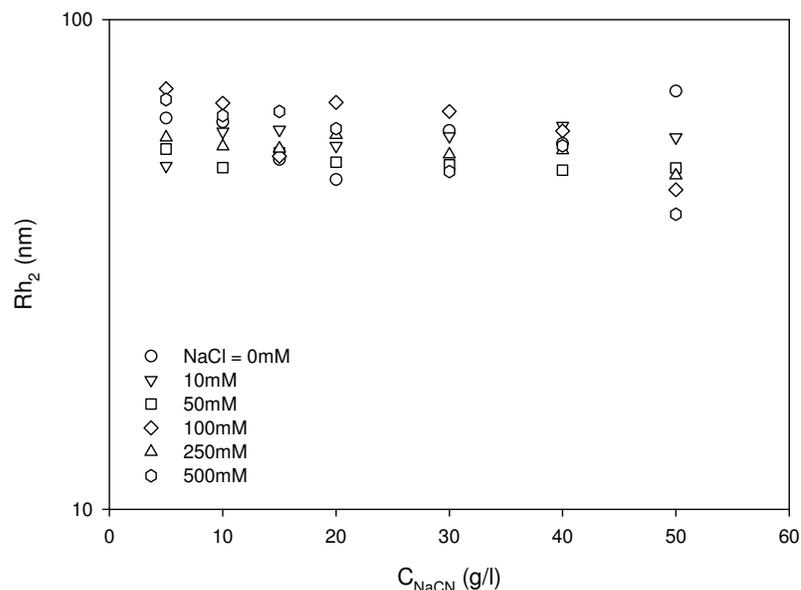


Figure 5.6 : Variation du rayon hydrodynamique, Rh_2 , des gros agrégats en fonction de la concentration de la protéine, à diverses quantités de sel. $pH = 6.7$ et $T=20^\circ C$

5.3.2 Effet du pH

Afin d'éviter une acidification brutale et donc la formation locale d'agrégats dans les solutions de NaCN, on additionne progressivement et sous agitation, aux échantillons (20g/l, 0mM et 250mM de NaCl, $T=20^\circ C$), une solution de HCl à 0.01 molaire. On détermine alors la turbidité, τ , en mesurant l'absorbance pour une longueur d'onde $\lambda = 450$ nm et en utilisant la relation : $\tau = Abs_{450nm} * Ln10/L$.

La figure 5.7, montre qu'en absence ou en présence de NaCl, la turbidité, devient sensible à l'acidification à partir du pH 5.6. Toutefois, en présence de NaCl, le développement de cette turbidité est plus lent. Ces constatations sont en accord avec celles faites par O'Kennedy [117], bien qu'il ait trouvé un pH , à partir duquel la turbidité est sensible, plus bas (pH 5.24). On a constaté, par ailleurs, que la dispersion devient instable pour un pH 5.2 et 4.9 en absence et présence de NaCl respectivement. Ces résultats sont proches de ceux de Braga (sans NaCl, $pH = 5.1$) [124], de Lucey (120 mM de NaCl, $pH = 5$) [131] et de O'Kennedy (100mM NaCl, $pH = 4.9$) [117].

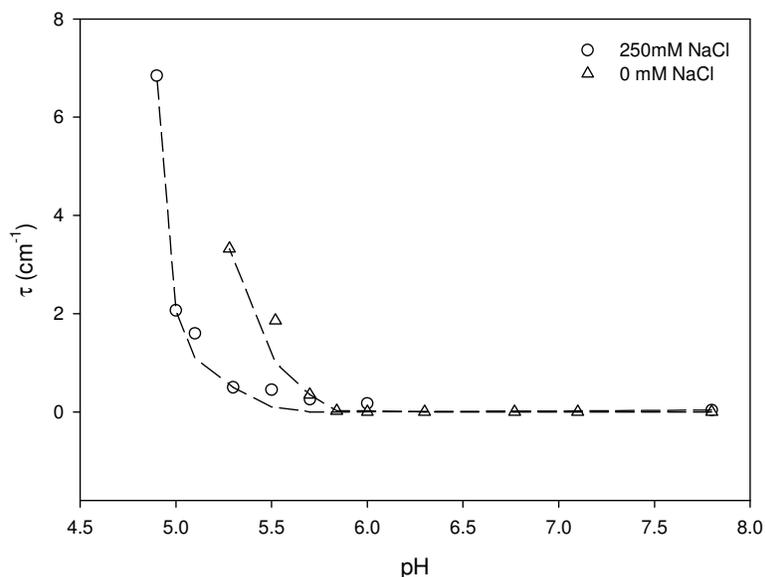


Figure 5.7 : Evolution de la turbidité à $\lambda = 450$ nm en fonction de la diminution du pH, de solutions de caséinate de sodium à 20g/l, contenant 0mM et 250 mM NaCl, T = 20°C.

Dans le but de voir comment évoluent les paramètres moléculaires et d'interaction lors du développement de la turbidité par acidification, on analyse, par DLS et SLS, des solutions de NaCN (20g/l, 10g/l, 5g/l et 1g/l), en présence et en absence de NaCl (0mM et 250mM), à divers pH. La variation des deux paramètres caractéristiques moléculaires, M_w et R_h , des submicelles, est représentée sur la figure 5.8. On remarque qu'en deçà d'un certain pH (pH 6.5 pour 0mM de NaCl et 6.0 pour 250mM de NaCl), ces deux paramètres deviennent sensibles à l'acidification et qu'en absence de NaCl, leur accroissement commence plus tôt et est plus rapide. Cette sensibilité à l'acidification se traduit par un processus d'agrégation des submicelles en de gros objets. En effet, on constate que M_w et R_h augmentent d'un facteur de 15 et de 4 (en présence de NaCl) et d'un facteur de 16 et de 8 (sans NaCl) respectivement. Pour ce qui du second coefficient de viriel, A_2 , il a été constaté que toutes les valeurs enregistrées sont très faibles, de l'ordre de 10^{-8} mole.l/g² et de ce fait sont insignifiantes. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles trouvées par Ruis [125], lorsque le pH ≥ 5 . Egalement Dickinson [13] a constaté que A_2 était très petit (mais négatif) et ne dépendait pas de la force ionique, à pH 5.5.

Il n'est pas inintéressant de souligner que le rayon hydrodynamique associé au mode lent est resté insensible à la variation du pH dont la valeur est de 60 ± 10 nm.

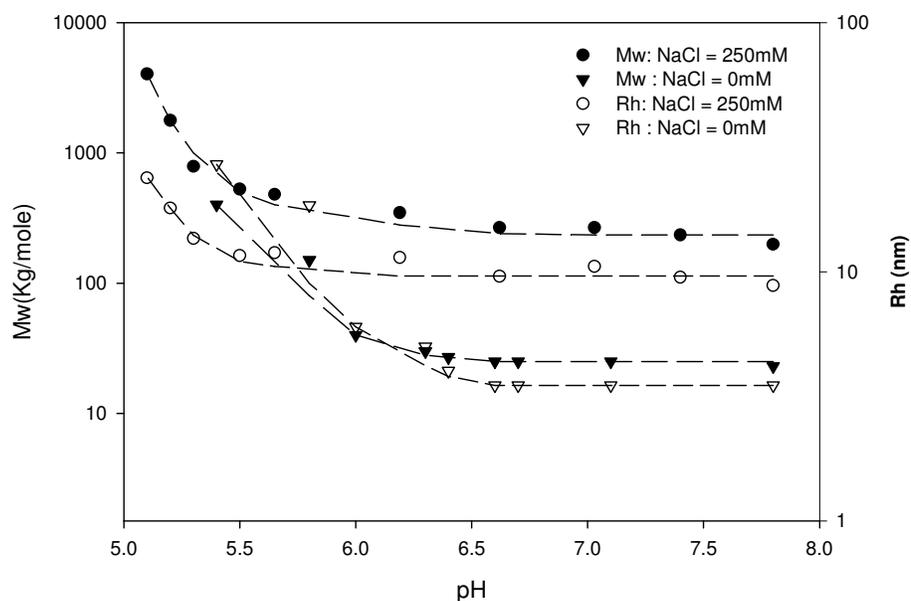


Figure 5.8 : Variation des paramètres moléculaires M_w et R_h des submicelles de caséinate en fonction du pH pour une solution de caséinate de sodium contenant 250mM de NaCl, $T=20^\circ\text{C}$.

5.3.3 Effet de la température.

Dans cette partie, on s'intéresse en fait à l'effet que la température peut générer sur les solutions de caséinate en termes de cinétique de formation d'agrégats ainsi que de stabilité. Les variations de la force ionique et du pH dans le système seront considérées.

a) Effet de la température à diverses concentrations de NaCl.

Les solutions de caséinates de sodium sont stables dans le temps à 20°C . En effet, nous avons suivi et analysé par DLS deux solutions à 40g/l de protéine, avec 0mM et 100mM de NaCl, pendant deux semaines. Il a été remarqué, à l'issue de traitement des données de l'intensité dynamique, que la taille de leurs populations est restée stable. Egalement, il a été observé que les solutions ont gardé leur aspect transparent. Aussi, est-il important de connaître l'impact de l'augmentation de la température sur ces systèmes. Pour ce faire, on a imposé une température de 70°C

à des solutions à 20g/l de caséinate (de 0mM à 500mM en NaCl) et on a mesuré d'une part l'intensité diffusée de la lumière à 30° et d'autre part l'absorbance par UV. On calcule alors de la première analyse I_r qui représente l'intensité relative de la lumière, corrigée par l'intensité du solvant et normalisée par une intensité d'un standard, à savoir le toluène. De l'absorbance, Abs, on détermine la turbidité, τ de la solution : $\tau = \text{Abs} \cdot \text{Log}(10)$. Les différentes courbes de cinétique de ces deux grandeurs sont représentées respectivement sur les figures 5.9 et 5.10.

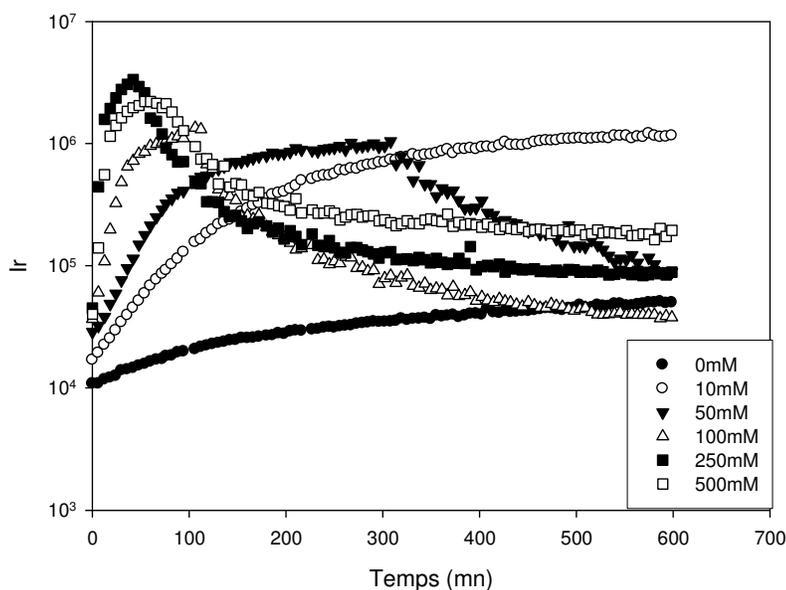


Figure 5.9 : Evolution de I_r d'une solution à 2% de NaCN à diverses concentrations en NaCl. $T=70^\circ\text{C}$.

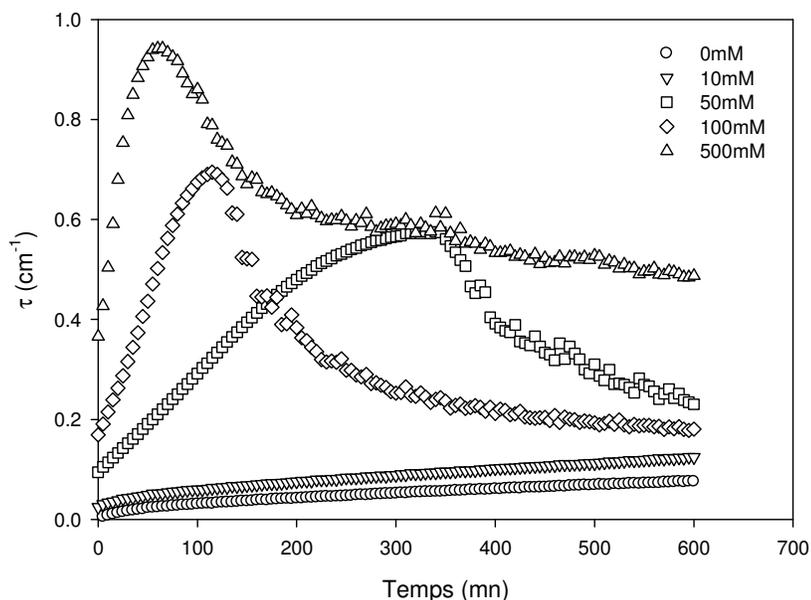


Figure 5.10 : Evolution de la turbidité d'une solution à 2% de NaCN à diverses concentrations en NaCl. $T=70^{\circ}\text{C}$.

Il est intéressant de voir que les cinétiques de I_r et de la turbidité ont le même profil. Ceci s'explique par le fait qu'à $T = 70^{\circ}\text{C}$, il y a formation d'agrégats qui se manifeste par l'augmentation simultanée de la turbidité de la solution et de l'intensité de diffusion de la lumière. La chute progressive de ces deux grandeurs qui se fait pratiquement au même moment est due à la sédimentation graduelle des gros agrégats formés, suite à laquelle, la solution enregistre une séparation de phase avec une phase, en dessus, transparente et une phase, en dessous, opaque de couleur blanche. I_r et la turbidité tendent alors vers des valeurs minimales. A noter, par ailleurs, que ce processus irréversible de formation d'agrégats dans le temps, dépend significativement de la force ionique du système, dans le sens où il est d'autant important que la quantité du sel mise en jeu est plus grande.

Flanagan [122] a trouvé le même profil de cinétique de turbidité à 400nm, en imposant une température plus élevée, de 140°C , à une solution à 10 g/l de NaCN (sans sel additionné, pH 6.7). Il a associé le développement de la turbidité à la formation d'agrégats et sa diminution, à la dégradation des caséines, en référence aux travaux de Guo [121].

A l'exception des solutions à faibles forces ioniques (0mM et 10mM), il a été observé que toutes les autres ont enregistré une sédimentation de gros objets blancs. Ceci conduit à supposer que la concentration du caséinate dans la phase transparente est moins importante que dans le cas d'avant traitement. On prélève alors la phase transparente des échantillons qui ont enregistré une sédimentation, et on détermine leur nouvelle concentration par absorbance UV. Ainsi, en dépit de l'importance du volume sédimenté obtenu à l'issue du traitement thermique, il apparaît, que la diminution de la concentration des protéines n'a pas été significative. En effet, la perte maximale de la concentration en protéine est en deçà de 5% de la concentration de la solution, avant traitement.

Ainsi, on peut déduire que les submicelles de ces nouvelles sauces (prétraitées à 70°C et dépourvues de leur sédiment) n'ont pas subi de dégradation.

On se propose d'imposer, une deuxième fois, à une préparation de NaCN (20g/l, 500mM de NaCl, pH 6.7, prétraitée à 70°C et dépourvue de son sédiment), une rampe croissante puis décroissante en température (de 10°C à 70°C) et d'observer l'évolution des M_a et R_{ha} . On remarque que la solution reste transparente pendant tout le traitement. Par ailleurs, en rampe croissante, la masse apparente des submicelles augmente sensiblement de 190 Kg/mole à 440 Kg/mole, entre 10°C et 50°C, puis enregistre un plateau entre 50°C et 70°C (figure 5.11). La même tendance de variation est observée pour le rayon hydrodynamique apparent, mais cette variation n'est pas aussi importante (de 12nm à 15nm). R_{h2} , des gros objets reste insensible à la variation de la température. Ainsi, l'augmentation de ces deux paramètres, impose l'existence d'un processus d'association des submicelles qui peut être dû aux interactions d'hydrophobie qui sont généralement plus présentes lorsque la température est élevée. Les courbes aller-retour en température sont assez proches, ce qui laisse supposer que le processus est réversible.

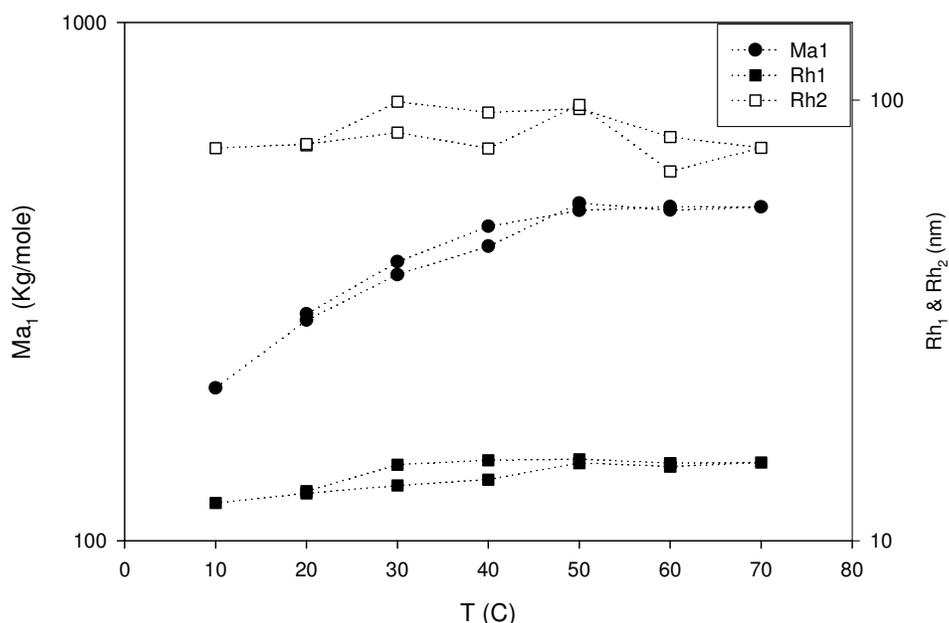


Figure 5.11 : Variation de M_a et de R_h submicelles en fonction de la température pour une solution à 20g/l de caséinate de sodium contenant 500mM de NaCl.

b) Effet de la température conjugué au pH.

Il a été observé, de l'étude précédente sur l'effet du pH à température ambiante (20°C), que la diminution du pH provoquait un processus d'agrégation des submicelles à partir de 5.2. Aussi est-il intéressant de voir comment va se comporter ce système une fois soumis à une température de 70°C. On impose alors à une solution de 20g/l de NaCN contenant 500mM de NaCl une série de valeur de pH variant de 7.8 à 4.8. On remarque à l'issue de l'augmentation de la température à 70°C, pendant une heure, qu'à l'exception de la solution à pH 7.8, toutes les autres ont enregistré une séparation de phase : un sédiment blanc et une phase en dessus transparente. Afin de quantifier la perte en protéine, suite à l'instabilité de ces systèmes, on mesure par UV la concentration du caséinate de la phase transparente et par la même la perte. On s'aperçoit, à la lumière de la figure 5.12, que cette perte en concentration est pratiquement insignifiante pour un $\text{pH} \geq 5.5$, elle est environ de 50% pour un pH 5.3 et atteint les 90% lorsque le pH est en deçà de 5. Aussi peut-on déduire le déplacement du point isoélectrique de la protéine de 4.5 aux alentours

d'un pH de 4.9, vu que presque la totalité des protéines dans la solution a sédimenté à partir de ce pH.

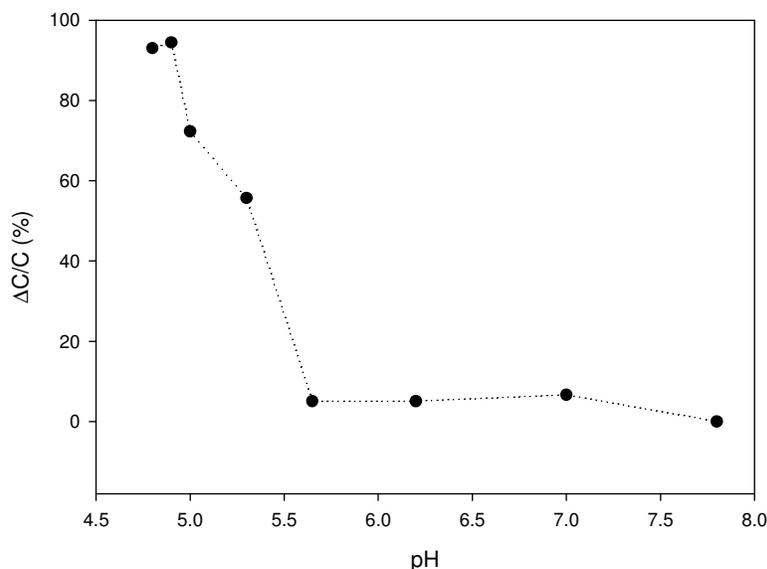


Figure 5.12: Variation de la perte de la concentration du caséinate en fonction du pH, à l'issue du traitement à $T=70^{\circ}\text{C}$. La concentration avant traitement de NaCN est de 20g/l additionnée à 500mM de NaCl.

5.4 Conclusion

Cette étude a été consacrée à la caractérisation des populations de caséinate de sodium en solution, en utilisant la diffusion de lumière en statique et en dynamique. Il a été montré que la distribution du temps de relaxation est bimodale, auquel le mode rapide est associé aux submicelles de caséine et le mode lent à une espèce d'assemblage moléculaire qui contient, entre autre, de la matière lipidique. Les caractéristiques moléculaires de cette deuxième population restent insensibles à l'addition de NaCl et à l'augmentation de la température. En revanche, on a observé un phénomène de submicellisation des particules de caséine avec l'addition de NaCl et d'agrégation irréversible lors de l'acidification. Par ailleurs, en imposant une température de 70°C , à pH 6.7, on a remarqué que le système devient turbide puis enregistre une sédimentation spectaculaire. Le sédiment ne représente, par contre, que très peu de matière protéinique. Des lors, les submicelles deviennent plus stables à l'augmentation de la température et leur agrégation est réversible.

CHAPITRE6

ETUDE DES SYSTEMES MIXTES : CASEINATE DE SODIUM/ κ -CARRAGHENANE

6.1 Introduction :

Les protéines et les polysaccharides sont deux types de biopolymères très employés dans l'industrie alimentaire, afin de contrôler la structure, la texture et la stabilité des produits. Cependant, les molécules de protéine peuvent être attirées vers les molécules du polysaccharide par complexation [132] ou être repoussées par ségrégation [62], menant le mélange à une forme instable. Ces types d'interactions dépendent évidemment des conditions de concentration des deux espèces de polymère [75], de la force ionique [133], de la température [76] et également des conditions opératoires, notamment de la purification des contre-ions, par dialyse.

Dans ce travail, on s'intéresse au mélange de protéines de caséinate de sodium et du κ -carraghénane sodique en solution. Ce mélange est fort important, sur la plan industriel, notamment dans le domaine agroalimentaire, du fait que la plus part des produits laitiers (yaourt crémeux, camembert, glace, fromage, crème dessert,...) contiennent ces deux ingrédients. Le problème majeur des industriels laitiers, réside dans le fait que les caséinates, au niveau mondial, coûte de plus en plus cher. Ainsi, leur souhait est de substituer une partie de cette protéine par un type de polysaccharide (relativement moins cher), tout en essayant de conserver la même qualité du produit, notamment, sur le plan organoleptique, textural et stabilité.

Cependant, de par la bibliographie, il est connu que les mélanges en solution de NaCN et du κ -carraghénane sont potentiellement instables, et les auteurs qui se sont intéressés à ces phénomènes, ont proposés divers mécanismes d'instabilité, en fonction des conditions de préparation et de la température de stockage. Bourriot S. et al. ont montré que lorsque la température est supérieure à la température de transition pelote hélice [133], alors la solution enregistre une séparation de phases, une phase haute riche en caséinate et une phase basse riche en κ -carraghénane. Les auteurs supposent que cette séparation est due à un mécanisme de floculation par déplétion, par analogie avec d'autres systèmes équivalents. Hemar et al. [75] ont suggéré que les deux biopolymères développent des interactions nettes répulsives

électrostatiques, vu qu'ils sont pourvus d'une charge électrique négative au pH neutre. Aussi, ils proposent une interaction d'incompatibilité thermodynamique entre les deux espèces de polymère. Dalgleish et Morris [134] ont montré qu'avant la température de transition pelote-hélice, le carraghénane s'adsorbe sur les micelles de caséine, pour former des complexes. Selon Snoeren [135], ces complexes sont formés par interaction électrostatique d'attraction entre les chaînes du carraghénane et la κ -caséine. Cette explication est la plus généralement donnée dans la littérature [136].

Au vu de ces constatations bibliographiques, on a fixé notre objectif sur une description à l'échelle macroscopique du comportement de phase du système NaCN- κ -carraghénane en solution, suivi d'une exploration du comportement rhéologique en fonction de la température ainsi qu'une étude des caractéristiques macromoléculaires par la technique de la diffusion de la lumière en dynamique.

6.2 Matériels et méthodes

6.2.1 Préparation des solutions mères de caséinate de sodium

De la poudre de NaCN (fournie par DMV International, France) est dissoute avec 200 ppm d'azidure de sodium dans de l'eau Millipore (18M Ω) à pH 7 et à T=20°C. Cette préparation est alors ultracentrifugée à 59,000g pendant deux heures. A l'issue de cette opération, il apparaît un sédiment au fond du tube qui représente de la matière insoluble, un voile surnageant riche en matière grasse et une phase intermédiaire riche en protéine. On prélève alors délicatement avec une seringue cette dernière et on la fait chauffer à 70°C pendant une heure. A l'issue de cette chauffe, on élimine le sédiment turbide qui se forme au fond du bêcher. Ainsi, on obtient une solution de caséinate qui ne devient pas turbide a T = 70°C [137].

Afin d'éliminer les contre ions, parasites, à savoir, K⁺ et Ca⁺⁺, on dialyse cette solution contre de l'eau pendant quatre jours. Ensuite, on fait passer la solution par un filtre dont le diamètre des pores est de 0.22 μ m. Le pH de la préparation est de 6.7. Suite à cela, on ajuste la solution à une force ionique de 100mM en NaCl et enfin on détermine la concentration en protéine de la préparation par absorption UV à 280 nm, auquel le coefficient d'extinction moléculaire, ϵ est égal à 0.81 mL.mg⁻¹.cm⁻¹.

6.2.2 Préparation des solutions mères de λ -carraghénane sodique

Tous les échantillons analysés ont été fournis par SKW biosystems qui s'est chargé de l'extraction et de la mise sous forme sodique. La mise en solution du κ -carraghénane n'est pas directe. Tout d'abord, il faut effectuer une mise en suspension dans "l'eau pure" (millipore) par simple agitation pendant environ deux heures. En fait, le solvant utilisé pour cette étape contient 200ppm d'azidure de sodium comme agent bactéricide. D'autre part, le pH est ajusté à 9 de façon à éliminer les risques d'hydrolyse [138-140]. Ceci est d'autant plus important que l'étape suivante de mise en solution proprement dite s'effectue à chaud (70°C sous agitation pendant deux heures).

Bien que la mise sous forme sodique soit pratiquement complète, il est nécessaire de dialyser contre de l'eau millipore pendant 4 jours [141]. Ceci permet d'éliminer les possibles traces de contre ions parasites (en particulier le potassium et le calcium) ainsi que l'excès de sel provenant de la solution alcaline (NaOH) utilisée au cours de la préparation. Suite à cela, on fait passer la solution par un filtre dont le diamètre des pores est de 0.45 μ m, puis on détermine la concentration de la solution mère de κ -carraghénane par chromatographie d'exclusion stérique, SEC, avec une valeur de l'incrément de l'indice de réfraction, $\left(\frac{\delta n}{\delta c}\right) = 0.145 \text{ cm}^3/\text{g}$ [141]. La colonne utilisée est de type HF PW 6000 (Cm) et le solvant est NaNO₃. Enfin, on ajuste la solution à une force ionique de 100mM en NaCl

6.2.3 Préparation de solutions de mélange : caséinate de sodium/ κ -carraghénane

On prélève une quantité de la solution mère du caséinate et on la met dans un bêcher. Sous agitation on rajoute progressivement une quantité appropriée de κ -carraghénane (en fonction des concentrations de mélange des deux ingrédients), et on maintient l'agitation jusqu'à l'obtention d'une phase homogène. Afin d'accélérer la séparation de phase éventuelle du mélange, on met l'échantillon à une température de 60°C pendant 30 mn (la température de transition pelote-hélice du κ -carraghénane en solution, avec 100 mM de NaCl, est inférieure à 60°C [40]), puis on centrifuge la préparation chaude pendant 15 mn.

6.2.4 Mesure de la diffusion de lumière

La mesure de la diffusion de lumière en dynamique et en statique a été effectuée sur un système ALV- 5000 multibit multi- τ corrélateur, couplé à un goniomètre de type Malvern et à un laser solide (Millina, Spectra Physics), polarisé verticalement à une longueur d'onde $\lambda = 532$ nm. Les données expérimentales sont collectées à des angles de diffusion entre 10° et 140° , ce qui correspond en vecteur d'onde de diffusion à $2.710^{-3} < q < 3.010^{-2}$ nm⁻¹. La cuve, dans laquelle se trouve la cellule de diffusion, est thermostatée par un bain externe au système. On a utilisé, par ailleurs, le toluène ou le ludox comme standard en fonction de l'intensité de la lumière diffusée.

6.2.5 Caractérisation rhéologique

La caractérisation rhéologique des mélanges de caséinate de sodium et du κ -carraghénane a été effectuée sur un rhéomètre AR2000 TA instrument. Ce rhéomètre a été utilisé pour des expériences en régime oscillatoire avec des géométries cône-plan de diamètre 40mm. Afin d'éviter l'évaporation du produit lors des expériences réalisées à haute température, nous avons mis de l'huile de paraffine sur le système de mesure et l'avons maintenue en place à l'aide d'un piège en silicone.

6.3 Résultats et discussions

6.3.1 Détermination du digramme de phases

Pour déterminer le digramme de phases, on a réalisé une série assez étendue de préparations, en respectant scrupuleusement la méthode de préparation des différentes solutions mères et mélange. La photo présentée sur la figure 6.1, montre un exemple d'échantillons qui ont enregistré une séparation de phases liquide-liquide. On peut remarquer que la phase haute est plus turbide à celle du bas. Par ailleurs, la mesure de la concentration de NaCN dans les deux phases, par spectrophotomètre à UV, montre que la phase haute est riche en protéine et donc par déduction est pauvre en κ -carraghénane. Aussi, par déduction, la phase basse est pauvre en NaCN et riche en κ -carraghénane.

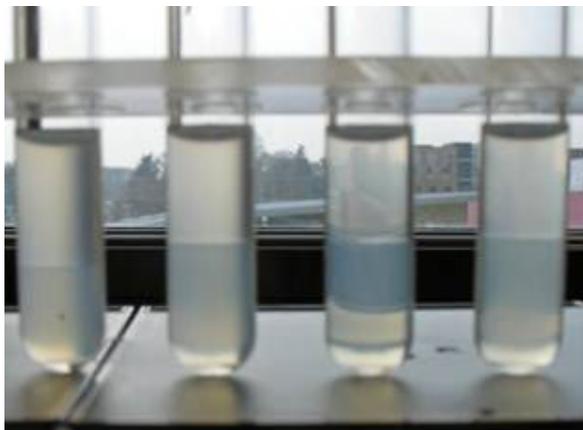


Figure 6.1 : Photo de quelques échantillons qui ont enregistré une séparation de phase à l'issue de la centrifugation, $T = 60^\circ\text{C}$, 100mM NaCl .

Ainsi, en analysant l'ensemble du comportement de phase des essais réalisés, juste après centrifugation, on a obtenu le diagramme de phase du système mixte NaCN/ κ -carraghénane en solution (Figure 6.2). La ligne binodale représente, en fait, la ligne qui sépare les systèmes homogènes des systèmes bi-phasiques.

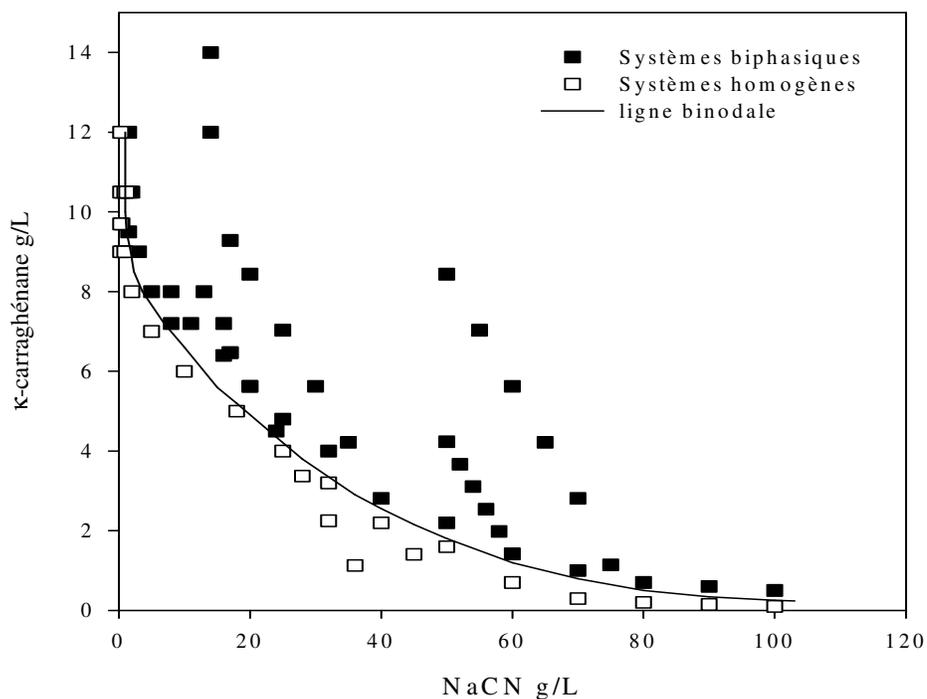


Figure 6.2 : Diagramme de phases du système mixte NaCN/ κ -carraghénane en solution, contenant 100mM NaCl , $T = 60^\circ\text{C}$.

A noter qu'il n'était pas possible d'obtenir des séparations de phases liquide-liquide, si la température des mélanges était inférieure à la température de transition pelote-hélice du κ -carraghénane. En effet, à 60°C, les macromolécules ont la conformation d'une pelote aléatoire (statistique) et donc, il est possible qu'elles s'interagissent par floculation par déplétion avec les molécules de caséinate, pour générer une séparation de phase, comme ça a été proposé par [68,133, 142], dans le cadre du système κ -carraghénane/micelle de caséine.

Langendorff et al. [142] ont proposé un mécanisme d'instabilité de floculation par déplétion basé sur l'adsorption des macromolécules du κ -carraghénane sur la micelle de caséine par interaction électrostatique entre les sites cationiques du κ -caséine et anioniques du κ -carraghénane. Dans le cas où il y a un excès de carraghénane dans la solution, alors ces macromolécules inadsorbées vont floculer par déplétion les caséines pelliculées (figure 6.3). Pour les systèmes qui n'ont pas subi de séparation de phases, la quantité de κ -car mise en jeu a été suffisante pour couvrir l'interface des micelles de caséine.

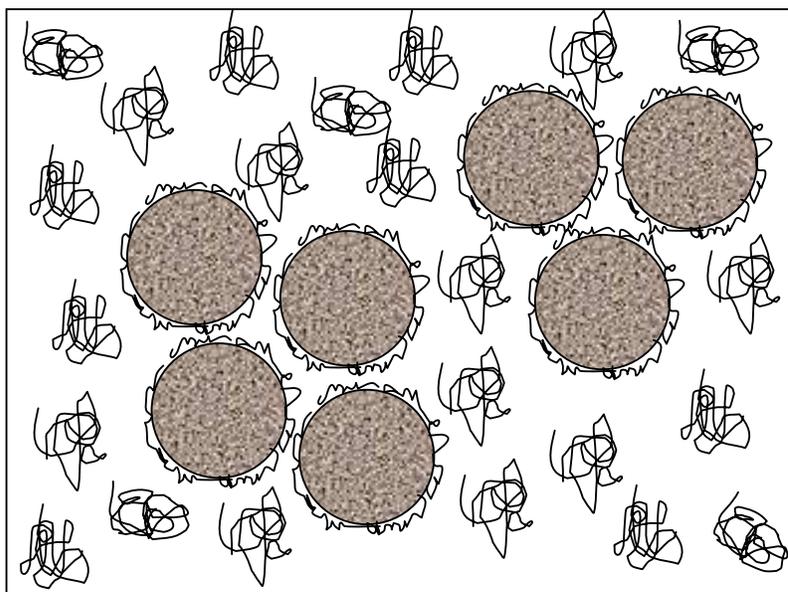


Figure 6.3 : Représentation schématique de la floculation par déplétion des micelles de caséine enrobées par des macromolécules de κ -car. $T=60^\circ\text{C}$, 100 mM de NaCl. Ici, les macromolécules de κ -car ont la conformation de pelote aléatoire [142].

Dans ce qui suit, on va s'intéresser, à température ambiante, aux comportements des solutions de mélange qui n'ont pas subi de séparation de

phases par floculation à 60°C (dans la partie du digramme de phase homogène). Après 24 heures de repos, nous avons observé trois comportements différents de ces solutions, par rapport à leurs aspect et texture :

- Une zone (1) dans laquelle les solutions gélifient et deviennent turbides.
- Une zone (2) dans laquelle les solutions restent liquides mais sont turbides.
- Une zone (3) dans laquelle les solutions sont quasiment transparentes.

La représentation schématique de ces comportements par un diagramme de phase (représenté en log-log) est montrée sur la figure 6.4.

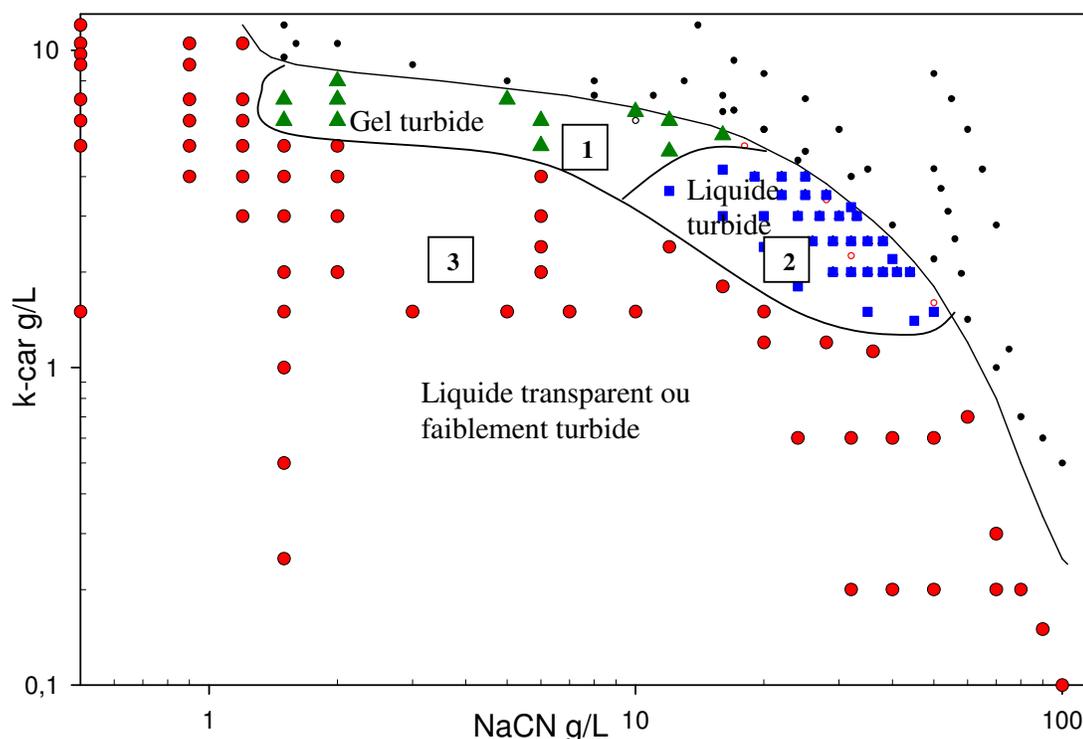


Figure 6.4 : Diagramme de phases du système mixte NaCN/ κ -carraghénane (dans la partie initialement homogène), après 24 heures de repos. $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$ et $T = 20^\circ\text{C}$.

A titre d'exemple, pour une concentration $C_{\text{NaCN}} = 2\text{g/L}$ (Figure 6.4), lorsqu'on augmente la quantité de κ -car de 3g/L à 5g/L (zone 3), on obtient des solutions qui ont tendance à devenir turbides (Figure 6.5-a) et lorsqu'on augmente d'avantage $C_{\text{k-car}}$ à 6 et à 7g/L (zone 1), on obtient des gels turbides (Figure 6.5-b).

En soumettant cette série d'essais ($C_{\text{NaCN}} = 2\text{g/L}$, $C_{\text{k-car}} = 3$ à 7g/L) à un temps de repos d'une semaine, à T ambiante, nous remarquons que les préparations qui formaient des gels sont devenues liquides et en même temps, deux phases ont pris naissance, une phase haute liquide qui tend à devenir plus transparente et une phase basse qui est plus turbide à la limite de l'opacité. Cette dernière est d'autant importante, en hauteur, que la quantité des κ -carraghénane l'est. Cette forme d'instabilité est vraisemblablement due à une sédimentation de complexes qui se sont formées. La figure 6.6 montre ces différentes transformations macroscopiques des échantillons considérés.

Ck-car : 7g/L 6g/L 5g/L 4g/L

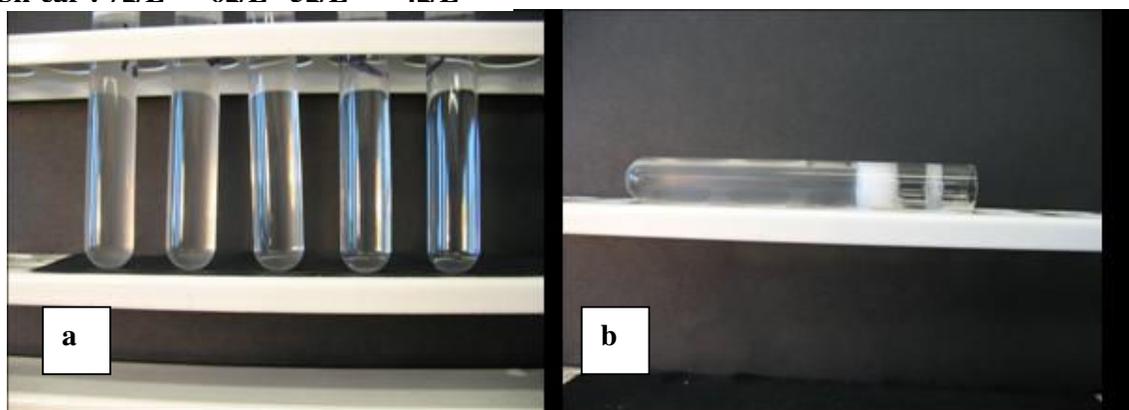


Figure 6.5 : (a) Variation de la turbidité des systèmes mixtes, après 24 heures de repos. $C_{\text{NaCN}} = 2\text{g/L}$ et $C_{\text{k-car}} = 3\text{g/L}$, 4g/L , 5g/L , 6g/L et 7g/L . (b) comportement « gel » de l'essai : $C_{\text{NaCN}} = 2\text{g/L}$, $C_{\text{k-car}} = 7\text{g/L}$. $T = 20^\circ\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$.

Ck-car : 7g/L 6g/L 5g/L 4g/L



Figure 6.6 : Après une semaine de repos, apparition de deux phases due à la sédimentation de particules formées. $C_{\text{NaCN}} = 2\text{g/L}$, $C_{\text{k-car}} = 3\text{g/L}$ à 7g/L . $T = 20^\circ\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$.

Une autre série de préparations de mélanges qui a attiré notre attention, où on a fixé cette fois-ci C_{k-car} à 2g/L et fait varier C_{NaCN} de 29g/L à 44g/L. Ainsi, après un jour de repos, les solutions sont toutes devenues turbides et sont restées liquides, malgré les grandes quantités mises en jeu des caséinates. Une semaine après, on a enregistré une présence de deux phases distinctes, une phase haute turbide qui s'est transformée en gel et une phase basse opaque, dans laquelle un sédiment s'est entreposé. L'épaisseur de ce sédiment n'a pas varié par augmentation des caséinates, figure 6.7.

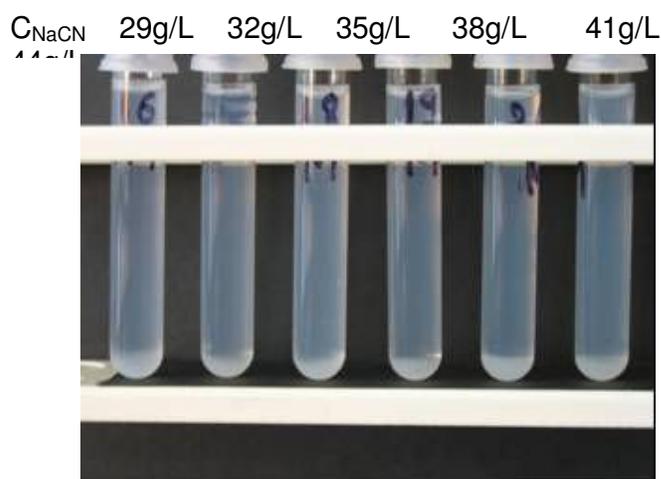


Figure 6.7 : Après une semaine de repos, apparition d'un gel turbide en haut et un sédiment entreposé en bas. $C_{k-car} = 2g/L$, $C_{NaCN} = 29g/L$ à $44 g/L$. $T = 20^{\circ}C$, $C_{NaCl} = 100mM$.

Ainsi, à l'issue des observations de toutes les préparations, à une semaine de repos, on obtient une nouvelle configuration du diagramme de phases (Figure 6.8).

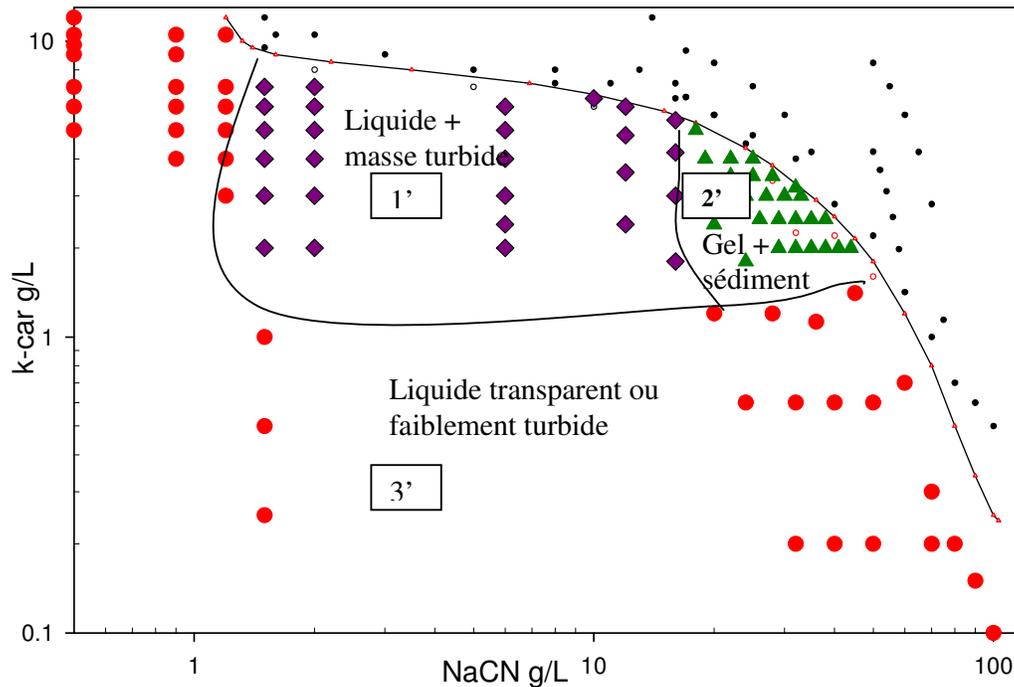


Figure 6.8 : Diagramme de phase du système mixte NaCN/κ-carraghénane (dans la partie initialement homogène), après une semaine de repos. $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$ et $T = 20^\circ\text{C}$.

6.3.2 Analyse par diffusion de la lumière en dynamique

6.3.2.1 Caractérisation par DLS de la solution de κ-carraghénane seul.

En premier lieu, on a utilisé la diffusion de la lumière en dynamique pour la caractérisation des solutions de κ-carraghénane sans les caséinates ($C_{\text{k-car}}$ varie 0.1g/L à 7g/L).

A l'issue de l'analyse, on obtient la variation du rayon hydrodynamique apparent, R_{ha} , en fonction de la variation de $C_{\text{k-car}}$ (Figure 6.9).

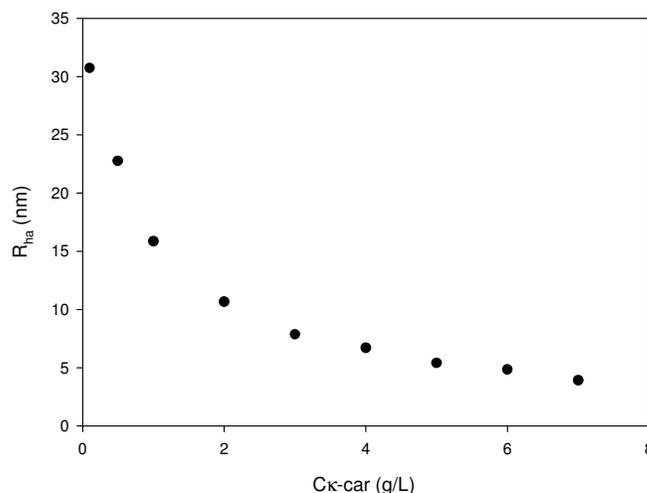


Figure 6.9 : Variation du rayon hydrodynamique apparent R_{ha} , en fonction de $C_{\kappa\text{-car}}$. $T = 20^\circ\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$, $\text{pH} = 7$.

A la lumière de cette courbe, on peut remarquer que la valeur du rayon hydrodynamique $R_h = R_{ha}(C_{\kappa\text{-car}} \rightarrow 0)$ est de 32 nm, auquel cas les particules colloïdales du κ -carraghénane sont dispersées. Ce résultat concorde avec celui trouvé par Sloopmaekers et al. [143]. Par ailleurs, la diminution de ce rayon hydrodynamique montre que les colloïdes de κ -carraghénane sont dans un état d'agrégation qui donne naissance à une structure enchevêtrée, auquel cas, le rayon hydrodynamique est associé à une certaine longueur de corrélation, ξ qui représente la dimension des blobs. R_h diminue au fur et à mesure que les agrégats sont plus denses (au-dessus de la longueur de corrélation ξ , le système paraît homogène).

6.3.2.2 Caractérisation par DLS des mélanges : Effet du κ -carraghénane

Il faut noter que cette étude de caractérisation, par DLS, a été effectuée une heure après avoir préparé les échantillons. Le but, en fait, était d'éviter la formation des grosses particules qui sont susceptibles de rendre le système turbide et de sédimenter. Ainsi, toutes les solutions qui ont été caractérisées étaient transparentes.

Suite au traitement des résultats de la DLS, on a obtenu deux modes de relaxation. Un mode rapide qui est associé à une population inconnue pour le moment (ça peut être soit des colloïdes de κ -carraghénane ou des submicelles de

NaCN individuelles ou leur combinaison) et un mode lent, associé aux complexes qui se sont formés (comme on l'a observé sur le diagramme de phase).

A noter que l'intensité relative diffusée de la population lente, est très grande devant celle de la population rapide comme, elle présente une dépendance angulaire et par la même au vecteur d'onde q . Aussi, on présente l'ensemble des courbes de l'intensité relative I_{r2} du mode lent, en fonction de q , et cela à divers C_{k-car} (Figure 6.10).

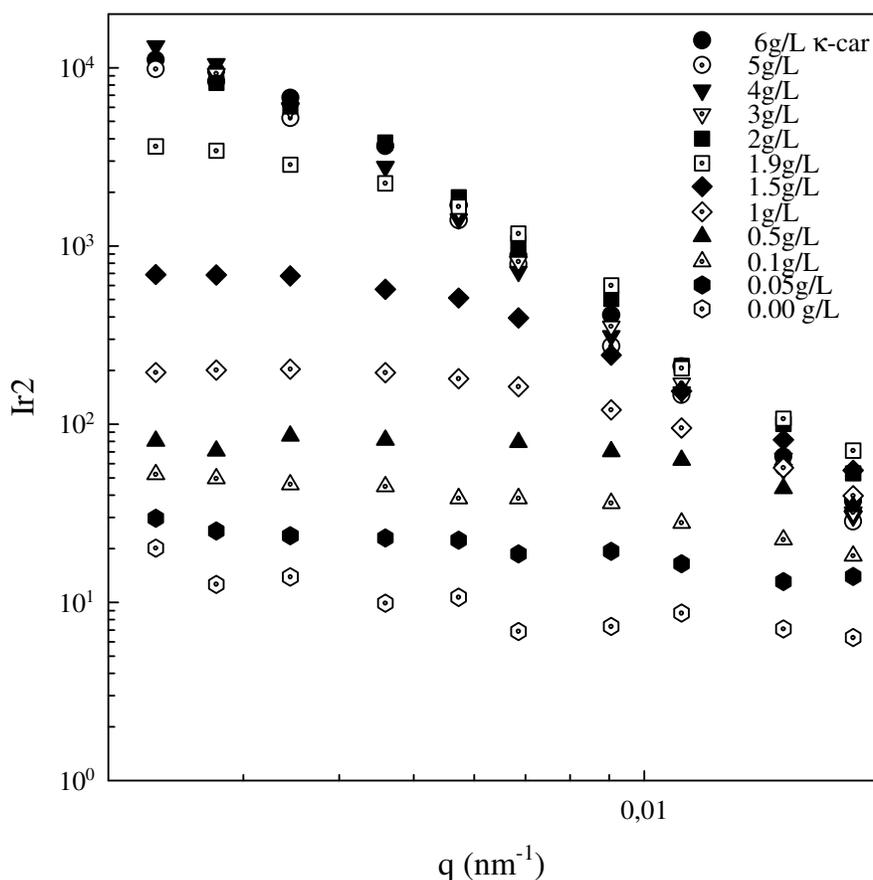


Figure 6.10 : Dépendance angulaire de l'intensité relative du mode lent associée aux complexes formés dans le mélange de caséinate et du κ -carraghénane. $C_{NaCn} = 1.5\text{g/L}$, $T = 20^\circ\text{C}$, $C_{NaCl} = 100\text{mM}$

Au vu de ces courbes, on remarque que I_{r2} augmente avec l'accroissement de C_{k-car} , ce qui permet de suspecter soit une augmentation de la taille des objets formés ou de leur nombre, car l'intensité diffusée de la lumière dépend non seulement de la taille de la particule mais également de la concentration.

Il est important de souligner, que lorsque $C_{\kappa\text{-car}} \geq 2\text{g/L}$, les courbes de I_{r2} se superposent et ne dépendent plus de la concentration en κ -carraghénane. Ceci démontre qu'à partir d'une $C_{\kappa\text{-car}}$ seuil de 2g/L, on obtient la même taille des particules et le même nombre. Ceci laisse penser que l'excès de carraghénane (par rapport au seuil), ne contribue ni dans le processus de formation des complexes, ni dans l'augmentation de leur taille.

Afin de voir l'effet éventuel de la quantité mise en jeu de NaCN sur cette concentration seuil de carraghénane, on réduit C_{NaCN} à 0.5g/L et on analyse par DLS les mélanges en fonction de la variation de $C_{\kappa\text{-car}}$. Les courbes de I_{r2} en fonction de $C_{\kappa\text{-car}}$ correspondantes sont présentées sur la figure 6.11.

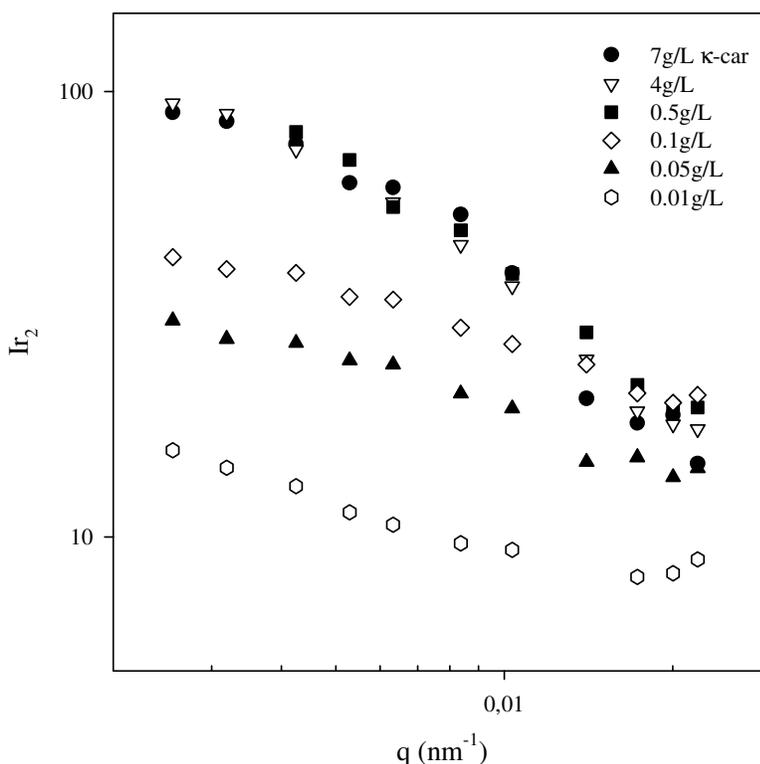


Figure 6.11 : Dépendance angulaire de l'intensité relative du mode lent, I_{r2} , associée aux complexes formés dans le mélange de caséinate et du κ -carraghénane. $C_{\text{NaCN}} = 0.5\text{g/L}$, $T = 20^\circ\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$

En analysant ces courbes (figure 6.11), on peut faire ressortir les constatations suivantes:

- La concentration seuil de κ -carraghénane, au-delà de laquelle les complexes et leur nombre sont constants, est égale à 0.5g/L.
- Cette concentration seuil est inférieure à celle du cas précédent.
- Les complexes diffusent moins de lumière que dans le cas précédent.

On se propose dans ce qui suit, de déterminer la taille des deux populations qui sont dans le mélange en fonction de la variation de la concentration de κ -carraghénane.

La figure 6.12 montre la variation du rayon hydrodynamique apparent des deux populations en fonction de la variation de $C_{\kappa\text{-car}}$ et cela 1.5g/L de NaCN.

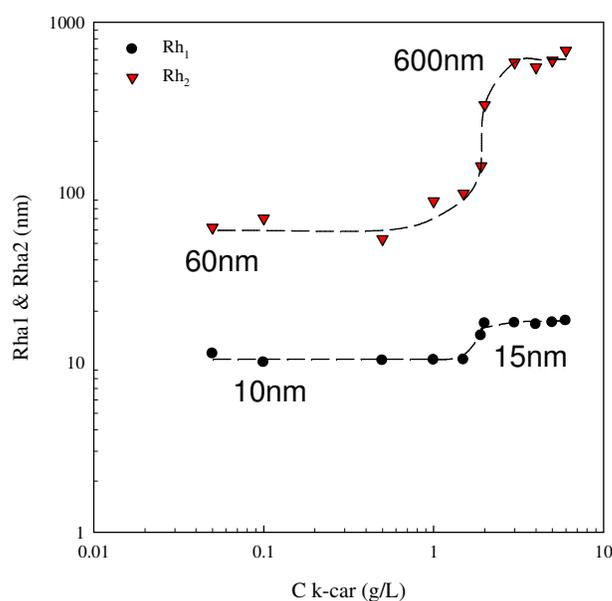


Figure 6.12 : Variation des rayons hydrodynamiques des deux populations en fonction de la variation de la concentration de κ -carraghénane. $C_{\text{NaCN}} = 1.5\text{g/L}$, $T = 20^\circ\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$.

Il est fort intéressant de remarquer que les valeurs du rayon hydrodynamique apparent de la première population, associée au mode rapide, sont comprises entre 10 et 15 nm. Or cette taille correspond à celle des submicelles des caséinates de Na. Si c'est le cas, on peut spéculer que dans les solutions mixtes, il existe une partie des submicelles qui restent libres dans la phase continue. Quand à la deuxième population, il est clair que leur taille est beaucoup plus grande. Elle augmente de façon spectaculaire lorsque $C_{\kappa\text{-car}}$ dépasse la valeur 1.9g/L de κ -carraghénane et se stabilise rapidement autour d'une valeur de 0.5 μm .

6.3.2.3 Caractérisation par DLS des mélanges : Effet des caséinates de Na.

On a caractérisé par DLS une série de systèmes de mélanges avec une concentration en κ -carraghénane égale à 1.5g/L, en variant C_{NaCN} de 0.5g/L à 20g/L. Les valeurs des intensités relatives de la lumière diffusée par la deuxième population (lente) sont données en fonction du vecteur d'onde q . Aussi, il est clair qu'il y a dépendance angulaire (Figure 6.13). Par ailleurs, l'augmentation de I_{r2} est liée étroitement à l'augmentation de la quantité mise en jeu des caséinates. Les valeurs du rayon hydrodynamique des deux populations (Figure 6.14), obtenue à l'issue du traitement des résultats expérimentaux, paraissent ne pas être sensibles à la variation de la concentration de caséinates. Le rayon moyen du mode rapide est de 11nm et correspond dans ce cas à la taille des submicelles des caséinate de sodium. Celui du mode lent est de 100nm ; il correspond à la taille des complexes formés. Ainsi, faut-il, déduire que l'ajout de la protéine dans le mélange ne fait pas augmenter la taille des complexes, mais fait plutôt augmenter leur nombre, vu que l'intensité relative diffusée n'a cessé d'augmenter.

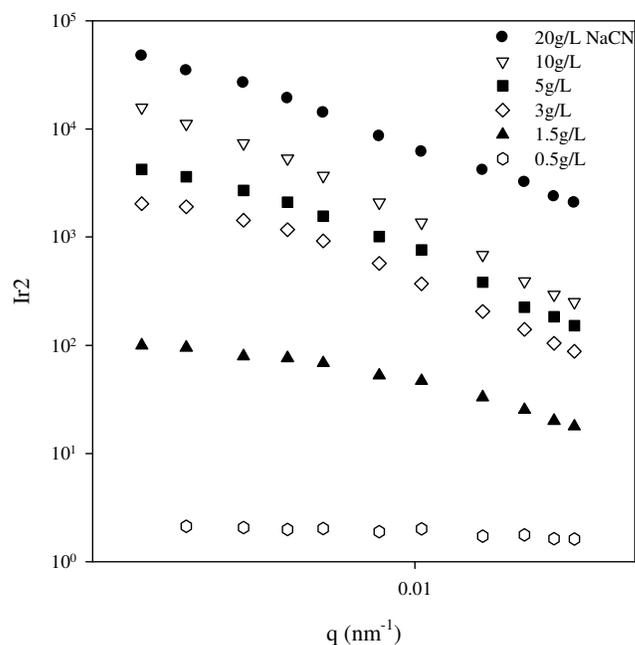


Figure 6.13 : Dépendance angulaire de l'intensité relative du mode lent à diverses concentrations de caséinate. $C_{\kappa\text{-car}} = 1.5\text{g/L}$, $T=20^\circ\text{C}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$.

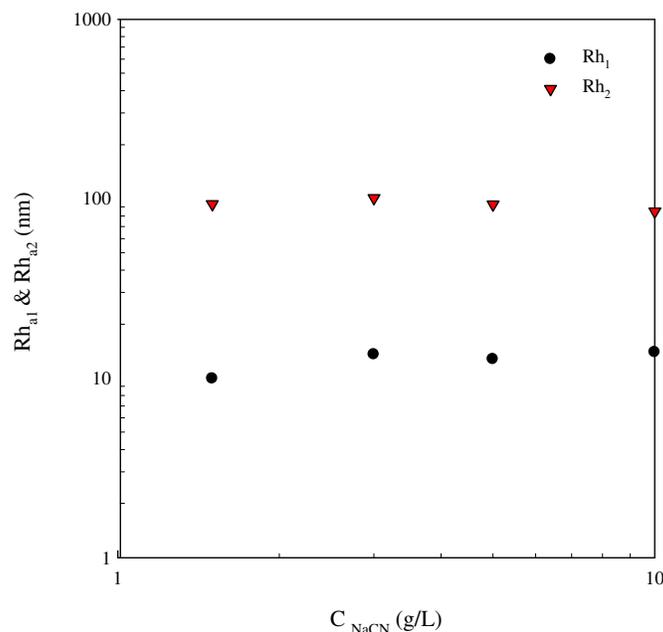


Figure 6.14 : Variation des rayons hydrodynamiques des deux populations en fonction de la variation de la concentration des caséinates. $C_{k-car} = 1.5g/L$, $T = 20^\circ C$, $C_{NaCl} = 100mM$.

6.3.2.4 Caractérisation par DLS des mélanges : Effet vieillissement

La figure 6.15 montre la dépendance angulaire de l'intensité relative du mode lent en fonction de l'âge de la préparation. Pour cela, on a choisi une préparation dans laquelle la concentration des caséinates est de 1.5g/L et celle de κ -carraghénane est de 1.5g/L. Ainsi, il est clair qu'il y a une cinétique de formation des complexes macromoléculaires, vu que I_{r2} a sensiblement augmenté après 48 heures. D'ailleurs, cette augmentation ne s'est pas poursuivie après ce temps. À noter que le rayon hydrodynamique du mode rapide est resté constant (10nm) et celui du mode lent, associé aux complexes, est passé de 98nm à 125nm.

6.3.2.5 Caractérisation par DLS des mélanges : Effet de la dilution.

Le but de cette partie de travail est de savoir si le processus de formation des complexes macromoléculaires est réversible, dans le sens où après les avoir obtenus, on procède à une dilution au 1/10 de la solution. Donc, on réduit les concentrations des deux espèces moléculaires d'un facteur de 10, puis on observe, par DLS, si la taille a changé. Dans la figure 6.16, nous présentons la sensibilité de l'intensité relative diffusée du mode lent à cette dilution. À la lumière de cette figure,

on remarque que cette intensité est insensible et donc on peut affirmer que le processus de formation d'agrégats dans le mélange est irréversible.

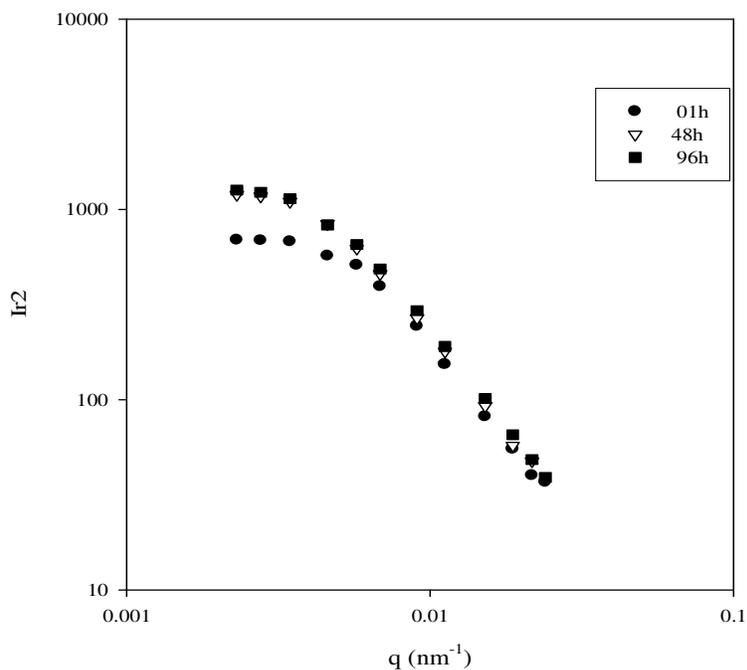


Figure 6.15 : Effet du vieillissement sur la dépendance angulaire de l'intensité relative du mode lent en fonction du temps. $C_{k-car} = 1.5g/L$, $C_{NaCN} = 1.5g/L$, $T=20^{\circ}C$, $C_{NaCl} = 100mM$.

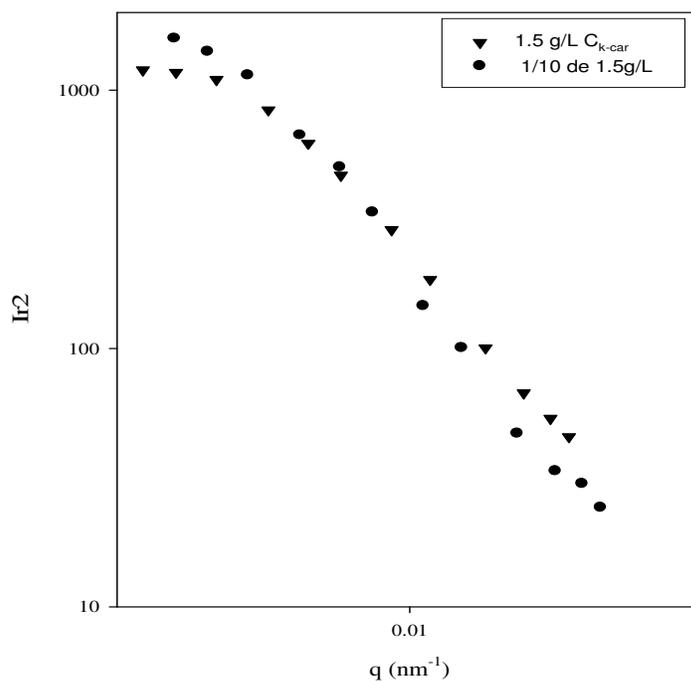


Figure 6.16 : Effet de la dilution sur la dépendance angulaire de l'intensité relative du mode lent. $C_{k-car} = 1.5g/L$, $C_{NaCN} = 1.5g/L$, $T= 20^{\circ}$ et $C_{NaCl} = 100 mM$.

6.3.3 Analyse rhéologique des mélanges

Les échantillons sont soumis à des sollicitations en régime d'écoulement oscillatoire. Pour obtenir une courbe de fonte du mélange, on impose une gamme de température en rampe croissante de 2°C à 70°C, à pas de 5°C/mn. Puis, on refroidit le système, dans les mêmes conditions, par une rampe décroissante, pour obtenir une courbe de gélation. A noter que lors du refroidissement de la substance, le module élastique, G' , n'atteint pas, sous ces conditions opératoires, sa valeur initiale d'avant traitement. En effet, lorsque la température atteint 2°C, le module élastique va augmenter progressivement et ne peut atteindre sa valeur initiale qu'après un temps extrêmement lent, comme le montre la figure 6.17, où l'on présente les cinétiques d'évolution de G' à 2°C, dans le cas où $C_{k-car} = 1.5g/L$ à diverses concentrations de NaCN (de 5g/L à 50g/L).

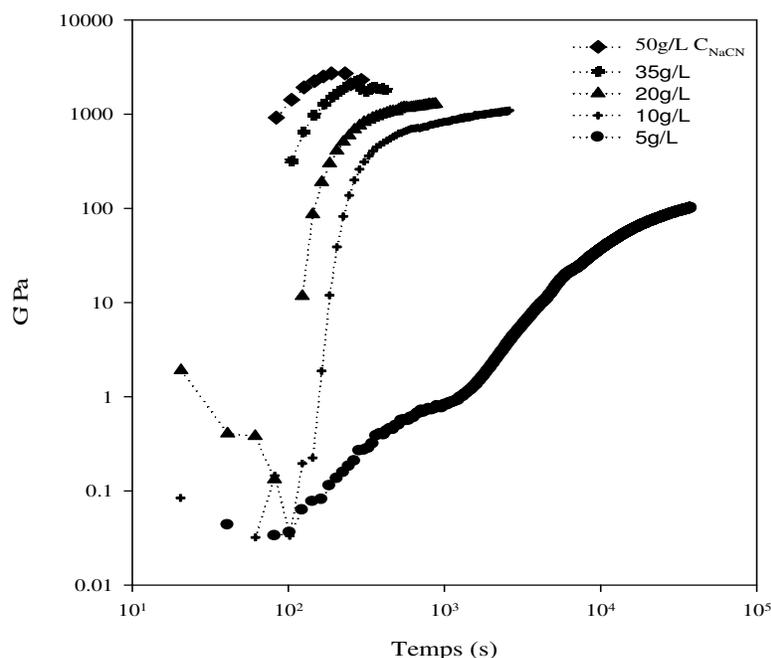


Figure 6.17 : Cinétique d'évolution de G' des mélanges à 2°C à diverses concentrations de caséinate. $C_{k-car} = 1.5g/L$, $C_{NaCl} = 100mM$

6.3.3.1 Effet de la concentration des caséinates sur les températures de fonte et de gélation du mélange

Pour des raisons de glissement, on a utilisé dans cette partie, un système de mesure plan-plan, avec une ouverture de 500 μ m.

Il apparaît à la lumière des courbes du module élastique G' , obtenues à l'issue des rampes croissante et décroissante en température (Figure 6.18), que les températures de fonte, T_f , et de gélification, T_g , augmentent, au fur et à mesure que la quantité des caséinates est plus importante. Oakenfull et al. [76] ont réalisé le même type d'expérience, dans le cadre du mélange κ -carraghénane-caséinate de sodium, sauf que le polysaccharide utilisé, contenait du potassium à 10,93%. Ces auteurs ont remarqué que la température de gélification n'était pas affectée par l'addition du caséinate, contrairement à celle de fonte qui augmentait. Aussi, les résultats des deux travaux ne peuvent être comparables, du fait que le potassium a un effet fondamental sur les températures T_g et T_f (dans notre travail, le κ -carraghénane utilisé est de type sodique et a été dialysé pour éliminer les contre-ions de potassium).

Aussi, il est tout à fait curieux et intéressant de constater que les caséinates font augmenter les températures de gélification et de fonte des systèmes, en comparaison avec l'effet de KCl sur les solutions de κ -carraghénane seul. En effet, on a déterminé ces courbes dans ce deuxième cas (Figure 6.19) et les résultats d'effet des caséinates et KCl sont assez similaires.

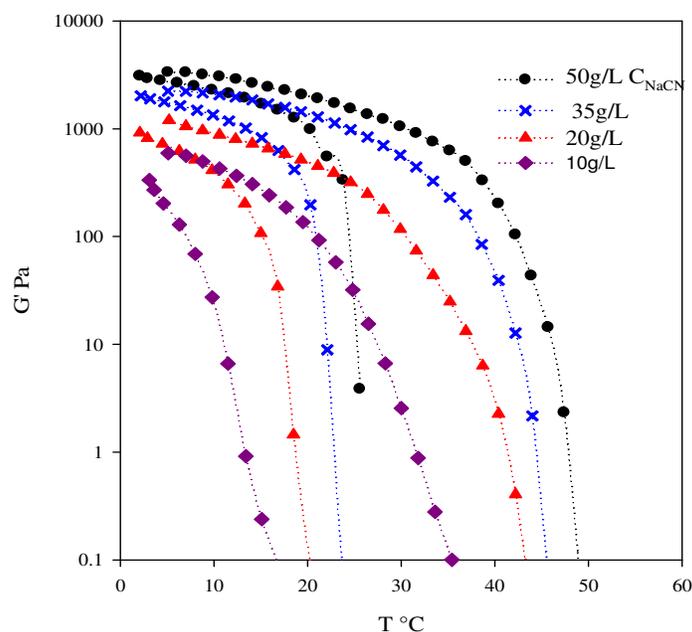


Figure 6.18 : Courbes de fonte et de gélification des mélanges à diverses concentrations de caséinate de sodium. $C_{NaCl} = 100\text{mM}$.

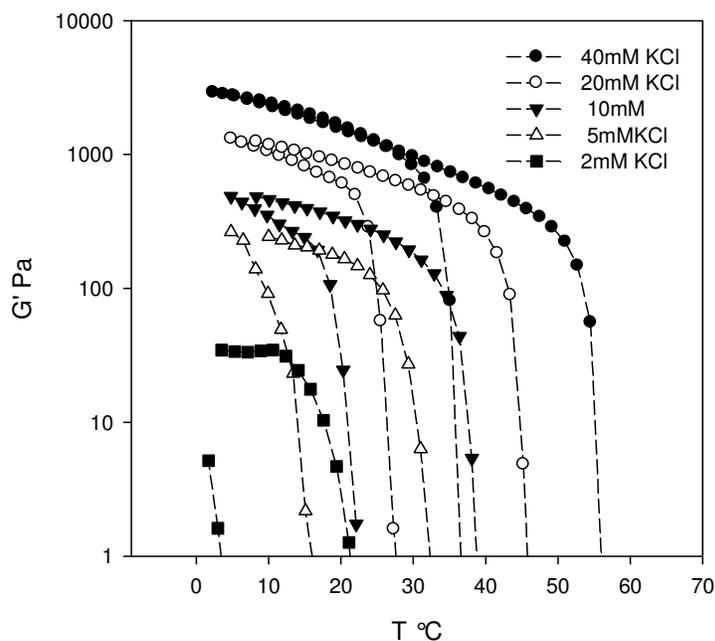


Figure 6.19 : Courbes de fonte et de gélification des solutions κ -carraghénane en fonction de la variation de KCl.

6.3.3.2 Effet de la concentration de κ -carraghénane sur les températures de fonte et de gélification du mélange

Dans ce cas, on fixe la concentration des caséinate à 20g/L et on fait varier le κ -carraghénane de 0.3 à 3 g/L. Suite à la mise sous cisaillement de différentes solutions, on obtient les courbes de fonte et de gélification, que nous présentons sur la figure 6.20.

A première vue, les deux températures de fonte et de gélification ne subissent pas de déplacement par rajout des κ -carraghénanes.

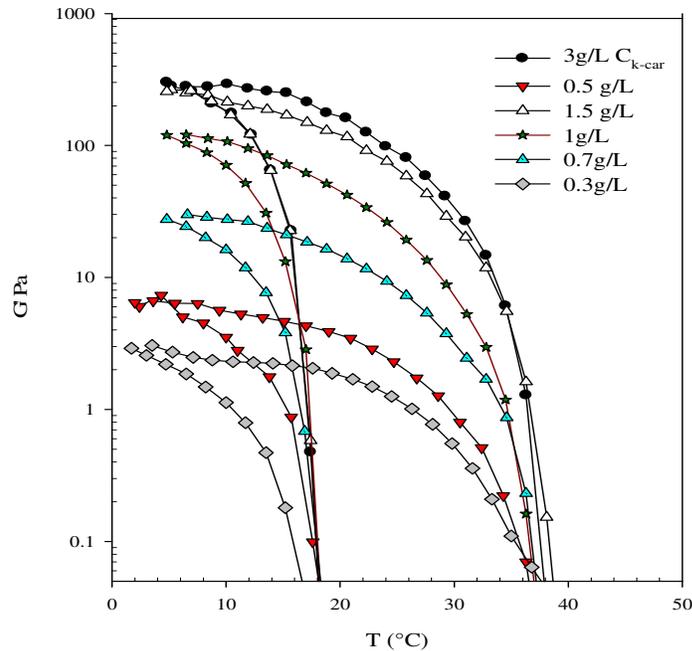


Figure 6.20 : Courbes de gélification et de fontes des mélanges en fonction de la variation de la température et à diverses concentrations de κ -carraghénane. $C_{\text{NaCN}} = 20\text{g/L}$, $C_{\text{NaCl}} = 100\text{mM}$.

6.4 Conclusion

Les systèmes mixtes de caséinate de sodium/ κ -carraghénane sont complexes et présentent plusieurs comportements différents en fonction du rapport de leur concentration et de la température:

- Une séparation de phase liquide-liquide qui peut être due aux interactions de floculation par déplétion, à $T = 60^\circ\text{C}$.
- Une sédimentation progressive dans la phase qui était initialement homogène, due à la formation de micro-domaines. La formation de ces complexes n'a pas été évoquée dans la bibliographie, vu que la plupart des auteurs ont travaillé sur les systèmes κ -carraghénane-micelles de caséine [133-136]. Dans ce système κ -carraghénane/caséinate, à température inférieure à la température de transition conformationnelle pelote-hélice, on obtient un gel. Oakenfful [76] qui a travaillé sur le même système, a également obtenu une gélification sans formation de complexes, sauf que le polysaccharide qu'il a utilisé contenait du potassium qui a un effet gélifiant. Hemar et al. [75] ont observé par microscopie confocale une séparation de phases microscopique du système

κ -carraghénane-caséinate, sans pour autant identifier la nature des deux phases.

- Les systèmes restent stables et sont transparents dans le cas où κ -car est faible (<1.5g/L).
- Une gélification des systèmes, lorsque la concentration du caséinate est suffisamment grande (au-delà de 20 g/L) et la concentration du κ -car est au-delà de 1.5g/L.

A noter que cette partie de travail est loin d'être achevée et une exploration détaillée et précise de chaque domaine, en fonction du comportement obtenu est indispensable. Egalement, pour mieux comprendre la structure des microdomaines formés par agrégation, il est souhaitable d'utiliser la microscopie confocale.

CONCLUSION GENERALE

Dans ce travail, il a été question d'étudier les comportements physicochimiques, rhéologique et de phase de systèmes mixtes, en solution, contenant des protéines de caséinate de sodium et un type de polysaccharide.

Dans la première partie, on a opté pour la gomme xanthane, et réalisé une série de préparations suivant la méthodologie des plans d'expériences. Les substances n'ont pas été purifiées, ce qui n'a pas permis de réaliser une étude fine de caractérisation. Aussi, les points importants qui ressortent de cette première partie sont :

- Mise en évidence, d'une concentration critique de NaCN, qui dépend de la quantité mise en jeu du xanthane, et au-delà de laquelle des interactions répulsives de ségrégation prennent naissance, générant un affaiblissement du module de conservation viscoélastique, G' et par la même une fragilisation de la structure du système colloïdal. Dans cette situation, il a été observé que le potentiel zêta diminue, ce qui laisse supposer que les interactions répulsives électrostatiques entre les deux espèces anioniques ne sont pas responsables du relâchement de la structure.

- Il a été observé, également, que lorsque la valeur de la viscosité à l'infini de Casson de la solution est au-dessus de 0.1 Pa.s, le système enregistre une séparation de phases, l'une riche en protéine et l'autre en polysaccharide.

- Par simulation polynomiale, il a été établi le diagramme de phases de la solution.

En deuxième partie de ce travail, on s'est focalisé sur la purification des caséinates de sodium en solution, notamment de sa matière grasse qui peut s'interférer et parasiter le mélange protéine-polysaccharide. Par ailleurs, on s'est intéressé à l'identification et à la caractérisation, par diffusion de la lumière en dynamique, de ses populations qui sont susceptibles de s'interagir avec les

polysaccharides et par la même conditionner le sort du système mixte. Les points forts qui se sont dégagés de cette étude sont :

- Il a été montré que la distribution du temps de relaxation est bimodale, auquel le mode rapide est associé aux submicelles de caséine et le mode lent à une espèce d'assemblage moléculaire qui contient, entre autre, de la matière lipidique.

- Les caractéristiques moléculaires de cette deuxième population restent insensibles à l'addition de sel (NaCl) et à l'augmentation de la température. En revanche, on a observé un phénomène de submicellisation des particules de caséine avec l'addition de NaCl et d'agrégation irréversible lors de l'acidification.

- En imposant une température de 70°C, à pH 6.7, on a remarqué que le système devient turbide puis enregistre une sédimentation spectaculaire. Le sédiment ne représente, par contre, que très peu de matière protéinique. Des lors, les submicelles deviennent plus stables à l'augmentation de la température et leur agrégation devient réversible.

Enfin, dans la troisième et dernière partie de ce travail expérimental, on a étudié le mélange de caséinate et de κ -carraghénane, en prenant en considération les méthodes de purification et de filtration qui ont été développées dans la partie précédente. A l'issue de ce travail expérimental, on a obtenu plusieurs comportements de phase qui sont différents tant sur le plan aspect que texture. Aussi, on a organisé ce travail, par la détermination du diagramme de phases et de son évolution dans le temps, puis caractériser les solutions qui n'ont pas enregistré initialement de séparation de phases, par diffusion de la lumière et de la rhéologie. De ce travail, on a fait ressortir les points suivants :

- Une séparation de phase liquide-liquide à $T = 60^\circ\text{C}$ qui peut être due aux interactions de floculation par déplétion.

- Une sédimentation progressive dans la phase qui était initialement homogène, due à la formation de microdomaines, à partir d'agrégats ($R_{ha2} \approx$

500nm), lorsque la concentration du caséinate est faible (en deçà de 5g/L) et la concentration du κ -car est suffisamment élevée ($> 1.5\text{g/L}$).

- Les systèmes restent stables et sont transparents dans le cas où κ -car est faible ($< 1.5\text{g/L}$).

- Une gélification des systèmes, lorsque la concentration du caséinate est suffisamment grande (20 g/L) et la concentration du κ -carraghénane est au-delà de 1.5g/L.

Ce travail est loin d'être achevé, essentiellement dans la troisième partie. En effet, une exploration détaillée et précise de chaque domaine, en fonction du comportement obtenu est indispensable. Egalement, pour mieux comprendre la structure des microdomaines formés par agrégation, il est souhaitable d'utiliser la microscopie confocale.

LISTE DES SYMBOLES

F	Force
r	Distance intermoléculaire
D	Coefficient de diffusion
I	Force ionique
K	Pouvoir de diffusion ou contraste des particules
b	Longueur de diffusion de la particule
n	Indice de réfraction du milieu
Z	Valence de l'ion
A_2	Coefficient d'interactions thermodynamiques
C_T	Concentration ionique totale
D_f	Dimension fractale
G'	Module d'élasticité
G'_0	Module élastique dans le domaine linéaire
I_r	Intensité relative de la lumière diffusée
L_e	Longueur électrostatique
L_0	Longueur intrinsèque
L_p	Longueur de persistance
M_e	Masse critique d'enchevêtrements
M_w	Masse molaire
N_a	Nombre d'Avogadro
pH	potentiel hydrogène
pI	Point isoélectrique
R_{gz}	Rayon de giration en z :
R_h	Rayon hydrodynamique
R_{ha}	Rayon hydrodynamique apparent
$S(q)$	Facteur de structure de la particule
T_m	Température de Transition ordre-désordre
KCl	Chlorure de potassium
NaCl	Chlorure de sodium

NaCN	Caséinate de sodium
ΔH_m	Enthalpie de mélange
ΔS_c	Entropie conformationnelle du biopolymère
ΔS_m	Entropie du mélange
$C_{\kappa\text{-car}}$	Concentration du κ -carraghénane
C_{NaCl}	Concentration du chlorure de sodium
C_{NaCN}	Concentration du caséinate de sodium
DLS	Dynamic light scattering
Γ	Energie potentielle
$\dot{\gamma}$	Vitesse de cisaillement
μ	Moment dipolaire
η	Viscosité
ξ	Longueur de corrélation
τ	Temps de relaxation
σ	Contrainte de cisaillement
λ	Longueur d'onde

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Dickinson E., Les colloïdes alimentaires, Série Sciences de l'Ingénieur, collection industrie alimentaires et biologique, Ed. Masson, Paris, 1996.
2. Reiffers-Magnani C. K., Cuq J. L., Watzke H. J., Depletion flocculation and thermodynamic incompatibility in whey protein stabilised O/W emulsions, Food Hydrocolloids, V14, 521-530, 2000.
3. Adrien J., Frangn R., La science alimentaire de A à Z, Tec et DOC Lavoisier, 1994-1998.
4. Holt C., Van Kemenade M. J. M., Nelson J. L. S., Sawyer L., Harris J. E., Bailey R.T., Hukins D. W. L., Composition and structure of micellar calcium phosphate, Journal of Dairy Research, V56, p.411-416, 1989.
5. Veisseyer R., Technologie du lait, Constitution, Récolte, Traitement et transformation du lait, 3^{ème} Ed. Technique laitière, Paris, 1979.
6. Murphy J. M., Fox P. F., Functional properties of rich casein fractions, Food Chemistry, V39, p.211-228, 1991.
7. Leclerc E., Calmettes, Interaction in micellar solutions of β -casein, Physical Review Letter, V78, p.150-153, 1979.
8. Swaisgoof H. E., Chemistry of milk protein. In P.F. Fox, Development in dairy chemistry, London: Elsevier Applied Science, V1, p.1-59, 1982.
9. Waugh D. F., Talbot B., Equilibrium Casein Micelle Systems, Biochemistry, 10, 4153-4160, 1971.
10. Morr C. V., Chemistry of milk proteins in food processing, Journal of Dairy Science, V58, p.977-984, 1975.
11. Chu B., Zhou Z., Wu G., Farrell J. Laser-light scattering of model casein solutions - effects of high-temperature, J colloid Interface Sci, V170, p.102-112, 1995.
12. Lucey J. A., Srinivasan M., Singh H., Munro P. A., Characterizations of commercial and experimental sodium caseinates by multiangle LASER light scattering and size exclusion chromatography, Journal of agricultural and food chemistry, V48(5), p.1610-1616, 2000.

13. Dickinson E., Semenova M. G., Belyakova L. E., Antipova M., Tsapkina E. N., Ritzoulis C., Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: relationship to emulsion flocculation, *Journal of colloid and interface science*, V239, p.87-97, 2001.
14. Nash W., Pinder D. N., Hemar Y., Singh H., Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures, *International Journal of Biological Macromolecules*, V30, p.269-271, 2002.
15. Emmanuel Rouy ; « Formulation d'un gel oxydant à matrice organique applicable à la décontamination nucléaire : propriétés rhéologiques, acido-basiques et ozonolyse de la matrice » Thèse de doctorat, Montpellier (2003).
16. Jansson, P.-E., Kenne, L., Lindberg, B., « Structure of the extra-cellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris* », *Carbohydrate Research*, vol. 45, , 275-282, 1975.
17. Melton, L.D., Mindt, L., Rees, D.A., Sanderson, G.R., «Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris* : evidence from partial hydrolysis studies », *Carbohydrate Research*, vol. 46, 245-257, 1976.
18. Sato, T., Norisuye, T., Fujita, H., « Double-stranded helix of xanthan: dimensional and hydrodynamic properties in 0,1 M aqueous NaCl, *Macromolecules* », vol. 17, 2696-2700, 1984.
19. Milas, M., Rinaudo, M., «Conformational investigation on the bacterial polysaccharide Xanthan », *Carbohydrate Research*, vol. 76, 189-196, 1979.
20. Capron, I., Brigand, G., Muller, G., «About the native and renatured conformation of xanthan exopolysaccharide », *Polymer*, vol. 38, 5289-5295, 1997.
21. Liu, W., Sato, T., Norisuye, T., Fujita, H., «Thermally induced conformational change of xanthan in 0,01 M aqueous sodium chloride », *Carbohydrate Research*, vol. 160, 267-281, 1987.
22. Capron, I., « Traitement thermique des moûts de fermentation et organisation moléculaire du xanthane, conséquences rhéologiques », Thèse de doctorat, Rouen, France, 1996.
23. Collic S.J, Zanchetta P., H ellery D., ratiskol J., Siquinc ., Fischer A.M., Guezennec J., E, « Exopolysaccharides produced by bacteria isolated from Deep Sea, *Biopolymers : Health» Cosmetic and Food Application* , *Polymer*, 2003.

24. Anderson, N.S. ; Dolan, T.C.S. et Rees, D.A.. Carrageenans. Part III. Oxidative hydrolysis of methylated κ -carragenan and evidence for a masked repeating structure. *Journal of the Chemical Society (C)*, 596, 1968.
25. Lawson, C.J. ; Rees, D.A. ; Stancioff, D.J. et Stanley, N.F., Carrageenans. Part VIII. Repeating structures of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*. *Journal of the Chemical Society (Perkin I)*, 2177, 1973.
26. Rees, D.A. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Advance in Carbohydrate Chemistry*, 24, 267, 1969.
27. Morris, E.R. ; Rees, D.A. ; Welsh, E.J. ; Dunfield, L.G. et Whittington, S.G. Relation between primary structure and chain flexibility of random coil polysaccharides: calculation and experiment for a range of model carrageenans. *Journal of the Chemical Society (Perkin II)*, 793, 1978.
28. Graham, T., Liquid diffusion applied to analysis. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 151, 183, 1861.
29. Hermans, P.H., Gels, dans "Colloïd Science", Ed. H. R. Kruyt, 483, 1949.
30. Anderson, N.S. ; Campbell, J.W. ; Harding, S.E. ; Rees, D.A. et Samuel, J.W.B., X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: Double helix models for κ - and ι -carrageenans, *Journal of Molecular Biology*, 45, 85, 1969.
31. Bayley, S.T. X-ray and infrared studies on carrageenan. *Biochimica et Biophysica Acta*, 17, 194, 1955.
32. Millane, R.P. ; Chandrasekaran, R. ; Arnott, S. et Dea, I.C.M. The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan. *Carbohydrate Research*, 182, 1, 1988.
33. Rochas, C. et Landry, S. Molecular Organisation of Kappa-carrageenan in Aqueous Solution. *Carbohydrate Polymers*, 7, 435, 1987.
34. Nilsson, S. et Piculell, L. Helix-Coil transition of ionic polysaccharides analysed within the Poisson-Boltzmann cell model. 4. Effects of site-specific counterion binding. *Macromolecules*, 24 (13), 3804, 1991.
35. Landry, S. Relation entre la structure moléculaire et les propriétés mécaniques des gels de carraghénanes. Thèse, Université Scientifique Technologique et Médicale de Grenoble, 1987.

36. Rochas, C. et Rinaudo, M. Activity Coefficients of Counterions and Conformation in Kappa-Carrageenans Systems. *Biopolymers*, 19, 1675, 1980.
37. Morris, E.R. ; Rees, D.A. et Robinson, G., Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology*, 138, 349, 1980.
38. Smidsrod, O. et Grasdalen, H., Conformations of κ -carrageenan in solution. *Hydrobiologia*, 116/117, 178, 1984.
39. Rochas, C. et Rinaudo, M., Mechanism of Gel Formation in κ -Carrageenan. *Biopolymers*, 23, 735, 1984.
40. Rochas, C., Conformational Transition of Kappa-Carrageenan. *Journal of Thermal Analysis*, 30, 1375, 1985.
41. Rochas, C., Etude de la transition Sol-Gel du Kappa-Carraghénane. Thèse, Université Scientifique et médicale de Grenoble, 1982.
42. Ueda, K. ; Ochiai, H. ; Imamura, A. et Yamaoka, K., An observation of the electric birefringence signal ok k-carrageenan gel. *The Chemical Society of Japan*, 601, 1993.
43. Hermansson, A.M., Rheological and microstructural evidence for transient states during gelation of kappa-carrageenan in the presence of potassium. *Carbohydrate Polymers*, 10, 163, 1989.
44. Hermansson, A.M. ; Eriksson, E. et Jordansson, E., Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of kappa-carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*, 16, 297, 1991.
45. Perrin P., Hourdet D., « Polymères en Solution », Ed. Techniques de l'ingénieur, 2-17, A 3 050, 1997.
46. Hiemenz, P.C; Rajagopalan, R. « Principles of colloid and surface science » 3rd Edition, Marcel Dekker: New York, 670 pp. Hiemenz et Rajagopalan, 1997.
47. Prausnitz, J.M.; Lichtenthaler, R.N.; de Azevedo, E.G. « Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria » 3rd Edition, Prentice-Hall inc., New Jersey, pp 9-117, 1999.
48. Israelachvili, J. « Intermolecular and surface forces » 2nd Edition, Academic Press: London, 1992.
49. Levisalles J., Jozefowics M., Chimie Organique, « Composés organiques complexes », Ed. Flammarion Sciences, Paris 1974.

50. Dickinson E., McClement D. J., «Molecular Basis of Protein Functionality», In *Advances in Food Colloids*, Blackie Academic, London, p.27-76,1996.
51. Tolstogulzov, V.B., «Functional properties of food protein. Role of protein polysaccharides interactions», *Food Hydrocolloids*, V.4, 429-468, 1991.
52. de Kruif, C.G., Tuinier, R., «Polysaccharide protein interactions», *Food Hydrocolloids*, V.15, 555-563, 2001.
53. Bungembeg De Jong, H.G. , «reversible systems», In H.R.Kruyt, *Colloid science*, Ed. Elsevier, Amsterdam, Chapters 8 and 10, 1949.
54. Xia, J.; Dubin, P.L. «Protein-polyelectrolyte complexes». In: *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer Verlag: Berlin, pp 247-271, 1994.
55. Van Oss, C.J. « Acid-base interfacial interactions in aqueous media». *Colloids Surf. A*, 78, 1-49, 1993.
56. Chen, C.C.; Kratochvil, J.F.; Lloyd, W.L.; inventors: Kraft Inc., assignee. «Microfragmented ionic polysaccharide/protein complexes solutions». U.S. Patent 1989.
57. Tostoguztov V. B., « Protein Polysaccharide Interaction», In *Food protein and their application*», 171-198, 1997.
58. Singh O. N., Burgess D. J., « Characterization of albumin-alginic acid complex coaservation», *J. Pharm. Phamacol*, V41, p.670-673, 1989.
59. Morr C. V., Ha E. Y. M., « Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties», *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, V33, p.431-476, 1993.
60. Semenova M.G., « Factor determining the character of biopolymer-biopolymer interaction in multicomponent aqueous solutions modeling food system, In *Macromolecular Interaction*» in *Food Technology*, ACS Symposium Series 650, Washington DC, p.37-49,1996.
61. Dickinson E., Powlowski K., «Effect of high pressure treatment of protein on the rheology of flocculated emulsion containing protein and polysaccharide», *J. Agri Food Chem.*, V44, p.2992-3000, 1996.
62. Doublier J. L., Garnier C., Renard D., Sanchez C., *Protein- Polysaccharide Interactions*, *Curr. Opinion, Colloid Surf* , V5, p.202-214, 2000.
63. de Kruif K. G., Tuinier R., « Whey protein aggregates and their interaction with exo-polysaccharides», *International Journal of Food Science and Technology*, V34, p.487-492, 1999.

64. Hemar Y., Tamehana M., Munro P.A., Singh H., Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum, *Food Hydrocolloids*, 15, 565-574, 2001.
65. Augustin M.A., Puvanenthiran A., McKinnon I.R., The effect of κ -carrageenan conformation on its interaction with casein micelles, *International Dairy Journal* 9 413-414, 1999.
66. Tziboula A., Horne D. S., Influence of milk proteins on κ -carrageenan gelation, *International Dairy Journal* 9 359-364, 1999.
67. Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A., & De Kruif, C. C., Effects of carrageenan type on the behavior of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, 14, 273–280, 2000.
68. Schorsch C., Jones M.G., Norton I.T., Phase behaviour of pure micellar casein/ κ - carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate, *Food Hydrocolloids* 14 , 347–358, 2000.
69. Thaiudom S., H.D. Goff, Effect of κ -carrageenan on milk protein polysaccharide mixtures, *Hydrocolloids*, 13, 211–218, *International Dairy Journal* 13 763–771, 2003.
70. Garnier C., Michon C., Durand S., Cuvelier G., Doublier J.-L., Launay B., Iota- carrageenan/casein micelles interactions: evidence at different scales, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 31 , 177-184, 2003.
71. Trčková J., Štetina J. and Kánský J., Influence of protein concentration on rheological properties of carrageenan gels in milk, *International Dairy Journal*, 14, 337-343, 2004 .
72. Spagnuolo P.A., Dalgleish D.G., Goff H.D., Morris E.R, Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers, *Food Hydrocolloids* 19 , 371–377, 2005.
73. Anneke H. M., Douglas G. H., Smith A., Dalgleish D.G., Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM), Article in press, *Food Hydrocolloids* 1–8, 2005.
74. Sedlmeyer F., Kulozik U., Impact of process conditions on the rheological detectable structure of UHT treated milk protein–carrageenan systems, article in press, *Journal of Food Engineering* xxx (2005) xxx–xxx.
75. Hemar Y., Hall C.E., Munro P.A., Singh H., Small and large deformation rheology and microstructure of κ -carrageenan gels containing commercial milkprotein products, *International Dairy Journal* 12 , 371–381, 2002.

76. Oakenfull D., Miyoshi E., Nishinari K., A. Scott, Rheological and thermal properties of milk gels formed with κ -carrageenan. I. Sodium caseinate, *Food Hydrocolloids* 13, 525–533, 1999.
77. Snoeren, T.H.M., Payens, T.A.J., Jevnink, J. and Both, P., Electrostatic Interaction between κ -Carrageenan and κ -Casein' in *Milchwissenschaft* 30, 393-396, 1975.
78. Brown, W., *Light scattering. Principles and developments.* Oxford, Clarendon Press, 1996.
79. Higgins, J. S.; Benoît, H. C., *Polymers and Neutron Scattering*, New York, Oxford University Press, 1994.
80. Rottereau, M., Agrégation, percolation et séparation de phase d'une assemblée de sphères dures browniennes adhésives. Approche par simulation hors réseau. Ph.D. thesis, Université du Maine: Le Mans, France 2005.
81. Stepanek, P., *Data analysis in dynamic light scattering*, Oxford Sciences Publications, Clarendon Press, 177-241, 1993.
82. Berne, B. J.; Pecora, P., *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics* New York, John Wiley & Sons 1976.
83. Doty, P.; Steiner, F. J. *Chem. Phys. Light scattering and spectrophotometry of colloidal solutions*, 18, 1211-1220, 1950.
84. Carr, M.; Gabriel, D. A., Dextran-Induced Changes in Fibrin Fiber Size and Density Based on Wavelength Dependence of Gel Turbidity, *Macromolecules*, 13, 1473-1477, 1980.
85. Bremer, L. G. B.; Van Vliet, T.; Walstra, P., Theoretical and experimental study of the fractal nature of the structure of casein gels, *J. Chem Soc., Faraday Trans. 1*, 85, 3359-3372, 1989.
86. Aymard, P.; Williams, M. A. K.; Clark, A. H.; Norton, I. T., A turbidimetric study of phase separating biopolymer mixtures during thermal ramping, *Langmuir*, 16, 7383-7391, 2000.
87. Horne, D. S., Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 83, 259-270, 1987.
88. Chanamai, R.; Mc Clements, D. J., [Prediction of emulsion color from droplet characteristics: dilute monodisperse oil-in-water emulsions](#) *Food Hydrocolloids*, 15, 83-91, 2001.
89. Moody, T. P.; Donovan, M. A.; Laue, T. M., Turbidimetric studies of Limulus coagulin gel formation, *Biophysical Journal*, 71, 2012-2021, 1996.

90. Chi-san Wu, "Column Handbook for Size Exclusion Chromatography"; International Specialty Products Wayne, New Jersey.
91. Stading, M., Rheological behaviour of biopolymer gels in relation to structure. Ph.D. thesis, Chalmers University of Technology: Göteborg , Sweden, 1993.
92. HUNTER R.J. Zeta potential in colloid science, Principles and applications, 1981
93. Dickinson, E., Emulsion stabilization by polysaccharides and protein-polysaccharide complexes. In A. M. Stephen, Food polysaccharides and their applications, pp. 501-515, New York: Marcel Dekker Inc, 1995.
94. Grinberg V. and Tolstoguzov V., Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. Food Hydrocolloids, 11: 145–158, 1997.
95. Tuinier R., Rieger J., Kruif C. G., Depletion-induced phase separation in colloid-polymer mixtures, Advances in Colloid and interface science, 103, 1-31, 2003.
96. Benichou A., Aserin A., Garti N., Protein-Polysaccharide Interaction for Stabilization of Food Emulsions, J. Dispersion Sciences and Technology, 23 (1-3), 93-123, 2002.
97. Sanchez C, Schmitt C., Babak V. G.; Hardy, J. Rheology of whey Protein Isolate Xanthan Mixed Solutions and els. Effect of pH and Xanthan Concentration, Nahrung 41, 336-343,1997.
98. Walkenstrom , P., Panighetti N., Windhab E., Hermansson A. M., Effect of Fluid Shear and Temperature on Whey Protein Gels, Pure or Mixed Xanthan. Food Hydrocolloids, 12, 469-479, 1998.
99. Laneuville S. I., Paquin, Turgeon S. L. Effect of Preparation Conditions on the Characteristics of Whey Protein-Xanthan Gum Complexes. Food Hydrocolloids, 14, 305-314, 2000.
100. Bryant C. M., McClement D. J., Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat denatured whey protein solutions and gels. Food Hydrocolloids, 14, 383-390, 2000.
101. Ye X., Narayanan T., and Tong P., Depletion interactions in colloid-polymer, mixtures, Physical Review E, Volume 54, Number 6, 6500-6510, 1996.
102. Vrij, A., Polymers at Interfaces and the Interactions in Colloidal Dispersions, Pure Appl. Chem. 48, 471,1976.

103. Gast P., Hall C. K., and Russel W. B., [Polymer-induced phase separations in nonaqueous colloidal suspensions](#), J. Colloid Interface Sci. 96, 251-267, 1983.
104. Sado G., M. C. Sado., Les plans d'expériences, AFNOR 2000.
105. Moulai-Mostefa N. HadjSadok A., Optimisation de la formation à froid d'une crème dépilatoire, in congress proceedings : le 3^{ème} Congrès Mondial de l'Emulsion, 4 C 190, 2002.
106. Moulai-Mostefa N. , HadjSadok A., Berrayah N. , Sabri N., Utilisation de la méthode du cubic simplex pour l'optimisation de la formulation à froid d'une émulsion de thioglycolate de calcium. International Journal of Cosmetic Science, 25: 227–233, 2003.
107. Rollema, H. S., Casein association and micelle formation. Pages 111–140 in Advanced Dairy Chemistry—1: Proteins. P. F. Fox, ed. Elsevier Appl. Sci., London, England, 1992.
108. Walstra, P., On the stability of casein micelles. J. Dairy Sci. 73:1965–1979, 1990.
109. Sandford and Baird, Sandford, PA & Baird, J, In: Aspinall, GO (Eds.) The polysaccharides. (pp. 470-473) Prague: Academia Press, 1983.
110. Bourriot S., Garnier C., Doublier J. L., Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein-guar gum mixtures, Food Hydrocolloids, 13, 43-49, 1999.
111. Langendorff V., Cuvelier G., Launey B., Parker A., Gelation and flocculation of casein micelle/carrageenan mixtures, Food Hydrocolloids, 11, 35-40, 1997.
112. Marozienne A., de Kruif C. G., Interaction of pectin and casein micelles, Food and hydrocolloids, 14, 391-394, 2000.
113. Tuinier, R. , de Kruif, C.G., Whey protein aggregates and their interaction with exo-polysaccharides, International Journal of Food Science and Technology, 34, 487–492, 1999.
114. R.J. Hunter, Zeta Potential in Colloid Science, Chap.3, Academic Press, London, 1981
115. Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H. In Advanced Dairy Chemistry., Vol. Volume 1: Proteins, 3rd edn., pp 1-48, 2003.
116. Farrell, H.M.; Cooke, P.H.; King, G.; Hoagland, P.D.; Groves, M.L.; Kumosinski, T.F.; Chu, B. "Particle Sizes of Casein Submicelles and Purified κ -Casein", ACS Symp. Ser. (Macromolecular Interactions in Food Technology), 650: 61-79. 1996.

117. O'Kennedy, B. T.; Mounsey, J. S.; Murphy, F.; Duggan, E.; Kelly, P. M., Factors affecting the acid gelation of sodium caseinate, *International Dairy Journal*, 16, 1132-1141, 2006.
118. Panouillé, M.; Nicolai, T.; Durand, Heat induced aggregation and gelation of casein submicelles, *D. International Dairy Journal*, 14, 297-303, 2004.
119. Panouillé, M.; Nicolai, T.; Benyahia, L.; Durand, D. In *Food Colloids Interactions, Microstructure and Processing*; Dickinson, E., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, pp 194-208, 2005.
120. Morris, G. A., The self-assembly and structure of caseins in solution *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 19, 357-376, 2002.
121. Guo, M.; Fox, P. F.; Flynn, A.; Mohammad, K. S., Heat-induced changes in sodium caseinate, *Journal of Dairy Research*, 56, 503-512, 1989.
122. Flanagan, J., Y. Gunning, et al. "Effect of cross-linking with transglutaminase on the heat stability and some functional characteristics of sodium caseinate." *Food Research International* 36(3): 267-274, 2003.
123. Istarova, T. A., M. G. Semenova, et al. (2005). "Effect of pH on the interactions of sodium caseinate with soy phospholipids in relation to the foaming ability of their mixtures." *Food Hydrocolloids (Harrogate)* 19(3): 429-440, 2004.
124. Braga, A. L. M., M. Menossi, et al. "The effect of the glucono- $[\delta]$ -lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation." *International Dairy Journal* 16(5): 389-398, 2006.
125. Ruis, H. G. M., P. Venema, et al. "Relation between pH-induced stickiness and gelation behaviour of sodium caseinate aggregates as determined by light scattering and rheology." *Food Hydrocolloids*, 21, pp. 545–554, 2007.
126. Carr, A. J., P. A. Munro, et al., "Effect of added monovalent or divalent cations on the rheology of sodium caseinate solutions." *Int. Dairy Journal* 12: 487-492, 2002.
127. Schmidt, D. G., P. Walstra, et al., "The size distribution of casein micelles in cow's milk." *Netherlands Milk and Dairy Journal* 27: 128-142, 1973.
128. Schuck, P., M. Piot, et al. "Déshydratation par atomisation de phosphocaséinate natif obtenu par microfiltration sur membrane." *Le lait* 74(5): 375-388, 1994.
129. Panouille, M., L. Benyahia, et al. "Dynamic mechanical properties of suspensions of micellar casein particles." *Journal of Colloid and Interface Science* 287(2): 468-475, 2005.

130. de Kruif, C. G. "Caseins." *Progress in Biotechnology* 23: 219-269, 2003.
131. Lucey, J. A., T. van Vliet, et al., "Properties of acid casein gels made by acidification with gluco-delta-lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties." *Int. Dairy Journal* 7: 389-397, 1997.
132. Bungenberg de Jong, H.G. 'Crystallization, Coacervation and Flocculation', in *Colloid Science* (Kruyt, H.R., ed.), vol. 2, pp. 232-258, 1949.
133. Bourriot S., Garnier C., Doublier J.-L., Micellar-casein- κ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure, *Carbohydrate Polymers* 40 145–157, 1999.
134. Dalgleish, D. G., & Morris, E. R. Interactions between carrageenans and casein micelles: Electrophoretic and hydrodynamic properties of particles. *Food Hydrocolloids*, 2, 311–320, 1988.
135. Snoeren, T.H.M., Payens, T.A.J., Jevnink, J. and Both, P., 'Electrostatic Interaction between κ -Carrageenan and κ -Casein' in *Milchwissenschaft* 30, 393-396, 1975.
136. Dickinson E., Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions, *Trends in Food Science & Technology*, 9, 347-354, 1998.
137. HadjSadok A., Pitkowski A., Nicolai T., Benyahia L., Moulai-Mostefa N. [Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering](#) *Food Hydrocolloids*, Volume 22, Issue 8, Pages 1460-1466, 2008
138. Rochas, C. et Heyraud, A., Acid and enzymic hydrolysis of kappa-carrageenan. *Polymer Bulletin*, 5, 81, 1981.
139. Ekström, L.-G., Molecular-weight-distribution and behaviour of kappa-carrageenan on hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 135, 283, 1985.
140. Hjerde, T. ; Smidsrod, O. et Christensen, B.E. The influence of the conformational state of κ - and ι -carrageenan on the rate of acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 288, 175, 1996.
141. Meunier V., Nicolai T., Durand D., Structure of aggregating κ -carrageenan fractions studied by light scattering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 28 157–165, 2001
142. Langendorff, V.; Cuvelier, G.; Launay, B.; Parker, A., Gelation and flocculation of casein micelle/carrageenan mixtures, Vol. 11, pp. 35-40, 1997.

143. Sloommaekers, D. ; Mandel, M. et Reynaers, H., Dynamic light scattering by κ - and λ -carrageenan solutions. International Journal of Biological Macromolecules, 13 (February), 17, 1991.