

LYNE BEAULIEU

**ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION  
DE LA MEMBRANE DES GLOBULES DE GRAS DANS UNE  
FORMULATION LACTÉE POUR NOURRISSONS.**

Mémoire  
présenté  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Département des sciences des aliments et de nutrition  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL

NOVEMBRE 1997

© Lyne Beaulieu, 1997



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-26157-3

Canada

**Nos rêves sont souvent plus grands que nous...**  
**Il faut alors savoir s'élever pour les atteindre**  
**et les faire devenir réalité.**

## Résumé

Les formulations lactées pour nourrissons représentent un aliment complet à base de lait de vache dans lequel on retrouve des protéines (sériques et caséiques), de la matière grasse ainsi que des hydrates de carbones, des vitamines et des minéraux. En cours d'entreposage, ces formules se modifient et évoluent. L'instabilité du produit, se traduit par des défauts visuellement apparents. Ces changements physiques concernent principalement les interactions entre la membrane de globules de gras et les protéines, suite au traitement thermique. L'isolement de la matière grasse, par centrifugation ainsi que l'utilisation de dissociants, permet de mettre en évidence l'influence des traitements thermiques sur la formation de nouvelles liaisons et la modification de la composition de la membrane des globules de gras.

Suite à la stérilisation, la dimension des globules de gras demeure constante alors que la charge protéique double. On retrouve donc à la surface de la membrane du globule de gras stérilisée, une plus grande quantité de protéines à y être associée. L'utilisation de 2- $\beta$ -mercaptoéthanol ou de Dodécyl Sulfate de Sodium a donc permis de dissocier des agrégats protéiques formés lors du traitement thermique. De cette façon, la détermination du ratio g de protéine/ g de gras lavé après stérilisation, est comparable au chapeau de gras non-lavé avant traitement thermique. En cours d'entreposage, les interactions entre les particules s'amplifient et forment un réseau protéique.

Lyne Beaulieu,  
étudiante.

Paul Paquin,  
directeur.

## Avant-propos

Entreprendre des études de deuxième cycle, a été une expérience enrichissante, qui m'a permis de m'accomplir tant sur le plan scientifique que personnel. J'aimerais donc remercier Monsieur Paul Paquin, mon directeur de maîtrise, de m'avoir permis de vivre cette belle et grande expérience entourer de gens dynamiques et compétents. Paul, merci pour tout.

Monsieur Michel Pouliot a été mon codirecteur de maîtrise. Je tiens à le remercier sincèrement pour ses judicieux conseils et son écoute attentive. Michel, merci pour ta sagesse et ta grande clarté, elles m'ont été précieuses.

J'aimerais souligner aussi l'apport de Yves Pouliot, directeur des études de 2e et 3 cycles en Science et technologies des aliments. Mon inscription à la maîtrise relève des plus grandes sagas. Merci Yves pour ta confiance et ton dévouement.

A ma famille et à mon mécène, merci d'avoir toujours été là. Pour les amis votre support et les nombreuses pause-café m'ont été d'un grand secours. Enfin, l'aboutissement de mes études a été en partie possible grâce à Réal qui dès le début de mon retour aux études, à toujours cru que je pouvais et que je devais aller plus loin. Merci pour tout.

# TABLE DE MATIÈRES

<b>CHAPITRE 1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
	1.1 Origine du produit.....	2
	1.2 Problématique.....	5
 <b>CHAPITRE 2</b>	 <b>Revue de littérature.....</b>	 <b>6</b>
	2.1 Composition de la formule adaptée pour nourrissons.....	7
	2.1.1 Système protéique.....	7
	2.1.1.1 Les caséines.....	8
	2.1.1.2 La micelle de caséine.....	9
	2.1.1.3 Les protéines sériques.....	10
	2.1.2 Système lipidique.....	12
	2.1.3 Hydrates de carbones.....	13
	2.1.4 Minéraux et vitamines.....	15
	2.2 Description résumé du produit.....	16
	2.3 Procédé de fabrication.....	18
	2.3.1 Description des étapes du procédé.....	18
	2.3.2 Les effets du procédé.....	22
	2.3.2.1 Homogénéisation.....	22
	2.3.2.2 Traitements thermiques.....	23
	a) Proteines.....	23
	b) Lipides.....	25

	c) Lactose.....	26
	d) Minéraux.....	26
2.4	Phénomènes de déstabilisation.....	28
2.4.1	Les protéines.....	28
2.4.2	L'émulsion.....	29
2.4.2.1	Crémage.....	29
2.4.2.2	Floculation.....	30
	a) pont de polymères.....	30
	b) zone d'épuisement.....	31
2.4.2.3	Coalescence.....	33
2.5	Méthodes d'isolement de la matière grasse.....	34
2.5.1	Centrifugation.....	34
2.6	Méthodes d'isolement des protéines adsorbées.....	36
2.6.1	Utilisation de dissociants.....	37
2.6.2	Action spécifique des dissociants.....	38
<b>CHAPITRE 3:</b>	<b>Hypothèse, buts et objectifs.....</b>	<b>39</b>
3.1	Hypothèse.....	40
3.2	Buts.....	40
3.3	Objectifs.....	41

<b>CHAPITRE 4: Study of the fat globule membrane composition, in infant formula, before and after sterilization.....</b>	<b>42</b>
4.1 Résumé.....	43
4.2 Abstract.....	44
4.3 Introduction.....	45
4.4 Materials and Methods.....	47
4.4.1 Samples supplies.....	47
4.4.2 Separation of infant formula samples before and after sterilization.....	47
4.4.3 Chemical analysis.....	48
4.4.4 SDS-Polyacrylamide Gel electrophoresis.....	49
4.4.5 Determination of fat globules size distribution and protein load.....	49
4.5 Results.....	51
4.5.1 Mass balance.....	51
4.5.2 Fat and protein recovery.....	51
4.5.3 PAGE analyses .....	52
4.5.4 Specific surface area of the fat globule membrane and protein load.....	53
4.6 Discussion.....	54
4.7 Conclusion.....	58



4.8 References.....	59
---------------------	----

## **CHAPITRE 5: Infant formula fat globule membrane:**

### **Study of $\beta$ - mercaptoethanol and Sodium Dodecyl Sulfate**

<b>dissociation of proteins components.....</b>	<b>67</b>
---	-----------

5.1 Résumé.....	68
-----------------	----

5.2 Abstract.....	69
-------------------	----

5.3 Introduction.....	70
-----------------------	----

5.4 Materials and Methods.....	72
--------------------------------	----

5.4.1 Samples supplies.....	72
-----------------------------	----

5.4.2 Separation and washing of top layer infant formula before and after sterilization.....	72
---	----

5.4.2.1 Centrifugation.....	72
-----------------------------	----

5.4.3 Chemical analysis.....	74
------------------------------	----

5.4.4 SDS-Polyacrylamide Gel electrophoresis.....	75
---	----

5.5 Results.....	76
------------------	----

5.5.1 Mass balance of the resuspended top layer samples.....	76
---	----

5.5.2 Protein recovery of the resuspended top layer samples.....	77
---	----

5.5.3 PAGE analysis.....	78
--------------------------	----

5.6 Discussion.....	80
5.7 Conclusion.....	85
5.8 References.....	86
<b>CHAPITRE 6: Conclusion générale.....</b>	<b>95</b>
6.1 Conclusion générale.....	96
6.2 Perspective.....	97
<b>Toutes les références citées.....</b>	<b>98</b>

## Liste des Tableaux

- Tableau 1.1:** Tableau de comparaison de la composition du lait de vache et du lait maternel.
- Tableau 2.1:** Liaisons et interactions protéine-protéine.
- Tableau 4.1:** Protein load of the lipid system in the infant formula before and after sterilization.
- Tableau 4.2:** Fat/protein ratio in the infant formula before (BT0) and after sterilization (AT0, AT1, AT3).
- Tableau 5.1:** Determination of the protein to fat ratio in the infant formula before (BT0) and after sterilization (AT0,AT1, AT3).

## Liste des Figures

- Figure 2.1:** Représentation schématique de la floculation en zone d'épuisement (depletion-floculation).
- Figure 4.1:** Organization of the sampling.
- Figure 4.2:** Recovery of the top layer, serum phase and pellet by centrifugation (40 000g, 60 min. 5°C) before (T0) and after sterilization (T0,T1,T3).
- Figure 4.3a:** Fat recovery among top layer, serum phase and pellet by centrifugation (40 000g, 60 min. 5°C) before (T0) and after sterilization (T0,T1,T3).
- Figure 4.3b:** Protein recovery among top layer, serum phase and pellet by centrifugation (40 000g, 60 min. 5°C) before (T0) and after sterilization (T0,T1,T3).
- Figure 4.4:** Electrophoresis SDS-PAGE gel of the infant formula before (BT0) and after sterilization (AT0).
- Figure 5.1:** Organization of sampling.
- Figure 5.2:** Experimental plan for preparation, washing and separation of the infant formula before and after sterilization.

**Figure 5.3:** Mass recovery of the top layer, serum phase and pellet by centrifugation (40 000g, 60 min. 5°C) with phosphate buffer,  $\beta$ -mercapto or SDS, before and after sterilization at T0, T1 and T3.

**Figure 5.4:** Protein recovery of the top layer, serum phase and pellet by centrifugation (40 000g, 60 min. 5°C) with phosphate buffer,  $\beta$ -mercapto or SDS, before and after sterilization at T0, T1 and T3.

**Figure 5.5:** Electrophoresis SDS-PAGE gel of the infant formula before and after sterilization with phosphate buffer,  $\beta$ -mercapto or SDS, at T? months.

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

## 1.1 Origine du produit.

Comme tous les jeunes mammifères, l'enfant doit naturellement se nourrir du lait de sa mère. Ce lait est parfaitement adapté afin de combler tous ses besoins nutritionnels et de croissance. De plus, il apporte aux nourrissons certains éléments de protection immunitaire afin de lui procurer un moyen de défense contre les agressions extérieures (Blanchon, 1985).

Cependant, depuis fort longtemps, des nourrissons se sont retrouvés dans des circonstances où la consommation du lait maternel n'était pas possible; soit que la quantité de lait maternel est insuffisante ou encore due à l'absence de la mère au moment de l'allaitement. Afin de remédier à cette situation, la vache, la chèvre et aussi l'ânesse ont été mises à contribution. Cependant un ajustement de la composition de ces laits était nécessaire. L'étape suivante a donc été de faire un écrémage partiel du lait et un ajout de lactose. Toutefois malgré les modifications de ces laits, certains nourrissons éprouvaient toujours des troubles de digestions. Cette situation s'expliquerait, en outre, par le fait que les protéines sériques dans 100 ml de lait de vache contiennent 1 gramme d'  $\alpha$ -lactalbumine et 3,6 grammes de  $\beta$ -lactoglobuline alors que pour le lait maternel il y a 2,6 grammes d'  $\alpha$ -lactalbumine et absence de  $\beta$ -lactoglobuline.

C'est donc à la fin des années 60 que l'on reconnaît le lait maternel comme étant unique (Blanchon, 1985). A partir de ce moment, on a alors tenté de reproduire le plus fidèlement possible la composition de ce lait.

Pour atteindre cet objectif, on a priorisé comme lait de départ celui de la vache, compte-tenu de sa grande disponibilité et ce, malgré la présence importante de protéines (Tableau 1.1). Afin de mimer le lait maternel, il a fallu diluer le lait de vache pour d'obtenir une quantité de protéines comparable. En plus, il a été nécessaire d'ajuster le ratio caséines et protéines sériques.

Pour la matière grasse, il a fallu principalement faire l'ajout d'huiles animales et/ou végétales pour enrichir le produit d'acides gras insaturés. L'ajout de lactose était important pour combler l'apport glucidique. En ce qui concerne les minéraux, le lait de vache se devait d'en être appauvri, principalement en sodium, potassium, calcium et en phosphore.

Tableau 1.1 Constituants majeurs du lait de vache et du lait maternel.

Composition en g / 100 ml				
	Protéines	Lipides	Glucides	Minéraux
Lait de vache	3,4	3,7	4,8	0,7
Lait maternel	1,2	3,8	7,0	0,2

Blanchon, 1985

L'élaboration de ces formules lactées adaptées, a conduit à la mise en marché des formules, comme on les connaît aujourd'hui. Dans la littérature, il existe plusieurs dénominations pour désigner ce même produit. Miles (1982) parle de formulations commerciales liquide pour nourrissons (Commercial liquid infant formulas), puis Scheider (1984), mentionne le nom de formules commerciales, alors que pour Blanchon (1985) il s'agit de laits infantiles ou de préparations lactées pour nourrissons. Par la suite, McDermott (1987), généralise le terme en utilisant formules pour nourrissons (Infant formulas) et les termes le plus récemment employés en littérature par Vigi et Chierici, (1994), sont un substitut commercial à base de lait (commercially prepared milk substitute) ou encore formules lactées (milk formulae).



Au cours des années, il y a donc eu évolution de la nomenclature. Toutefois, tous ces noms décrivent le même aliment soit un produit liquide ou en poudre, à base de lait, adapté et modifié afin de combler les besoins du nourrisson. C'est pourquoi l'utilisation de tous ces termes est employée sans aucune forme de discrimination.

Ainsi, les formules lactées pour nourrissons représentent un aliment complet à base de lait de vache dans lequel on retrouve des protéines (sériques et caséiques), de la matière grasse ainsi que des hydrates de carbones, des vitamines et des minéraux. Cette formule est donc une suspension de tous ces éléments.

Lors de l'élaboration de ces formules lactées pour nourrissons, plusieurs étapes sont nécessaires. Ces dernières peuvent varier selon la recette et le fabricant. (Rowley et Richardson, 1985).

De façon générale, on retrouve comme étapes:

- 1) l'élaboration de la recette afin d'obtenir la composition désirée;
- 2) le préchauffage du mélange;
- 3) l'homogénéisation (afin de disperser la matière grasse);
- 4) la période d'entreposage au frais (d'environ 8 heures);
- 5) l'ajout de vitamines et de micro-nutriments (juste avant la mise en boîte);
- 6) la stérilisation;
- 7) l'emballage.

Tous les ingrédients mentionnés précédemment sont mélangés en phase liquide de façon à reconstituer un lait pour nourrissons ayant la composition désirée.

## 1.2 Problématique.

En cours d'entreposage des formulations lactées liquides, le produit se modifie et évolue. La complexité du système ainsi que les nombreuses étapes du procédé et les températures élevées, entraînant une déstabilisation visuellement apparente.

Les phénomènes classiques d'instabilité d'une émulsion sont le crémage, la floculation et la coalescence. Normalement dans les formulations lactées, ces défauts ne devraient pas apparaître avant 18 mois. Toutefois, étant donné l'apparition précoce de ces phénomènes, ces derniers sont souvent associés par le consommateur, à une détérioration microbiologiques. Alors qu'il s'agit, sans plus, d'effets rattachés aux phénomènes mentionnés précédemment ou encore de l'évolution du système colloïdal.

## **CHAPITRE 2**

### **REVUE DE LITTÉRATURE**

## 2.1 Composition des formules adaptées pour nourrissons

Étant le seul aliment consommé par le nourrisson, ce dernier se doit d'être complet afin de combler tous les besoins nutritionnels nécessaires au bon développement et à la croissance de l'enfant (McDermott, 1987). L'objectif des formules lactées adaptées est donc de reproduire le plus fidèlement possible la composition de ce dernier à partir de lait de vache.

On retrouve actuellement sur le marché, plusieurs formulations adaptées. Ces formules adaptées se retrouvent commercialement sous forme de poudre, de liquide concentré ou sous forme prête-à-boire.

Leurs compositions varient selon le type de formulations. Dans le cas qui nous intéresse, le produit est une formule liquide concentrée. Elle possède une composition moyenne de : 3.1% (p/v) de protéines, 7.2% (p/v) de lipides, 14.1% (p/v) de glucides, 0.4% (p/v) de minéraux et vitamines (George et Labenthal, 1981).

### 2.1.1 Système protéique.

Le lait maternel représente un modèle difficile à imiter à partir de lait de vache, car la composition protéique diffère de façon importante et de plus, le ratio protéines sériques sur caséines est différent. Étant donné que le système protéique des formulations est composé majoritairement de lait de vache, les protéines sériques constituent 20 % des protéines du lait et les caséines 80%. On retrouve aussi, en faible quantité, des acides aminés libres, des nucléotides, de l'urée et de l'acide urique. C'est pourquoi, une modification du ratio protéique est nécessaire lors de l'élaboration des formules lactées adaptées. Le ratio passe alors de 20:80 pour le lait à celui de 60:40 pour les formulations pour nourrissons. Cet ajustement, en protéines sériques, dans les formulations lactées est réalisé pour mimer le lait maternel et par le fait même contribuer de façon importante à la qualité nutritionnelle (Miles, 1982) en modifiant le profil d'acides aminés.

### 2.1.1.1 Les caséines.

Toutes les caséines laitières sont des macromolécules peu structurées contenant du phosphore, et un grand nombre d'acides aminés parmi lesquels dominant l'acide glutamique et à un degré moindre la leucine et la proline (Pouliot, 1994). Cette dernière est répartie régulièrement dans la structure primaire. Sachant que la proline limite l'établissement d'une structure secondaire organisée, les caséines possèdent une structure lâche et désordonnée, rappelant celle d'une protéine dénaturée.

Toutefois, le nombre de résidus phosphorylés varie d'une caséine à l'autre. La présence de ces résidus permet aux caséines de s'associer à certains minéraux, en particulier le calcium. Par contre cette association avec le calcium réduit la solubilité des caséines.

De façon plus précise, la caséine  $\alpha_{s1}$  est la plus abondante des caséines, elle possède 199 acides aminés et 3 régions hydrophobes (1- 44, 90-113, 132-199). En plus, d'une région fortement chargée qui constitue le noyau de phosphosérines (41-80) (Swaisgood, 1992). Ces structures confèrent à la caséine, un comportement associatif.

La caséine  $\alpha_{s2}$  est la plus riche en résidus phosphorylés et par le fait même, la plus sensible au calcium. De plus, cette caséine possède à chacune de ses extrémités, des charges opposées et un site hydrophobe au centre (Cheftel *et al.*, 1985). Elle est composée de 207 acides aminés et le nombre de résidus phosphosérine se situe entre 8 et 13 (Whitney, 1988).

La principale caractéristique de la caséine  $\beta$  est son hydrophobicité et sa structure amphipolaire. En fait, elle est la plus hydrophobe des caséines du lait et la deuxième plus importante en quantité. Sa structure comporte 209 acides aminés, des résidus phosphosérine variant entre 1 et 5 et c'est elle qui contient le plus de proline (Swaisgood, 1992).

Enfin, la caséine  $\kappa$  possède une structure très amphipolaire et des quatre types de caséines, elle est la seule qui contient un résidu glucidique. Elle est composée de 169 acides aminés et d'un résidu phosphosérine. Cette caséine se différencie des autres mentionnées précédemment par la glycosilation des résidus thréonine et la susceptibilité du lien (105-106) phénylalanine-méthionine à l'attaque de la chymosine (Swaisgood, 1992).

#### 2.1.1.2. La micelle de caséine.

La micelle de caséine est une particule colloïdale sphérique, représentant une association de ces quatre caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  dans un rapport 4:1:4:1,3 (Walstra, 1990), et du phosphate de calcium, de petite quantité de magnésium, de sodium, de potassium et de citrate. La majorité des micelles de caséines possèdent un diamètre moyen de 150 nm. L'intégrité de la structure micellaire est maintenue par la présence de phosphate de calcium et par la présence en surface de la caséine  $\kappa$ , qui participe à la stabilité de la micelle de caséine en suspension (Rollema, 1992).

Les micelles de caséines sont de façon globale des structures qui résistent bien à des élévations de températures supérieures à 100° C et à des traitements d'homogénéisation sévères, alors que de faibles variations de la composition de la phase sérique ou des variations de pH peuvent les déstabiliser.

### 2.1.1.3 Les protéines sériques.

Le deuxième grand groupe des protéines sont les protéines sériques ou solubles. Elles se retrouvent en quantité plus importante dans les formulations, car du point de vue nutritionnel, les protéines sériques sont de qualité supérieure aux caséines et en plus, elles permettent une composition protéique se rapprochant sensiblement du lait maternel. En effet, ces protéines sont riches en acides aminés essentiels tels la lysine, la méthionine et le tryptophane. La composition en acides aminés des protéines sériques est très différente de celle des caséines. Elles contiennent moins d'acide glutamique et de proline, mais elles sont plus riches en acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) (Cheftel *et al.*, 1985). Ce groupe se divise principalement en 4 fractions soit: la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg), l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -la), la sérumalbumine (BSA) et les immunoglobulines (Ig).

La  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) est la plus importante des protéines du lactosérum et est constituée de 162 acides aminés. C'est une protéine globulaire, riche en lysine, en leucine, en acide glutamique et en acide aspartique. Les résidus hydrophobes de cette protéine sont enfouis au cœur de la molécule. Elle contient deux ponts disulfures et un groupement thiol (SH) libre (Swaisgood, 1992) en position 119 ou 121. La dénaturation provoque une ouverture de la structure, qui amène l'exposition du groupement SH libre en position 121 de la chaîne protéique. Lors du chauffage, la  $\beta$ -lg peut également former un complexe avec la  $\kappa$ -caséine située à la surface des micelles. C'est d'ailleurs le groupement SH libre qui serait responsable de cette association. Cette protéine sérique représente 50 % des protéines solubles.

L' $\alpha$ -lactalbumine, ( $\alpha$ -la) est également une protéine globulaire et elle représente de 15 à 25% de ce groupe, sa structure comporte 123 acides aminés (Swaisgood, 1992). Elle ne contient pas de groupement SH libre et est plus résistante à la chaleur que la  $\beta$ -lactoglobuline.

La sérum albumine bovine (BSA) est particulièrement riche en lysine et en cystéine. Elle est très soluble dans l'eau et comporte dans sa molécule un groupement thiol libre et 17 ponts disulfures intrapeptidiques. Sa structure primaire est constituée de 582 résidus d'acides aminés.

Les immunoglobulines (Ig), sont responsables de la transmission de l'immunité de la mère au jeune enfant et sont présentes en grande quantité dans le colostrum. Mais, dans le lait, cette fraction ne constitue que 1% des protéines solubles.

A cause de leur structure globulaire plus compacte, les protéines du lactosérum sont plus sensibles à la chaleur que les caséines. La majorité des dénaturations thermiques des protéines globulaires se produisent entre 50 et 95°C.



### 2.1.2 Système lipidique

La fraction lipidique, (phase dispersée), présente dans les formulations pour nourrissons, est décrite comme étant une émulsion stable de gouttelettes microscopiques d'huile végétale et animale dispersées dans un milieu aqueux, (phase continue) (Miles, 1982).

Le choix de ces huiles, dans les formules lactées commerciales, est fait selon leur degré d'insaturation et le profil d'acides gras essentiels afin de simuler le plus possible, le lait humain. C'est donc l'huile de maïs et de tournesol qui seront le plus utilisées. Par ces huiles, l'apport d'acides gras saturés et insaturés sont comblés à l'exception de l'acide linoléique. La matière grasse d'origine végétale devra donc s'assurer de satisfaire les quantités de cet acide gras. C'est pourquoi, l'utilisation de mélanges complexes de matière grasse d'origines différentes est employée. Cette situation permet d'obtenir un profil d'acides gras aussi semblable que possible à celui du lait maternel.

En plus de la matière grasse déjà présente dans les formulations, l'ajout de stabilisants et d'agents émulsifiants est fait lors de la fabrication de formulations adaptées permettant alors d'obtenir une émulsion relativement stable en cours d'entreposage.

Les monoglycérides et la lécithine sont les plus utilisés pour diminuer la tension interfaciale entre la phase aqueuse et lipidique (Rowley et Richardson, 1985). Les monoglycérides sont souvent utilisés pour les émulsions alimentaires. Par leurs structures moléculaires, ils créent une barrière entre les gouttelettes de gras et les empêchent de se regrouper. De plus, parce qu'ils se transforment facilement dans l'organisme, les monoglycérides sont des additifs alimentaires relativement inoffensifs (Scheider, 1984). La lécithine représente un groupe de phospholipides. Elle agit comme agent émulsifiants efficace dans la dispersion de matière grasse (Scheider, 1984).

### 2.1.3 Hydrates de carbone (glucides)

Sachant que le lait de vache ne contient que 4,8 g/100ml de glucides, un supplément est alors nécessaire. Pour ce faire, il s'agit d'ajouter du lactose, ou du saccharose (glucose et fructose) ou encore des malto-dextrines (2 glucoses + fragment de polysaccharides). Les dextrines utilisées en présence de glucose sont des additifs alimentaires sans danger car l'organisme les digère très facilement et métabolise le glucose résiduel au moment de la digestion (Scheider, 1984). Ces dextrines favorisent en plus une augmentation de la viscosité du produit.

Étant donné la présence importante de lactose dans le produit, lors d'un traitement thermique sévère, un brunissement non enzymatique se produit. Il s'agit d'un ensemble complexe de réactions impliquant des sucres réducteurs ou des composés carbonylés et des composés aminés libres. Cette réaction survient durant le procédé de transformation. Elle est accélérée par la chaleur et apparaît tout particulièrement lors de la stérilisation. Ce brunissement non enzymatique conduit au développement de couleurs, d'odeurs et de saveurs. Cette réaction dans les formulations lactées est indésirable car l'apparence visuelle du produit en est affectée. De plus la réaction de Maillard, rend indisponible une partie des résidus de lysine diminuant la valeur nutritive du produit.

Comme les malto-dextrines, la carragénine peut aussi être ajoutée aux formulations lactées. C'est aussi un polysaccharide soit un galactose sulfaté provenant d'extrait d'algues rouges (Hansen, 1982). Son ajout est premièrement fait dans un but de stabiliser la formule lactée plutôt que d'agir comme agent sucrant (Rowley et Richardson, 1985). Ce polysaccharide, se retrouve en faible quantité dans les formules lactées.

Dans le lait, la carragénine n'existe pas sous forme d'un colloïde libre, il semble qu'elle s'associerait alors à la micelle de caséine afin de rendre la structure micellaire plus stable (Lin et Hansen, 1970).

La carragénine permet donc d'augmenter la viscosité du produit en plus de retarder la séparation des phases aqueuses et lipidiques lors de l'entreposage. Elle est capable aussi de stabiliser les protéines du lait sensible au calcium. Selon Hansen (1982), ce sont peut-être ses interactions avec le calcium qui permettraient d'éviter la remontée de la matière grasse. De plus, Snoeren (1976) a démontré qu'il existe une attraction électrostatique entre la carragénine et la  $\kappa$ -caséine. Enfin, l'action de stabilisant, comme la carragénine, est complexe car cette dernière interagit en présence de minéraux et est influencée par le pH du lait (Walstra et Jenness, 1984). Toutefois, en ce qui concerne les formulations pour nourrissons et ses interactions avec la carragénine, il existe peu de littérature faisant état des liaisons entre la carragénine et les ingrédients présents.

Enfin, la concentration de la carragénine influence l'action de cette dernière dans un système complexe. A des concentrations près de 0.1% le système gélifie et ce, peu importe la concentration du lait: un réseau de carragénine est formé et les micelles de caséines semblent interagir avec les chaînes latérales qui ne sont pas impliquées dans le réseau. Lorsque les concentrations sont inférieures à 0.1 %, le système demeure liquide et instable. Il y a formation d'agrégats, composés de chaînes latérales partiellement recouvertes de micelles de caséines (Langendorff *et al.*, 1997).

#### 2.1.4 Minéraux et vitamines.

Plusieurs minéraux solubles sont ajoutés afin de satisfaire aux exigences nutritionnelles et légales. La quantité, la forme, le ratio des principaux minéraux (carbonate de calcium, phosphate de calcium, citrate de potassium, chlorure de magnésium et du phosphate de magnésium) ont une influence sur la stabilité du système colloïdal.

De plus, le développement d'une suspension stable de phosphate de calcium est difficile à obtenir, car la sédimentation est presque toujours présente lors de l'entreposage (Miles, 1982), de formulations lactées pour nourrissons.

Cette situation s'explique selon Fox (1982) par le fait que les cations divalents (par exemple  $\text{Ca}^{++}$ ) sont reconnus pour jouer un rôle dans les phénomènes d'instabilité des systèmes protéiques du lait lors de traitement thermique. Cette instabilité des protéines et des minéraux serait peut-être due aux interactions de la  $\beta$ -lactoglobuline et de la  $\kappa$ -caséine (Holt, 1985). Une attention particulière lors du choix et de la quantité des minéraux doivent donc être portée lors de l'ajout de ces derniers dans les formulations lactées.

Les vitamines liposolubles et hydrosolubles sont souvent ajoutées, après traitements thermiques mais avant stérilisation compte-tenu de leur fragilité, (McDermott, 1987) toutefois, leurs effets sur la stabilité de l'émulsion sont considérés comme mineurs.

## 2.2 Description résumée du produit.

La formulation lactée pour nourrissons est essentiellement une suspension de protéines, d'huile émulsifiée en petites gouttelettes, de lactose et d'une faible proportion de minéraux solubles et d'autres ingrédients mineurs ajoutés au mélange. Il s'agit donc d'un système complexe et complètement reconstitué. Les formulations à l'étude, sont des concentrées, en boîtes de conserves stériles de 385 ml et sans ajout de fer.

De façon globale, l'élaboration des formules lactées, se fait à partir de lait de vache, qui devra être ajustée dans un seul but, soit celui d'obtenir un aliment complet, se rapprochant le plus possible du lait maternel. Pour ce faire, les modifications nécessaires sont de:

- 1) Diminuer la quantité totale de protéine et le ratio protéines sériques :caséines à 60:40.
- 2) Ajuster à la hausse la quantité de lactose.
- 3) Modifier la source lipidique du lait, par ajout d' un mélange d'huile végétale et animale.
- 4) Diminuer la quantité de minéraux totaux.
- 5) Maintenir le pH au environ de 6,7 et la force ionique à 0,1 M.

Lors de la reconstitution du produit à partir des ingrédients, la membrane des globules de gras se compose de couches adsorbées successives de triglycérides, de phospholipides, de lipoprotéines insolubles et de protéines solubles (Cheftel *et al.*, 1985). La dimension des globules de gras devient alors variable et non uniforme. Toutefois, la majorité de ceux-ci semblent être de l'ordre du micromètre (Miles, 1982).

Compte-tenu de la complexité de l'émulsion et des nombreux ingrédients qui la composent (protéines, lipides, lactose, stabilisants, vitamines et minéraux) différentes interactions entre les composés sont possibles. Des modifications et des changements chimiques et/ou physiques sur le produit sont presque inévitables. C'est d'ailleurs dans ce même ordre d'idée que Fox (1982), Harwalkar (1982) et Morr (1985) ont remarqué des déstabilisations des émulsions engendrées par des variations de dimension des globules de gras, de la quantité d'huile émulsifiée et de la composition de la membrane. C'est donc tous ces éléments qui, en cours d'entreposage, influenceraient la structure et la stabilité de l'émulsion.

## 2.3 Procédé de fabrication.

Lors de l'élaboration des formules lactées pour nourrissons, de nombreuses étapes sont nécessaires. Certaines de ces étapes sont plus déterminantes que d'autres sur les caractéristiques du produit. L'homogénéisation et les traitements thermiques sont de celles qui influencent le plus la structure et par le fait même, la stabilité du produit.

C'est la membrane des globules de gras qui se modifie et qui interagit avec les composants de son milieu selon les procédures de fabrication et la manière dont celles-ci sont appliquées. (McPherson and Kitchen, 1983).

### 2.3.1 Descriptions des étapes du procédé.

#### **Préchauffage du lait écrémé.**

Il s'agit du premier traitement thermique à être appliqué au lait écrémé qui servira à l'élaboration de la formulation lactée. Cette étape se veut un chauffage intensif afin de réduire la flore microbienne et permettre d'augmenter la stabilité thermique de la formulation pour nourrissons.

#### **Élaboration du mélange.**

Lors de cette étape tous les ingrédients sont incorporés au mélange. Cette étape se produit à des températures entre 60-70 °C et sous agitation continue. On retrouve dans la formulation, le lait écrémé en poudre ou liquide, le lactose et/ou d'autres sucres, la poudre de lactosérum déminéralisée, le stabilisant (comme la carragénine), la lécithine et les vitamines liposolubles mélangées

préalablement à la matière grasse et enfin les minéraux et d'autres micro-nutriments (Pouliot et al., 1997).

Afin d'obtenir un ratio (60:40), la poudre de lactosérum devra être déminéralisée de façon à éviter des problèmes de concentrations élevées en sels. Ainsi, le lactosérum sera déminéralisé, par électrodialyse. La déminéralisation partielle permet, selon McDermott, (1987) d'éviter un apport minéral excessif aux nourrissons en plus d'améliorer la saveur de la formule lactée. Cette étape sera effectuée par électrodialyse. Cette dernière aura donc comme double avantage de diminuer la concentration totale en sel et d'augmenter celle en lactose. De façon globale, l'électrodialyse allie le concept du champ électrique et de la dialyse. Le premier permet aux minéraux en solution de se diriger, sous l'action d'un courant électrique continu, vers l'un ou l'autre pôle. Le deuxième est possible à raison de la superposition des membranes de dialyse, alternativement anionique et cationique. Les membranes anioniques sont des membranes sur lesquelles on a déposé une fine couche de résine échangeuse d'ions, greffée d'un groupement alcalin, en général, un amide quaternaire. Les membranes cationiques, elles, sont greffées d'un groupement acide, en général un groupement sulfonique.

Enfin, la température utilisée pour l'étape d'élaboration, se situe dans une zone critique de dénaturation, pour les protéines sériques. Ainsi, la  $\beta$ -lactoglobuline se dénature de façon irréversible à 73 °C alors que l' $\alpha$ -lactalbumine se dénature de façon réversible à 65 °C ( Pearce, 1992). Cette situation occasionne alors des modifications des propriétés et des interactions des protéines entre elles et avec d'autres composés.



### **Préchauffage du mélange.**

Ce deuxième traitement thermique se produit à des températures d'environ 100 °C durant 1 à 2 minutes à l'aide d'un échangeur à plaque ou par injection directe de vapeur (Pouliot *et al.*, 1997). A cette température, différentes réactions concernant chacun des ingrédients (protéines, lactose, stabilisants, minéraux), se produisent.

### **Homogénéisation.**

L'homogénéisation est un traitement physique qui a pour objet de réduire la matière grasse en des globules de dimension plus petite ( $< 1 \mu\text{m}$ ). Ce procédé permet ainsi de retarder la remontée de globules de gras et d'assurer une meilleure homogénéité du produit. L'homogénéisation est réalisée par un homogénéisateur à deux stages classique Manton-Gaulin. La température d'exécution est d'environ 70 °C (Pouliot *et al.*, 1997).

Des études préliminaires, effectuées sur le produit, permettent d'affirmer que la dimension moyenne des globules de gras est de 500 nm (Vallerand, 1997). La membrane des globules de gras nouvellement formée est dite réorganisée.

### **Chambrage.**

Ce temps d'entreposage à froid, est habituellement de 8 à 12 heures et est essentiel afin de prévenir la coagulation lors de la stérilisation. De plus, il semble que l'équilibre minéral se stabilise.

**Stérilisation.**

Après le chambrage, la stérilisation s'effectue à 120 °C durant quelques minutes dans des boîtes de conserves hermétiquement scellées, placées dans un stérilisateur rotatif.

**Entreposage.**

Des réactions se poursuivent, après la mise en boîte de conserve. Néanmoins, elles ne sont pas clairement définies et elles entraînent la réorganisation du produit.

## 2.3.2 Les effets du procédé sur le produit commercial.

### 2.3.2.1 Description de la formation d'une membrane reconstituée pendant l'homogénéisation.

L'homogénéisation permet de diminuer le diamètre des gouttelettes de gras. Cette étape est réalisée en forçant, à pression élevée le produit à travers une fente étroite. Ceci entraîne des forces de cisaillement très élevées, de la cavitation et des microturbulences qui déforment et modifient les globules de gras. La surface de chaque globule de gras diminue et la composition de ce dernier en est tout autant affectée par ce traitement (Walstra, 1983). C'est pourquoi, concernant les formulations pour nourrissons, la membrane des globules de gras est dite réorganisée ou reconstituée.

Selon Goff et Hill (1993), ce sont les nombreuses différences de composition, de structure et de comportement entre la membrane initiale et la membrane dite reconstituée, qui suscitent tant d'intérêt dans le domaine de la recherche sur les étapes de production de produits laitiers. Conséquemment, une grande variété de membranes des globules de gras peuvent être formées selon la composition protéique de la solution homogénéisée et les conditions du procédé (Aguilera and Kessler, 1988).

Lorsqu'il y a homogénéisation du lait de vache, la dimension des globules de gras diminue et une nouvelle interface huile/eau est créée en fonction des pressions utilisées (Mulder et Walstra, 1974). Cette dernière, est recouverte par du matériel amphiphile (principalement des protéines) (Oortwijn et Walstra, 1979). Ainsi, à la surface de la membrane nouvellement formée, les particules de caséines sont adsorbées de façon préférentielle aux protéines sériques (Darling et Butcher, 1978).

Toutefois, dans les formulations adaptées pour nourrissons, la proportion de caséines est inférieure, dans un ratio 60 :40, à celle des protéines sériques. Ainsi, il semble que la composition de la membrane des globules de gras, suite à l'homogénéisation, serait principalement formée de protéines sériques dénaturées et agrégées, et en proportion plus faible de caséines.

Dans les formulations lactées, l'homogénéisation est une étape qui modifie la membrane des globules de gras et les caractéristiques de cette dernière. En effet, l'homogénéisation permet de favoriser la stabilité de l'émulsion lors des traitements thermiques et de l'entreposage. McCrae et Muir (1991) ont démontré que la quantité de protéines adsorbées à la surface des globules de gras était l'élément déterminant de la stabilité du lait reconstitué.

#### 2.3.2.2 L'influence des traitements thermiques sur les composants.

##### **a) Protéines.**

Lors du procédé de fabrication des formulations lactées, trois traitements thermiques, le pré-chauffage du lait écrémé, le préchauffage du mélange et la stérilisation, sont utilisés. Durant ces traitements, de nombreuses réactions influencent les propriétés physiologiques et nutritionnelles du lait (Walstra et Jenness, 1984) et de ses produits dérivés.

Ces étapes, aux températures élevées, favorisent entre autres la modification des structures protéiques. Dans un lait de consommation, ayant un ratio caséines:protéines sériques (80:20), les changements les plus évidents, occasionnés aux protéines sériques sont leurs interactions avec les micelles de caséines (Creamer *et al.*, 1978; Singh et Fox, 1985). Ces derniers conduisent à la formation de complexes de hauts poids moléculaires formés de protéines sériques et de  $\kappa$ -caséine (Singh et Latham, 1993). Toutefois, le type et l'étendue de la liaison entre les protéines sériques et les micelles de caséines est fonction de la sévérité du traitement thermique (Hostettler *et al.*, 1965; Josephson *et al.*, 1967).

Cependant, dans une formulation pour nourrissons, le ratio diffère. Ainsi, les protéines sériques dénaturées, n'ayant pas été associées avec la micelle de caséines seraient alors disponibles pour se complexer ou s'agréger entre elles, ou avec d'autres composés présents dans les formules lactées.

Ruegg *et al.*, (1977) ont démontré, que les protéines sériques présentes dans le lait, comme les immunoglobulines et la sérum albumine bovine sont les plus facilement dénaturées. La  $\beta$ -lactoglobuline est toutefois plus résistante que ces dernières mais l' $\alpha$ -lactalbumine demeure la plus stable à la chaleur. Cette affirmation semble s'appliquer aussi aux formules adaptées pour nourrissons.

La microscopie électronique du lait de vache a permis de constater que le chauffage à haute température augmente non seulement la dimension des micelles de caséines mais aussi le nombre de particules de protéines plus petites que les micelles de caséines (Creamer *et al.*, 1978; Mohammad et Fox, 1987). Quelques unes des petites particules sont composées de protéines solubles dénaturées, lesquelles ne sont pas attachées à la micelle et aux caséines solubles formées par la désintégration des micelles (Morr, 1969; Aoki *et al.*, 1974). Certains de ces changements sont aussi transposables aux formulations pour nourrissons.

## **b) Lipides.**

Sachant que des protéines, des émulsifiants et des stabilisants, forment la membrane du globule de gras, les interactions produites lors du chauffage font intervenir ces constituants.

Pour les protéines, composant la membrane des globules de gras, lors des traitements thermiques, les interactions des protéines sériques avec les micelles de caséines du lait semblent plus importantes quantitativement que les réactions avec le globule de gras lui-même. Et ce, même si les protéines sériques dénaturées semblent migrer à l'interface, occasionnant une augmentation de densité de la membrane des globules de gras (Fink et Kessler, 1985).

Ainsi, les protéines sériques dénaturées et associées avec la  $\kappa$ -caséine se retrouvent à la surface de la membrane des globules de gras et des micelles de caséines (Singh *et al.*, 1996). Ainsi, suite au traitement thermique, la  $\beta$ -lactoglobuline aurait préférentiellement des interactions avec la  $\kappa$ -caséine et ce, à la surface des globules de gras.

Les émulsifiants, comme les phospholipides, migrent à la surface de la phase aqueuse durant le chauffage (Radema, 1956; Koops et Tarassuk, 1959; Houlihan *et al.*, 1992), seuls ou associés avec d'autres composés (Mulder et Walstra, 1974).

Les stabilisants, comme la carragénine, lors du préchauffage (70 °C) sont actifs principalement avec les caséines. Ceux-ci permettent d'améliorer la stabilité des formules lactées, à long terme en favorisant l'établissement de liaisons entre les protéines et l'adsorption de l'eau.

### **c) Lactose.**

Lors d'élévation de la température, la solubilité du lactose augmente. Puisqu'il s'agit d'un sucre réducteur, le lactose est susceptible d'induire la réaction de Maillard, menant à l'apparition de composés mélanoïdes bruns réducteurs. C'est donc suite à la dégradation du lactose, qu'il y a formation d'acides organiques modifiant par le fait même variation du pH de la solution. Malgré cette diminution du pH du lait, le lactose ne semble pas être impliqué de façon particulière dans les réactions d'instabilité des formulations lactées.

### **d) Minéraux.**

Le système minéral, dans une formule lactée, est en équilibre dynamique qui se modifie durant le chauffage (McDermott, 1987). Selon Guo *et al.*, (1996), les interactions qui se produisent lors de l'augmentation de la température peuvent résulter de la redistribution des nutriments, spécialement les minéraux associés avec les caséines. Pour ce qui est des protéines sériques, les principales interactions impliquées avec les minéraux concernent l' $\alpha$ -lactalbumine qui peut lier le calcium ou d'autres cations divalents. La  $\beta$ -lactoglobuline, quant à elle, interagit peu avec les minéraux lors du traitement thermique.

Enfin, dans les formules pour nourrissons, les traitements thermiques comme la stérilisation finale, favorisent la formation d'interactions de type: protéine-protéines, lipides-protéines, hydrate de carbone-protéines, carragénine-protéines et enfin minéraux-protéines (McDermott, 1987). De ces réactions, plusieurs se poursuivent en cours d'entreposage.

De façon plus précise, l'impact des traitements thermiques, dans le lait est substantiel. Il y a dénaturation des protéines sériques, agrégation de micelles de caséines en des grosses particules protéiques (Schmidt, 1968; Creamer et Matherson, 1980; Mohammad et Fox, 1987) et de nombreuses interactions entre les composés. Ainsi ces réactions peuvent aussi être présentes dans les formulations pour nourrissons.



## 2.4 Phénomènes de déstabilisation des formules lactées.

Les formules lactées sont des systèmes complexes où des changements chimiques et physiques au cours du temps sont inévitables (Miles, 1982). Les changements les plus importants concernent les interactions entre la membrane de globules de gras et les protéines. Selon Zahar et Smith (1996), la stabilité de l'émulsion peut être affectée par les protéines adsorbées et l'épaisseur de la membrane des globules de gras.

### 2.4.1 Les protéines.

De nombreuses interactions sont impliquées dans la structure des formules lactées. Il y a premièrement les interactions électrostatiques et deuxièmement les forces d'attraction.

1) Ces **interactions électrostatiques** se produisent lorsque des groupements chargés, portés par les acides aminés se trouvent à proximité. Les interactions électrostatiques contribuent au maintien de la structure des protéines. Toutefois, ce type de liaisons est sensible aux variations de pH.

2) Dans les forces d'attraction, on retrouve entre autres les forces de van der Waals et les interactions hydrophobes.

Les forces de **van der Waals** s'établissent lorsque les molécules se rapprochent et s'attirent à cause d'une variation de densité électronique.

Les **interactions hydrophobes** proviennent des chaînes latérales des acides aminés qui possèdent des structures chimiques apolaires. En milieu aqueux, les chaînes d'acides aminés hydrophobes auront tendance à se regrouper, au centre de la molécule, afin de réduire leur contact avec l'eau ou d'autres molécules polaires.

La présence de protéine peut aussi favoriser des phénomènes de restriction. On retrouve des **contraintes stériques** à l'interface qui sont occasionnées par les groupements latéraux des acides aminés qui sont volumineux et qui nuisent à l'enroulement spécifique d'une protéine. Ce type de contrainte est plus physique que chimique. Néanmoins, elles peuvent aussi influencer la structure protéique et les liaisons possibles avec d'autres constituants.

#### 2.4.2 L'émulsion.

En ce qui concerne la matière grasse, dans les formules lactées, trois mécanismes principaux sont à l'origine de la déstabilisation de l'émulsion soit: le crémage, la floculation et la coalescence.

##### 2.4.2.1 Crémage.

Il est la première forme d'instabilité rencontrée dans une émulsion. Ce phénomène se traduit par la remontée des globules de gras à la surface du produit. Cette couche de gras se produit en raison de la différence de densité entre la matière grasse et la phase aqueuse. Dans les produits lactés pour nourrissons, le crémage est un phénomène naturel qui se produit lors de l'entreposage (Miles, 1982). Lors de cette déstabilisation, les globules de gras demeurent distincts. C'est pourquoi par une simple agitation vigoureuse, la matière grasse peut-être redispersée. Le crémage commence immédiatement après la production et se poursuit durant tout le temps d'entreposage (Miles, 1982). Toutefois, en industrie, l'ajout de gomme alimentaire permet d'inhiber ou de ralentir ce processus, en augmentant la viscosité de la phase aqueuse.

#### 2.4.2.2 Flocculation.

La flocculation est le regroupement des globules de gras, sans la rupture du film interfacial qui les entoure. Ce mécanisme se réfère aux réactions d'agréations des globules de gras entre eux, prenant des formes irrégulières. C'est pourquoi, la flocculation augmente la taille apparente des gouttelettes (Cheftel *et al.*, 1985). Toutefois, les globules conservent leur taille originale.

Ce phénomène se produit, le plus souvent, à cause de la suppression de répulsions électrostatiques ou de charges électriques.

Cette déstabilisation, se produit fréquemment en présence de macromolécules (protéines, polysaccharides) adsorbées. C'est pourquoi, quand un polymère est introduit dans un système colloïdal, la flocculation est souvent observée (Napper, 1983).

La flocculation de l'émulsion peut se produire de 2 façons. Selon que les protéines soient adsorbées (ponts) ou non à la surface du globule de gras (épuisement).

Il peut donc y avoir formation de   a) ponts de polymères (bridging flocculation)  
ou de   b) zone d'épuisement (depletion flocculation)

a) La formation des ponts de polymères (bridging flocculation), se produit lorsque des macromolécules (protéines ou polysaccharides) s'adsorbent sur plus qu'un globule de gras formant alors un pont particule-particule. Cette liaison est favorisée lorsque la concentration en polymères est basse ou que le temps nécessaire à l'adsorption est faible, comme lors de l'homogénéisation.

Selon Goff et Hill (1993), ce phénomène se retrouve souvent dans le lait ou des produits à base de lait, compte-tenu de la présence des micelles de caséines qui peuvent s'adsorber en même temps sur deux ou plusieurs globules de gras.

b) Cette zone d'épuisement s'organise lorsque les particules colloïdales sont si près les unes des autres que les molécules de polymères, en surplus, sont exclus de la région continue. Ainsi, les particules sont suffisamment proches entre elles, que les macromolécules dissoutes mais non adsorbées n'arrivent pas à prendre place à la surface des particules. Le gradient de pression osmotique résultant, engendre une floculation spontanée des globules de gras.

Asakura et Oosawa (1954) sont les premiers à présenter des analyses quantitatives de ce phénomène d'épuisement. Ces auteurs ont avancé l'hypothèse, que la déstabilisation d'un produit est occasionné par la présence des forces attractives entre les particules en suspension dans une solution de polymères, lorsqu'il n'y a aucune interaction directe entre les particules elles-mêmes, ni entre les particules et les macromolécules dissoutes. Cette zone est située près de la surface, en contact avec une solution de polymères non-adsorbées.

Ainsi, la pression osmotique de la solution, à l'extérieur des particules serait plus forte que celle entre les particules. Un phénomène d'attraction, entre deux molécules, est alors favorisé et une zone d'épuisement, pour les macromolécules non adsorbées, est formée. Donc, plus la pression osmotique se fait importante, plus il y a attraction entre les molécules, et par le fait même, exclusion des polymères libres de la surface des molécules. L'importance des interactions à l'intérieure de la zone d'épuisement est dépendante de la pression osmotique produite par la solution de polymères.

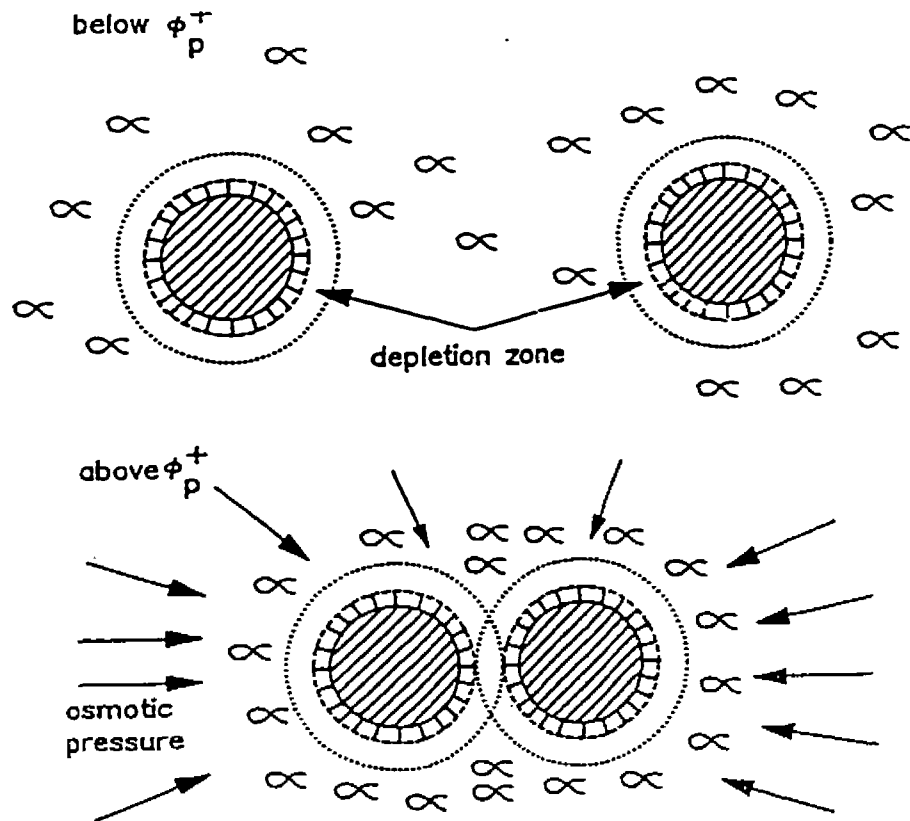


Figure 2.1. Représentation schématic de la floculation en zone d'épuisement (depletion flocculation), selon Tadros (1996).

La figure 2.1 (haut), montre que pour une concentration volumique inférieure à la fraction volumique critique,  $\phi_p^+$ , il y a formation d'une zone d'épuisement, qui est influencée par le poids moléculaire des polymères libres. Ainsi, plus  $\phi_p^+$  est élevée, plus la zone d'épuisement est importante et plus la pression osmotique sera forte, favorisant l'attraction des molécules entre elles.

La présence de polymères libres dans une solution, est influencée par différents paramètres. En effets, selon Tadros (1996), la fraction volumique critique,  $\phi_p^+$ , pourrait être affectée par les fractions volumiques de la suspension et de la grosseur des particules. Donc, plus le poids moléculaire des molécules est élevé, plus faible est la valeur de la fraction volumique critique.

La présence de polymères non adsorbés, solubles dans l'eau, comme des polysaccharides de hauts poids moléculaires (dextran, xanthan....) amorcent la floculation par un mécanisme de d'épuisement. C'est le haut poids moléculaire de ces macromolécules et l'asymétrie de forme des ces dernières qui seraient les facteurs les plus importants de cette déstabilisation. Ces facteurs occasionneraient alors, une variation de la pression osmotique de la solution de polymères.

Dans les formules lactées, la formation de cette zone pourrait être possible étant donné que la présence de polysaccharides est importante. De plus, selon Sharma et Walz, (1996), les particules colloïdales non adsorbées pourraient aussi être des molécules de polymères, des micelles, des agrégats et même des particules de petites dimensions.

Toutefois, dans les émulsions alimentaires, ce phénomène est peu documenté, mais il semble qu'il se produit en présence de polysaccharides (stabilisants), et de force d'attraction importante entre les particules colloïdales (Rohm *et al.*, 1996). Ce phénomène a été suggéré comme étant celui qui augmente le phénomène de crémage dans une émulsion (Gunning *et al.*, 1986).

#### 2.4.2.3 Coalescence.

Il s'agit du phénomène de déstabilisation d'une émulsion le plus sérieux car, lors de la coalescence, le film interfacial entourant les gouttelettes est rompu et ce, de façon irréversible. On observe alors la fusion des gouttelettes et la formation des globules de gras de plus en plus gros et dans des cas extrêmes, pouvant même aller jusqu'à la séparation de l'émulsion en deux phases distinctes.

## 2.5 Méthodes d'isolement de la matière grasse.

L'étude de la composition et des propriétés du matériel composant la membrane des globules de gras nécessite d'abord l'isolement de la matière grasse. Toutefois, la mesure des quantités de protéines adsorbées, peut-être sujet à d'importantes erreurs (biais), inhérent à la méthode d'isolement (Walstra, 1983).

### 2.5.1 Centrifugation.

Lorsqu'il s'agit de caractériser des membranes des globules de gras, il est important d'isoler cette dernière sans pertes sélectives ou modifications majeures (Sharma *et al.*, 1996).

Plusieurs méthodes ont été utilisées afin de parvenir à isoler les constituants membranaires des globules de gras dans un lait homogénéisé (Brunner *et al.*, 1953; McPherson *et al.*, 1984) de même que sur le lait reconstitué (Oortwijn et Walstra, 1979).

Une des méthode consiste en la détermination de la composition protéique de la phase continue avant et après homogénéisation. Par cette technique, le calcul de la composition de la surface du globule de gras est obtenu par différence (Oortwijn and Walstra, 1979). Toutefois, cette technique est considérée comme occasionnant plusieurs erreurs (Hunt and Dalgleish, 1994).

Dans la littérature, on retrouve la centrifugation avec des étapes de lavages, qui est la méthode la plus couramment utilisée (Singh et Latham, 1993, Sharma et Dalgleish. 1993) et facile à réaliser. Les étapes de lavages répétées sont utilisées afin d'éliminer les protéines faiblement fixées (Cheftel *et al.*, 1985).

Crujisen (1996), rapporte les conditions de centrifugation de 44 000g durant 60 minutes à 10-20 °C, pour séparer une émulsion. Singh (1991), utilise comme substrat du lait chauffé et les conditions sont: 88 000g, 90 minutes à 20 °C.

Rowley et Richardson (1985), et Zahar et Smith (1996), ont utilisé des conditions de centrifugation de 30 minutes à 110 000g à 25°C, puis 45 000g durant 2 heures à 4 °C afin de séparer des formulations lactées pour nourrissons. C'est donc en tenant compte de ces expertises que nos conditions d'opérations seront établies.

Suite à cette étape, les conditions d'opérations permettent d'obtenir 3 phases distinctes soit: 1) le chapeau (surageant) principalement formé de matière grasse, 2) la phase sérique (au centre) et 3) le culot (au fond) qui est insoluble. Guo *et al.*, (1996) font mention que, lors de la centrifugation de formules lactées pour nourrissons sous forme liquide, le chapeau représente une moyenne de 51% de protéines présentes dans la formule, la phase sérique 37% et le culot 12%. Le pourcentage élevé de protéine dans la phase sérique est selon ces mêmes auteurs, attribuables à l'importance du ratio des protéines du lactosérum dans ces formulations pour nourrissons.



## 2.6 Méthode d'isolement des protéines adsorbées.

Comme il a été mentionné précédemment, la structure protéique comporte plusieurs interactions ou liaisons possibles. Les 4 principales sont 1) les interactions de Van der Waals qui sont des liaisons faibles entre les atomes dans la protéine; 2) les liaisons hydrogènes, qui s'établissent entre un atome électronégatif et un atome d'hydrogène lui-même lié par covalence à un atome électronégatif; 3) les interactions hydrophobes qui ont tendance à s'associer dans des régions internes de la protéine; et 4) les liaisons covalentes. La formation de ces ponts entre les résidus de cystéine limite le nombre de structures protéiques possibles et contribue à la stabilisation de celles-ci.

Ainsi, dans le but de rompre ou d'affaiblir les différents types de liaisons présentes, l'utilisation d'agents dénaturant ou dissociants est nécessaire.

### 2.6.1 Utilisation des dissociants.

Le tableau 2.1, montre bien que pour rompre des liaisons et parvenir à caractériser le matériel adsorbé sur la membrane des globules de gras, l'utilisation des dissociants peut s'avérer un outil intéressant.

Tableau 2.1. Liaisons et interactions protéine-protéine.

Type	Énergie (kj.mole <sup>-1</sup> )	Groupe fonctionnel impliqué	agents de rupture
liaison covalente	330-380	cystine S-S	mercaptoéthanol
liaison hydrogène	8-40	amide, hydroxyle phénol	détergents chaleur
interactions hydrophobes	4-12	résidus d'acides aminés à chaîne latérale aliphatique	détergents solvants organiques
interactions électrostatiques	42-84	groupe carboxyle aminé	solutions salines pH faible ou élevé
Van der Waals	1-9	dipôles permanents induits ou instantanés	-----

Chefftel *et al.*, 1985.

### 2.6.2 Action spécifique des dissociants.

De façon résumée, le chauffage induit des associations, particulièrement entre la  $\beta$ -lactoglobuline et les différentes caséines. Les propriétés des caséines sont alors modifiées. Les liaisons intermoléculaires entre la  $\beta$ -lactoglobuline et la  $\kappa$ -caséine par des ponts S-S et les liens hydrophobes sont responsables des associations protéiques. Le choix des dissociants devra donc être fait selon leurs actions spécifiques. Leurs utilisations permettront donc d'expliquer les liaisons impliquées dans le phénomène d'adsorption protéique d'une émulsion concentrée ayant été chauffée.

Le  $\beta$ -mercaptoéthanol ( $\beta$ -mercapto) est un agent réducteur. Son action est de rompre les ponts disulfures (S-S) et de modifier ainsi la conformation de la protéine (Smits et van Brouwershaven, 1980). Sharma *et al.*, (1996), ont utilisé le  $\beta$ -mercapto dans le but de dissocier les micelles de caséines adsorbées à la surface de la membrane des globules de gras d'un lait recombiné.

Le deuxième dissociant est le dodécylsulfate de sodium (SDS). Il est un agent tensioactif et un puissant agent dénaturant. Il agit comme intermédiaire entre les régions hydrophobes des protéines et l'environnement hydrophile. Ainsi, il réduit les interactions hydrophobes et contribue au déplissement de la protéine native. Donc, l'utilisation de ces dissociants permettrait de dissocier les agrégats formés lors des traitements thermiques.

## **CHAPITRE 3**

### **HYPOTHÈSES, BUTS ET OBJECTIFS**

### 3.1 Hypothèses.

Lors de l'entreposage, de la formulation lactée concentrée pour nourrissons, on observe une déstabilisation progressive du produit, allant de modifications visuelles à la synérèse.

Ainsi, durant le procédé de fabrication, l'homogénéisation construirait un type d'émulsion qui serait, par la suite modifiée par le traitement thermique de la stérilisation.

Notre hypothèse est que l'instabilité du produit serait due à la composition protéique de la membrane des globules de gras et de l'évolution de cette dernière en cours d'entreposage.

### 3.2 Buts

Le but premier de cette recherche est d'identifier et de caractériser les structures qui composent la membrane des globules de gras présents dans les formulations lactées commerciales pour nourrissons.

De mettre en évidence l'effet de la stérilisation, sur la structure de la membrane des globules de gras.

De suivre l'évolution des protéines membranaires à partir de la réception du lot, de la première semaine, puis de la 4<sup>e</sup> et enfin de la 12<sup>e</sup> semaines d'entreposage.

### 3.3 Objectifs.

1. Isoler la matière grasse de la formulation lactée avant et après la stérilisation, par la méthode de centrifugation.
2. Évaluer les changements de l'émulsion concentrée suite à la stérilisation, et lors d'un entreposage de 1 et 3 mois.
3. Identifier l'impact de 2 dissociants sur les interactions impliquées entre les composants adsorbés à la surface de la membrane des globules de gras.

## **Chapitre 4**

**Study of the fat globule membrane composition,  
in infant formula,  
before and after sterilization.**

#### 4.1 Résumé

La matière grasse, présente dans les formulations lactées pour nourrissons, est émulsifiée par des protéines (sériques/caséines). Lors de l'application de traitement thermique, les protéines présentes à la surface de la membrane de globule de gras sont affectées. Par le fait même, les caractéristiques de cette dernière sont modifiées.

Le but de ce travail est donc de mettre en relief les modifications, que subissent les membranes des globules de gras, avant et après la stérilisation.

Pour ce faire, l'isolement de la matière grasse a été obtenu par centrifugation. Lors de cette étape, 3 fractions ont été obtenues, au-dessus le chapeau, au centre la phase sérique et au fond, le culot. La récupération de ces trois fractions dépassaient les 97%. Par les bilans de masse effectués, on remarquait que le chapeau de gras, dans la formule lactée avant stérilisation, augmentait de 2 fois plus que celui après traitement thermique passant d'environ 10% à 20%. Toutefois, ces résultats n'augmentaient pas dans le temps. Pour ce qui est du culot, les résultats variaient en sens inverse. De plus, le ratio matière grasse/protéine dans le chapeau de gras diminuait de 2,4 fois après stérilisation. Le diamètre moyen des globules de gras augmentait de 36 nm après traitement thermique, alors que la charge protéique passait de  $4.97 \pm 0.13$  mg protéine/m<sup>2</sup> à  $13,83 \pm 0,39$  mg protéine/m<sup>2</sup>.



## 4.2 Abstract

The fat present in the infant formula, is emulsified by proteins (whey protein/caseins). Therefore with a heat treatment, those proteins presents at the surface of the fat globule membrane were modified, and the characteristics were too.

The goal of this work is to show that the composition of the fat globule membrane could be different before and after the sterilization.

With the centrifugation, the fat was isolated and 3 fractions were obtain. On the top, a top layer in the center, a serum phase and in the bottom, a pellet. The recovery from the three fractions exceeded 97% in the samples before and after sterilization. The recovery contents showed that top layer, before sterilization, increased by 2 times more passing throught approximately 10% to 20% after sterilization. Also we can see in the top layer, after sterilization, that the fat/protein ratio decreased by 2,4 times compared to top layer before heat treatment. Futhermore, the average diameter of fat globule of the infant formula before sterilization increased of 36 nm during sterilization and the protein load increased from  $4,97 \pm 0.13$  mg protein/m<sup>2</sup> from  $13,83 \pm 0,39$  mg protein/m<sup>2</sup>.

### 4.3 Introduction

Current infant formulas are significantly different in composition from cow's milk, which by itself, is inappropriate for feeding infants (McDermott, 1987). That explains why modern formulas have been modified to provide all of the nutrients known to be required by the infant to support his intellect development and normal growth.

The cow's milk-based formulas contain specific source of protein (milk and demineralized whey powder or concentrated whey), fat (vegetable oil), carbohydrate (mainly lactose), vitamins and mineral system (multivitamin and mineral mix) all combined during formulation (Guo *et al.*, 1996). One of the most important modification, in infant formula, is the addition of whey protein to the milk protein system to modify the ratio of whey protein / caseins from (20:80) to (60:40), which creates additional challenges to product stability.

To enhance heat stability and to minimize the effect of the sterilization, the infant formula requires specific heat treatments of the milk supply. This is specially problematic for concentrated infant formulas, which contain twice the concentration of solids than ready-to-feed formula and therefore are more difficult to stabilize (McDermott, 1987) during storage.

Heat-induced interactions between caseins and whey proteins in model systems and in dairy product have been studied extensively. Interactions between milk protein and fat globules were investigated by Fox *et al.*, (1960), McPherson *et al.*, (1984 a,b,c), Houlihan *et al.*, (1992), and Sharma and Dalgleish (1993, 1994) who mentioned that heating milk favoured the formation of complex between serum proteins and caseins micelles and that the heat induced complexes could form the new reconstituted fat globule membrane.

Such interactions also occur during manufacture of infant formulas (Rowley and Richardson, 1985).

Centrifugation can be used to fractionate concentrated infant formula into three fractions based on the density. Thus, fat and associated proteins, which were found at the top of the continuous phase upon centrifugation (Rowley and Richardson, 1985).

In Canada, infant formulas can be found in powder and liquid forms, single strength and double strengths. Since the major difference between these 2 forms of product is the time stabilization process (drying vs retort sterilization), the objective of the work was to assess the impact of retort sterilization on concentrated infant formulas. To reach this goal, mass balance, fat and nitrogen recovery, protein load, electrophoresis and fat protein ratio were analyzed to the three phases, obtained by centrifugation, of infant formula before and after sterilization.

## 4.4 Materials and methods

### **4.4.1 Samples supplies**

The infant formula was obtained from the manufacturer (Quebec, Canada ). Sodium azide (  $\text{NaN}_3$  0.02 %) was added to the raw samples, to prevent microbial spoilage. A single lot of formula was sampled prior to canning (BT0) and after retort sterilization (AT0). The raw samples were stored in a controlled temperature room (4 °C). For the sterilized samples, after 1 month (AT1) and 3 months (AT3), the storage was done at room temperature Figure 4.1.

### **4.4.2 Separation of the infant formula samples before and after sterilization**

#### **4.4.2.1 Centrifugation**

Formulas (35 g) were centrifuged at 40 000 x *g* for 60 minutes at 5 °C (Sorvall RC5C, Rotor SS-34, DuPont Company, Newtown, CT), and kept in the cold before separation of the layers (Vallerand, 1997). Centrifugation resulted in three distinct fractions: a solid fat layer at the top, an aqueous serum phase in the center and an insoluble pellet at the bottom of the tube. The top layer, serum phase and pellet fractions were carefully removed, quantitatively separated and precisely weighed. This separation was done in duplicate of the same can.

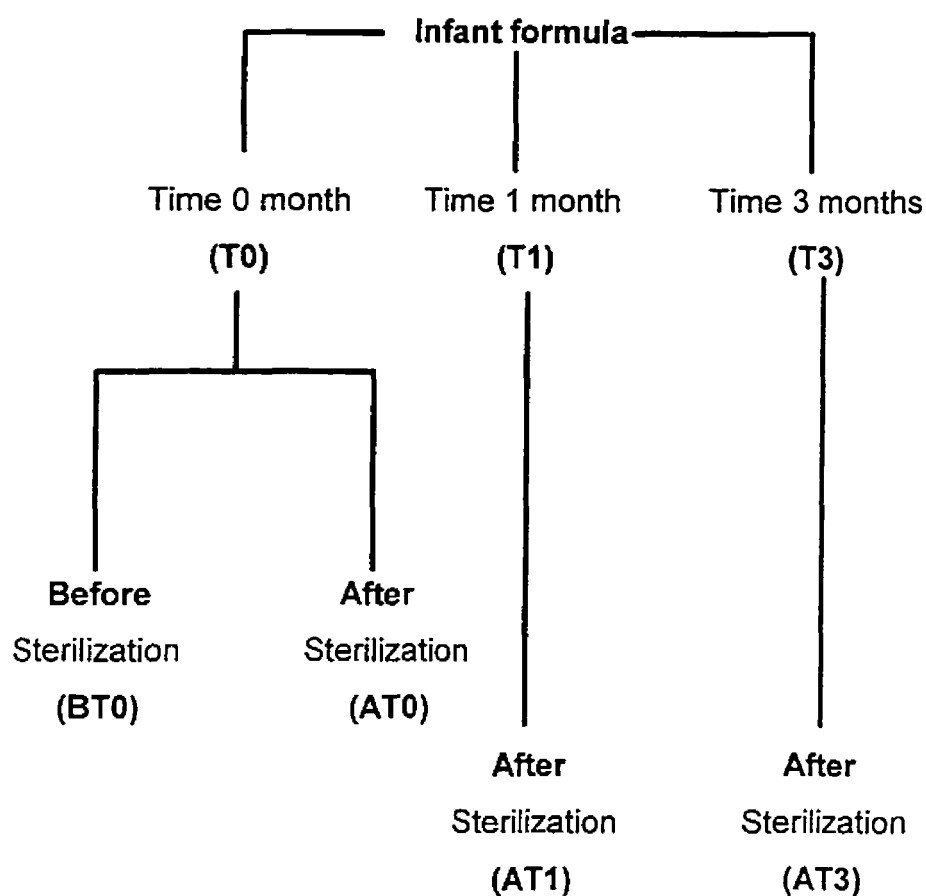


Figure 4.1: Organization of the sampling.

#### 4.4.3 Chemical analyses

Total fat in infant formula (BT0, AT0, AT1, AT3), in the top layer and in the serum phase was determined using the Röse-Gottlieb gravimetric method for infant food with milk (IDF Standard 123A:1988). The fat present in the pellet was obtained by difference between the total fat in the infant formula and the fat present in both top layer and serum phase.

Total protein was determined by measuring total N by the Kjeldahl method (AOAC, 1990) and multiplying by 6.38, on the three fractions and infant formula before and after sterilization.

#### **4.4.4 SDS-Polyacrylamide Gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE was carried out on the fat layer, serum phase and the pellet before and after sterilization, using ready to use gel at 15% acrylamide with stacking gel at 4% acrylamide (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

A weighted amount of the centrifuged samples fractions (about 0.013g for the pellet; 0.060g for the serum phase and 0.022g for the fat layer) were suspended in 0.200 ml of buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0); 0.250 ml of a 20% solution of sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.100 ml of a solution of bromophenol blue (0.01%) and 0.100 ml of 2-mercaptoethanol and heated for 5 minutes in a boiling water bath (Corredig and Dalgleish, 1996). A further centrifugation at 3000g for 3 minutes (IEC MicroMax, for Eppendorf) was performed before electrophoresis, to remove the fat from all the samples after heating with SDS. Then 5  $\mu$ l were collected below the fat layer and loaded on the SDS-PAGE. The gel was run at 200 V for about 45 minutes and then stained with Coomassie Blue in 25% (v/v) isopropanol and 10% acetic acid (v/v).

#### **4.4.5 Determination of the fat globule size distribution and the protein load**

Samples of infant formula were dispersed in a buffer containing 8 M urea, 50 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0 (Robin and Paquin, 1991) prior to analyses.

The size distribution and the volume weight average diameter of the fat globules were determined by Photon Correlation Spectroscopy (PCS). The measurements were made using a 64-channel Nicomp photon multibit (7 bits) correlation system ( Pacific Scientific, Hiac/Royce Instruments Division, model 370, Menlo Park, CA ).

The protein load ( $\Gamma$ ), as mg protein/m<sup>2</sup> of fat surface area, was calculated from the protein present in the fat of the top layer in the samples BT0 and AT0 according to Robin and Paquin (1991).

## 4.5. Results

### **4.5.1 Mass balance**

The separation and recovery of the 3 phases after centrifugation allowed to recover over 97% of the initial sample.

In the BT0 sample, the recovery content of top layer represented 10.60%, serum phase 85.55% and pellet 3.85% of the total sample (Figure 4.2). For the sterilized formulas all the mass recovery were superior to those before sterilization. For the AT0 sample, the results showed that top layer increased to 20.81%, the serum phase and pellet decreased to 77,95% and to 1.24% respectively. For AT1, the top layer was highest with 25,90%, the serum phase and the pellet were the lowest, with respectively 73,50% and 0,83%. The samples stored during 3 months, showed that the top layer compared to the AT1 decrease to 23,13% but the AT3 serum phase and pellet increased respectively to 75,55% and 1,32% (Figure 4.2).

### **4.5.2 Fat and protein recovery**

The fat and the protein recovery, in each fractions before and after sterilization, are presented in Figure 4.3. The majority of the fat was present in the top layer for all formulas and the results are in agreement with the literature (Singh *et al.*, 1996), where the quantity of fat in the top layer, of a recombined milk, was between 74% to 86%. The proportion of fat in the top layer increased after heating from 80.26% to 84.77%. During storage, it increased after 1 month to 93,8% and decreased after 3 months to 83.40%.



The amount of fat in the serum phase decreased after sterilization from 17.11% to 12.76%. In the first month of storage, it continued to decrease to 2.08% and after 3 months, it raised back to 10.37%.

The pellet behaved differently during sterilization where the proportion of the total fat did not change. But during storage, an increase can be observed. However, the increase never exceeded 6.23% of fat. After 1 month of storage, more fat was found in the pellet compared to the serum phase.

The protein distribution was severely modified by the heat treatment. In the Figure 4.3b, the proportion of total protein in the top layer increased from 19.30% before sterilization, to 49.09% after sterilization. During storage the increase continued, giving 52.29% for AT1 and to 54.29% for AT3.

In the serum phase, the BT0 sample was the highest with approximately 57.89% of all the total proteins. After sterilization, that proportion of protein decreased to an average of 41.91%.

For the pellet, the proportion of all proteins before sterilization was of 22.81%. It decreased more than half after sterilization (10.00%) and decreased further during storage, to 3.67% and 5.71% for AT1 and AT3 respectively.

#### **4.5.3 PAGE analysis**

SDS-PAGE of the top layer, serum phase and the pellet fractions had been dispersed in SDS-Buffer with mercaptoethanol to obtain information on the distribution of each protein present among these fractions.

The protein profile of the fractions of infant formula are shown in Figure 4.4. The top layer, serum phase and the pellet samples, before

sterilization, showed that all of the proteins were observed in each fraction, but the intensity of the band was particularly different in the pellet. This is showing that the large protein aggregates (whey proteins and caseins) are not present in important amount on the surface of the fat globules and they are too heavy to stay in suspension.

The situation is quite different in the fractions obtained after sterilization. High molecular weight aggregates are found in the 3 fractions. This shows that protein materials were added to the initial membrane under the influence of sterilization.

It is only in the serum phase (B and E) that we could find less denatured  $\beta$ -lg. Most probably those proteins were complexes with the polymers or with the large aggregates, in the others fractions. According to Guo *et al.*, (1996), the smearing of the proteins bands specially those after sterilization, indicated the presence of heat degradation products.

#### **4.5.4 Specific surface area of the fat globule membrane in infant formulas and protein load.**

The average size of fat globules in infant formulas showed an increase of 36 nm upon sterilization. The impact of the sterilization on the protein load is an increased by a factor of 2.8 (Table 4.1).

#### 4.6 Discussion

The centrifugation allowed the separation of fat and proteins into three fractions in a similar way for the samples before and after sterilization. This showed that the quality of the separation was not affected by the state of the product .

Figure 4.2 showed an increased recovery, in top layer, after sterilization. Starting from BT0, AT0, AT1 and AT3, top layer increased by approximately 2 times upon sterilization. For the pellet the opposite situation was observed. The recovery content of the pellet had not permitted to concluded that the decrease of pellet was similar to the increase of top layer. To explain this situation we measured the fat and the proteins concentration, before and after sterilization, in the top layer. Those analysis showed that for BT0 top layer, fat and protein concentrations were of 50% and 7% respectively. The rest (43%) was made of continuous phase (water, lactose and other soluble components).

After sterilization, the same analysis were made. The results showed that the fat concentration decreased to 25% and the proteins concentration remained constant to 7%. The continuous phase was now accounting for 68% of the samples.

In top layer, the comparison fat/protein ratio (Table 4.2), upon sterilization decreased by 2.4 times. It is known (Figure 4.3a), that the amount of fat recovered in the top layer before and after sterilization was about the same. The decreased in fat/protein ratio was then explain by an increase in the amount of protein instead of a lost of fat in top layer.

The amount of continuous phase associated with the fat globules also increased with sterilization. On a fat basis, 1 gram of fat was associated to 0.14 gram of protein and 0.86 gram of continuous phase before sterilization.

After the heat treatment, we found that 1 gram of fat was associated with 0.28 gram of protein and 2.72 grams of continuous phase. The continuous phase associated to fat was then increase by 3.2 times. The sterilized formula only showed slight changes after 3 months of storage.

This important difference could probably be explained by the heat treatment. Somehow, the material present in the continuous phase, must interact, strongly (after sterilization), with fat or proteins already on the globules (Singh *et al.*, 1996). But, those material must be highly hydrated in order to increase the continuous phase in the top layer.

Figure 4.3, showed that proteins contents, in the top layer after sterilization, increased compared to the infant formula before sterilization. The difference of proteins in the samples AT0, AT1 and AT3, were sensibly the same for each fractions. Guo *et al.*, (1996) have found in the top layer 51%, in the serum phase 37% and in the pellet 12% of proteins in the sterilized infant formula sample. Those results were in agreement with our sterilized samples, Figure 3b. However, for the AT1 samples, gelation happened during fat extraction. That explain the fat recovery among top layer, serum phase and pellet were different from the others. And as it showed in Figure 4.3b, the proteins recovery was also modified by the fat extraction.

The average diameter of fat globule of the infant formula increased of 36 nm upon sterilization (Table 4.1). That increase was too small to believe that the emulsion had coalesced. After the heat treatment, the protein load pass trough  $4,97 \pm 0,13$  mg protein/m<sup>2</sup> to  $13,83 \pm 0,39$  mg protein/m<sup>2</sup>, confirming an increase of proteins material at the surface of the fat globule. In general, larger fat

globules have lower protein load than smaller fat globules (Sharma *et al.*, 1996). However, if the globule membrane was modified by an important heat treatment and induced severe denaturation, the increase in the protein load could be explain by some interactions between proteins and proteins aggregates presents at the surface of the fat globule. To explain the important amount of protein per m<sup>2</sup> of fat and the little increase of the diameter, we assumed that probably these interactions favored the thickening at the surface of the fat globule membrane. This could explain why the diameter of the fat globule stayed sensibly the same an the protein load increased by more then 2 times. The heat treatment, of the infant formula, favoured the interactions of proteins at the surface of the fat globule membrane.

The SDS-PAGE, of the BT0 sample allowed to see that high molecular weight protein material were present only in the pellet. In the top layer and the serum phase, very little proteins aggregates (not dissociated by the sample buffer) associated with fat were found in suspension. This observation allows to state that the fat was probably emulsified by whey proteins/caseins complexes. However, those complexes, found in the top layer, did not seem to be highly denatured since they can be dispersed by the SDS sample buffer.

The highly denatured aggregates were probably present, in the infant formula before sterilization, because of the pre-heating step. However, we suspect them to be poor emulsifiers since they were not found associated with fat. During centrifugation, those large aggregates were sediment and formed a large pellet.

After sterilization, the protein bands were different to those before heat treatment. The large aggregates who were presents only in the pellet of the BT0 sample, are now found in the three fractions of the AT0 sample.

Because of the important difference between before and after sterilization, the 3 fractions of the BT0 and AT0 samples were showed in Figure 4.4. However, no important differences were found between the sterilized samples after 1 and 3 months of storage.

The detailed analysis of the SDS-PAGE proteins bands, showed that in the fat fraction, before and after heat treatment, caseins and  $\beta$ -lactoglobulin (Figure 4.4, lanes A and D), were present and  $\alpha$ -lactalbumin was evident at lower levels in the fat fractions. Preference of casein in the fat fraction was presumably due to adsorption of caseins micelles to the surfaces of fat globules during homogenization (Fox *et al.*, 1960; Jackson and Brunner, 1960; Darling and Butcher, 1978; McPherson *et al.*, 1984c).

As expected  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin were the dominant proteins in the serum phase before and after sterilization (Figure 4.4, lanes B and E). In contrast, the pellets, in both formulas, (Figure 4, lanes C and F), contained substantial amounts of  $\beta$ -lactoglobulin, in addition to the caseins and low levels of  $\alpha$ -lactalbumin indicating that extensive casein-whey protein ( $\beta$ -lg) interactions occurred in the formula (Guo *et al.*, 1996).

In Figure 4.4, the appearance of stained material, in the loading wells, was probably due to protein-protein crosslinking caused by the severe heating (Guo *et al.*, 1996). The presence of smearing was presumably due to the formation of complexes between fat globules and caseins and denatured whey proteins. This is consistent with the exceptional high level of whey proteins and caseins associated with the lipid fraction in the infant formula (Guo *et al.*, 1996).

#### 4.7 Conclusion

This study has revealed strong experimental evidences that retort sterilization affect to an important extent, the structure of the fat globules membrane of liquid concentrated infant formulas.

During retort sterilization, highly denatured protein material is adding to the existing initial membrane composed of casein and whey protein to increased the protein load by more than 2 times. That increase in protein material is accompanied by an increasing of the amount of continuous phase (water and soluble material) associated to the fat fraction. The fat globule membrane did not change much in quantity during the first 3 months of storage.

Work is continuing in order to identify the interactions generating this change during sterilization and to evaluate the change in the quality of fat globule membrane during storage.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Wyeth-Ayerst Canada Inc. and Groupe Lactel for their financial support.

#### 4.8 References

A.O.A.C., 1990, Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.), Association Official Analytical Chemists Washington, DC.

Corredig, M., Dalgleish, D.G., 1996, Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. J. Dairy Res., 63: 441-449.

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

Darling, D.F., Butcher, D.W., 1978, Milk-fat globule membrane in homogenized cream. J. Dairy Res., 45:197-208.

Fox, K.K., Holsinger, V.H., Caha, J., Pallansch, M.J., 1960, Formation of a fat-protein complex in milk by homogeneisation. J. Dairy Sci., 43: 1396-1406.

Guo, M.R., Hendricks, G.M., Kindstedt, P.S., Flynn, A., Fox, P.F., 1996, Nitrogen and mineral distribution in Infant Formulae, Int. Dairy J., 6: 963-979.

Houlihan, A.V., Goddard, P.A., Nottingham, S.M., Kitchen, B.J., Masters, J., 1992, Interactions between the bovinemilk fat globule membrane and skin milk components on heating whole milk. J. Dairy Res., 59: 187-195.

IDF Standard 123A, 1988, Infant Foods with milk-Fat content (Röse-Gottlieb). International Dairy Federation, Brussels.



Jackson, R.H. and Brunner, J.R., 1960, Characteristics of protein fractions isolated from the fat/plasma interfaces of homogenized milk. *J. Dairy Sci.*, 43: 912-919.

McDermott, R.L., 1987, Functionality of Dairy Ingredients in Infant Formula and Nutritional Specialty Products. *Food Technology*, October 93-102.

McPherson, A.V., Dash, M.C., Kitchen, B. J., 1984a, Isolation of bovine milk fat globule membrane material from cream without prior removal of caseins and whey proteins. *J. Dairy Res.*, 51: 113-121.

McPherson, A.V., Dash, M.C., Kitchen, B. J., 1984b, Isolation and composition of milk fat globule membrane material.I. From pasteurized milks and creams. *J. Dairy Res.*, 51: 279-287.

McPherson, A.V., Dash, M.C., Kitchen, B. J., 1984c, Isolation and composition of milk fat globule membrane material. II. From homogenized and ultra heat treated milks. *J. Dairy Res.*, 51: 289-297.

Robin, O. Paquin, P., 1991, Evaluation of the particule size of fat globules in a milk model emulsion by Photon Correlation Spectroscopy. *J. Dairy Sci.*, 74: 2440-2447.

Rowley, B.O. Richardson,T.,1985, Protein-lipis interactions in concentrated infant formula. *J.Dairy Sci.*, 68: 3180-3188.

Sharma, R., Dalgleish, D.G., 1994, Effect of heat treatments on the incorporation of milk serum proteins into fat globule membrane of homogenized milk. *J. Dairy Res.*, 61: 375-384.

Sharma, R., Dalgleish, D.G., 1993, Interactions between milk serum proteins and synthetic fat globule membrane during heating of homogenized whole milk. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 1407-1412.

Singh, H., Sharma, R., Taylor, M.W., Creamer, L.R., 1996, Heat-induced aggregation and dissociation of protein and fat particules in recombined milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 50:149-166.

Vallerand, C., 1997, Private communication.

**Table 4.1: Protein load of the lipid system in the infant formula before and after sterilization.**

Lipids system	Volume-weighted average diameter (nm)	Protein load (mg/m <sup>2</sup> )
Infant formula Before sterilization	385 ± 11	4,97 ± 0,13
Infant formula after sterilization	421 ± 12	13,83 ± 0,39

**Table 4.2: Fat/protein ratio in the infant formula before (BT0) and after sterilization (AT0, AT1, AT3).**

<b>Samples fractions</b>	<b>Before sterilization (BT0)</b>	<b>After sterilization (AT0)</b>	<b>After sterilization (AT1)</b>	<b>After sterilization (AT3)</b>
Top layer	4.16	1.73	1,79	1.54
Serum phase	0.30	0.31	0,05	0.26
Pellet	0.12	0.25	1,12	1,09

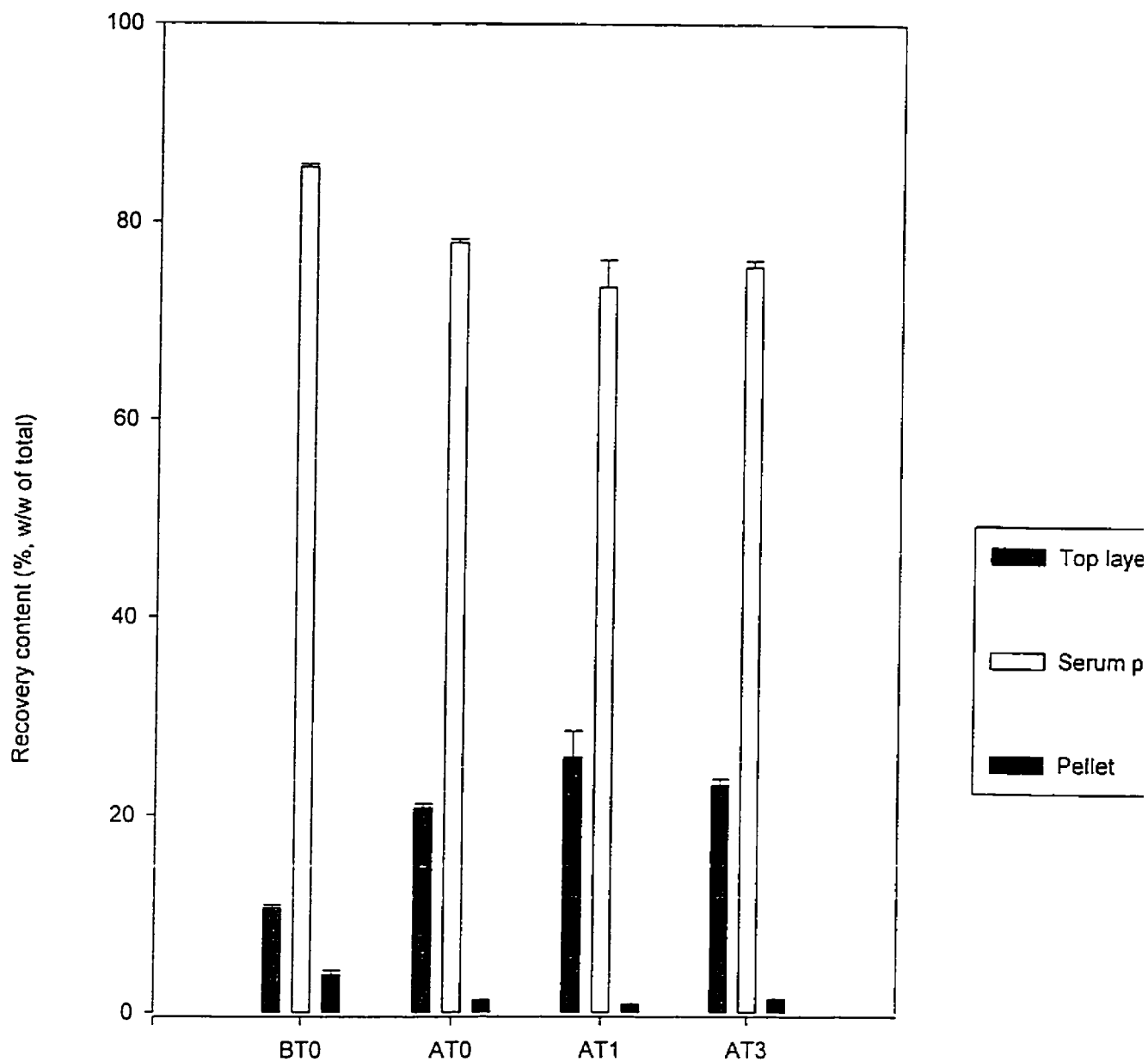


Figure 4.2 Recovery of top layer, serum phase and pellet by centrifugation before (T0) and after sterilization (T0, T1, T3).

Means of 8 samples (Standard deviation).

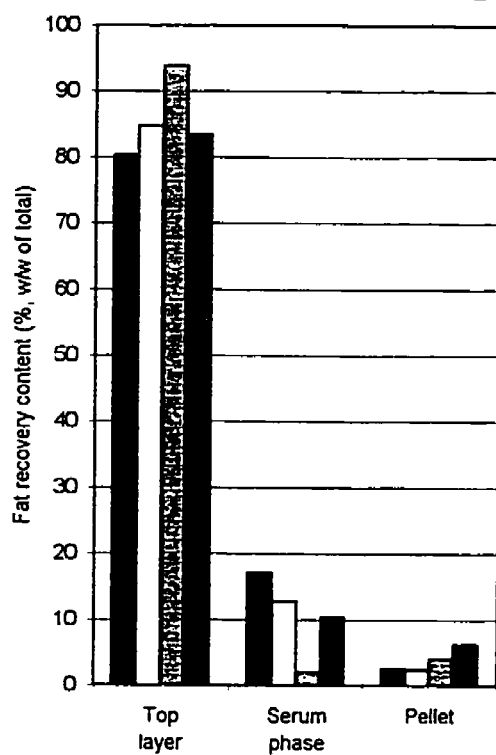


Figure 4.3a: Fat recovery among top layer, serum phase and pellet by centrifugation (40 000g, 60 min., 5 C) before and after sterilization (T0, T1, T3).

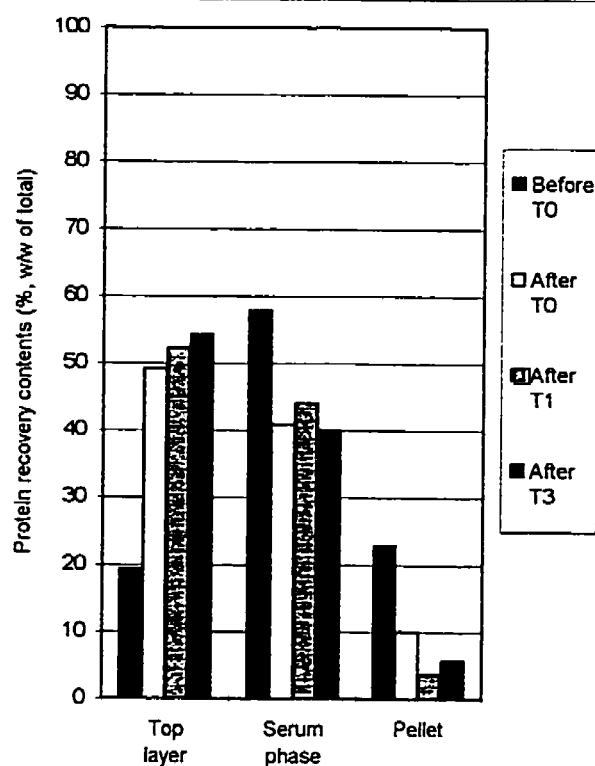
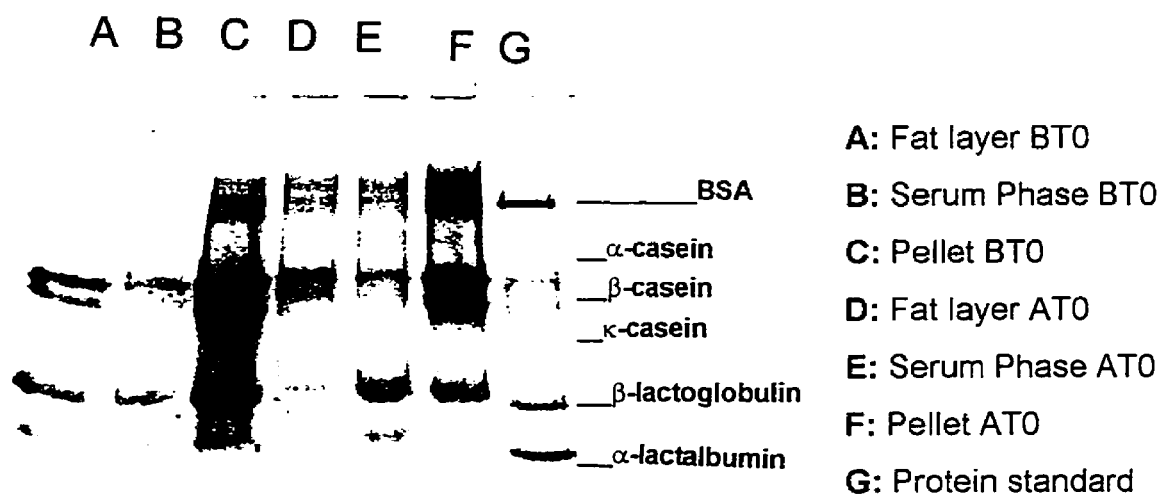


Figure 4.3b: Protein recovery among top layer, serum phase and pellet by centrifugation (40 000g, 60 min., 5 C) before and after sterilization (T0, T1, T3).



**Figure 4.4: SDS-PAGE of the infant formulas before(BT0) and after sterilization(AT0) by centrifugation (40 000g, 60 min.,5°C).**

## **Chapitre 5**

**Infant formula fat globule membrane: study of  $\beta$ -mercaptoethanol and Sodium Dodecyl Sulfate dissociation of protein components.**



## 5.1 Résumé

Les traitements thermiques dénaturent les protéines (sériques et caséiques) présentes à la surface de la membrane des globules de gras et favorisent la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires.

Le but de ce travail est de caractériser les interactions produites lors de la stérilisation entre le matériel protéique et la membrane des globules de gras d'une formulation lactée pour nourrissons, et ce, suivant un entreposage de 3 mois. L'utilisation de la centrifugation combiné à une solution de phosphate ou à 2 dissociants 2- $\beta$ -mercaptoéthanol (BM) et le Dodecyl Sulfate de Sodium (SDS) ont permis d'identifier ces interactions.

Les chapeaux de gras lavés avec les 3 solutions, avant stérilisation, ont réparti le produit de la même façon soit au-dessus un chapeau de gras, puis une phase sérique et un culot. Avant la stérilisation, l'action des agents de lavage n'est pas perceptible mais, après traitement thermique, tous les chapeaux de gras lavés étaient différents selon l'agent de lavage. Le chapeau lavé au phosphate ( $\text{PO}_4$ ), après stérilisation, représente 20% de l'échantillon total alors que pour BM et SDS, le pourcentage est le même que pour les échantillons avant traitement thermique soit d'environ 10%. Toutefois le dosage protéique des chapeaux de gras lavés au  $\text{PO}_4$  avant et après stérilisation montre que les résultats obtenus sont sensiblement les mêmes soit 50% des protéines totales.

Enfin, le ratio g de protéine/ 1 g de matière grasse du produit sans lavage montre que le produit avant traitement thermique contient près de 3 fois moins de protéines que le produit chauffé à haute température, passant de 0.12 g à 0.32 g de protéine/ gramme de gras après stérilisation. Par contre le ratio de ce même produit, durant son entreposage, n'est pas modifié de façon importante.

## 5.2 Abstract

Heat treatment denatured the proteins (whey proteins/caseins) presents at the surface of the fat globule membrane and favorised the formation of aggregates with high molecular weight.

The goal of this work was to characterized the interactions presents in the protein material associated to the fat in the infant formula upon sterilization and further storage up to 3 months. The used of the centrifugation combined to phosphate buffer ( $\text{PO}_4$ ) or 2 dissociating agents 2- $\beta$ -mercaptoethanol (BM) and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) for washing, had allowed to identify the specifics interactions happening in the heated milk products.

For all the toplayers samples, the 3 washing systems before sterilization, had the same partitionning effects. After sterilization, the resuspended top layers were modified according to the washing agents. The  $\text{PO}_4$  top layer, after sterilization, was representing 20% of the sample but for BM or SDS, the percentage was the same as it was for the sample before heat treatment with 10%. However the protein content of the  $\text{PO}_4$  top layer, before and after sterilization, showed that the results were similar representing 50% of the total protein.

The amount of protein/ gram of fat ratio of the whole product showed that the product before heat treatment was containing 3 times less proteins than the product after sterilization with 0.12 gram before to 0.32 gram de proteine/ gram of fat. Finally, during the storage of that product, the ratio stay similar as it was earlier.

### 5.3 Introduction

As for concentrated milk, infant formula requires specific heat treatments of milk during processing to enhance heat stability during sterilization. The effect of heat treatment on the proteins (whey protein/casein) present in the infant formula, is to disrupt the stabilizing hydrogen and disulfide bonds, to expose the hydrophobic regions and to lead the reorganization of the denatured proteins (McDermott, 1987).

It has been extensively reviewed by Morrissey (1969), Fox (1982), Harwalkar (1982), Morr (1985) that the sterilization affects the heat stability of milk products. Heat treatments induce protein denaturation, aggregation of casein micelles forming large particles (Schmidt, 1968; Carroll *et al.*, 1971; Creamer *et al.*, 1980; Mohammad *et al.*, 1987) and favour the interactions between components.

At temperatures higher than 70°C, an extensive denaturation of whey proteins and intermolecular disulfide bonding occur (de Wit and Klarenbeek, 1984). The proteins may unfold and the free silylhydriyl groups become available for interactions (Kinsella and Whitehead, 1989). Because of its free cystein residue,  $\beta$ -lactoglobulin is highly involved in the denaturation process of dairy products (Corredig and Dalgleish, 1996).

In the case of emulsions (infant formulas), whey proteins are adsorbed at the oil/water interface, the protein molecules may interact with neighboring molecules adsorbed on the same droplet, or on different droplets via a combinaison of non-covalent bonds or covalent disulfide bonding, where cysteine-thiol groups are involved (McClements *et al.*, 1996).

Interactions between whey proteins and casein micelles are favoured by heat treatment (Creamer *et al.*, 1978; Singh and Fox, 1985). The association of whey protein with the  $\kappa$ -casein promotes the formation of high molecular weight complexes (Singh and Latham, 1993). The association between  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein is the result of S-S bonding and hydrophobic interactions. However, the strength and the type of interactions between those two depend on the severity of the heat treatment. Because of the protein nature of the infant formula, those reactions are susceptible to be found.

The use of centrifugation, previously shown in chapter 4 (Beaulieu, 1997), mentioned that the material recovered in the top layer (associated to the fat) doubled upon sterilization. Analysis showed that the amount of protein associated to the fat, of the whole product, increased from 0.12 gram protein/ gram of fat to 0.32 gram protein/ gram of fat, but no further increase was noticed during the 3 months of storage.

2- $\beta$ -mercaptoethanol (BM) is a reducing agent, used for breaking S-S linkages among proteins and the proteins conformation (Smits and van Brouwershaven, 1980). Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) is a highly tensio-active material used to limit hydrophobic and electrostatics interactions by giving a uniform negative charge to the protein molecules (Cheftel *et al.*, 1985). The properties of these 2 dissociating agents are used in SDS-PAGE for example. Sharma *et al.*, (1996) also used them, but separately in order to identify the specific interactions happening in heated milk products.

## **5.4 Materials and methods**

### **5.4.1 Samples supplies**

The infant formula was obtained from the manufacturer (Quebec, Canada ). Sodium azide (  $\text{NaN}_3$  0.02 %) was added to the raw samples, to prevent microbial spoilage. A single lot of formula was sampled prior to canning (BT0) and after retort sterilization (AT0). The raw samples were stored in a controlled temperature room (4 °C). For the sterilized samples, after 1 month (AT1) and 3 months (AT3), the storage was done at room temperature. Sample selection is described in Figure 5.1

### **5.4.2 Separation and washing of top layer infant formula samples.**

#### **5.4.2.1 Centrifugation**

A centrifugation procedure with the infant formula was developed to recover the adsorbed protein in the fat layer. The analysis were done in duplicate of the same can. Formula (35 g) were centrifuged at 40 000 x g for 60 minutes at 5 °C (Sorvall RC5C, Rotor SS-34, DuPont Company, Newtown, CT), and kept in the cold before separation of the layers (Vallerand, 1997). Centrifugation resulted in three distinct fractions: a solid fat layer at the top, an aqueous serum phase in the center and an insoluble pellet at the bottom of the centrifuge tube. The top layer, serum phase and pellet fractions were carefully removed, quantitatively separated and precisely weighed.

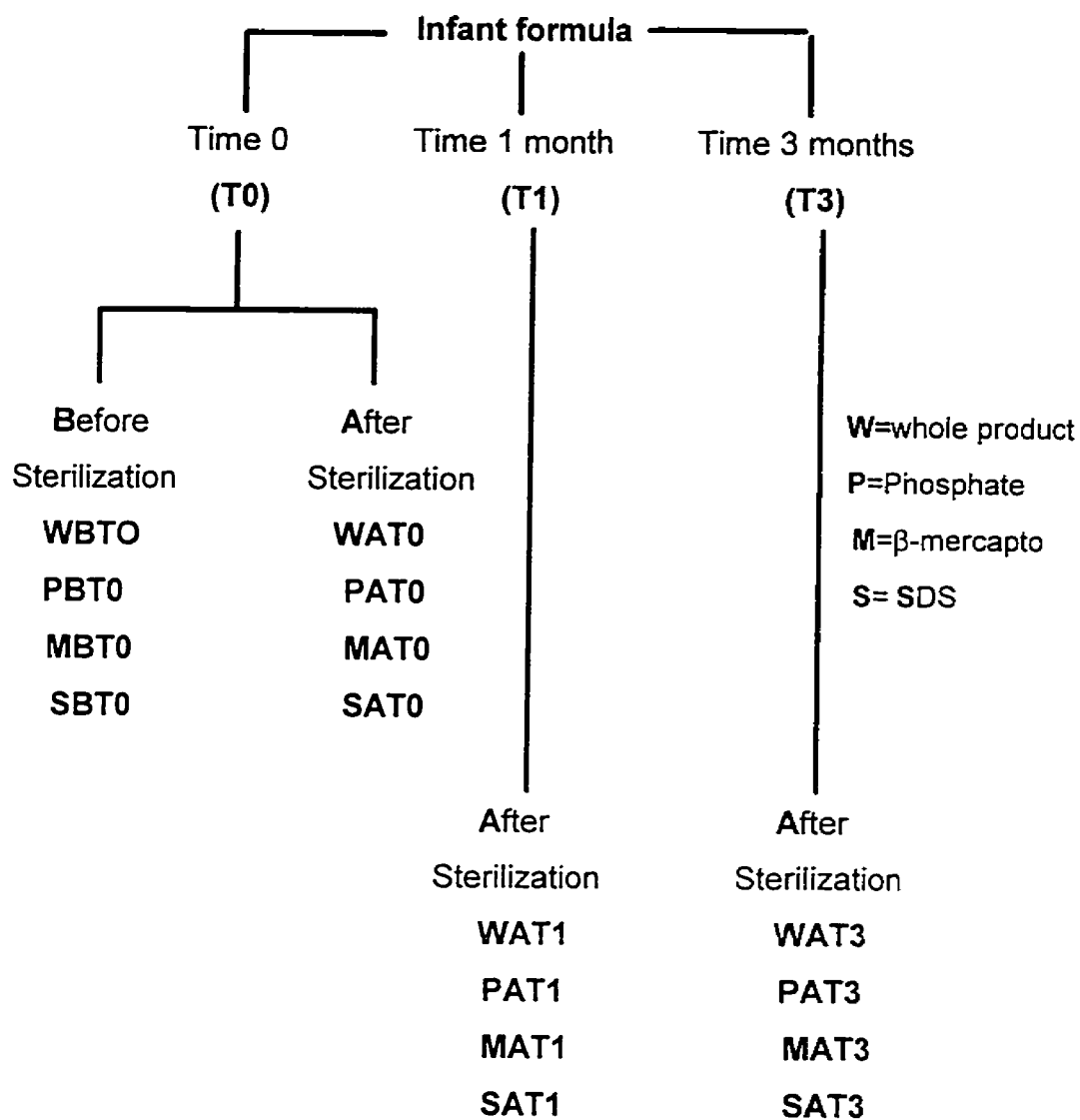


Figure 5.1: Organization of sampling.

A phosphate (sodium) buffer (pH 6.7, 0.1M) was used as a negative control of dissociation. The conditions were chosen to minimize the pH and ionic strength changes and to avoid the loss of specific interactions among adsorbed material and the non-adsorbed material during washing. A 2- $\beta$ -mercaptoethanol (BM 10 mM) was used as a disulfide bridges reducers as used by Robin and Paquin (1991). For dissociating protein material before particles size measurement. And the Sodium Dodecyl Sulfate (SDS 0.1% w/v) was used to reduce hydrophobic and electrostatics interactions (Dalglish and Banks, 1991).

The resuspended material were agitated under magnetic stirring for 30 minutes at room temperature prior to a second centrifugation in the same conditions as done before. The purpose of this washing step was to remove any material physically trapped or loosely associated to the surface of fat globules (Sharma *et al.*, 1996). After washing, the three fractions were separated and precisely weighed for further analysis. The procedure is summarized in Figure 5.2.

#### 5.4.3 Chemical analyses

After the resuspension of the top layer in phosphate and the 2 dissociating agents, total fat in the washed top layer and the serum phase (BT0, AT0, AT1, AT3 ) was determined by the Röse-Gottlieb gravimetric method for infant food with milk (IDF Standard 123A:1988). The fat present in the pellet was obtained by the difference between the total fat in the infant formula and the fat present in both washed top layer and serum phase.

Total protein was determined by measuring total N by the Kjeldahl method (AOAC, 1990) and multiplying by 6.38, on the three washing fractions (with phosphate, BM and SDS) of the infant formula before and after sterilization.

#### **5.4.4 SDS-Polyacrylamide Gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE was carried out on the washing fat layer, serum phase and the pellet before and after sterilization, using ready-to-use gel at 15% acrylamide with stacking gel at 4% acrylamide (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

A weighted amount of the centrifuged washed samples fractions (about 0.002g for the pellet; 0.061g for the serum phase and 0.007g for the top layer) were suspended in 0.200 ml of buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0); 0.250 ml of a 20 % solution of sodium dodecyl sulphate ( SDS ), 0.100 ml of a solution of bromophenol blue (0.01%) and 0.100 ml of 2- $\beta$ -mercaptoethanol and heated for 5 minutes in a boiling water bath (Corredig and Dalgleish, 1996). A further centrifugation at 3000g for 3 minutes ( IEC MicroMax, for Eppendorf ) was performed before electrophoresis, to remove fat from all the samples. Then 5  $\mu$ l were collected below the fat layer and loaded on the SDS-PAGE. The gel was run at 200 V for about 45 minutes and then stained with Coomassie Blue in 25% (v/v) isopropanol and 10% acetic acid (v/v).



## 5.5. Results

### **5.5.1 Mass balance of the resuspended top layer samples**

The quantitative separation of the 3 fractions obtained from centrifugation allowed to recovered over 97% of the initial samples for all the washing media. The 3 washing systems, before sterilization, had the same partitioning effects. The top layers represented 10%, the serum phases 89% and the pellets less than 1% of the total sample (Figure 5.3). After sterilization, the resuspended top layers were modified according to the washing agents. The fraction washed in the  $\text{PO}_4$  system showed a top layer representing 20% of the total sample. However, for the 2 dissociating agents before heat treatment, the mass recovery were not different one from another (Figure 5.3) and allowed a similar recovery of the BT0 top layer.

For PAT0 and PAT1 samples, the pellets were representing 3% of the sample and for SAT0, SAT1 and MAT0, MAT1 the percentge increase to 6%. All the AT3 samples had the same tendency but the mass recovery was twice higher.

The AT1 sample, after washing gave similar pellets but BM allowed to remove more material from the top layer than SDS did. After 3 months of storage (AT3), the  $\text{PO}_4$  and SDS allowed to remove the same quantity of material from the top layer as after 1 month. But the pellets obtained were larger than at 1 month. Probably because of an increasing interactions in the top layer, BM did not remove as much material at 1 month than after 3 months, but always allowed to harvest the largest pellets.

### 5.5.2 Protein recovery of the resuspended top layer samples

Before the heat treatment, the actions of the dissociating agents and the phosphate buffer on the samples are different. With the phosphate buffer, the top layer contained 54% of the total protein, for the BM it was 46% and for the SDS 38% of the protein material (Figure 5.4). The most important difference for the BT0 in SDS solution, was with the serum phase is 42% of the total protein was found. This fraction was different from the 2 others with respectively 21% of total protein for the phosphate buffer and 25% for BM. The phosphate and BM pellets were approximately the same, but all the pellets ( AT0, AT1 and AT3) obtained with SDS were containing less protein material.

After the sterilization, for all samples in time, the tendency was the same: the protein recovery of the phosphate buffer in top layer was higher and the pellets were always smaller than the other (Figure 5.4). For the ATO sample, the top layer of the SDS and the BM were similar with 22% of the total protein against 47% for the phosphate buffer. The larger pellets were found for the 2 dissociating agents with 25% for SDS and 31% of the total protein for BM. Compared to the dissociating agents, the phosphate pellet was containing only 7% of the total protein.

During storage (AT1 and AT3), the samples changed. The total protein present in top layers and pellets increased. The top layers resuspended in SDS or BM showed that the dissociating agents were less efficient during storage compared to the AT0 sample. Probably, that during storage the adsorbed proteins were more difficult to remove from the top layer. The increase of protein material in the pellets could be explain by the formation of larges aggregates during storage induced by the heat treatment.

### 5.5.3 PAGE analysis

SDS-PAGE of the top layer, serum phase and the pellet fractions have been performed to obtain informations on the distribution of each protein presents among these fractions.

The protein profiles of whole product (infant formula) before (WBT0) and after sterilization (WAT0) have been described in chapter 4 (Beaulieu, 1997). For the samples before sterilization, the high molecular weight protein material were abundant in the pellet and less in top layer and serum phase where the aggregates were associated with fat or found in suspension.

For the samples after sterilization, the large aggregates were presents in the 3 fractions. The detailed analysis of the SDS-PAGE protein bands, showed that the most important difference between the proteins bands of the washed samples were found between BT0 (lanes B, D, E, G, H and J) and AT0 samples (lanes A, C, D, F, G and I) (Figure 5.5). The sterilized samples (AT1 and AT3) during storage (washed with PO<sub>4</sub>, SDS or BM) showed that the results were sensibly the same.

The protein material present in all top layers, serum phases and pellets samples PBT0, SBT0 and MBT0, were observed in each fraction. But the intensity and the width of the pellets bands were particularly different. Probably because of an important amount of strongly denatured proteins aggregates. In SAT0 top layer  $\beta$ -lactoglobulin was particularly abundant.

For the formula after sterilization, the washing solution did not have specific effects on the proteins distribution. On the top of the gel, the well were containing very large aggregates and high molecular weight polymers.

After 3 months, the intensity and the width of the bands, were larger and the resolution less efficient. The smearing was particularly increasing during time. According to Guo *et al.*, (1996), the smearing of the proteins bands specially those after sterilization, indicated of the presence of the heat degradation products.

## 5.6 Discussion

Before sterilization, washing the samples with phosphate buffer or the dissociating agents had no specific effects and the recovery of the fractions were similar. However, some differences appeared in the protein recovery content of the 3 fractions. The use of  $\text{PO}_4$  buffer had removed 46% of all the proteins present in the top layer of the non-sterilized infant formula (Figure 5.4). With BM, the washing effects were similar to the  $\text{PO}_4$ . For the SDS, the percentage of total protein in the top layer was the lowest with approximately 40%. The efficiency of SDS to remove proteins was important, but its tensio-active nature (Cheftel et al., 1985), kept in suspension more material than phosphate or BM. The protein material in suspension explained the smallest pellet of the SDS sample compared to BM or phosphate buffer.

The SDS-PAGE of the PBT0, SBT0 and MBT0 top layers showed that all the bands were similar. But for the PBT0 pellet the intensity of the caseins and whey proteins bands were much abundant, compared to those with SBT0 and MBT0 (Figure 5.5).

The PAT0 top layer showed that protein recovery was 2 times more important than those with dissociating agents (Figure 5.4). To explain the important amount of protein in the top layer, we have determined the ratio of the protein (gram) in 1 gram of fat. For the whole product without washing, no gelation was observed on the samples, and the results showed that before heat treatment, less protein was associated to fat. And for all the BT0 samples, the

resuspended samples had the same results with the phosphate buffer or the 2 dissociating agents. Those results could be explain by the fact that the washing step was done to disrupt the interactions between proteins aggregates at the surface of the fat globule membrane. The absence of heat treatment had not induced denaturation and favoured the formation of aggregates in all the BT0 samples.

However for the sterilized whole product, the amount of protein increased more then twice with the heat treatment. For the BT0 sample the result was 0.12g protein/1 g fat for AT0 it was 0. 32g, AT1 0.29g and for AT3 0.28g protein/1 g fat (Table 5.1). For the others samples gelation occured during fat extraction.

The important increased of the protein ratio associated with fat was explained by the effects of the heat treatment. Mohanam et al., (1996) had mentionned that the thermally denatured proteins, facilitated both interactions between droplets and interactions between unadsorbed proteins in the continuous phase and adsorbed proteins on droplets. Probably that in the top layer, it could be the same situation.

Compared to the other sterilized top layers SAT0, showed an important amount of  $\beta$ -lactoglobulin (Figure 5.5). This observation could probably be explained by the interactions of  $\beta$ -lactoglobulin with the fat globule membrane after heat treatment. The aggregates (whey protein and  $\kappa$ -casein) were formed during sterilization and stayed in suspension even after centrifugation.

The major effect of heat treatment was principally observed in the top layers and the pellets. The weight of the resuspended top layer was higher than the sample before sterilization. However the top layer, after sterilization and washed with both dissociating agents, had permitted to obtain similar results to those before sterilization. For the PAT0, PAT1, PAT3, top layers were always larger than the others. This indicates that the effect of the phosphate buffer had only be to washed the fat globules without affecting the adsorbed material.

According to Singh and Fox, (1987) heating milk at temperature higher to 90°C at pH 6.9, causes whey proteins to complex and become co-sedimentable with micelles. Because the temperature of sterilization is superior to this condition and the pH of the infant formula is 6.7; probably that disulfide-linked proteins, hydrophobic and electrostatics interactions were formed and complexes with the fat globule membrane. And the used of the dissociating agents with the centrifugation has allowed to those proteins to form an important pellet.

The mass balance of the top layers, during storage were similar for all the samples. The important effect was observed in the pellets samples after the sterilization with the combination of time and dissociating agents. The pellets represented, after 3 months, 50% of the total proteins in the SAT3 and MAT3 samples. According to Singh *et al.*, (1996), the caseins and whey proteins, both at the fat globule surface and in the serum, were modified through the formation of new non-disulfide covalent cross-links.

After the heat treatment, the protein recovery in the pellet increased with storage. Probably that after sterilization, the compact structures of whey protein were modified and the hydrophobics site were exposed. Those structures were now able to interact with others proteins to formed covalents links.

After 3 months of storage, the proteins have established a network and the actions of the dissociating agents were less efficient and less specific. Probably because those interactions were less accessible to SDS and BM and their impacts were not enough strong to be observed after the washing step. Those large aggregates initially presents in the sterilized top layers were then found in the pellet.

Dickinson and Matsumura (1991), mentioned that the abundant presence of whey proteins in all the SDS-PAGE samples (Figure 5.5) could indicated that disulfide bond formation involved both  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -la at the emulsion droplet surface and the extent of this situation increased with storage. According to Mohanam (1996)  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -la were difficult to displace from the oil-water interface because time-dependent disulfide polymerization occurred at the droplet surface.

Even with the used of strong dissociating agents, SDS for disrupting hydrophobic interactions and non-covalent protein-protein interactions, and BM for S-S bonds, the abundant of whey proteins (specially  $\beta$ -lactoglobulin) suggest that they were still strongly bound to the fat globules.

However those bonds were not responsible for the large complexes formation (Figure 5.5). They were probably due mainly to disulfide bonding between  $\beta$ -lg and  $\kappa$ -casein and the adsorption on the surface of fat globules on homogenization (Dalgleish and Banks, 1991; Sharma and Dalgleish, 1993.)



According to Corredig and Dalgleish (1996), the presence of whey proteins at the interfaces of fat globules, after heat treatment, suggested that two different mechanisms of interaction might occur: disulphide bonding with proteins others than caseins (the original milk fat globule membrane proteins) or true physical adsorption of whey proteins directly to the fat/water interface.

In all the pellets,  $\beta$ -lg was also present. According to Smith and Brouwershaver (1980); Haque *et al.*, (1988); Dalgleish (1990); Jang and Swaigood (1990), this was probably due mainly to the heat induced formation of intermolecular disulfide bonds between  $\beta$ -lg and  $\kappa$ -casein during processing.

It has been observed that all the proteins bands were presents in each fractions, but the intensity were variable and dependent of the fractions. Probably, those bands indicated that extensive casein-whey protein interactions occurred in the infant formula (Guo *et al.*, 1996).

### 5.7 Conclusion

It has been established that heat treatment favoured the coating of the fat globule membrane by the aggregations of proteins at the surface. However, the washing step allowed to dissociated some of the adsorbed proteins and obtained the same amount of protein associated to fat as the sample before sterilization.

During storage the infant formula, as an emulsion, became a suspension colloidal of aggregates. The aggregates structures were uniformly dispersed to stay in suspension in the solution. But those highly denatured protein material were then more difficult to removed by the dissociating agents. Their actions did not allowed to discriminate the nature of the interactions present in the top layer. Also, with storage time, the dissociated material was found in the pellet.

After 3 months, it seem that the instability of the emulsion was more affected by the presence of large aggregates than the modifications of the fat globule membrane during process.

### Acknowledgments

The author wish to thank Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERCC), Wyeth-Ayerst Canada Inc. and Groupe Lactel for their financial support.

## 5.8 References

A.O.A.C.,1990, Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.), Association Official Analytical Chemists Washington, DC.

Beaulieu, L., 1997, Isolation and characteristics of the fat globule membrane in infant formula, Memory M.Sc., Laval University, Quebec, Canada.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D., 1985, Les protéines du lait dans: Protéines alimentaires. Chapitre 6. ed.Lavoisier pp. 156-192.

Corredig, M., Dalgleish, D.G., 1996, Effect of temperature on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. Food Research International, Vol. 29, No.1, pp.49-55.

Corredig, M., Dalgleish, D.G., 1996, Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. J. Dairy Res., 63: 441-449.

Creamer, L.K., Matherson, A.R., 1980, Effect of heat treatments on the proteins of pasteurized skim milk. N. Z. J. Dairy Sci.Techno., 15:37-49.

Creamer, L.K., Berry, G.P., Matherson, A.R., 1978, The effect of pH on protein aggregation in heated skim milk. N. Z. J.Dairy Sci. Techno., 13: 9-15.

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

Dalgleish, D.G., 1990, Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk. *J. Agric. Food Chem.*, 38:1995-1999.

de Wit, J. N. and Klarenbeek, G., 1984, Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 67: 2701-2710.

Dickinson, E., and Matsumura, Y., 1991, Time-dependent polymerization of  $\beta$ -lactoglobulin through disulfide bonds at the oil-water interface in emulsions. *Int. J. Biol. Macromol.* 13:26-30.

Fox, P.F., 1982, *Developments in Dairy Chemistry -1*. applied Science Publishers, London, Chap. 6, pp. 189-228.

Guo, M.R., Hendricks, G.M., Kindstedt, P.S., Flynn, A., Fox, P.F., 1996, Nitrogen and mineral distribution in Infant Formulae, *Int. Dairy J.*, 6:963-979.

Haque, Z., Kristjansson, M.M., Kinsella, J.E., 1988, Interaction between  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin: possible mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, 35:644-649.

Harwalkar, V.R., 1982, Age gelation of sterilized milk. In: *Development in Dairy Chemistry- 1. Proteins*. P.F. Fox (ed.), Applied Science Publishers, London, 229-269.

IDF Standard 123A., 1988, *Infant Foods with milk-Fat content* (Roese-Gottlieb). International Dairy Federation, Brussels.

Jang, H.D., Swaisgood, H.E., 1990, Disulphide bond formation between thermally denatured  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein in casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 66:196-203.

Kinsella, J.E. and Whitehead, D.M., 1989, Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Adv. Food and Nutr. Res.*, 33: 343-425.

McClements, D.J., Monahan, F.J., Kinsella, J.E., 1996, Disulfide Bond Formation Affects Stability of Whey Protein isolate Emulsions. *J. Food Science*, 58: 1036-1039.

McDermott, R.L., 1987, Functionality of Dairy Ingredients in Infant Formula and Nutritional Specialty Products. *Food Technology*, October 93-102.

Mohammad, K.S., Fox, P.F., 1987, Heat-induced microstructural changes in casein micelles before and after heat coagulation. *N. Z. J. Dairy Sci. and Techno.*, 22:191-203.

Mohanam, F.J., McClements, D.J., German, J.B., 1996, Disulfide-mediated Polymerization Reactions and Physical Properties of Heated WPI-stabilized Emulsions. *J. Food Science*, 61: 504-509.

Morr, C.V., 1985, Functionality of heated milk proteins in dairy and related foods. *J. Dairy Sci.*, 68: 2773-2778.

Morrissey, P.A., 1969, The heat stability of milk as affected by variations in pH and milk salts. *J. Dairy Res.* 36: 343-346.

Robin, O. Paquin, P. ,1991, Evaluation of the particule size of fat globules in a milk model emulsion by Photon Correlation Spectroscopy. *J. Dairy Sci.*, 74, 2440-2447.

Schmith, D.G., 1968, Electron-microscopy studies of the gelation of UHTST sterilized concentrated skim milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 22: 40-49.

Sharma, S.K., and Dalgleish, D.G., 1993, Interactions between milk serum proteins and synthetic fat globule membrane during heating of homogenized whole milk. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 1407-1412.

Sharma, S.K., Singh, H., Taylor, M.W., 1996, Composition and structure of fat globule Surface layers in recombined milk. *J. Food Sci.*, 61:28-32.

Singh, H., Fox, P.F., 1987, Heat stability of milk: role of  $\beta$ -lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -casein. *J. Dairy Res.* 54: 509-521.

Singh, H., Fox, P.F., 1985, Heat stability of milk: pH-dependant dissociation of micellar  $\kappa$ -casein on heating milk at ultra high temperatures. *J.Dairy Res.*, 52: 529-538.

Singh, H., Sharma, R., Taylor, M.W., Creamer, L.R., 1996, Heat-induced aggregation and dissociation of protein and fat particules in recombined milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 50:149-166.

Smits, P., van Brouwershaven, J.H.V., 1980, Heat-induced association of  $\beta$ -lactoglobulin and casein micelles. *J. Dairy Res.*, 47: 313-325.

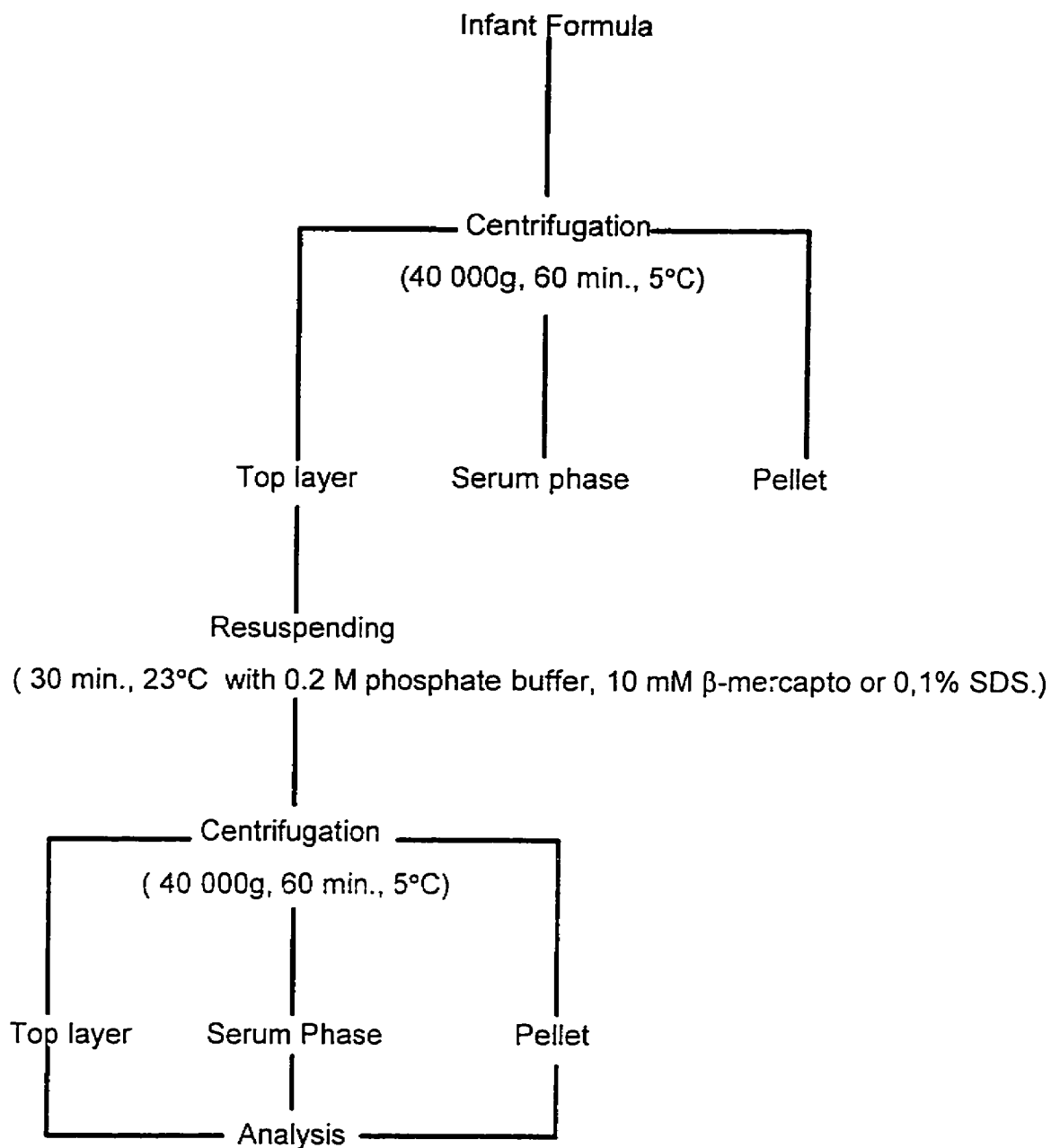
Vallerand, C., 1997, Private communication.

**Table 5.1: Determination of the protein to fat ratio in the infant formula before (BT0) and after sterilization (AT0, AT1, AT3).**

	Samples			
	Whole product <sup>1</sup>	Phosphate <sup>1</sup>	SDS <sup>1</sup>	$\beta$ -mercapto <sup>1</sup>
BT0	0.12	0.08	0.06	0.07
AT0	0.32	0.18	0.19	0.17
AT1 <sup>a</sup>	0.29	-----	-----	-----
AT3 <sup>a</sup>	0.28	-----	-----	-----

a: Samples gelation during fat extraction.

1: Mean of duplicate fractionnation.



**Figure 5.2: Experimental plan for preparation, washing and separation of the infant formula before and after sterilization.**



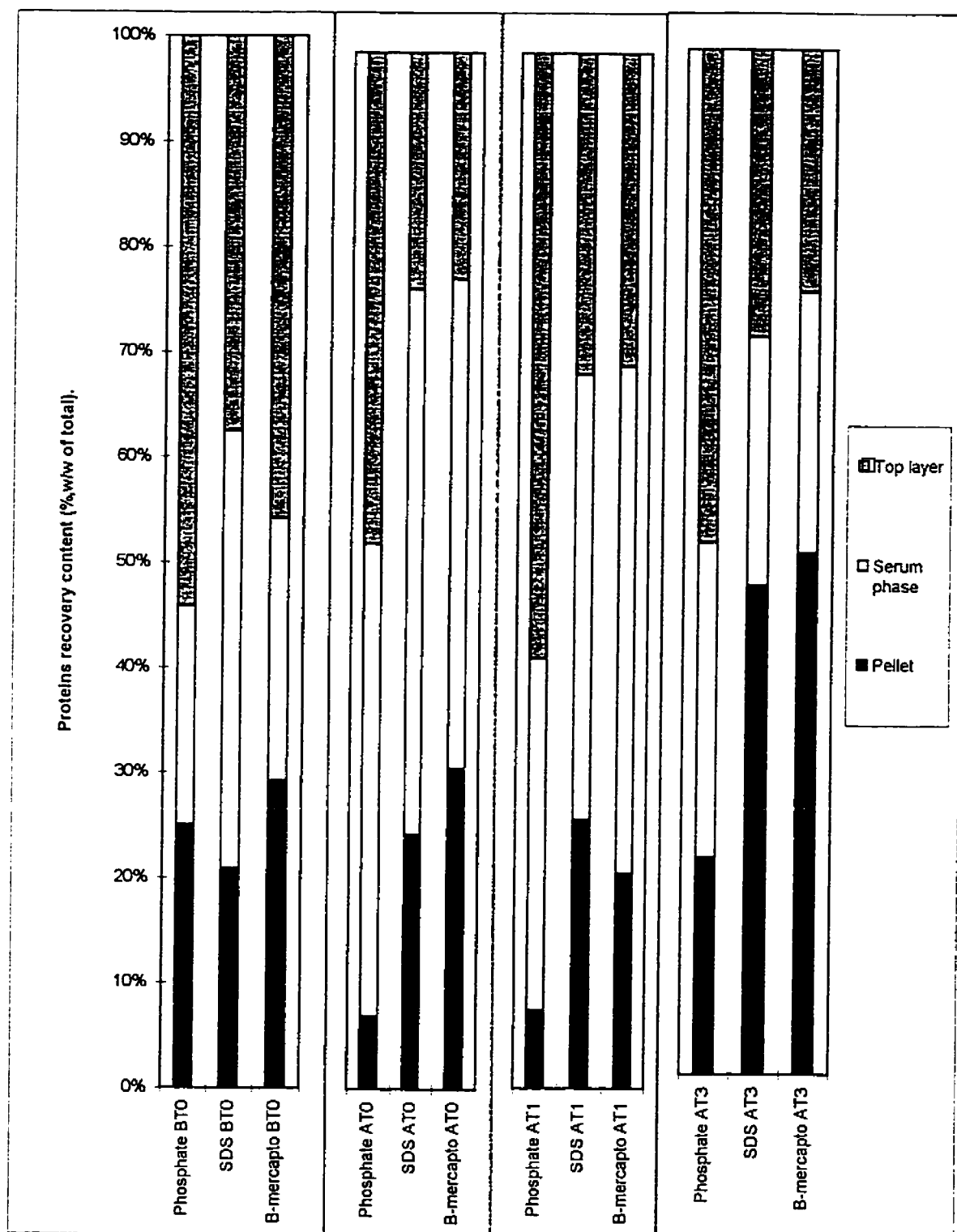


Figure 5.4: Protein recovery of top layer, serum phase and pellet, by centrifugation (40 000g, 60 min., 5 C) with phosphate buffer, B-mercapto or SDS before and after sterilization at T0, T1 and T3.

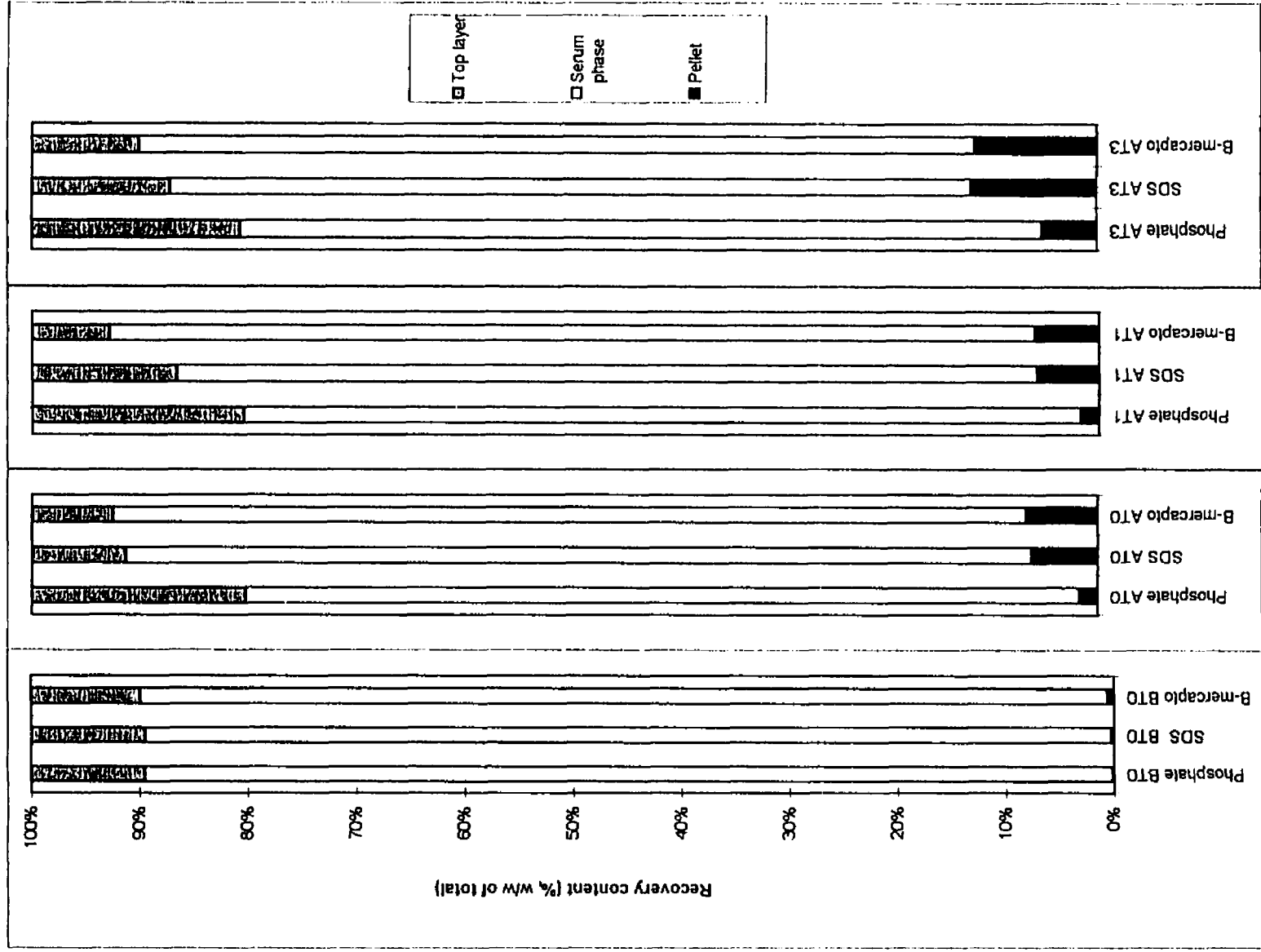
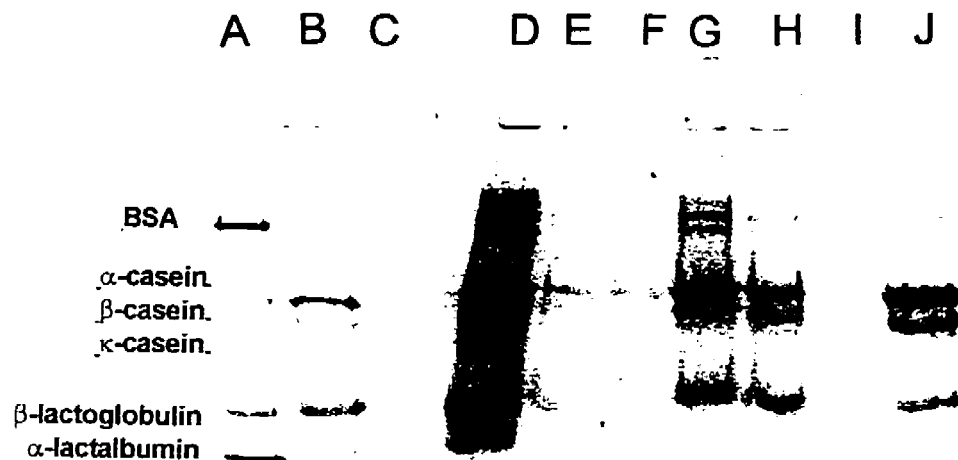
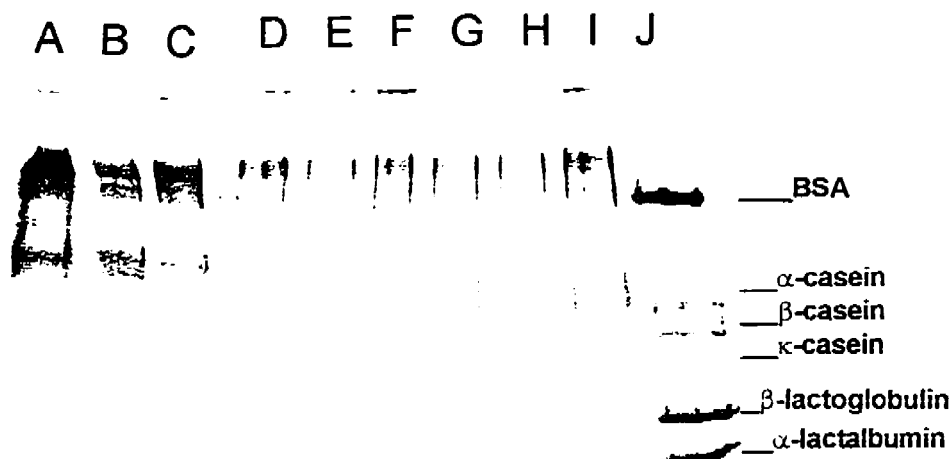


Figure 5.3: Mass recovery of top layer, serum phase and pellet, by centrifugation (- with phosphate buffer, B-mercapto or SDS, before and after sterilization at T0, T1 and T3.



A:Standard, B:Top layer PBT0, C:Serum PBT0, D: Pellet PBT0, E: Top layer SBT0, F:Serum SBT0, G: Pellet SBT0, H: Top layer MBT0, I:Serum MBT0, J: Pellet MBT0.



A:Top layer PAT0, B:Serum PAT0, C: Pellet PAT0, D: Top layer SAT0, E:Serum SAT0, F: Pellet SAT0, G: Top layer MAT0, H:Serum MAT0, I: Pellet MAT0, J: Standard.

**Figure 5.5: SDS-PAGE gel of the resuspended top layer before (BT0) and after sterilization (AT0), in phosphate (0.1M), SDS (0.1%w/v) or β-mercapto (10 mM) after centrifugation (40 000g, 60 min., 5°C).**

## **CHAPITRE 6**

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

## 7.1 Conclusion générale.

Bien que la littérature soit relativement abondante en ce qui concerne les formulations lactées pour nourrissons, il n'en demeure pas moins que les procédés de transformations ainsi que leurs impacts sur la stabilité de l'émulsion, n'est pas clairement définie. La littérature fait donc référence à ce qui existe actuellement dans le lait de vache. Toutefois, compte-tenu de sa composition et de son procédé de fabrication, les formules comporte plusieurs particularités. On retrouve donc un apport en protéines de lactosérum important et un procédé de fabrication comportant plusieurs étapes dont un traitement thermique sévère, la stérilisation.

L'identification et la caractérisation des constituants de la membrane des globules de gras, dans une formulation lactée pour nourrissons, a été possible suite à l'isolement de la matière grasse par centrifugation combiné à des analyses chimiques et des caractérisation par électrophorèse.

La comparaison des formulations lactées pour nourrissons avant et après stérilisation, a permis de mettre en relief l'importance du traitement thermique sur la composition de la membrane des globules de gras. Cette dernière voit sa charge protéique doubler alors que le diamètre moyen demeure sensiblement le même. Il y a aussi l'accumulation d'une phase continue importante dans le chapeau de gras suite à la stérilisation.

De plus, l'utilisation de dissociants sur le chapeau de gras, avant et après stérilisation, confirme la formation d'interactions entre les protéines et la membrane des globules de gras. La détermination de la quantité de protéine dans 1 gramme de gras, du chapeau lavé après stérilisation, permet d'obtenir de résultats similaires à ceux du chapeau de gras non-lavé mais avant traitement thermique.

Enfin, mentionnons que le suivi de l'évolution du produit en cours d'entreposage, a permis d'observer que les interactions entre les particules s'amplifient de façon à former un réseau. Celui-ci est formé d'agrégats protéiques se comportant plus comme une suspension colloïdale que comme un émulsion.

## 7.2 Perspectives.

Sachant que l'homogénéisation modifie la dimension du globule de gras en cours de fabrication, il serait à propos d'identifier les protéines composant la membrane nouvellement formée, immédiatement après cette étape et suivre les analyses en cours de procédé. De cette façon, il serait possible d'établir l'évolution de la membrane des globules de gras. Et éventuellement prédire la stabilité de l'émulsion en fonction de la composition de la membrane des globules de gras.

De plus, il a été clairement établi que les formulations lactées pour nourrissons, subissent une déstabilisation en cours d'entreposage et ce suite à la stérilisation. Ce traitement thermique favorise l'association de protéines à la surface de la membrane des globules de gras. Il y a alors épaissement de la membrane par les protéines. Il serait donc intéressant pour une étude ultérieure, de déterminer chacune des protéines composant la membrane des globules de gras, par rapport aux protéines qui sont associées ou liées à cette dernière.

### **Toutes les références citées.**

AOAC.1990. Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.), Association Official Analytical Chemists Washington, DC.

Aguilera, J.M., Kessler, H.G., 1988, Physico-chemical and rheological properties of milkfat globules with modified membranes. *Milchwissenschaft*, 43: 411-415.

Aoki, T., Suzuki, H., Imamura, T., 1974, Formation of soluble casein in whey protein-free milk heated at high temperature. *Milchwissenschaft*, 29:589-594.

Asakura, S., Oosawa, F., 1954, On interaction between Two bodies immersed in a solution of macromolecules. *J. Chem. Phys.*, 22:1255-1256.

Beaulieu, L., 1997. Isolation and characteristics of the fat globule membrane in infant formula, Memory M.Sc., Laval University, Quebec, Canada.

Blanchon, P., 1985, Produits laitiers spéciaux dans Laits et produits laitiers. Vol.2 . Chapitre 5. ed. Lavoisier.pp 557-562.

Brunner, J.R. Duncan, C.W., Trout, G.M., 1953, The fat globule membrane of nonhomogenized and homogenized milk. I. The isolation and aminoacid composition of the fat-membrane protein. *Food Res.*, 18:454-458.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D., 1985, Les protéines du lait dans: Protéines alimentaires. Chapitre 6. ed.Lavoisier pp. 156-192.

Corredig, M., Dalgleish, D.G., 1996. Effect of temperature on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International*, Vol. 29, No.1, pp.49-55.

Corredig, M., Dalgleish, D.G., 1996, Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. *J. Dairy Res.*, 63: 441-449.

Creamer, L.K., Matherson, A.R., 1980, Effect of heat treatments on the proteins of pasteurized skim milk. *N. Z. J. Dairy Sci. Techno.*, 15:37-49.

Creamer, L.K., Berry, G.P., Matherson, A.R., 1978, The effect of pH on protein aggregation in heated skim milk. *N. Z. J. Dairy Sci. Techno.*, 13: 9-15.

Crujisen, J.M.M., 1996, Physical stability of caseinate stabilized emulsions during heating. Thesis Agricultural University Wageningen, The Netherlands. pp.28-29.

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

Dalgleish, D.G., 1990, Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk. *J. Agric. Food Chem.*, 38:1995-1999.

Darling, D.F., Butcher, D.W., 1978. Milk-fat globule membrane in homogenized cream. *Journal of Dairy research* 45:197-208.

de Wit, J. N. and Klarenbeek, G., 1984. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 67: 2701-2710.

Dickinson, E., and Matsumura, Y., 1991. Time-dependent polymerization of  $\beta$ -lactoglobulin through disulfide bonds at the oil-water interface in emulsions. *Int. J. Biol. Macromol.* 13:26-30.



Fink, A., Kessler, H.G., 1985, Changes in the fat globule membrane produced by heating. *Milchwissenschaft*, 40:261-264.

Fox, P.F., 1982. *Developments in Dairy Chemistry -1*. applied Science Publishers, London, Chap. 6, pp. 189-228.

Fox, K.K., Holsinger, V.H., Caha, J., Pallansch, M.J. (1960). Formation of a fat-protein complex in milk by homogenisation. *J.Dairy Sci.*, 43, 1396-1406.

George, D.E. and Labenthal, E., 1981, *Textbook of gastroenterology of nutrition infancy*, New-York, Raven Press; Laurence R.A. Breast-feeding: a guide for the medical profession, St-Louis, pp. 44-72.

Goff, H.D., Hill, A.R., 1993, Chemistry and Physics. In: *Dairy Science and Technology, Handbook*, vol 1, Chap.1, ed. Y.H.Hui. pp.1-83.

Gunning, P.A., Hennock, M.S.R., Howe, A.M., Mackie, A.R., Richmond, P., Robins, M.M., 1986. *Colloids Surf.*, 20:65-69.

Guo, M.R., Hendricks, G.M., Kindstedt, P.S., Flynn, A., Fox, P.F. (1996). Nitrogen and mineral distribution in Infant Formulae, *Int. Dairy J.*, 6:963-979.

Hansen, P.M.T., 1982, Hydrocolloid-protein interactions: Relationship to stabilization of fluid milk products. A Review. *Prog. Fd. Nutr. Sci.*, vol 6. pp.127-138.

Haque, Z., Kristjansson, M.M., Kinsella, J.E. (1988) Interaction between  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin: possible mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, 35:644-649.

Harwalkar, V.R., 1982. Age gelation of sterilized milk. In: Development in Dairy Chemistry- 1. Proteins. P.F. Fox (ed.), Applied Science Publishers, London, 229-269.

Holt, C., 1985, The milk salts: their secretion, concentration and physical chemistry in: Developments in Dairy Chemistry.3. Lactose and minor constituents. P.F.Fox. Elsevier ed. Applied Science Publishers, London, U.K.

Hostettler, H. Imhof, K., Stein, J., 1965, Studies on the effect of heat-treatment and lyophilisation on the state of distribution and physiological properties of milk proteins with special consideration of heat-treatment conditions applied in uperization. I Effect on the state of distribution of protein. *Milchwissenschaft*, 20: 189-198.

Houlihan, A.V., Goddard, P.A., Kitchen, B.J., Masters, C.A., 1992, Changes in structure of the bovine milk fat globule membrane on heating whole milk. *J. Dairy Res.*, 59:321-329.

Houlihan, A.V., Goddard, P.A., Nottingham, S.M., Kitchen, B.J., Masters, J., 1992. Interactions between the bovinemilk fat globule membrane and skin milk components on heating whole milk. *J. Dairy Res.*, 59, 187-195.

Hunt, J.A., Dalgleish, D.G., 1994, Adsorption behaviour of whey protein isolate and caseinate in soy oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 8: 175-187.

IDF Standard 123A. 1988. Infant Foods with milk-Fat content (Roese-Gottlieb). International Dairy Federation, Brussels.

Jackson, R.H. and Brunner, J.R. (1960). Characteristics of protein fractions isolated from the fat/plasma interfaces of homogenized milk. *J. Dairy Sci.*, 43:912-919.

Jang, H.D., Swaisgood, H.E. (1990). Disulphide bond formation between thermally denatured  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein in casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 66:196-203.

Josephson, R.V., Thomas, E.L., Morr, C.V., Coulter, S.T., 1967, Relation of heat-induced changes in protein-salt constituents to astringency in milk systems. *J. Dairy Sci.*, 50: 1376-1383.

Kinsella, J.E. and Whitehead, D.M., 1989. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Adv. Food and Nutr. Res.*, 33: 343-425.

Koops, J., Tarassuk, N.P., 1959, The effect of various processing treatments on the partition of phosphatides between the fat phase and the milk plasma. *Neth. Milk Dairy J.*, 13: 180-189.

Langendorff, G., Cuvelier, B., Parker, A., 1997, Gelation and flocculation of casein micelle/carrageenan mixtures. *Food Hydrocolloids*, 1: 35-40.

Lin, C.F., Hansen, P.M.T., 1970, Stabilization of caseins micelles by carrageenan. *Macromolecules*, 3:269-274.

McClements, D.J., Monahan, F.J., Kinsella, J.E., 1996. Disulfide Bond Formation Affects Stability of Whey Protein isolate Emulsions. *J. Food Science*, 58: 1036-1039.

McCrae, C.H. and Muir, D.D., 1991, Effect of surface protein concentration on the heat stability of systems containing homogenized fat globules from recombined milk. *International Dairy J.*, 1:89-100.

McDermott, R.L., 1987. Functionality of Dairy Ingredients in Infant Formula and Nutritional Specialty Products. *Food Technology*, October 93-102.

McPherson, A.V., Kitchen, B.J., 1983, Reviews of the progress of Dairy Science: The bovine milk fat globule membrane-its formation, composition, structure and behavior in milk and dairy products. J. Dairy Res., 50: 107-133.

McPherson, A.V., Dash, M.C., Kitchen,B.J.(1984a). Isolation of bovine milk fat globule membrane material from cream without prior removal of caseins and whey proteins. J. Dairy Res., 51, 113-121.

McPherson, A.V., Dash, M.C., Kitchen,B.J.(1984b). Isolation and composition of milk fat globule membrane material.I. From pasteurized milks and creams. J. Dairy Res., 51, 279-287.

McPherson, A.V., Dash, M.C., Kitchen,B.J.(1984c). Isolation and composition of milk fat globule membrane material. II. From homogenized and ultra heat treated milks. J. Dairy Res., 51, 289-297.

Miles, J.P., 1982. Infant Formula Physical Stability. J.Assoc. Off. Anal. Chem. Vol 65, No 6: 1482-1487.

Mohammad, K.S., Fox, P.F., 1987, Heat-induced microstructural changes in casein micelles before and after heat coagulation. N. Z. J. Dairy Sci. and Techno., 22:191-203.

Mohanam, F.J., McClements, D.J., German, J.B., 1996. Disulfide-mediated Polymerization Reactions and Physical Properties of Heated WPI-stabilized Emulsions. J. Food Science,61: 504-509.

Morr, C.V., 1969, Protein aggregation in convential and ultra-high-temperature heated skim milk. J.Dairy Sci., 52: 1174-1180.

Morr, C.V., 1985. Functionality of heated milk proteins in dairy and related foods. *J. Dairy Sci.*, 68: 2773-2778.

Morrissey, P.A., 1969. The heat stability of milk as affected by variations in pH and milk salts. *J. Dairy Res.* 36: 343-346.

Mulder, H., Walstra, P., 1974, The Milk Fat Globule. Emulsion science as applied to milk products and comparable foods. pp.67-98. Wageningen: Pudoc.

Naper, D.H., 1983, Polymeric stabilization of colloidal dispersions. Academic Press, London. pp.332-413.

Oortwijn, H., Walstra, P., 1979, The membrane of recombined fat globules.2. Composition. *Neth. Milk Dairy J.*, 33:134-154.

Pearce, R.J., 1992, Whey protein recovery and whey protein fractionation. In: *Whey and lactose processing*. Ed.Zadow, J.G., Elsevier, London, pp.271-316.

Pouliot, M., Pouliot.Y., Gauthier, S., Paquin, P., 1997, Stability of milk ingredients based Infant Formula. Private communication.

Pouliot, Y., 1994, Sciences et Technologies du lait, notes de cours. Université Laval.

Radema, L., 1956, The effect of pasteurization on the partition of phosphatides between the fat and aqueous phase of cream. *Proc. XIV Int. Dairy Congr.* 1, part 2, pp.403-413.

- Relkin, P., Launay, B., 1990. Concentration effects on the kinetics of  $\beta$ -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study. *Food Hydrocoll.*, 4, 19-32.
- Robin, O. Paquin, P. (1991). Evaluation of the particule size of fat globules in a milk model emulsion by Photon Correlation Spectroscopy. *J. Dairy Sci.*, 74, 2440-2447.
- Röhm, E.J., Hörner, K.D., Ballauf, M., 1996, Interactions in Mixtures of latex particles and polymers as revealed by turbidimetry. *Colloid poly. Sci.*, 274:732-740.
- Rollema, H.S., 1992, Casein association and micelle formation. In: *Advances Dairy chemistry*, 1: Proteins, ed. P.F. Fox. Elsevier Science Publishers. London, pp. 111-140.
- Rowley, B.O. Richardson, T. (1985). Protein-lipid interactions in concentrated infant formula. *J. Dairy Sci.*, 68, 3180-3188.
- Ruegg, M., Morr, C.V., Blanc, B., 1977, A Calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. *J. Dairy. Res.*, 44:509-520.
- Scheider, W.L., 1984, Les Lipides. In: *La nutrition*, Chap. 3. ed. McGraw-Hill. pp. 70-93.
- Schmith, D.G., 1968, Electron-microscopy studies of the gelation of UHTST sterilized concentrated skim milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 22: 40-49.
- Sharma, A., and Walz, J.Y., 1996, Direct measurement of the depletion interaction in a charged colloidal dispersion. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 92:4997-5004.

Sharma, R., Dalgleish, D.G. (1994). Effect of heat treatments on the incorporation of milk serum proteins into fat globule membrane of homogenized milk. *J. Dairy Res.*, 61, 375-384.

Sharma, R., Dalgleish, D.G. (1993). Interactions between milk serum proteins and synthetic fat globule membrane during heating of homogenized whole milk. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1407-1412.

Sharma, S.K., Singh, H., Taylor, M.W., 1996, Composition and structure of fat globule Surface layers in recombined milk. *J. Food Sci.*, 61:28-32.

Singh, H., Creamer, L.K., 1991, Changes in size and composition of protein aggregates on heating reconstituted concentrated skim milk at 120 °C. *J. Food Sci.*, 56:671- 677

Singh, H., Fox, P.F., 1987. Heat stability of milk: role of  $\beta$ -lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -casein. *J. Dairy Res.* 54: 509-521.

Singh, H., Fox, P.F., 1985, Heat stability of milk: pH-dependant dissociation of micellar  $\kappa$ -casein on heating milk at ultra high temperatures. *J.Dairy Res.*, 52: 529-538.

Singh, H., Latham, J.M., 1993, Heat Stability of Milk: Aggregation and Dissociation of Protein at Ultra-high Temperatures. *Int. Dairy Journal*, 3: 225-237.

Singh, H., Sharma, R., Taylor, M.W., Creamer, L.R., 1996, Heat-induced aggregation and dissociation of protein and fat particules in recombined milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 50:149-166.

Smits, P., van Brouwershaven, J.H.V., 1980, Heat-induced association of  $\beta$ -lactoglobulin and casein micelles. *J. Dairy Res.*, 47:313-325.

Snoeren, T.H.M., 1976, Kappa-carrageenan. A study on its physico-chemical properties, sol-gel transition and interactions with milk proteins. Ph.D Thesis, Wageningen, The Netherlands, 102 pp.

Swaigood, H.E., 1992, Chemistry of caseins. In: *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1. Proteins.* ed. P.F. Fox. Applied Science Publishers, London, pp.63-110.

Tadros, Th.F., 1996, Correlation of viscoelastic properties of stable and flocculated suspensions with their interparticle interactions, *Advances in Colloid and Interface Science*, 68:97-200.

Vallerand, C., 1997, Personal communication.

Vigi, V. and Chierici, R., 1994. Milk formulae for the normal infant. 1. General considerations and historical background. *Acta Paediatr. Suppl.*, 402: 14-17.

Walstra, P., 1990, On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 73: 1965-1979.

Walstra, P., 1983, Physical chemistry of milk fat globules. In: P.F. Fox (editor), *Developments in Dairy Chemistry-2. Lipids.* Applied Science Publishers, Barking, UK and New York, NY.

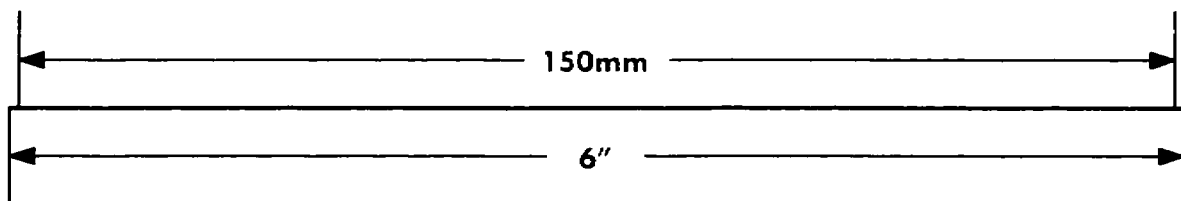
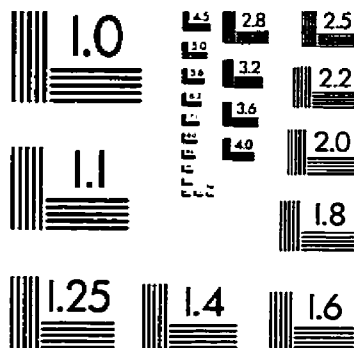
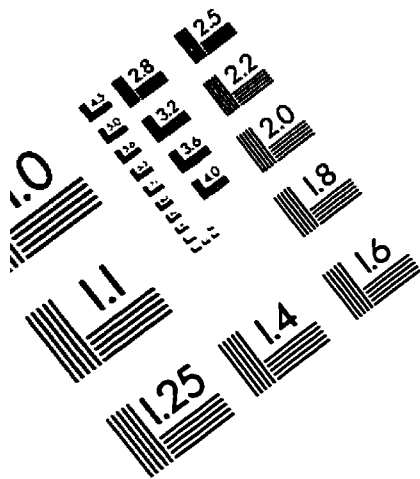
Walstra, P., Jenness, R., 1984, *Dairy Chemistry and Physics.* pp 254-278. New York: John Wiley and Sons.

Whitney, R. Mcl., 1988, Proteins of milk. In: *Fundamentals of Dairy Chemistry.* Third Edition. N.P. Wong edit. Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp. 81-170.



Zahar, M., Smith, D. E., 1996, Adsorption of Proteins at the Lipids-Serum Interface in Milk Systems with Various Lipids. *Int. Dairy Journal*, 6: 697-708.

# TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE . Inc  
1653 East Main Street  
Rochester, NY 14609 USA  
Phone: 716/482-0300  
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved

